Universidad Técnica Federico Santa María
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental



Efecto de la separación de productos de hidrólisis enzimática de proteínas de suero de leche mediante ultrafiltración sobre la productividad de un reactor de membrana.

Tesis de titulación para optar al grado de:
Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química

Autor:
Francisco Ibáñez Espinel

Profesor guía:
Dr. Pedro Valencia Araya
Profesores correferentes:
Dra. Carolina Astudillo
Dr. Sergio Almonacid

Valparaíso, Chile. Octubre 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi amiga y colega la MSc. Paula Constanza Rojas, por su paciencia, consejo, sabiduría, apoyo, dialéctica e infinitos debates pluriversales que me enriquecieron tanto en lo académico como en lo personal.

Al MSc. Gustavo Garay, por su contagioso amor infinito a la ciencia y a la política, que me impulso a perfeccionarme y a continuar por las sendas de la investigación.

A los ingenieros Ricardo Rodríguez, Andrés León, Juan Acevedo y Nelly Flores por su amistad incondicional, apoyo inconmensurable, humildad y amor invaluable durante todos estos años, en los que me han hecho crecer significativamente como persona.

A mi profesor guía el Dr. Pedro Valencia, por su consejo, conocimiento, apoyo y confianza durante todo el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Alejandra Urtubia por su apoyo y confianza durante las actividades académicas que delegó a mi responsabilidad.

Al director de Postgrados Científicos-Tecnológicos Isaac Flores, por el apoyo incondicional brindado hacia mí y hacia todos mis coterráneos.

A la U.T.F.S.M y al proyecto FONDECYT 1161293, por el apoyo financiero para el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi hijo *Tomas Ibáñez* y a mi hermosa madre *Guillermina Espinel*, que son la fuente angular inagotable de alegría, amor, fuerza y esperanza en mi vida.

A mi hermana la *Dra. Marcela Ibáñez*, el estandarte de mi familia y sabia consejera en cada una de las decisiones trascendentales de mi vida.

A mi padre *Fernando Ibáñez* y a mi hermanito *Julian Ibáñez*, por acompañarme día a día espiritual y emocionalmente desde la distancia.

A mis amadas abuelas *Blanca Hernandez* y *María Juana Suárez*, que ayudaron a forjar mi carácter y a ver el mundo como un dominio microscópico que debe ser explorado.

A mi abuelo *Francisco de Asís*, que siempre me aconsejo y que hoy día (desde el cielo) cuida cada uno de mis pasos.

A mi bella tía *Olga Ibáñez*, por su amor maternal, sabio consejo e infinita confianza.

A la ingeniera *Diana Gutiérrez*, la mejor amiga y confidente que el destino pudo poner en este largo camino denominado vida.

RESUMEN

La hidrólisis enzimática de proteínas de aislado proteico de suero de leche (APSL), genera péptidos con alto valor agregado, debido a las múltiples propiedades funcionales ausentes en las proteínas originales. Se sabe que la enzima es el factor más importante en los costos del proceso y que es inhibida por los productos de la reacción, disminuyendo la productividad del sistema. La hipótesis postula que la separación de los productos de hidrólisis y el reciclaje de la enzima mediante un reactor de membrana aumentan significativamente la productividad del proceso. El objetivo de esta propuesta es determinar el efecto de la separación de productos de reacción y del reciclaje de enzimas mediante ultrafiltración en la productividad del reactor enzimático de membrana (REM) para la hidrólisis de APSL. La metodología consistió en el estudio del desempeño de un reactor acoplado a una membrana de ultrafiltración. Se propusieron tres configuraciones del reactor: i) el reactor enzimático de membrana cíclico por lotes (CBEMR), para estudiar el efecto inhibitorio del tamaño de los péptidos formados durante la hidrólisis, ii) el reactor enzimático de membrana semicontinuo (SCEMR), para evaluar el efecto de la separación de los productos de hidrólisis durante la reacción y iii) el reactor enzimático de membrana continuo (CEMR), para evaluar el efecto de la adición continua de sustrato fresco a la reacción. La evidencia obtenida mostró un aumento significativo de la productividad debido a la separación continua de los productos de hidrólisis mediante una membrana de ultrafiltración comparado con un reactor operado en modalidad batch. Se observó un aumento de la eficiencia del proceso, debido a la retención y reutilización de la enzima en 5 ciclos completos de operación, con una disminución del efecto de la inhibición por producto y un aumento de la productividad total del sistema de 439 [%], 530 [%] y 416 [%] para los CEMR de 1 [kDa], 5 [kDa] y 10 [kDa], respectivamente. Los resultados de esta investigación resaltan la importancia de la implemetanción de reactores enzimáticos de membrana para las reacciones de hidrólisis de proteínas en términos de la productividad total acumulada y de la actividad relativa de la enzima.

Índice general

Resumen iv

Índice de Tablas xii

Índice de Figuras xviii

1. Introducción 1

2. Hipótesis 4

3. Objetivos 5

4. Antecedentes 6

4.1. Producción sostenible y suero de leche 6

4.2. Caracterización de las proteínas del suero de leche 8

4.3. Concentrados proteicos de suero de leche 11

4.4. Filtración por membranas 13

4.4.1. Configuraciones de operación de las membranas 16

4.4.2. Modalidades de operación 17

4.4.3. Clasificación 19

4.5. Hidrólisis de proteínas 24

4.5.1. Hidrólisis química 24

4.5.2. Hidrólisis enzimática 25

4.5.3. Hidrolizados proteicos 28
4.5.4. Grado de hidrólisis 28
4.5.5. Efecto del pH 31
4.5.6. Efecto de la temperatura 32
4.5.7. Modelamiento de la hidrólisis enzimática 33
4.6. Reactores de membrana 35
4.6.1. Reactor enzimático de membrana 36

5. Metodología **39**
5.1. Primera etapa - CBEMR 39
5.1.1. Sección 1 - Experimentación 39
5.1.2. Sección 2 - Calibración de parámetros 41
5.2. Segunda etapa - SCEMR 44
5.2.1. Experimentación 44
5.3. Tercera etapa - CEMR 47
5.4. Materiales y equipos 49
5.4.1. Primera etapa - CBEMR 49
5.4.2. Segunda etapa y tercera etapa - SCEMR y CEMR 51
5.5. Métodos 52
5.5.1. Concentración de producto - pH-Stat 52
5.5.2. Concentración de producto - OPA 53
5.5.3. Actividad enzimática 53

6. Resultados y Discusión **54**
6.1. Sección 1 - Experimentos CBEMR 54
6.1.1. Hidrólisis para filtración de extremos cerrados 54
6.1.2. Caracterización del perfil de distribución de tamaños del hidrolizado 54

6.1.3. Hidrólisis con inhibidor 57
6.1.4. Determinación de parámetros cinéticos 59
6.1.5. Análisis post/regresión 65
6.2. Sección 2 - Experimentos SCEMR 67
6.2.1. Caracterización Membranas Flujo Tangencial 67
6.2.2. RCB F_1 - Concentración de sustrato 69
6.2.3. RCB F_2 - Concentración de enzima 77
6.2.4. RCB F_3 - Volumen del reactor 81
6.3. Sección 3 - Experimentos CEMR 90
6.3.1. Diafiltración 90
6.3.2. Fed-batch 95

7. Conclusiones **102**

8. Proyecciones **104**

Bibliografía **117**

A. Protocolos de preparación de reactivos y análisis de muestras **118**
A.0.1. Análisis OPA 118
A.0.2. Actividad proteolítica con azocaseína 119

B. Péptidos bioactivos **121**
B.0.1. Actividad anticoagulante 121
B.0.2. Actividad antimicrobiana 121
B.0.3. Actividad hipotensiva 122
B.0.4. Actividad hipocolesterolémica 122
B.0.5. Actividad antioxidante 122
B.0.6. Actividad inmunomoduladora 123

C. Análisis estadísticos **124**

C.0.1. RCB F_2 - Concentración de enzima 124

C.0.2. RCB F_3 - Volumen del reactor 127

C.0.3. RCB F_2 - Diafiltración 131

Índice de tablas

4.1. Composición de leche bovina y suero de leche (Adaptado de [Smithers, 2008]). 7

4.2. Concentración de suero de leche bovina (Adaptado de [Singh & Geetanjali, 2016, Rodrigues & Teixeira, 2009]). 8

4.3. Proporción, aplicaciones y beneficios y de las proteínas de suero (Adaptado de [Singh & Geetanjali, 2016, Rodrigues & Teixeira, 2009]). . . . 9

4.4. Composición de CPSL y APSL comerciales (Adaptado de [Morr, 1989, Foegeding & Mleko, 2002]). 13

4.5. Clasificación de las operaciones de separación por membranas, PES-Poliéter sulfonas, PVDF-fluoruro de polivinilideno, PP-Polipropileno, PTFE-Politetrafluoroetileno, TFC-PA-Compuesto de película delgada de poliamida (Adaptado de [Cooke et al., 2000]). 15

4.6. Tipos de membranas orgánicas (Adaptado de [Reif, 2006]). 20

5.1. **RCB** para todos los factores independientes (F=Factor y n=Nivel). . 45

5.2. Especificaciones técnicas Autotitulador Mettler Toledo T50. 50

5.3. Especificaciones técnicas Autotitulador Mettler Toledo T50. 51

5.4. Especificaciones técnicas Spectrum^{TM} KR2i. 51

5.5. Parámetros método pH-Stat y OPA. 53

6.1. Grado de hidrólisis final (técnica OPA). 54

6.2. Balances molar DH 10 [%]. 57

6.3. Balances molar DH 20 [%]. 57

6.4. Reconstrucción de hidrolizado original. 58

6.5. Perdida de velocidad inicial (PVI) e índice de inhibición (I_i). 59

6.6. Parámetros del modelo Michaelis-Menten y estadígrafos. 62

6.7. Parámetros del modelo EDO en función de la conversión. 63

6.8. Estadígrafos de los modelos EDO variables y fijos (MSE = Error cuadrático medio, SR^2 = Sumatoria de los residuos al cuadrado). . . 63

6.9. Parámetros de los modelos de Arrhenius y van't Hoff en función de la temperatura (E_A = Energía de activación, A_0 = Factor pre-exponencial). 65

6.10. Caracterización de las membranas de trabajo (PH = Permeabilidad Hidráulica). 69

6.11. Tasas de concentración para el **RCB F**$_1$. 70

6.12. Resultados para el **RCB F**$_1$ concentración de sustrato. Niveles de F$_1$ (1 = 3 [%], 2 = 5 [%] y 3 = 8 [%]). Condiciones de operación: E$_0$ = 5 [mAU/g], V$_R$ = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 72

6.13. Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F**$_1$ en los bloques (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza). 73

6.14. Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F**$_1$ en los niveles de tratamiento (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza). 73

6.15. Resultados del test ANOVA para la productividad del **RCB F**$_1$. . . . 73

6.16. Resultados del test ANOVA para la actividad relativa del **RCB F**$_1$. . 74

6.17. Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del **RCB F**$_1$ concentración de sustrato. Niveles de F$_1$ (1 = 3 [%], 2 = 5 [%] y 3 = 8 [%]). Condiciones de operación: E$_0$ = 5 [mAU/g], V$_R$ = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min] 76

6.18. Tasas de concentración para el **RCB F**$_2$ 77

6.19. Resultados para el **RCB F**$_2$ concentración de enzima. Niveles de F$_2$ (1 = 2.5 [mAU/g], 2 = 5 [mAU/g] y 3 = 10 [mAU/g]). Condiciones de operación: S$_0$ = 5 [%], V$_R$ = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 79

6.20. Tasas de concentración para el **RCB F**$_3$ 81

6.21. Resultados para el **RCB $\mathbf{F}_3$** volumen del reactor. Niveles de F_3 (1 = 0.2 [L], 2 = 0.4 [L] y 3 = 1 [L]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 84

6.22. Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad en nivel de tratamiento del 3 **RCB $\mathbf{F}_3$** (VCC = variables categóricas de comparación). 85

6.23. Tasas de concentración para V_R **2 [L]**. 86

6.24. Resultados para V_R **2 [L]**. Niveles del tiempo de reacción (1 = 1 [h] y 2 = 3 [h]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, F = 66 [mL/min]. 88

6.25. Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del V_R de **2 [L]** en el nivel de tratamiento 1 (1 [h] - VCC = variables categóricas de comparación). 89

6.26. Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del V_R **2 [L]** en el nivel de tratamiento 2 (3 [h] - VCC = variables categóricas de comparación). 89

6.27. Tasas de dilución para el $\mathbf{F}_A$ 92

6.28. Resultados para experimentos diafiltración. Niveles del flujo de alimentación (1 = 33 [mL/min], 2 = 66 [mL/min] y 3 = 90 [mL/min]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min] y V_R = 0.4 [L]. 92

6.29. Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del F_A en el nivel de tratamiento 1 (33.3 [mL/min] - VCC = variables categóricas de comparación). 93

6.30. Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del F_A en el nivel de tratamiento 2 (66.6 [mL/min] - VCC = variables categóricas de comparación). 94

6.31. Tasa de dilución del concentrado para el CEMR en modalidad fed-batch 96

6.32. Tiempos de vida media 97

C.1. Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB $\mathbf{F}_2$** en los bloques (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza). 124

C.2. Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F$_2$** en los niveles de tratamiento (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza). 124

C.3. Resultados del test ANOVA para la productividad del **RCB F$_2$**. . . . 124

C.4. Resultados del test ANOVA para la actividad relativa del **RCB F$_2$**. . 125

C.5. Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del **RCB F$_2$** concentración de enzima. Niveles de F$_2$ (1 = 2.5 [mAU/g], 2 = 5 [mAU/g] y 3 = 10 [mAU/g]). Condiciones de operación: S$_0$ = 5 [%], V$_R$ = 0.2 [L], T = 50 [^{o}C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 125

C.6. Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F$_3$** en los bloques (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza). 127

C.7. Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F$_3$** en los niveles de tratamiento (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza). 127

C.8. Resultados del test ANOVA para la productividad del **RCB F$_3$**. . . . 127

C.9. Resultados del test ANOVA para la actividad relativa del **RCB F$_3$**. . 127

C.10. Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del **RCB F$_3$** volumen del reactor. Niveles de F$_3$ (1 = 0.2 [L], 2 = 0.4 [L] y 3 = 1 [L]). Condiciones de operación: S$_0$ = 5 [%], E$_0$ = 5 [mAU/g], T = 50 [^{o}C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 129

C.11. Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del V_R de **2 [L]**. Condiciones de operación: S$_0$ = 5 [%], E$_0$ = 5 [mAU/g], T = 50 [^{o}C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 129

C.12. Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento para los experimentos de diafiltración. Condiciones de operación: S$_0$ = 5 [%], E$_0$ = 5 [mAU/g], T = 50 [^{o}C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min] y V$_R$ = 0.4 [L]. 132

Índice de figuras

4.1. Estructuras tridimensionales de proteínas principales suero de leche, β-lactoglobulina (A), α-lactoalbúmina (B) [Kilara & Vaghela, 2018]. . 10

4.2. Valor nutricional de la proteína de suero de leche comparada con otras fuentes proteicas convencionales, medido por el contenido de aminoácidos de valor biológico (A), esenciales (B) y de azufre (C) [Smithers, 2008]. 11

4.3. Sistema de filtración de membrana en industria cervecera [Pentair, 2019]. 14

4.4. Funcionalidad del flux como función de la presión transmembrana y otras variables operacionales (Adaptado de [Saavedra & Romero, 2010]). 16

4.5. Tipos de flujos continuos ideales utilizados en separaciones basadas en membrana, a) flujo de co-corriente, b) flujo individual completamente mezclado, c) flujo contra corriente, d) flujo cruzado y e) filtración tradicional [Koros et al., 1996]. 17

4.6. Modalidades de operación y equipos de funcionamiento. A) Modalidad batch y B) Modalidad fed-batch y diafiltración [Mah et al., 2014, Cooke et al., 2000]. 18

4.7. Clasificación de membranas por su geometría [Saleh & Gupta, 2016]. 22

4.8. Perfil de elución de albúmina de suero bovino después de hidrólisis ácida [Meussen et al., 2014]. 25

4.9. Reacciones catalizadas por la enzima proteasa. a) Hidrólisis de enlace peptídico. b) Intercambio de oxígeno carboxilo [Hajkova et al., 2011]. 27

4.10. Reacción OPA. El reactivo OPA reacciona con grupos aminos primarios y con el compuesto-SH (Ditiotreitol, DTT), para formar un compuesto que absorberá la luz a 340 [nm] [Nielsen et al., 2001]. 31

4.11. Actividad relativa como función del A) pH, B) temperatura [Liu, 2016]. 31

4.12. Curvas de hidrólisis experimentales (puntos) y predicciones del modelo con valores de constantes de inhibición fijas (líneas discontinuas) y constantes de inhibición variables (líneas continuas). Condiciones de operación (S_0, E_0 y T) A: 110 [mM], 1,7 [g/L], 60 [°C] (círculos); 77 [mM], 0,83 [g/L], 44 [°C] (diamantes); B: 143 [mM], 1,7 [g/L], 50 [°C] (triángulos); 143 [mM], 2,60 [g/L], 56 [°C] (cuadrados) [Valencia et al., 2015]. 34

4.13. Concepto esquemático del REM [Wöltinger et al., 2005]. 35

4.14. Clasificación de los reactores de membrana. A) Modalidad extractor, B) Modalidad distribuidor [Caro, 2008]. 36

4.15. P&ID CEMR. 38

5.1. Metodología experimental CBEMR. 40

5.2. Metodología experimental SCEMR. 44

5.3. Metodología experimental CEMR. 47

5.4. Sustrato de estudio biPro, A) Envase y B) Tabla de contenido. 49

5.5. Equipos del laboratorio de Biocatálisis. A) Mettler Toledo T50, B) Stirred Cell HP4750, C) Memmert WNB 7 y D) IKA Eurostar EUROST P CV. 50

5.6. Spectrum™ KR2i. 52

6.1. F_0 vs PTM en CBEMR para membrana de 10 [kDa]. Condiciones de operación: T = 20 [°C], pH = 8, t = 20 [min]. 55

6.2. Curvas de progreso del flux vs tiempo para ultrafiltración batch a diferentes tamaños de membrana. A) DH 10 [%], B) DH 20 [%]. Condiciones de operación: T = 20 [°C], pH = 8. y ΔP_T = 20 [bar]. 56

6.3. Curvas de progreso hidrólisis enzimática de proteínas de APSL 5 [%] p/p, 50 [°C], pH 8.0 y 6 [mAU/g] de Subtilisina A. Inhibidor preparado a una concentración de 20 [mM] para A) DH 10 [%] y B) DH 20 [%]. 59

6.4. Curvas de producto vs tiempo para distintas concentraciones de sustrato inicial. A) 40 [°C], B) 50 [°C] y C) 60 [°C]. 60

6.5. Curva de Michaelis-Menten para el ajuste de los parámetros V_{max} y K_m para una solución de APSL. A) 40 [°C], B) 50 [°C], C) 60 [°C]. . 61

6.6. Curvas de hidrólisis experimentales (puntos) y modeladas para la formación de producto utilizando como sustrato una solución de APSL con parámetros de inhibición variables en función de la conversión. A) 40 [°C], B) 50 [°C], C) 60 [°C]. $S_o/K_m = 10$ (cuadrados), 50 (círculos), 100 (triángulos). 62

6.7. Correlación de los parámetros de los parámetros estudiados con la temperatura para una solución de APSL. A) V_{max}, B) K_m, C) K_{10}, D) K_{20}. 64

6.8. Resultados del análisis de identificabilidad (ID) y sensibilidad normalizada (SN). A) ID 40 [°C], B) ID 50 [°C], C) ID 60 [°C], D) SN 40 [°C], E) SN 40 [°C], F) SN 60 [°C]. 66

6.9. Resultados del análisis de sensibilidad dinámica relativa. A) EDO 1 - 40 [°C], B) EDO 2 - 40 [°C], C) EDO 3 - 40 [°C], D) EDO 1 - 50 [°C], E) EDO 2 - 50 [°C], F) EDO 3 - 50 [°C], G) EDO 1 - 60 [°C], H) EDO 2 - 60 [°C], I) EDO 3 - 60 [°C]. 67

6.10. Correlación entre los $\bar{F}_0$ y la $P\bar{T}M$. A) Agua, B) Solución de APSL al 5 [%]. C) Permeabilidad hidráulica vs NMWCO con membranas MidiKros de mPES. Condiciones de operación: V_R = 0.2 [L], T = 20 [°C], pH = 8, t = 10 [min], F = 66 [mL/min]. 68

6.11. Resultados experimentales **RCB F_1**. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (3 [%], 5 [%] y 8 [%]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: E_0 = 5 [mAU/g], V_R = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 71

6.12. Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento del **RCB F_1** para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (3 [%], 5 [%] y 8 [%]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles. 75

6.13. Resultados experimentales **RCB F_1** concentración de sustrato. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles de F_1 (1 = 3 [%], 2 = 5 [%] y 3 = 8 [%]). Condiciones de operación: E_0 = 5 [mAU/g], V_R = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min] 76

6.14. Resultados experimentales **RCB F_2**. Cada columna corresponde a un nivel de F_2 (2.5 [mAU/g], 5 [mAU/g] y 10 [mAU/g]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], V_R = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. 78

6.15. Resultados experimentales **RCB F_2** concentración de enzima. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles de F_2 (1 = 2.5 [mAU/g], 2 = 5 [mAU/g] y 3 = 10 [mAU/g]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], V_R = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].. 81

6.16. Resultados experimentales **RCB F_3**. Cada columna corresponde a un nivel de F_3 (0.2 [L], 0.4 [L] y 1 [L]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. . . 83

6.17. Resultados experimentales **RCB F_3** volumen del reactor. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles de F_3 (1 = 0.2 [L], 2 = 0.4 [L] y 3 = 1 [L]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]. . . . 86

6.18. Resultados experimentales V_R de **2 [L]**. Cada columna corresponde a un tiempo diferente de operación (1 [h] y 3 [h]). **A-B)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **C-D)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **E-F)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **G-H)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, F = 66 [mL/min]. 87

6.19. Resultados experimentales para V_R **2 [L]**. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles del tiempo de reacción (1 = 1 [h] y 2 = 3 [h]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, F = 66 [mL/min]. 89

6.20. Resultados experimentales CEMR en modalidad diafriltración. Cada columna corresponde a un nivel de flujo de alimentación al modulo de UF (33 [mL/min], 66 [mL/min] y 90 [mL/min]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min] y $V_R = 0.4$ [L]. 91

6.21. Resultados experimentales diafiltración. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles del flujo de alimentación (1 = 33 [mL/min], 2 = 66 [mL/min] y 3 = 90 [mL/min]). Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min] y $V_R = 0.4$ [L]. 94

6.22. Concentración y moles de producto en CEMR operado en modalidad fed-batch como función del FCV. **A)** CEMR 1 [kDa]. **B)** CEMR 5 [kDa]. **C)** CEMR 10 [kDa]. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L]. 95

6.23. Resultados experimentales CEMR operado en modalidad fed-batch. **A)** Concentración de producto en el permeado en función del FCV. **B)** Moles de producto en el permeado en función del FCV. **C)** Flux en función del tiempo de reacción. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L]. 97

6.24. Actividad relativa en CEMR operado en modalidad fed-batch como función del FCV. **A)** CEMR 1 [kDa], **B)** CEMR 5 [kDa], **C)** CEMR 10 [kDa], **D)** Actividad en permeados. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L]. 98

6.25. Resultados experimentales CEMR operado en modalidad fed-batch. **A)** Rendimiento en función del FCV. **B)** Coeficientes de tamizado en función del FCV. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L]. 99

6.26. Productividad total vs FCV para CEMR operado en modalidad fed-batch. **A)** CEMR 1 [kDa]. **B)** CEMR 5 [kDa]. **C)** CEMR 10 [kDa]. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L]. 100

A.1. Curva de calibración para reacción de serina con OPA 119

A.2. Curva de calibración para la medición de actividad proteolítica con azocaseína 119

C.1. Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento del **RCB $\mathbf{F}_2$** para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (2.5 [mAU/g], 5 [mAU/g] y 10 [mAU/g]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles. 126

C.2. Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento del **RCB $\mathbf{F}_3$** para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (0.2 [L], 0.4 [L] y 1 [L]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles. 128

C.3. Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento de los experimentos de V_R para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel (1 [h] y 3 [h]). **A-B)** Q-Q plot productividad. **C-D)** Q-Q plot actividad relativa. **E-F)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **G-H)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles. 130

C.4. Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento de los experimentos de diafiltración para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (33.3 [mL/min], 66.6 [mL/min] y 90.0 [mL/min]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles. 131

Abreviaturas

Abreviatura	Término
$APSL$	Aislado proteico de suero de leche
$CBEMR$	Reactor enzimático de membrana cíclico por lotes
$CEMR$	Reactor enzimático de membrana continuo
$CPSL$	Concentrado proteico de suero de leche
DH	Grado de hidrólisis
EDO	Ecuaciones diferenciales ordinarias
FR	Fenómeno de reacción
FS	Fenómeno de separación
$NMWCO$	Peso molecular nominal de corte
OPA	Ortoftaldialdehído
PID	Control proporcional-integral-derivativo
PTM	Presión transmembrana
RCB	Diseño de bloque completo aleatorizado
REM	Reactor enzimático de membrana
$RILES$	Residuos industriales lıquidos
RMI	Reactor de membrana integrada
RMS	Reactor de membrana escalonado
$SCEMR$	Reactor enzimático de membrana semicontinuo
TCC	Tasa de concentración del concentrado
TDC	Tasa de dilución del concentrado
$TNBS$	Trinitrobencenosulfónico
UF	Ultrafiltración

Capítulo 1

Introducción

La hidrólisis enzimática de proteínas de suero de leche genera productos versátiles con múltiples propiedades funcionales y nutraceúticas ausentes en los sustratos originales. Esto genera un bien de consumo de alto valor agregado a partir de un coproducto de la elaboración del queso (insumo de costo cero) y evitan su disposición. Catalogada como un grave problema medioambiental de la industria láctea, ya que se estima que solo el 50 [%] del volumen global generado es gestionado conforme a la legislación de residuos de cada país, debido a los costos que implica tratar grandes cantidades de efluentes con cargas orgánicas catalogadas como fuertemente contaminadas (8-9 [kg] de suero de leche por cada 1-2 [kg] de queso producido con una DQO que varía entre 50,000-100,000 [mg O_2/L] [Baldasso et al., 2011, Ramírez, 2012].

En este contexto, la filtración por membrana permite el fraccionamiento, la concentración (moléculas, iones y solutos) y el control de las tasas relativas de transporte de las diferentes especies a través de su estructura matricial, proporcionando una corriente concentrada y una agotada (permeado) en los diversos componentes de interés presentes en el suero de leche. La membrana actúa como una fase semipermeable regulada por las diferentes fuerzas motrices de transferencia (gradiente de concentración, potencial eléctrico, presión transmembrana, temperatura, etc.), seleccionadas con base en las propiedades fisicoquímicas de los compuestos a separar (solubilidad, carga eléctrica, tensión de vapor, difusividad, dimensión molecular, afinidad química, etc.) y de los tamaños medios de partícula de los solutos que se desean retener (micro-, ultra-, nano- e hiperfiltración). El origen de esta tecnología se remonta al descubrimiento del fenómeno de ósmosis observado por Abbe Nollet en 1748 y al desarrollo de Fick en 1856 de la primer membrana sintética de nitrocelulosa, siendo utilizada cuando se busca i) minimizar la desnaturalización de los componentes que conforman el sistema, ii) evitar el uso de solventes químicos para procesos de extracción líquido-líquido, iii) evadir el uso de calor y operaciones ulteriores de purificación y iv) cuando los métodos tradicionales de separación no resultan económicamente factibles. En este contexto, ha encontrado una gran aplicación en la separación de mezclas de fluidos (gases, vapores y líquidos miscibles), dispersiones (sólido/líquido y líquido/líquido) y sólidos o solutos disueltos en líquidos, generando investigaciones científicas y tecnológicas

que promedian aproximadamente las 65000 publicaciones/año en los últimos 10 años [Elsevier, 2019].

El continuo desarrollo de esta tecnología y el creciente interés por la intensificación de procesos, ha permitido explorar el acoplamiento de las operaciones reacción-separación en unidades conocidas como reactores de membrana. Estas permiten la separación y/o adición de productos y reactivos generados por las reacciones químicas a través de la membrana, buscando la reducción de las operaciones unitarias (procesos más compactos), el consumo energético, el impacto ambiental, los costos de instalación y el aumento de la eficiencia global del proceso, obteniendo una mayor productividad y un procesamiento *downstream* más eficiente (etapas de purificación). Este enfoque favorece a las reacciones de hidrólisis catalizadas por enzimas, proteínas globulares de alto peso molecular con selectividad enantiomérica susceptibles a fuertes tasas de inhibición (por sustratos y productos), factor principal del decaimiento progresivo de la velocidad de reacción y, en consecuencia, de su productividad [Valencia et al., 2014]. Por consiguiente, una operación limitada en sustratos y/o productos mediante una separación por membrana, permitiría no solo aumentar el desempeño de los catalizadores enzimáticos, sino también, su reutilización, presentándose como una alternativa rentable y sostenible en la producción catalítica de múltiples compuestos químicos en condiciones más afables para el medio ambiente.

Los reactores de membrana que trabajan con catalizadores enzimáticos solubles se denominan reactores enzimáticos de membrana (REM) y reúnen las múltiples ventajas de ambos procesos, permitiendo adicionalmente conservar la actividad y selectividad de la enzima (propiedades alteradas en la inmovilización), caracterizar las clases de tamaño que presentan los mayores grados de inhibición e identificar los tamaños de corte que favorecen la remoción selectiva de los compuestos que afectan significativamente la velocidad de reacción. Las investigaciones centradas en este campo han abordado los tópicos de reutilización enzimática y de ultrafiltración, pero con poco detalle en lo que concierne al efecto inhibidor de los diferentes productos de reacción presentes en los hidrolizados y como esto incide en la productividad del proceso. [Perea & Ugalde, 1996] operaron un CEMR de volumen 1 [L] y peso molecular nominal de corte de membrana 10 [kDa] por 7 [h], obteniendo una productividad de 30 [mmolN/h]. [Guadix et al., 2006] operaron un CEMR con una membrana de ultrafiltración de 3 [kDa], obteniendo una de productividad después de 13 [h] de operación de 45 [g Proteína / g Enzima]. [Prieto et al., 2008] encontraron una relación gráfica para un reactor cíclico de membrana, que expresa el número óptimo de reutilizaciones de una misma concentración enzimática como función de una productividad especificada, a diferentes temperaturas de operación. Encontrando productividades en el rango de 0-2 [1/h]. Finalmente, [Prieto et al., 2010] incorporaron a los estudios anteriores una perspectiva de operación no isotérmica (lote a lote), encontrando que el funcionamiento óptimo no isotérmico mejora en un 11 [%] el rendimiento de la enzima, en comparación con el funcionamiento isotérmico. En este contexto, esta investigación propone determinar el efecto de la separación de productos de reacción y del reciclaje de enzimas mediante ultrafiltración, en la productividad de un REM para la hidrólisis

de aislado de proteínas de suero de leche (APSL), la cual presenta una productividad en modalidad batch de 8 [mmol/h] en 1 [h] de reacción [Valencia et al., 2019]. Con el objetivo de proyectarla como una alternativa tecnológica sostenible en términos económicos y ambientales.

Capítulo 2

Hipótesis

Los estudios relacionados con la hidrólisis enzimática de proteínas indican que la inhibición por producto es el factor más importante en la disminución de la velocidad especifica de reacción. También identifican que los costos asociados con el biocatalizador y su recuperación, son el factor limitante para su implementación masiva en procesos sostenibles a escala industrial. Esto permite establecer estrategias de operación que busquen disminuir la concentración de producto dentro del reactor, con el objetivo de favorecer el equilibrio termodinámico de la reacción y reducir el impacto de la inhibición por producto. Logrando una diferencia significativa en la productividad del reactor y, por consiguiente, en la rentabilidad de su implementación tecnológica. Por todo lo anterior, se postula la siguiente hipótesis de trabajo:

La separación de los productos de hidrólisis y el reciclaje de la enzima utilizada en un reactor de membrana, aumenta la productividad de la hidrólisis enzimática de proteínas aisladas de suero de leche.

Capítulo 3

Objetivos

General

- Determinar el efecto de separar productos de hidrólisis y reciclado enzimático por ultrafiltración en la productividad del reactor enzimático de membrana para la hidrólisis de APSL.

Específicos

- Caracterizar el producto de la reacción en términos de contenido de proteínas, contenido de enlaces peptídicos y susceptibilidad a hidrólisis enzimática.
- Caracterizar el efecto de la concentración del sustrato, la concentración de enzima y la temperatura en la hidrólisis de APSL.
- Determinar la permeabilidad del producto y la retención de las enzimas en las membranas de ultrafiltración.
- Determinar el efecto del sustrato en el ensuciamiento de la membrana.
- Determinar el efecto de la separación de los productos de hidrólisis y del reciclaje de enzimas en la velocidad de hidrólisis y en la productividad.
- Modelar el rendimiento del reactor en términos de la inactivación térmica de la enzima y la velocidad de reacción.
- Optimizar la productividad y el reciclaje de las enzimas en un reactor enzimático de membrana continuo.

Capítulo 4

Antecedentes

4.1. Producción sostenible y suero de leche

La producción alimentaria sostenible establece como objetivo angular la reutilización de los subproductos generados a partir de la fabricación de los bienes de interés principal. Motivo por el cual, los esfuerzos internacionales de los entes políticos, empresariales y científicos del siglo XXI convergen en el desarrollo e implementación de estrategias de residuos cero, que aportan un motor económico adicional a las empresas productoras, diversifican su gama de productos y eliminan su generación de efluentes. En consecuencia, los planes de I+D+i ejecutados en la industria alimentaria, brindan alternativas rentables y sostenibles de producción que mejoran y/o optimizan el uso de las materias primas, las rutas de producción y las técnicas de conversión convencionales. La industria láctea ha abordado estos propósitos como consecuencia de los efectos negativos generados por los residuos industriales líquidos (RILES) dispuestos en el medio ambiente y la presión ejercida por las autoridades sanitarias, incorporando subproductos a sus cadenas de valor (coproducto) y generando planes de gestión ambiental que garantizan su competitividad y sostenibilidad comercial.

Los principales RILES de esta industria se generan en los procesos de producción de quesos, cremas, mantequillas y lavado de torres de secado (soluciones de limpieza alcalina), siendo el suero de leche el efluente primario [Arango & Sanches, 2012]. El suero de leche (también conocido como lactosuero) es un coproducto liquido de color amarillo/verde (incluso azulado) procesado a partir de la producción de queso (alrededor del 85 %) y caseinatos (alrededor del 15 [%]), después de la coagulación de las proteínas de la caseína por la acción de la quimosina (cuajo) o un ácido mineral/orgánico. Se obtiene a partir de cualquier tipo de leche (vaca, cabra, oveja, búfalo, camello, llama, entre otras) y como regla general, se considera que 1000 gramos de queso producen 560 gramos de suero de leche en base seca [Smithers, 2008]. Se estima que el volumen anual de suero de leche producido a nivel mundial es de $180 - 190 * 10^6$ [ton/año] y que el promedio crece aproximadamente a la misma velocidad que los volúmenes de leche. Por consiguiente, un aumento en la cantidad de leche

se traduce en un aumento concomitante en del volumen de suero de leche [Baldasso et al., 2011, Smithers, 2008]. El suero de leche contiene cerca del 50 [%] y 20 [%] de los sólidos y proteínas lácteas originales junto con el total de lactosa (ver Tabla 4.1), siendo el disacárido la proporción más representativa de los sólidos totales ($> 75[\%]$) y el responsable de su elevado poder contaminante (DQO 50,000-100,000 [mg O_2/L]) [Baldasso et al., 2011, Ramírez, 2012], dada su capacidad para actuar como sustrato en la fermentación microbiana. Por lo anterior, su disposición se realizó por décadas rociando campos y lagos, en los sistemas de alcantarillado y como alimento para animales después de un tratamiento de evaporación y deshidratación [Smithers, 2008].

Tabla 4.1: Composición de leche bovina y suero de leche (Adaptado de [Smithers, 2008]).

Componente	**Leche bovina [%] p/v**	**Suero de leche [%] p/v**
Caseína	2.8	< 0.1
Proteína de suero	0.7	0.7
Grasa	3.7	0.1
Ceniza	0.7	0.5
Lactosa	4.9	4.9
Solidos totales	12.8	6.3

No obstante, el suero de leche es una excelente fuente de lípidos (0,1 [%] p/v), vitaminas (tiamina, riboflavina y piridoxina) y minerales (8–10 [%] p/p extracto seco), enriquecido con proteínas y péptidos solubles (0,6–0,8 [%] p/v) que pueden ser utilizadas para la fabricación de productos nutricionales, funcionales y nutraceúticos. Encontrado aplicaciones en las industrias de nutrición deportiva, aderezos para ensaladas, productos horneados, emulsionantes, fórmulas nutricionales médicas y fórmulas infantiles (ver Tabla 4.3). La Tabla 4.2 presenta la concentración y el peso molecular de las principales proteínas presentes en el suero de leche. Indicando que el suero de leche esta compuesto de 50[%]-55[%] de β-lactoglobulina, 20[%]-25[%] de α-lactoalbúmina, 10[%]-15[%] de glicomacropéptido (solo en suero de leche cuajado) y 15[%] de componentes menores de proteína/péptido (por ejemplo, inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa, albúmina de suero, lisozima y factores de crecimiento).

Existen dos procedimientos para eliminar la caseína remanente del proceso de producción de suero de leche. El primero se realiza a pH $\geq 5,6$ (suero dulce) por coagulación enzimática de la caseína durante la fabricación de queso, siendo este aproximadamente el 75 [%] del total producido [Zall, 1992]. El segundo, a través de la precipitación ácida en su punto isoeléctrico (pH ≤ 4.6 – suero ácido) a temperatura ambiente, tratando el 25 [%] restante obtenido en la producción de caseínas y quesos frescos (quarg, cottage, entre otros). Este ultimo presenta diferencias en contenido de lactatos (6,4 [g/L] a 2,0 [g/L]), calcio (1,4 [g/L] a 0,5 [g/L]), fosfatos (2-4.5 [g/L] a 1-3 [g/L]) y lactosa (44-46 [g/L] a 46-52 [g/L]), con respecto al suero dulce [Jelen, 2000].

4.2. Caracterización de las proteínas del suero de leche

La Tabla 4.2 presenta la composición de las proteínas predominantes en el suero de leche. La β-lactoglobulina (Figura 4.1A) es una proteína globular de 162 residuos de aminoácidos que representa aproximadamente la mitad de la proteína total del suero de leche rumiante (50 [%] a 55 [%]), siendo inicialmente el 10 [%] de total de proteína de la leche e inexistente en leche de roedores, lagomorfos y humana. Su peso molecular se encuentra alrededor de los 18,4 [kDa], existiendo diferentes variantes genéticas entre las que resaltan las preparaciones A y B [Rodrigues & Teixeira, 2009]. Estas difieren por la sustitución de una molécula de ácido aspártico en la formula A, por una de glicina en la variante B. Su estructura cuaternaria depende del pH del medio, tal que [Singh & Geetanjali, 2016]:

- Dímero estable con un peso molecular de $\sim$ 36,7 [kDa] a valores de pH entre 7 y 5.2.
- Octámero con una masa molar de $\sim$ 140,0 [kDa] a valores de pH entre 5.2 y 3.5
- Monómero con dos residuos de cisteína por monómero por debajo de pH 3.0 y por encima de 8.0.

La α-lactoalbúmina (Figura 4.1B) es la segunda proteína más abundante en el suero de leche (20 [%] a 25 [%]), siendo inicialmente el 2 [%] del total de proteína de la leche y una de las principales en la leche humana (sintetizada en su totalidad en la glándula mamaria). Presenta un peso molecular de $\sim$ 14,2 [kDa], actúa como coenzima para la biosíntesis de la lactosa (fuente de energía para el recién nacido) modificando la actividad de la enzima galactosil-transferasa y contiene una variedad de 123 aminoácidos con una secuencia homóloga a la de la lisozima (40 [%] de los residuos son iguales y otro 20 [%] tiene estructuras similares) sin relación antigénica

Tabla 4.2: Concentración de suero de leche bovina (Adaptado de [Singh & Geetanjali, 2016, Rodrigues & Teixeira, 2009]).

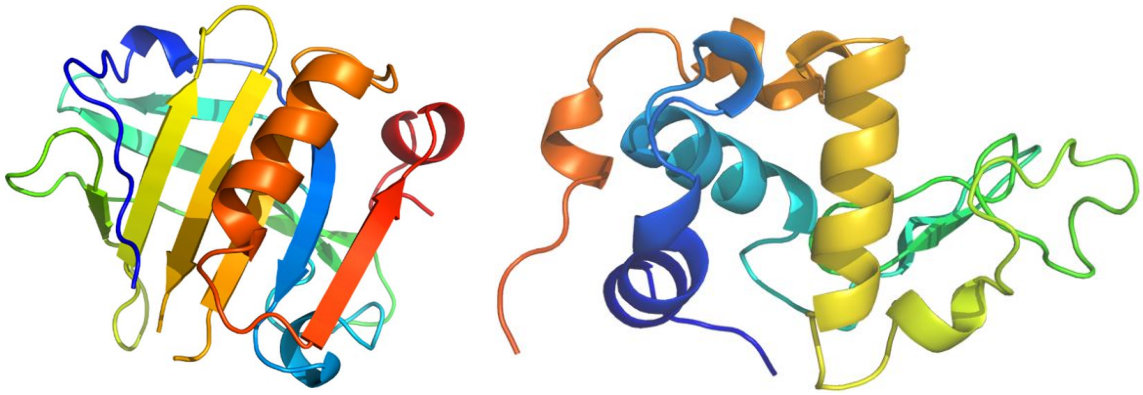
No.	**Proteína**	**Concentración [g/L]**	**Peso molecular [kDa]**
1	β-lactoglobulina	3-4	18.4
2	α-lactoalbúmina	1.5	14.2
3	Albúmina de suero bovino	0.3-0.6	69
4	Inmunoglobulinas	0.6-0.9	150-1000
5	Lactoperoxidasa	0.006	89
6	Lactoferrina	0.05	78
7	Glicomacropéptido	1.2	67

Tabla 4.3: Proporción, aplicaciones y beneficios y de las proteínas de suero (Adaptado de [Singh & Geetanjali, 2016, Rodrigues & Teixeira, 2009]).

No.	**Proteína**	**Composición [%]**	**Aplicaciones/beneficios**
1	β-lactoglobulina	50-55	Transportador (retinol, palmitato, ácidos grasos, vitamina D y colesterol); Mejora de la actividad de esterasa pregástrica; Transferencia de inmunidad pasiva; Regulación del metabolismo del fósforo en la glándula mamaria.
2	α-lactoalbúmina	20-25	Prevención del cáncer; Síntesis de lactosa; Tratamiento de enfermedades crónicas inducidas por estrés.
3	Albúmina de suero	5-10	Unión a ácidos grasos; Función antimutagénica; Prevención del cáncer; Inmunomodulación
4	Inmunoglobulinas	10-15	Prevención y tratamiento de diversas infecciones microbianas (infecciones del tracto respiratorio superior, gastritis, caries dental, diarrea, entre otras)/Ayuda en el crecimiento y al desarrollo.
5	Lactoperoxidasa	0.5	Prevención del cáncer de colon y piel/Inhibe el crecimiento de bacterias,antiviral.
6	Lactoferrina	1-2	Antioxidante, antibacteriano, antiviral, antifúngico/Promueve el crecimiento de bacterias benéficas.
7	Glicomacropéptido	10-15	Interacción con toxinas, virus y bacterias (mediada por la fracción de carbohidratos). Actividad inmunomoduladora.

[Kilara & Vaghela, 2018]. Se han identificado tres variantes genéticas (A, B y C) que presentan un aumento de la termoestabilidad en presencia de calcio (manteniéndose soluble incluso a 100 [°C]), debido a la formación de enlaces iónicos intramoleculares [Mc Sweeney & O Mahony, 2003].

Las inmunoglobulinas son proteínas producidas por los linfocitos B que compren-



(A) (B)

Figura 4.1: Estructuras tridimensionales de proteínas principales suero de leche, β-lactoglobulina (A), α-lactoalbúmina (B) [Kilara & Vaghela, 2018].

den una fracción menor al 2 [%] de la proteína total de la leche, concentrándose a un valor de 10 [%] a 15 [%] en suero de leche. Son estables a los procesos de pasteurización HTST (*High Temperature/Short Time* a 81 [°C] por 152 [s]), inhiben la actividad de los coagulantes bacterianos, ralentizan los procesos fermentativos y ejercen una función inmunológica importante (especialmente en calostro), comportándose como receptor y anticuerpo que se libera en la sangre y en la linfa para brindar protección inmunológica a la cría. Existen 4 tipos de estructuras moleculares identificadas en suero de leche (lgG1, lgG2, lgA y lgM), siendo lgM y lgG aproximadamente el 75 [%] de los anticuerpos en un humano adulto [Mc Sweeney & O Mahony, 2003]. Cada una de las estructuras presenta similitud molecular con las siguientes salvedades:

- lgG presenta estructura monomérica con peso molecular de $\sim$ 160 [kDa].
- IgA presenta dímeros y tetrámeros con peso molecular de $\sim$ 370 [kDa].
- IgM presenta pentámeros con peso molecular de $\sim$ 900 [kDa] a 1000 [kDa].

El Glicomacropéptido es una proteína proveniente de la hidrólisis enzimática de la caseína que se encuentra naturalmente en la leche bovina en una baja concentración ($\sim$ 4.3 [mg/L]), aumentando sustancialmente en el suero de leche dulce (10 [%] - 15 [%]). Se deriva de la escisión de la κ-caseína a través de la acción de la quimosina en el cuajo utilizado en la fabricación de queso, presentando autoasociación conforme aumenta el pH. Esto quiere decir que, aunque el peso molecular teórico está entre 7 [kDa] y 10 [kDa], a pH 7 el peso molecular de acuerdo con filtración en gel es de 20 [kDa] a 67 [kDa] y a pH 3.5 esta entre 10 [kDa] a 30 [kDa] (dependiendo del grado de glicosilación) [Zall, 1992]. Además, posee un alto contenido de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina), por lo que se utiliza en formulas alimenticias infantiles y para personas que padecen fenilcetonuria [Rodrigues & Teixeira, 2009].

Adicionalmente, el suero de leche es una fuente importante de albúmina de suero bovino (10[%] - 15[%]) [Rodrigues & Teixeira, 2009], lactoperoxidasa [Zall, 1992],

lactoferrina [Mc Sweeney & O Mahony, 2003], aminoácidos esenciales (Figura 4.2B), aminoácidos de azufre (metionina, cisteína – Figura 4.2C) y aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina, 20 [%] p/p), aportando un valor biológico[1] excepcional que supera incluso a la proteína del huevo (Figura 4.2A). En definitiva, las proteínas y péptidos provenientes del suero de leche han aumentado significativamente su formulación alimenticia, gracias al continuo descubrimiento y verificación de la funcionalidad biológica de sus constituyentes. Incluyéndose como ingredientes para productos funcionales y nutracéuticos, basados en la fuerte tendencia de los consumidores a adquirir productos que aumenten su salud y bienestar [Akal, 2017]. Los desafíos actuales en la explotación de estos componentes incluyen su recuperación máxima del suero de leche su estabilidad en diferentes matrices de alimentos y su óptima biodisponibilidad en el cuerpo, brindando los efectos de salud esperados [Korhonen, 2006].

4.3. Concentrados proteicos de suero de leche

La evolución tecnológica de la industria láctea ha facilitado la eliminación selectiva de los componentes no proteicos del suero de leche (minerales, lípidos, lactosa, humedad, entre otros), logrando la recuperación parcial o total de las proteínas nati-

[1]Rapidez y eficiencia para que el cuerpo pueda utilizar la proteína consumida.

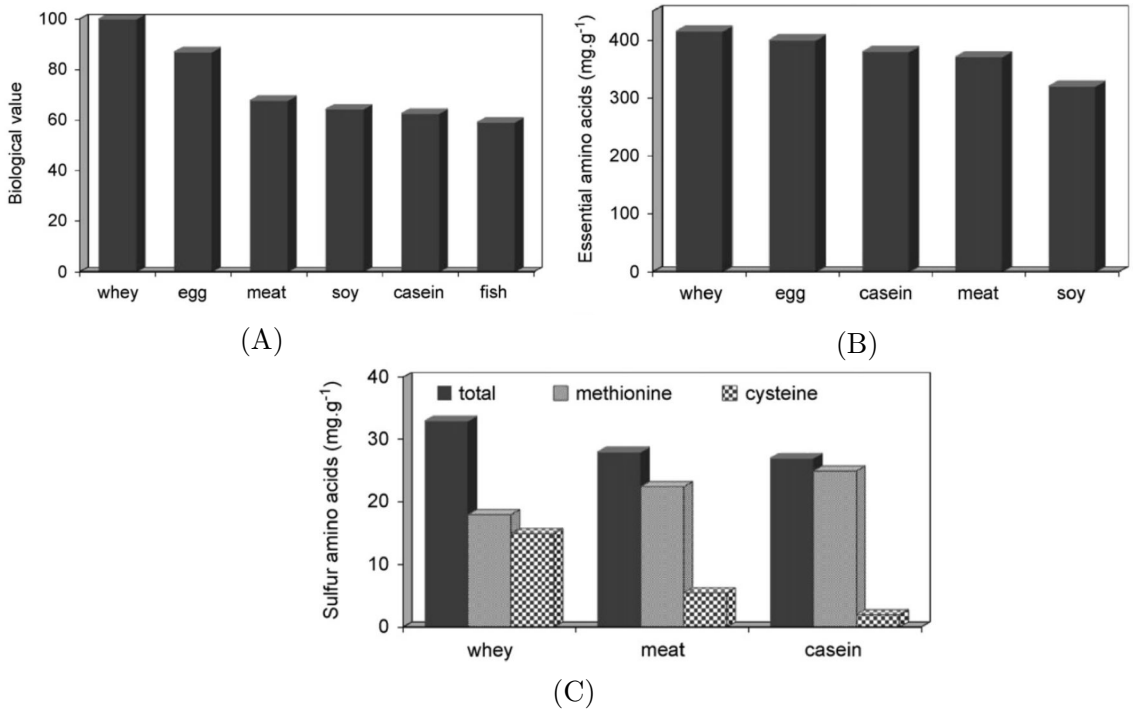


Figura 4.2: Valor nutricional de la proteína de suero de leche comparada con otras fuentes proteicas convencionales, medido por el contenido de aminoácidos de valor biológico (A), esenciales (B) y de azufre (C) [Smithers, 2008].

vas inmersas en él. El Instituto Americano de Productos Lácteos [ADPI, 2019] define las siguientes categorías para los concentrados proteicos de SL:

- Concentrado proteico de suero de leche (CPSL), cuando dentro de su composición en peso seco contiene un porcentaje de proteína ≥ 25 [%].
- Aislado proteico de suero de leche (APSL), cuando dentro de su composición en peso seco contiene un porcentaje de proteína ≥ 85 [%].

Estos productos se obtienen comercialmente a partir de técnicas modernas de filtración por membranas junto con procesos ulteriores de adsorción por intercambio iónico (mayor selectividad en APSL), con el fin de disminuir las grasas y cenizas que aumentan conforme el grado de contenido proteico lo hace (ver Tabla 4.4). Las operaciones unitarias tradicionales que se realizan para obtener el suero de leche son [Laye et al., 1995, Hobman, 1992]:

1. Centrifugación del suero de leche para eliminar los finos de la caseína (por ejemplo la κ-caseína ~ 19 [kDa]) y disminuir la carga microbiana y grasas.
2. Pasteurización para suero de leche dulce (~ 72 [°C] por 15 [s]). El suero de leche ácido no se pasteuriza, ya que el tratamiento térmico a pH 4.6 puede provocar una gran desnaturalización proteica, por el contrario, se almacena a 52 [°C] resultando inhibitorio para los microorganismos.
3. Almacenamiento en refrigeración.
4. Pretratamientos para reducir la colmatación de la membrana (desmineralización, modificaciones enzimáticas y eliminación de grasa), esto implica realizar ajustes de pH y T, adición de calcio, microfiltración, entre otros.
5. Ultrafiltración (contenido máximo de proteína $\sim\leq 70$ [%]) y/o Diafiltración (contenido máximo de proteína $\sim\geq 80$ [%], aumentando la eliminación de lactosa, grasa y minerales).
6. Concentrado a pasteurización – Almacenamiento de permeado.
7. Evaporación tubular a vacío de película descendente (25 [%] a 50 [%] de los sólidos totales a temperaturas mayores a 50 [°C]).
8. Enfriamiento a 50 [°C].
9. Deshidratación del concentrado en secadores por atomización (aire a 160 [°C] - 180 [°C)] y, de ser necesario, con un secador de lecho fluidizado.
10. Envasado desde silos o desde ciclones.

El aislamiento individual de las proteínas de suero de leche una vez terminado el proceso de concentración, se logra mediante técnicas como la electroforesis, la cromatografía, la ultrafiltración, la cristalización y la precipitación. Un ejemplo de esto

es la concentración de α-lactoalbúmina y β-lactoglobulina , mediante cromatografía de permeación en gel, procesado por membranas, intercambio iónico y precipitación selectiva [Imafidon et al., 1997].

Tabla 4.4: Composición de CPSL y APSL comerciales (Adaptado de [Morr, 1989, Foegeding & Mleko, 2002]).

	CPSL	**APSL**
Composición general	[%]	[%]
Humedad	4,1 – 6,0	2,4 – 5,6
Proteína	72,0 – 76,6	88,6 – 92,7
Nitrógeno no proteico	0,93 – 4,6	0,29 – 0,34
Lactosa	2,1 – 5,8	0,42 – 0,46
Lípidos totales	3,3 – 7,4	0,39 – 0,67
Fosfolípidos	0,8 – 1,5	0,11 – 0,31
Cenizas	2,5 – 6,0	1,4 – 2,2
Sodio	0,15 – 1,7	0,36 – 0,42
Calcio	0,23 – 1,1	0,20 – 0,24
Composición proteica		
β-lactoglobulina	40,4 – 76,9	67,6 – 74,8
α-lactoalbúmina	14,5 – 24,8	8,3 – 17,5
Inmunoglobulinas	3,8 – 15,4	5,9 – 7,5
Seroalbúminas	5,8 – 19,6	7,2 – 10,9

4.4. Filtración por membranas

La IUPAC define a las membranas como estructuras que poseen dimensiones laterales mucho mayores a su espesor, siendo una fase permeable entre mezclas de fluidos, que permite la permeación preferencial de al menos una de las especies de la mezcla [Koros et al., 1996]. Por lo tanto, la permeación selectiva y el flujo de los diferentes compuestos de la mezcla a través ella, permiten cuantificar su desempeño y determinar su implementación en procesos de separación y/o purificación [Pentair, 2019] (Figura 4.3). El flux o tasa de permeación, se define como la cantidad (volumétrica, másica o molar) de fluido que atraviesa a la membrana por unidad de área por unidad de tiempo. Por otra parte, la selectividad mide la tasa relativa de permeación de dos especies a través de la membrana en las mismas condiciones (presión, pH, temperatura, entre otras). Idealmente, los procesos industriales requieren membranas con alta selectividad y permeabilidad, pero, como regla general, una alta permeabilidad corresponde a una baja selectividad y viceversa, comprometiendo la maximización de un factor con la reducción del otro [Mehta & Zydney, 2005]. Parámetros operativos como la presión transmembrana y velocidad tangencial, controlan el régimen de turbulencia, el espesor de la capa límite y el grado de polarización por concentración, afectando la permeabilidad y la selectividad de los solutos más pequeños [Taddei et al., 1986].



Figura 4.3: Sistema de filtración de membrana en industria cervecera [Pentair, 2019].

La Tabla 4.5 presenta una clasificación de las diferentes operaciones de filtración con un ejemplo de sus respectivas aplicaciones, evidenciando que una disminución del tamaño de poro de la membrana requiere un aumento de la fuerza impulsora (diferencia de presión) para que el proceso de separación ocurra [Cooke et al., 2000]. La distribución del tamaño de los poros puede visualizarse mediante microscopía electrónica, caracterizándose por marcadores moleculares (polietilenglicoles y dextranos) que miden su capacidad para retener proteínas de un peso molecular particular [Yoon, 2015]. Las membranas de microfiltración toman clasificaciones absolutas de la partícula más grande que podrán retener en condiciones estándar (de pH, temperatura, fuerza iónica e interacciones con el buffer). Por otra parte, a las membranas de UF se les asigna una clasificación nominal, referida al peso molecular de un soluto que se rechaza en un 90 [%] en condiciones estándar. Esta clasificación se denomina peso molecular nominal de corte (*Nominal Molecular Weight Cut off* - NMWCO) de la membrana, definida mediante el coeficiente de retención aparente (R_{ap}) (ecuación 4.1). Cuando los solutos presentan un tamaño molecular del mismo orden de magnitud que el del poro, su paso se ve afectado por la presencia de moléculas más grandes, ya que la molécula grande forma una membrana dinámica secundaria en la membrana original que inhibe el paso de la molécula más pequeña [Lutz, 2015]. Este efecto puede contrarrestarse con la dilución de la alimentación, ya que se minimizan las interacciones soluto-soluto y soluto-membrana.

$$R_{ap} = 1 - \frac{C_{permeado}}{C_{concentrado}} \tag{4.1}$$

El transporte a través de los poros se modela como un flujo laminar directamente proporcional a la presión transmembrana aplicada. Sin embargo, este puede comportarse de forma independiente, debido a que los solutos que son concentrados parcial

o completamente por la membrana se acumulan en su superficie (ensuciamiento, conocido en inglés como *fouling*), consolidando una capa solida de gel que actúa como una nueva resistencia al flux, genera un gradiente de concentración dentro de la capa límite y resulta en un transporte de soluto hacia el seno del fluido, fenómeno conocido como polarización por concentración [Taddei et al., 1988]. Este régimen depende de las características de transferencia de masa del sistema (coeficiente de difusión de las moléculas rechazadas en la capa límite), la temperatura, la viscosidad, la turbulencia en el canal de flujo y la densidad del fluido. El espesor del *fouling* es controlado por la acción hidrodinámica de remoción que genera el flujo de alimentación a la membrana, ya que este continuamente remueve los solutos depositados en ella [Corbatón-Báguena et al., 2018]. Este efecto no es conseguido con el aumento de la presión del proceso, ya que se produce una capa solida de gel más gruesa que precede a un decaimiento súbito del flux. Lo anterior, condiciona al proceso a modalidades de operación que

Tabla 4.5: Clasificación de las operaciones de separación por membranas, PES-Poliéter sulfonas, PVDF-fluoruro de polivinilideno, PP-Polipropileno, PTFE-Politetrafluoroetileno, TFC-PA-Compuesto de película delgada de poliamida (Adaptado de [Cooke et al., 2000]).

Proceso de separación	**Diferencia de presión [bar]**	**Tamaño de poro [Å]**	**Material**	**Ejemplo de sustancias a separar**
Microfiltración	$\leq 1 - 5$	$800 - 10^5$	PES, PP, PTFE, PVDF.	Bacterias, levaduras y agregados de proteínas de suero.
Ultrafiltración (UF)	$1 - 10$	$50 - 1100$	PES, PVDF, PP.	Ácidos nucleicos, miscelas de caseína, nanopartículas, pirógenos, proteínas y virus.
Nanofiltración	$20 - 40$	$10 - 100$	TFC-PA.	Ácidos orgánicos disociados, disacáridos (lactosa), sales divalentes y vitaminas.
Ósmosis inversa	$30 - 200$	$1 - 10$	TFC-PA, Triacetato y acetato de celulosa.	Iones y sales monovalentes.

permitan modificar las velocidades de alimentación al sistema, la concentración alimentada y la temperatura (Figura 4.4), para favorecer al flux, a la permeabilidad y a la productividad global del proceso de filtración [Saavedra & Romero, 2010].

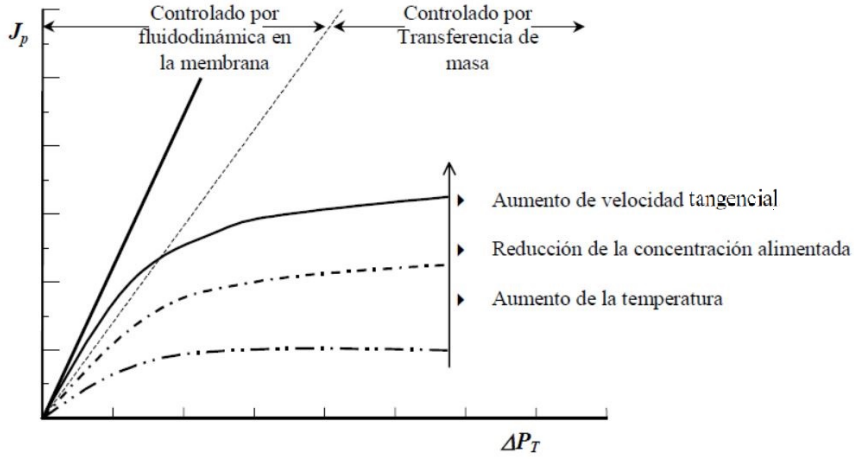


Figura 4.4: Funcionalidad del flux como función de la presión transmembrana y otras variables operacionales (Adaptado de [Saavedra & Romero, 2010]).

Aún cuando la mayoría de los solutos son continuamente removidos de la superficie de la membrana, las fuerzas de van der Waals, de atracción electrostática o de enlace de hidrógeno que se establecen entre la interacción membrana-soluto, resultan en un decaimiento progresivo del flux en el tiempo [Taddei et al., 1988]. Esto conlleva a la aplicación de protocolos de limpieza que pretenden restaurar las condiciones originales de la membrana y asegurar operaciones continuas y rentables. Diferentes tipos de detergentes y sustancias químicas tensoactivas pueden ser utilizadas en estos protocolos de restauración, potenciados con enzimas proteolíticas que rompen proteínas atrapadas en el medio filtrante [Matzinos & Álvarez, 2002]. Sin embargo, cuando existen depósitos de solutos al interior de la membrana (partículas coloidales o de mayor tamaño que el del poro) que no pueden ser eliminados después aplicar varias veces el protocolo de limpieza (*fouling* irreversible) y el flux disminuye al 50 [%] del valor original conseguido con agua, la membrana debe reemplazarse, con el fin de asegurar la eficiencia del proceso [Cabero et al., 1999].

4.4.1. Configuraciones de operación de las membranas

Las configuraciones de operación de las membranas son denominadas según la dirección en la que los flujos de alimentación y permeado actúan sobre ellas (Figura 4.5), tal que:

a) Si los flujos son paralelos a la membrana y avanzan en la misma dirección, la configuración se conoce como flujo de co-corriente.

b) Si los flujos a ambos lados de la membrana están completamente mezclados, la configuración se conoce como flujo individual completamente mezclado.

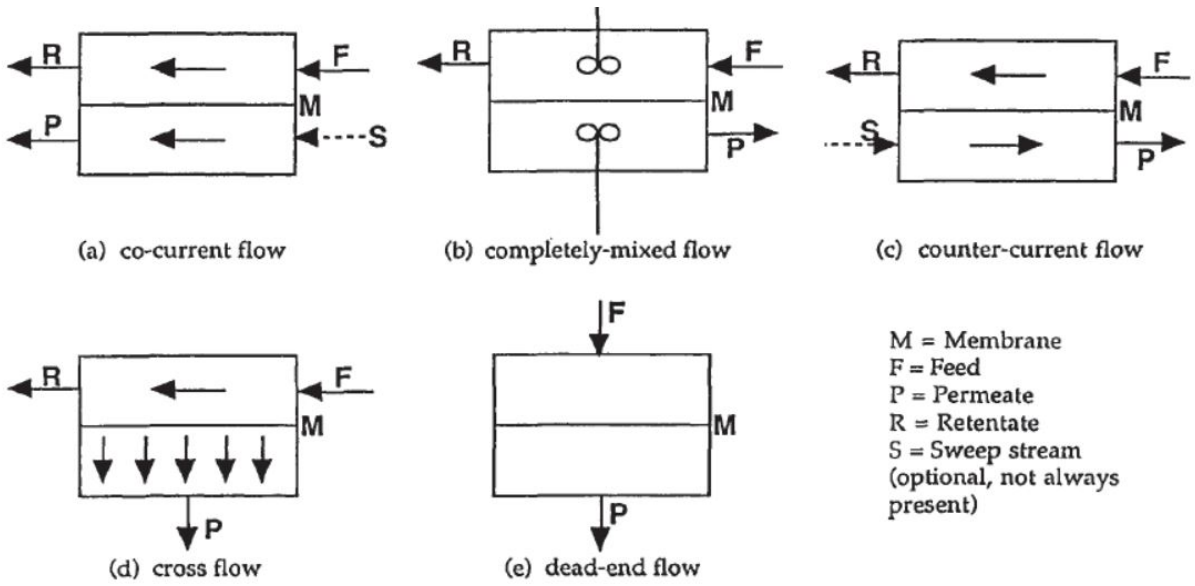


Figura 4.5: Tipos de flujos continuos ideales utilizados en separaciones basadas en membrana, a) flujo de co-corriente, b) flujo individual completamente mezclado, c) flujo contra corriente, d) flujo cruzado y e) filtración tradicional [Koros et al., 1996].

c) Si los flujos son paralelos a la membrana y avanzan en direcciones contrarias, la configuración se conoce como flujo contra corriente.

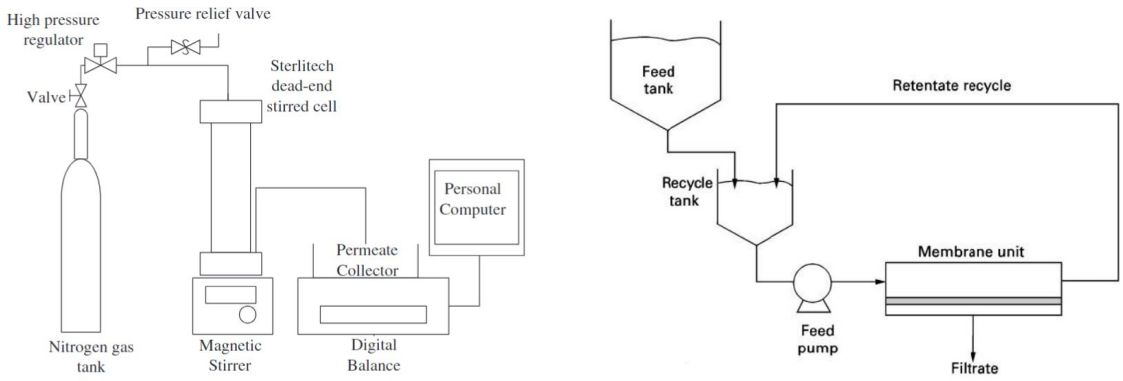
d) Si el flujo de alimentación es paralelo a la membrana y perpendicular al flux, la configuración se denota como flujo cruzado.

e) Si el flujo de alimentación ingresa perpendicular a la membrana y permea en su misma dirección, la configuración es conocida como flujo final (dead-end).

Las configuraciones a, c y d permiten mitigar la acción del *fouling* e incrementar sustancialmente el flux conseguido en la operación de flujo final, lo que, junto con la reducción de costes y la optimización de procesos, ha garantizado el desarrollo sostenible de los sistemas industriales de filtración [Koros et al., 1996].

4.4.2. Modalidades de operación

Las modalidades de proceso pueden establecerse batch y fed batch, dependiendo de los objetivos de concentración establecidos. En el proceso batch (Figura 4.6A), el volumen total del fluido de trabajo es alimentado al inicio de la operación, lo que facilita el control de la presión transmembrana del proceso (manual o automático) y disminuye los costos de instrumentación [Cooke et al., 2000]. En este modalidad, los flux disminuyen producto de la concentración del concentrado conforme avanza la operación y la precipitación de los solutos en la superficie de la membrana, lo que impide alcanzar factores de concentración elevados y diseñar sistemas eficientes de mezclado a nivel industrial [Singh, 2015]. Las configuraciones fed-batch (Figura 4.6B) incorporan una línea de alimentación que proporciona concentrados bien mezclados y



(A) (B)

Figura 4.6: Modalidades de operación y equipos de funcionamiento. A) Modalidad batch y B) Modalidad fed-batch y diafiltración [Mah et al., 2014, Cooke et al., 2000].

suministran mayores factores de concentración (comparados con la operación batch), otorgando una mayor flexibilidad al proceso de separación. Las desventajas de esta modalidad incluyen un mayor tiempo de operación y de reciclos del concentrado a través de las bombas y válvulas del proceso. La diafiltración es una modalidad derivada de la operación fed-batch, en donde una solución tampón (comúnmente agua) se adiciona para aumentar el flux y la concentración del producto deseado en el permeado. Generalmente, esta modalidad mantiene constante el volumen del concentrado al igualar el flux con el flujo de alimentación de la solución tampón. La concentración del producto final (C_F) en un proceso batch, puede evaluarse a partir de un balance de masa asumiendo coeficientes de rechazo constantes, tal que:

$$\frac{C_F}{C_O} = \left(\frac{V_O}{V_F}\right)^{1-S} \tag{4.2}$$

Donde V_F, V_O y S son el volumen final, el volumen inicial y el coeficiente de tamizado $(1 - R)$, respectivamente. La expresión análoga para el proceso fed-batch es:

$$\frac{C_F}{C_O} = \frac{1}{S} + \left(1 - \frac{1}{S}\right) exp\left[-S\left(\frac{V_O}{V_F} - 1\right)\right] \tag{4.3}$$

La concentración final después de la modalidad diafiltración a volumen constante es:

$$\frac{C_F}{C_O} = exp(-SN) \tag{4.4}$$

Donde N es el número de volúmenes diafiltrados (V_D/V) y V_D el volumen de solución tampón adicionado.

4.4.3. Clasificación

Existe una amplia gama de membranas disponibles para diversos tipos de aplicaciones. La clasificación general que incluye los factores principales que deben considerarse para implementar una membrana en un proceso específico es:

1. Naturaleza y materiales.
2. Estructura y morfología.
3. Geometría y configuración.
4. Operación y separación de procesos.
5. Mecanismo de separación.
6. Aplicaciones.

Naturaleza y materiales

Los materiales de las membranas se dividen en naturales y sintéticos. Las membranas sintéticas se dividen en i) orgánicas, ii) líquidas, iii) inorgánicas, iv) híbridas y v) fabricadas con base en nanomateriales, siendo las más relevantes a nivel industrial las orgánicas y las inorgánicas. En el caso de las membranas orgánicas, generalmente están constituidas por materiales poliméricos. La Tabla 4.6 presenta los principales materiales orgánicos utilizados en aplicaciones industriales, con sus respectivas ventajas y desventajas. Los materiales inorgánicos exhiben una mayor estabilidad en condiciones de proceso extremas (altas temperaturas, valores extremos de pH, erosión, protocolos rigurosos del limpieza y disolventes orgánicos), con poca o nula susceptibilidad a ataques microbianos. Ejemplos de estas membranas son las preparadas a partir de cerámica, óxidos metálicos (zirconia (ZrO_2), alúmina (Al_2O_3), titanio (TiO_2) y la cerio (CeO_2), aluminio, zeolita, acero de alta calidad, vidrio y carbono reforzado con fibra. La mayoría de las membranas metálicas y algunas cerámicas son producidas por un proceso de sinterización, mientras que otras membranas cerámicas son producidas por el proceso sol-gel o por oxidación anódica [Lee et al., 2015]. Una de las desventajas principales de las membranas inorgánicas, es la dificultad en el proceso de fabricación para lograr una calidad reproducible, siendo adicionalmente limitadas por la fragilidad intrínseca de sus materiales.

Estructura y morfología

Según su morfología, las membranas inorgánicas pueden ser clasificadas como densas (no porosas) y porosas. Las primeras son capas delgadas de polímero que forman una fase continua, comúnmente implementadas en procesos de separación de moléculas pequeñas (fase líquida o gaseosa) como lo son la industria para la separación de gases y la de ósmosis inversa [Mohammadi et al., 2008]. Las membranas porosas consisten en fases co-continuas de polímero seguidas de vacíos interconectados que funcionan como pasaje de transporte convectivo y/o difusivo.

Tabla 4.6: Tipos de membranas orgánicas (Adaptado de [Reif, 2006]).

Tipos de material orgánico	**Ventajas**	**Desventajas**	**Ejemplos**
Poliamidas	Excelente compatibilidad química, térmica y física con diferentes solventes. Resistencia a la fatiga y a la abrasión.	Resistencia límitida a los cambios de pH (alto y bajo). Naturaleza hidrofílica, lo que produce expansión en la membrana.	Polieterimida (PEI) y poliamida (PA).
Polímero de celulosa	Alta compatibilidad con ácidos como el acético y el nítrico.	Baja capacidad de adsorción. Requiere estabilización para trabajar a pH elevado.	Celulosa regenerada y acetato de celulosa (CA).
Polísulfona	Baja polaridad, matriz de membrana robusta, alta resistencia térmica (> 200 [^{o}C]) y a la irradiación ionizante. Resistente a la hidrólisis en todo el rango de pH, incluso en presencia de vapor caliente o agua.	Disolventes orgánicos con una polaridad similar (dimetilformamida y el dimetilsulfóxido), pueden tener efectos disolventes.	Polisulfona (PS), polietersulfona (PES), Polietersulfona modificada (mPES) y polifenilsulfona (PPSu).
Polímeros a base de hidrocarburos.	Resistentes y versátiles con estructuras poliméricas rígidas y resistentes.	Alcanzan una porosidad limitada, son principalmente simétricas en su estructura y tienen una alta resistencia intrínseca.	Polietileno (PE) y polipropileno (PP).
Fluoropolímeros.	Simétricas con altas porosidades y buenos caudales. Aceptable resistencia a solventes y temperatura. Alta hidrófobicidad.	Menor tensión superficial debido a la baja polarización y a la fuerte electronegatividad del átomo de flúor.	Politetrafluoroetileno (PTFE) y el fluoruro de polivinilideno (PVDF).
Policarbonatos .	Dureza extrema, alta resistencia al calor, bajo precio y alta transparencia. Compatible con agua, alcoholes y disolventes alifáticos.	Bajas porosidades.	Bisfenol A.

Su estructura puede ser homogénea (microporosa o densa) y heterogénea (asimétrica o de capa fina), siendo los tamaños de los poros clasificados en i) macroporos (> 50 [nm]), ii) mesoporos (2 a 50 [nm]) y microporos (< 2 [nm]) [Xia et al., 2003]. Son implementadas en procesos de separación de partículas coloidales sólidas y en las aplicaciones de microfiltración, ultrafiltración y diálisis [Surya Murali et al., 2010, Aroon et al., 2010]. La clasificación por estructura está basada en la simetría de los poros. En este contexto, las membranas simétricas están constituidas por poros uniformes en toda su estructura [Saleh & Gupta, 2016], presentando formas cilíndricas, de esponja y de hendidura. La mayoría de los poros simétricos son cilíndricos y son producidos por métodos de: irradiación, película de polímero semicristalino en fusión, separación de fase inducida por temperatura y separación de fase inducida por vapor [Issaoui & Limousy, 2018]. Estas encuentran aplicación en la electrodiálisis para la producción de agua potable a partir de agua salobre. Contrario a esto, las membranas asimétricas anisotrópicas son membranas en donde el tamaño de los poros varía a lo largo de la estructura. Este tipo de membranas es más eficaz en separaciones de gases y ósmosis inversa que una densa membrana simétrica hecha del mismo material [Reif, 2006]. Entre las aplicaciones más comúnmente utilizadas se encuentran la diálisis, la microfiltración, la UF y la pervaporación [Atkinson & Prinz, 2002].

Geometría y configuración

La geometría y la configuración del módulo se utilizan para describir la forma en que la membrana se organiza para separar la alimentación en las corrientes de permeado y concentrado, logrando distintas características en condiciones hidrodinámicas, áreas de filtración y consumos de energía. Los módulos difieren en i) su diseño, ii) modo de operación, iii) costos de producción y iv) requisitos de energía para bombear la solución de alimentación a través de la membrana [Galiano et al., 2018]. La Figura 4.7 presenta la división tradicional para geometrías planas y cilíndricas [Saleh & Gupta, 2016]. En el caso de las membranas planas tenemos:

- **Membranas de hoja plana**: Diseñadas en módulos de placa y bastidor en donde los espaciadores de la alimentación y producto se superponen entre dos placas extremas. La alimentación pasa a través de la superficie y la placa espaciadora distribuye el flujo de alimentación dentro del módulo [Wu et al., 2019].
- **Membranas de pilas de discos planos**: Diseñadas mediante el apilamiento de hojas planas de membranas una sobre otra.
- **Modulo enrollado en espiral**: Sistema de placa y marco enrollado alrededor de un tubo central perforado que recoge el permeado. La alimentación fluye en el sistema en dirección axial mientras que el permeado fluye en dirección radial hacia el centro [Bucs et al., 2018].

Para las geometrías cilíndricas tenemos:

- **Módulo de fibra hueca**: Consiste en finas fibras capilares paralelas reunidas en forma de haz, que se disponen en ambos extremos del soporte para garantizar

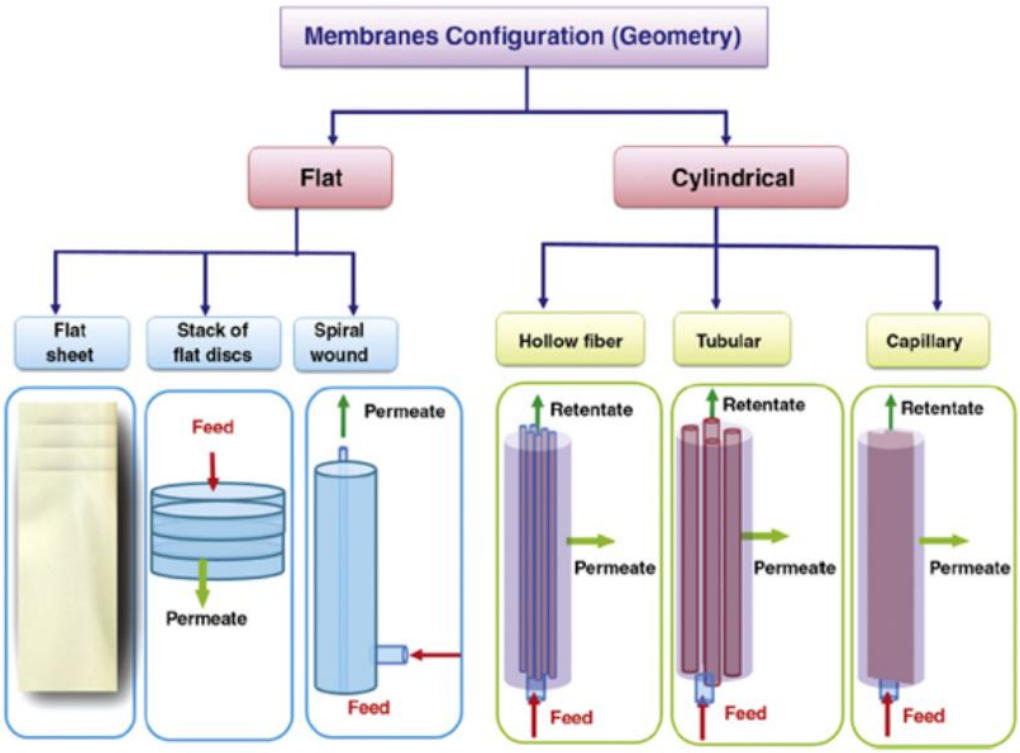


Figura 4.7: Clasificación de membranas por su geometría [Saleh & Gupta, 2016].

la hermeticidad de las cámaras de alimentación y permeado [Wu et al., 2018]. En estos módulos, una de las fases acuosas fluye en el interior de las fibras huecas, generando una permeación perpendicular por los poros de la membrana.

- **Módulo tubular**: Formado por membranas insertadas en el interior de tubos, que se colocan juntas en una matriz cilíndrica. Cuentan con una capa activa en el interior y el permeado atraviesa la capa de membrana hacia el exterior. Por lo tanto, el flujo es de adentro hacia afuera debido a la débil fijación de la membrana a la capa de soporte [Li et al., 2019].
- **Módulo capilar**: Consiste en un gran número de capilares reunidos en una estructura modular. Cuentan con extremos libres que actúan como agentes de soporte y generalmente se comercializan en disposiciones de flujo adentro hacia afuera y de afuera hacia adentro [Spruck et al., 2013].

Operación y separación de procesos

Estas clasificación hace referencia a las fuerzas impulsoras que permiten que el proceso ocurra. Estas pueden ser gradientes de presión (presión termodinámica y diferencia de presión parcial), vació, fuerza centrifuga, diferencia de concentración (actividad o fuerza iónica), diferencia de temperatura y diferencia de potencial eléctrico (entre la fase de alimentación y la fase de permeado) [Wisniak, 2013, Saleh & Gupta, 2016].

Mecanismo de separación

Existen 4 principales mecanismos de separación que son utilizados en la tecnología de membranas para retener o separar selectivamente los compuestos de interés. Estos son: i) el tamaño, ii) la solubilidad y/o difusivididad, iii) el potencial electroquímico y iv) las interacciones de carga. Cada uno de estos o una combinación de los diferentes mecanismos, pueden ser implementada para mejorar y optimizar el desempeño del proceso de separación, aumentando la selectividad, el rendimiento y la productividad del proceso específico estudiado [De Falco et al., 2011].

Aplicaciones

Las aplicaciones más relevantes a nivel industrial se presentan en la Tabla 2.5, indicando los respectivos tamaños de corte para cada tipo de membrana. En este sentido, las aplicaciones principales son:

- **Microfiltración**: Esterilización en frío de bebidas y productos farmacéuticos, recolección de células, clarificación (zumos, vinos y cervezas), recuperación de metales como óxidos o hidróxidos coloidales, tratamiento de aguas residuales, fermentación continua, separación de emulsiones [Rouquié et al., 2019].
- **Ultrafiltración**: Concentración en industria de alimentos (concentración de leche, elaboración de quesos, recuperación de las proteínas de suero y almidón de papa), clarificación (jugos de fruta y alcohol), recuperación de antibióticos y tratamiento de agua potable [Emani, 2018].
- **Nanofiltración**: Purificación de agua potable, eliminación de pesticidas en aguas subterráneas, eliminación de nitratos, filtración de dióxido de carbono, recuperación de metales pesados en aguas residuales, eliminación de sustancias orgánicas (micro-contaminantes, iones multivalentes, etc) [Voigt et al., 2019].
- **Ósmosis inversa**: Purificación de aguas contaminadas con metales pesados y pesticidas, agua ultrapura en la industria de semiconductores, industria de alimentos (azúcar, café, entre otros), concentración de nitritos y nitratos, electrodeposición [Siddiqui et al., 2018].
- **Pervaporación**: Industria química (producción de acetato de sodio, plata, acetato, anhídrido acético, anhídrido ftálico, acetato de vinilo), recuperación del ácido acético, desalinización (industria alimentaria y farmacéutica), separación de aminoácidos y producción de sal [Moulik et al., 2016].
- **Electrodiálisis** : Regeneración en la manufactura de acero inoxidable (recuperación de HF, HNO_3, KOH, entro otros), desulfuración de humos y gases para producir sulfito sódico, recuperación de ácido fluorhídrico del ácido fluorsilícico, recuperación de ácidos y aminoácidos orgánicos, recuperación del regenerante de intercambiadores iónicos y purificación de ácidos y bases [Albornoz et al., 2019].

4.5. Hidrólisis de proteínas

Se utiliza el término hidrólisis de proteínas para aquellas reacciones en donde por acción del agua se produce la ruptura de los enlaces peptídicos[2] que unen a los aminoácidos que conforman las proteínas. Esta fragmentación sucede en la estructura primaria de la secuencia proteica, resultando en la producción parcial de L-α-aminoácidos libres y péptidos de diversos tamaños. Cuando todos los enlaces peptídicos susceptibles a hidrólisis son degradados en su totalidad en L-α-aminoácidos libres, la operación es denominada hidrólisis total.

4.5.1. Hidrólisis química

La hidrólisis química se lleva a cabo por escisión no específica de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas, mediante la acción de ácido o base. Una ventaja clave de este proceso es que cuenta con protocolos robustos que pueden implementarse en operaciones de gran escala, las cuales requieren estudios previos de factibilidad técnica, económica y financiera. Los principales inconvenientes se refieren i) a las condiciones de operación del proceso (temperatura, presión y pH extremos que aumentan considerablemente los costos del sistema de control automático), ii) a la naturaleza tóxica de los disolventes y reactivos utilizados, iii) a la baja tasa de racemización de los aminoácidos (referida a la formación de isómeros de configuración L y D enantiómeros), iv) a la reducción de la calidad nutricional, v) a la disminución de las propiedades funcionales (en comparación con un hidrolizado enzimático) y vi) a la variabilidad de las sustancias químicas presentes en el producto generado, siendo una limitante para su aplicación en la industria de alimentos [Gill et al., 1996, Nilsson et al., 2005]. A pesar de estas restricciones, la hidrólisis química de proteínas puede considerarse la tecnología más madura disponible, siendo especialmente adecuada para péptidos de tamaño medio de hasta cien residuos de aminoácidos, que comprenden la mayoría de los péptidos de relevancia terapéutica [Kristinsson et al., 2000].

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es una operación no especifica que utiliza ácidos fuertes concentrados (clorhídrico, sulfúrico, entre otros) por periodos prolongados de tiempo, para escindir todos los enlaces peptídicos y amida presentes en la proteína. Estos procesos suelen alcanzar altos grados de hidrólisis finales, utilizan la adición de ácidos débiles (propanoico, acético, entre otros) para disminuir los tiempos de reacción y requieren de un posterior proceso de neutralización antes del proceso de secado [Tsugita & Scheffler, 2008]. Un ejemplo de esta reacción es la hidrólisis ácida de la cadena A de la insulina bovina, realizada con HCl 6 [M] a 100 [^{o}C] durante 24 [h]. Este proceso hidroliza al triptófano y deja indetectable a la cisteína y a la prolina (ver Figura 4.8), mientras que la asparagina y la glutamina presentan baja racemización y se

[2]El enlace peptídico es un enlace covalente tipo amida que se representa como -CONH-, donde el oxígeno del grupo carbonilo se encuentra en posición trans con relación al hidrógeno del grupo amino.

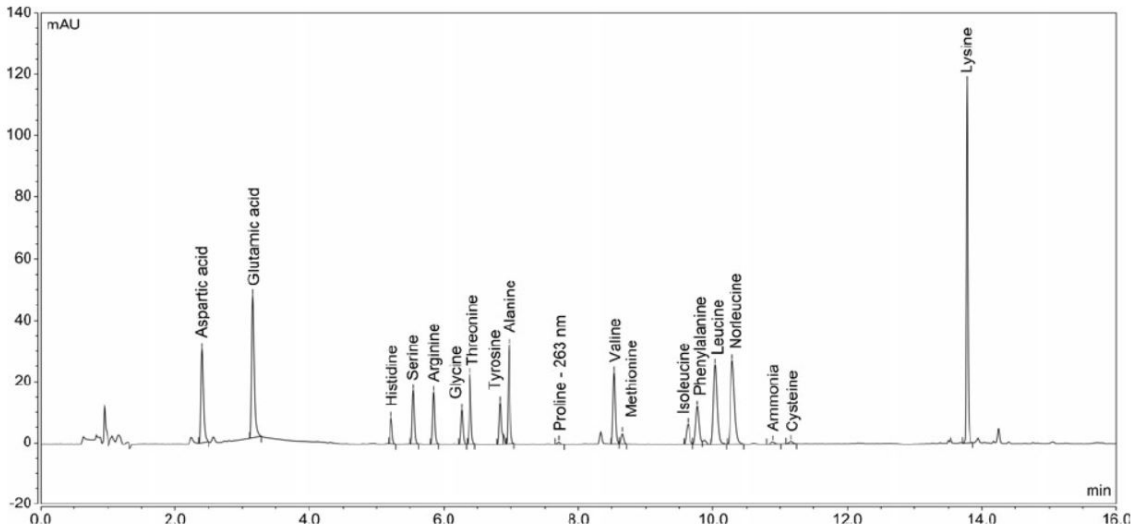


Figura 4.8: Perfil de elución de albúmina de suero bovino después de hidrólisis ácida [Meussen et al., 2014].

convierten en sus respectivos ácidos, glutámico y aspártico [Meussen et al., 2014].

Hidrólisis alcalina

Este tipo de hidrólisis utiliza tradicionalmente al hidróxido de sodio (NaOH) como base fuerte a altas temperaturas, produciendo una alta racemización de aminoácidos (los cuales no son absorbidos por humanos). La hidrólisis alcalina se utiliza normalmente para valorar el triptófano (el cual es estable en estas condiciones, pero inestable en el tratamiento ácido) y es poco implementada en la industria alimentaria, dada la posibilidad de formación de compuestos tóxicos (lisinoalanina, entre otros). Un ejemplo de esta reacción es la hidrólisis básica de la cadena A de la insulina bovina, que se realiza en disoluciones concentradas de hidróxido de sodio (NaOH) en ebullición, produciendo la destrucción de los aminoácidos arginina, serina y treonina, al igual que la ácida, además de cisteína y cistina (unión de dos residuos de cisteína) [Meussen et al., 2014].

4.5.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática in vitro de proteínas es una operación estereoespecífica[3] en sustrato, que utiliza proteínas de alto peso molecular (15.000 < PM < varios millones de Daltons [Da]) con actividad catalítica (enzimas) para escindir enlaces peptídicos en una proteína. Las enzimas al ser catalizadores biológicos estereoespecíficos, versátiles y efectivos, presentan una tasa de reacción mucho más alta en comparación con las reacciones catalizadas químicamente bajo condiciones ambientales. La alta selectividad de los procesos enzimáticos proporciona i) menos reacciones adversas, i) menos

[3]Una reacción es estereoespecífica si, reactivos que difieren sólo en su estereoisomería, son transformados exclusivamente en productos que se diferencian también sólo en su estereoisomería.

pasos de reprocesamiento y purificación, iii) una separación de producto más fácil, iv) menor requerimiento de equipos, v) menor consumo de energía y vi) menor impacto ambiental, como consecuencia de las menores cantidades y los menores índices de toxicidad de los residuos producidos.

La formación del complejo enzima-sustrato (ES) reduce la energía de activación para una reacción, creando una vía alterna de reacción que no genera una alteración en su equilibrio termodinámico (energía libre de Gibbs y constante de equilibrio de la reacción). Esta unión puede generarse mediante enlaces covalentes (catálisis electrofílica y nucleofílica) y no covalentes[4], mejorándose en ambos casos la velocidad de reacción. La catálisis covalente presenta dos vías diferentes de síntesis, clasificadas en:

a) **Catálisis nucleofílica**: En donde los grupos nucleofílicos de la enzima son más donadores de electrones que los grupos atacantes normales, y se forma un intermediario reactivo que se descompone rápidamente para formar los productos.

b) **Catálisis electrofílica**: Esta involucra catalizadores que retiran electrones del centro de reacción del intermediario y, por lo tanto, son sumideros de electrones que estabilizan una carga negativa.

En la catálisis nucleofílica los nucleófilos más comunes en las enzimas son la serina hidroxilo (que se encuentra en las serinas proteasas, esterasas, lipasas y fosfatasas), la cisteína tiol (proteasas tiol), el grupo carboxílico del ácido aspártico, el grupo amino de la lisina (aldolasa, transaldolasa, DNA ligasa), el -OH de la tirosina (en las topoisomerasas) y, posiblemente, el imidazol (en conjunción con los grupos de fosforilo en la transferencia de fosfato) [Phadatare et al., 1993]. Para el caso de las fuerzas no covalentes, cuando el sustrato se desplaza del medio acuoso externo (seno del fluido) al sitio activo de la enzima (sitio de reacción), su caparazón de solvatación se pierde y la diferencia de energías entre el estado de disolución y la del complejo ES determina la fuerza de unión del sustrato al complejo. En general, las fuerzas de unión por enlaces hidrógeno y las interacciones electrostáticas son las más importantes.

La proteólisis por hidrólisis de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en la cadena de polipéptidos que forman la proteína, es llevada a cabo por las proteasas (EC 3.4.21.–). Estas enzimas son aplicadas en reacciones de i) hidrólisis de ésteres o amidas del ácido carboxílico (Figura 4.9), ii) esterificación o transesterificación y iii) en la formación de enlaces amida/péptidos [Hajkova et al., 2011]. Las serin-proteasas contienen un aminoácido serina en su sitio activo esencial para la unión y separación del sustrato. El mecanismo de reacción involucra un centro catalítico que contiene serina como nucleófilo, aspartato como electrófilo e histidina como base [Chellappan et al., 2006]. En él, ocurre la formación del complejo ES unido covalentemente a través de acilación, lo que resulta en la pérdida del correspondiente fragmento de aminoácido o péptido. El ataque nucleofílico del agua al complejo resulta en la deacilación, completando así la hidrólisis del péptido [Germano et al., 2003]. Las proteasas que

[4]Las principales fuerzas no covalentes de unión del complejo son: i) Interacción electrostática, ii) fuerzas de van der Waals, iii) enlaces de hidrógeno y iv) fuerzas hidrofóbicas.

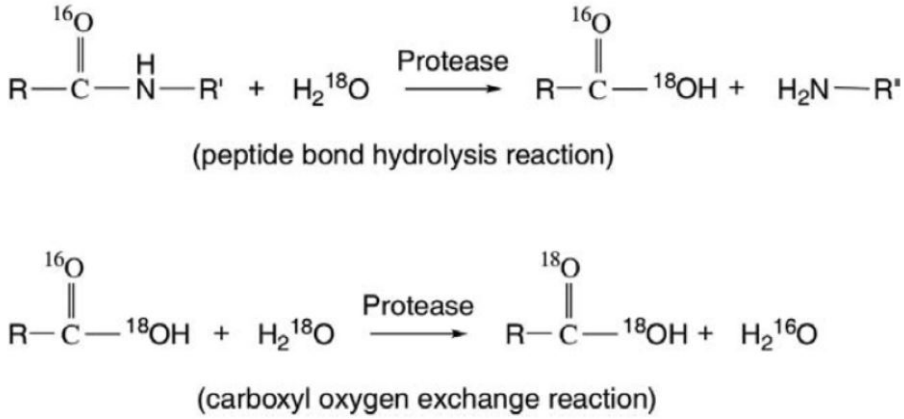


Figura 4.9: Reacciones catalizadas por la enzima proteasa. a) Hidrólisis de enlace peptídico. b) Intercambio de oxígeno carboxilo [Hajkova et al., 2011].

causan la ruptura de enlaces peptídicos específicos que no se encuentran en los extremos de la cadena polipeptídica, es decir, en el extremo amino terminal o en el extremo carboxilo terminal, son denominadas las endoproteasas. Contrario a esto, las exoproteasas (como la aminopeptidasa y la carboxipeptidasa) actúan rompiendo sólo el enlace peptídico del aminoácido terminal respectivo. Un ejemplo es la proteólisis de la cadena A de la insulina bovina por medio de quimiotripsina, endopeptidasa que actúa sobre los enlaces peptídicos en los que está unido un residuo de aminoácido aromático, fenilalanina, tirosina o triptófano, causando la ruptura del lado del grupo carbonilo en las posiciones 14 y 19, donde está la tirosina.

Dado que las enzimas son en general catalizadores lábiles, la producción a gran escala de péptidos biológicamente activos con proteasas implica el estudio preliminar de los intervalos de pH, temperatura, concentración (sustratos, productos, disolventes orgánicos), solubilidad-estabilidad (sustratos y productos) y actividad-estabilidad (biocatalizador) en las condiciones reales de operación. Esto permite aumentar la confiabilidad y la reproducibilidad del proceso, ya que la proteína enzimática debe estar presente en un estado conformacional catáliticamente activo. Los rendimientos y las productividades del proceso permiten dilucidar puntos óptimos de operación, que pueden ser incorporados a estudios de factibilidad técnica y económica. Elaborando análisis conjuntos que permitan establecer procesos tecnológicamente competitivos en el mercado [Guzmán et al., 2007].

Las proteasas representan alrededor del 60 [%] de las ventas mundiales totales de enzima, con valor anual de alrededor de 3 mil millones de USD [Chellappan et al., 2006]. Su síntesis se produce en mayor medida por microorganismos (*Conidiobolus coronatus, Penicillium sp. y Aspergillus parasiticus*) y vegetales [Tunga et al., 2003], ampliamente utilizados en medicina y en diferentes procesos químicos e industriales [Phadatare et al., 1993, Germano et al., 2003]. Las proteasas microbianas son las más importantes en términos de cuota de mercado debido a las ventajas de su producción intensiva. Sin embargo, las proteasas vegetales y algunas animales siguen siendo

pertinentes para determinadas aplicaciones médicas e industriales [Guzmán et al., 2007].

4.5.3. Hidrolizados proteicos

Los hidrolizados de proteínas se definen como una mezcla compleja de oligopéptidos, péptidos y aminoácidos libres, que se producen esencialmente por hidrólisis química y/o enzimática (parcial o extensiva) de proteínas, seguidas de etapas para aislar los péptidos bioactivos[5] de una mezcla compleja de péptidos activos e inactivos. Diferentes estudios han evidenciado que los hidrolizados proteicos además de actividad nutricional, exhiben diferentes funciones biológicas descritas en el anexo B. La producción de hidrolizados proteicos in vitro ha sido ampliamente estudiada a partir de subproductos ricos en proteínas, especialmente de subproductos de pescado [Kristinsson et al., 2000]. Debido a que los residuos de las industrias de procesamiento de pescado (piel, cabezas, vísceras y tejidos musculares) contienen un alto contenido proteínico, la hidrólisis enzimática es un método promisorio en la producción sostenible de productos con alto valor agregado [Abdelhedi et al., 2016, Chalamaiah et al., 2012].

El primer proceso de producción de péptidos bioactivos se realizó mediante la fermentación de las proteínas nativas de la leche, por medio de las proteasas microbianas presentes en los microorganismos *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* [Nakamura et al., 1995]. El producto (leche agria Calpis) presento un enriquecimiento de los péptidos Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro, después de un proceso fermentativo a 37 [°C] y 24 [h] de reacción sin control de pH. El análisis de la fracción de lactosuero evidenció la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, uno de los principales factores responsables de la hipertensión sistémica humana. La administración oral posterior de la leche agria a ratas hipertensas espontáneas, confirmó la eficacia de la reducción de la presión arterial, con una disminución de hasta 20 [mmHg] en la presión arterial sistólica 6 [h] después de la ingestión [Nakamura et al., 1995]. Otros ejemplos en la industria láctea, son la hidrólisis enzimática de β-lactoglobuli-na con quimotripsina durante 24 [h] a 37 [°C], generando hidrolizados con un alto contenido de péptidos antioxidantes fuertes [Elias et al., 2006]. Este mismo proceso realizado a un concentrado de proteína de suero rico en β-lactoglobulina con tripsina, permite establecer a este sustrato como fuente potencial de peptidos inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, agentes orales para el tratamiento de la diabetes tipo 2 [Silveira et al., 2013].

4.5.4. Grado de hidrólisis

La proteólisis enzimática se encuentra acompañada de la liberación de iones hidrógeno, (H^+), los cuales generan una disminución del pH en el tiempo. Por consiguiente, el proceso puede llevarse a cabo con o sin control de pH. Las principales ventajas de controlar el pH mediante la adición de una base fuerte (NaOH, KOH, entre otros), son

[5]Péptidos que poseen propiedades farmacológicas beneficiosas basadas principalmente en su composición y secuencia aminoacídica.

i) el seguimiento en línea de la reacción en curso (lo que permite descartar la perdida de actividad de la enzima generada por los cambios ocurridos en esta variable), ii) la cuantificación de los péptidos generados a través del volumen de solución alcalina añadida y iii) la identificación del grado máximo de hidrólisis, en experimentos de hidrólisis total (reacciones de larga duración) [Guo et al., 2009]. Un efecto indeseable de añadir NaOH es el aumento de los niveles de ceniza (sodio) en el producto final del hidrolizado [Girgih et al., 2014], lo que requiere de la incorporación de procesos *downstream* de desalinización. En los escenarios en donde no se controla pH, se suele añadir una solución tampón para mantener el pH en valores aproximadamente constantes [Adjonu et al., 2013], imposibilitando la validación de la finalización de la proteólisis, dados los pocos cambios que ocurren en el pH en el transcurso de la reacción. La estimación del número total de enlaces peptídicos escindidos, puede cuantificarse mediante el grado de hidrólisis (DH), definido como la razón porcentual entre los enlaces peptídicos escindidos (h) y los enlaces peptídicos totales (h_{tot}) conforme:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} * 100\ [\,\%] \tag{4.5}$$

El DH es utilizado como indicador de seguimiento de la proteólisis y permite comparar diferentes hidrolizados de proteínas [Giménez et al., 2009]. El incremento del DH no sólo aumenta el número de péptidos divididos, sino que también reduce el tamaño promedio de los péptidos formados, lo que modifica sus propiedades fisicoquímicas y mejora las propiedades funcionales del producto generado [Shen et al., 2012]. Los métodos mas utilizados para cuantificar los grupos α-amino liberados (y con base en esta información calcular el DH) son el pH-Stat, el ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), el o-ftaldialdehído (OPA) y los métodos de titulación con formol.

Método pH-Stat

El método de valoración del protón (pH-Stat) se basa en la incorporación de un lazo cerrado de control en la medición en línea del pH, restableciendo el set point predefinido mediante la manipulación del flujo de adición de base al volumen de control. Las reacciones químicas involucradas en este método son [Adler-Nissen et al., 1983]:

Apertura del enlace peptídico:

$$-\mathrm{CHR'} - \mathrm{CO} - \mathrm{NH} - \mathrm{CHR''} - + \mathrm{H_2O} \overset{Enzima}{\rightarrow} -\mathrm{CHR'} - \mathrm{COOH} + \mathrm{NH_2} - \mathrm{CHR''}$$

Intercambio de protones:

$$-\mathrm{CHR'} - \mathrm{COOH} + \mathrm{NH_2} - \mathrm{CHR''} \rightarrow -\mathrm{CHR'} - \mathrm{COO^-} + \mathrm{NH_3^+} - \mathrm{CHR''}$$

Valoración del grupo amino:

$$\mathrm{NH_3^+} - \mathrm{CHR''} + \mathrm{OH^-} \rightleftharpoons \mathrm{NH_2^-CHR''} + \mathrm{H_2O}$$

El volumen de base añadido al sistema permite cuantificar el producto de la reacción y el DH de la proteólisis [Wei & Zhimin, 2006] mediante:

$$P = \frac{V_b N_b}{V_R \alpha} * 1000 \tag{4.6}$$

$$DH = \frac{V_b N_b}{M_p h_{tot} \alpha} * 100 \ [\,\%] \tag{4.7}$$

Donde V_b, V_R, N_b, M_p y α son el volumen de la solución alcalina consumido, el volumen del reactor, la concentración de la base (expresada en normalidad), la masa total de proteína [kg] y el grado promedio de disociación de los grupos $\alpha - NH_2$, respectivamente. El grado de disociación (α) se establece conforme:

$$\alpha = \frac{10^{\,pH-pk}}{1 + 10^{\,pH-pk}} \tag{4.8}$$

Donde pK es el promedio de los grupos de aminoácidos liberados durante la hidrólisis y puede determinarse a partir de un ensayo directo de los grupos amino liberados [Adler-Nissen et al., 1983], siendo valores de referencia 7.7 para reacciones a 25 [°C] y 7.1 para reacciones a 50 [°C]. El pH-Stat es el método más utilizado a nivel industrial [Aspevik et al., 2016, Rutherfurd, 2010], pero presenta desventajas como: i) la no determinación de los enlaces peptídicos en forma directa, ii) su aplicabilidad limitada a reacciones que operan en pH superior a 7, iii) su inviabilidad económica en procesos que operan a altos grados de hidrólisis (DH $\geq$ 30 [%]) y iv) su precisión dependiente del tipo de enzimas utilizada, del tamaño de los péptidos hidrolizados y de la temperatura de la reacción [Adler-Nissen et al., 1983, Nielsen et al., 2001].

Métodos colorimétricos

Los métodos colorimétricos (TNBS, OPA y formol) se basan en la unión de ciertos compuestos a los grupos α-amino liberados (Figura 4.10). La intensidad del color cuantificada mediante espectrofotometría en el intervalo de 340-420 [nm], es directamente proporcional al número de grupos amino libres. La absorbancia se convierte entonces en valores cuantitativos utilizando una curva estándar preparada con un aminoácido libre (serina, leucina, entre otros). El DH se calcula como la relación porcentual entre el valor del hidrolizado y el de la proteína total. Para obtener el total de los grupos amino libres, toda la proteína se digiere en aminoácidos y se utiliza para el ensayo colorimétrico. Los métodos colorimétricos más comunes incluyen el uso de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS - 420 [nm]) [Adler-Nissen, 1979] y el ortoftaldialdehído (OPA - [340 nm]) [Nielsen et al., 2001]. La concentración de producto y el DH por el método OPA pueden calcularse mediante:

$$P = \frac{ABS_{Muestras} - b}{m} * f_d \tag{4.9}$$

$$DH = \frac{P * V_R}{1000 * h_{tot} * N_b} \tag{4.10}$$

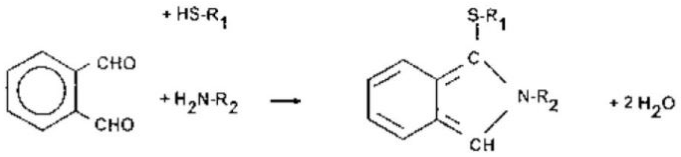
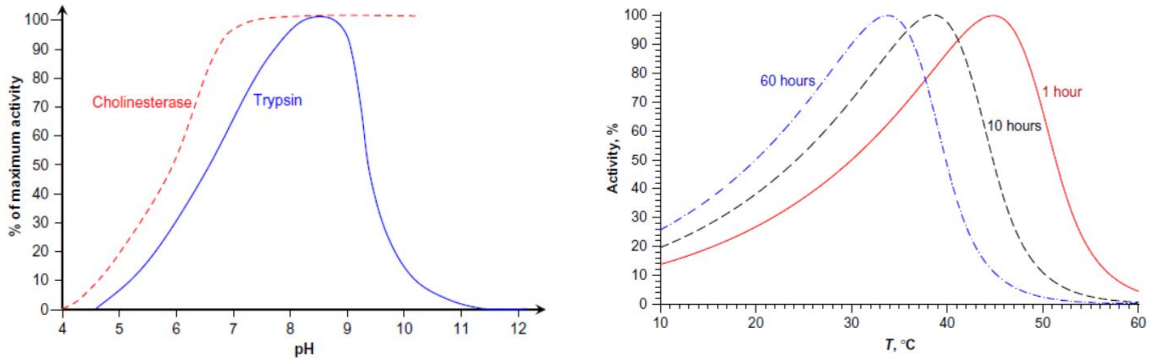


Figura 4.10: Reacción OPA. El reactivo OPA reacciona con grupos aminos primarios y con el compuesto-SH (Ditiotreitol, DTT), para formar un compuesto que absorberá la luz a 340 [nm] [Nielsen et al., 2001].

Donde ABS, f_d, b y m son las absorbancias de las muestras, el factor de dilución, el intercepto y la pendiente de la curva de calibración con serina (patrón), respectivamente. Los métodos colorimétricos presentan la desventaja de su dependencia de las mediciones off-line, requiriendo una alícuota de la mezcla reactiva a intervalos de tiempo predeterminados para monitorear la tasa catalítica. Esto implica que no se pueden establecer estrategias de control de pH utilizando esta medición, requiriendo de una metodología adicional que controle el pH del reactor.

4.5.5. Efecto del pH

Los sitios activos de las enzimas contienen grupos iónicos que presentan propiedades ácidas o básicas indispensables para la catálisis. Modificar el de pH del medio provoca cambios en i) la forma iónica del sitio activo, ii) la actividad de la enzima, iii) la forma tridimensional de la enzima y iv) la afinidad del complejo enzima sustrato. Afectando a la velocidad máxima de reacción (V_{max}), la constante de equilibrio (K_m) y la estabilidad de la enzima. La predicción teórica del pH óptimo (Figura 4.11A) requiere un conocimiento detallado de las características intrínsecas del sitio activo, motivo por el cual, la determinación suele hacerse por vía experimental. Tal como sucede con la temperatura, los valores extremos de pH (ácido o básico) pueden hacer que las enzimas se desnaturalicen.



(A) (B)

Figura 4.11: Actividad relativa como función del A) pH, B) temperatura [Liu, 2016].

4.5.6. Efecto de la temperatura

Las tasas específicas de una reacción catalizada por enzimas siempre aumentan con la temperatura (parte ascendente de las curvas de la Figura 4.11B). Esto obedece a la ecuación de Arrhenius según:

$$V_{max} = k_{cat}[E] \tag{4.11}$$

$$k_{cat} = k_0 exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \tag{4.12}$$

Donde V_{max}, k_{cat}, $[E]$, k_0, E_a, R y T son la velocidad máxima de reacción, la constante especifica de reacción catalítica, la concentración de enzima, el factor pre-exponencial, la energía de activación, la constante universal de los gases y la temperatura, respectivamente. Un fenómeno que actúa en paralelo y que es el causante de la perdida de actividad catalítica, se encuentra asociado a la inactivación térmica producto de la desnaturalización de la enzima (parte descendente de las curvas de la Figura 4.11B). Esto en términos diferenciales puede escribirse como:

$$\frac{dE}{dt} = -k_d[E] \tag{4.13}$$

Integrando la ecuación 4.13 tenemos:

$$[E] = [E_0]exp^{-k_d t} \tag{4.14}$$

Donde $[E_0]$ es la concentración inicial de la enzima y k_d es la constante de desnaturalización. Adicionalmente k_d también varía con la temperatura según:

$$k_d = k_{d_0} exp\left(\frac{-E_d}{RT}\right) \tag{4.15}$$

Donde E_d y k_{d_0} son la energía de activación de la inactivación térmica y el el factor pre-exponencial. Reemplazando 2.14 y 2.12 en 2.11, tenemos:

$$V_{max} = k_0[E_0] exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) exp^{-k_d t} \tag{4.16}$$

Evaluando la tasa máxima media para un tiempo de exposición total de t, tenemos:

$$\bar{V}_{max} = \frac{\int_0^t V_{max} dt}{t} = k_0[E_0] exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)\left(\frac{1 - exp^{-k_d t}}{t}\right) \tag{4.17}$$

Siendo la desnaturalización térmica mucho más rápida que la activación enzimática. Un aumento de la temperatura de 30 [°C] a 40 [°C] resulta en un aumento de 1,7 veces la actividad de las enzimas, pero un aumento de 45 veces en la desnaturalización de las enzimas [Liu, 2016].

4.5.7. Modelamiento de la hidrólisis enzimática

El modelamiento de la hidrólisis enzimática de proteínas permite conceptualizar los fenómenos implícitos en el sistema y establecer objetivos tecnológicos orientados al escalamiento, la optimización, el control y la rentabilidad del proceso. Por lo general, la hidrólisis del suero de leche ha sido catalogado como un bioproceso complejo de modelar, debido a [Martínez-araiza et al., 2012]:

- **La diversidad de los componentes de la reacción**: Los fragmentos de péptidos son productos y reactivos de la siguiente reacción.
- **La multiplicidad de tipos de reacción**: Un gran número de enlaces peptídicos se dividen en paralelo y en secuencia simultáneamente.
- **La complejidad de las redes de reacción**: La posibilidad de inhibición del sustrato, la diversidad del producto y las reacciones de inactivación de las enzimas durante la hidrólisis.
- **Las múltiples influencias ambientales**: Entre las que se cuentan el pH, la temperatura, la fuerza iónica, y la presión.

Estos efectos i) dificultan la interpretación de los resultados experimentales mediante ecuaciones cinéticas simples (primer, segundo o tercer orden), ii) generan la deducción de diferentes modelos que pueden ajustarse a un set de datos experimentales en particular, pero que no permiten realizar inferencias mecanicistas del sistema reactivo y iii) reducen la información disponible para identificar los diferentes parámetros cinéticos que se plantean en los modelos.

Por lo anterior, diferentes enfoques de modelamiento han sido descritos ampliamente en la literatura, generalmente fundamentados en modificaciones de la cinética plantada originalmente en 1913 por Leonor Michaelis y Maud Menten (ecuación 4.18, siendo K_m la constante de disociación del complejo enzima sustrato) [Johnson & Goody, 2011]. [Moreno & Cuadrado, 1993] fundamentaron un análisis mecanísmico que finalizó con la postulación de un modelo logarítmico de dos parámetros (a, b) que describe el comportamiento del producto de la reacción como función del tiempo de operación en un reactor batch (ecuación 4.19). [Sousa et al., 2004] al estudiar la catálisis heterogénea de las proteínas de suero de leche con Alcalase®, identificó la existencia de un parámetro adicional que complementaba la ecuación de Michaelis-Menten, denotando este la existencia de inhibición por producto dentro del mecanismo de reacción. [Wei & Zhimin, 2006] detallaron un sistema afectado por la inactivación enzimática y las reacciones de inhibición (sustrato y/o producto), ampliando y generalizando el análisis originalmente descrito por Marquez y Fernandez.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \tag{4.18}$$

$$\frac{d(DH)}{dt} = aS_0 exp(-b(DH)) \tag{4.19}$$

Por otra parte, [Valencia et al., 2015] propusieron que las constantes de inhibición por producto implícitas en el modelo modificado de Michaelis-Menten (ecuación 4.20), podrían ser una función lineal de la conversión de la reacción (ecuación 4.20). Esta hipótesis mejoró considerablemente el ajuste del modelo a los datos experimentales de la hidrólisis enzimática de proteínas de musculo de salmón con Alcalase® (Figura 4.12), incluso a diferentes temperaturas de operación en un reactor batch (ecuación 4.21).

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{k_{cat} exp(-k_d t)[S]E_0}{K_m(1 + \frac{P}{K_1}) + [S](1 + \frac{P}{K_2})} \tag{4.20}$$

$$K_i = K_{i,0} + bnX \tag{4.21}$$

$$b_n = MT + N \tag{4.22}$$

Donde P, K_1, K_2, X, $K_{i,0}$, b_n, M y N, son la concentración de producto, la constante competitiva de inhibición, la constante no competitiva, la conversión y los parámetros de ajuste lineal, respectivamente. Un estudio anterior de [Valencia et al., 2014] había dilucidado que la inhibición causada por los productos de la hidrólisis enzimática de proteínas resultaba en la disminución notable y progresiva de la velocidad de reacción. Esta investigación explicó el fundamento de la forma clásica de la curva de hidrólisis enzimática de proteínas y permitió establecer inferencias tecnológicas para reducir el efecto de los inhibidores (productos de la reacción) utilizando un reactores de membrana (Figura 4.13). Lo que podría tener una repercusión significativa en la productividad total del proceso.

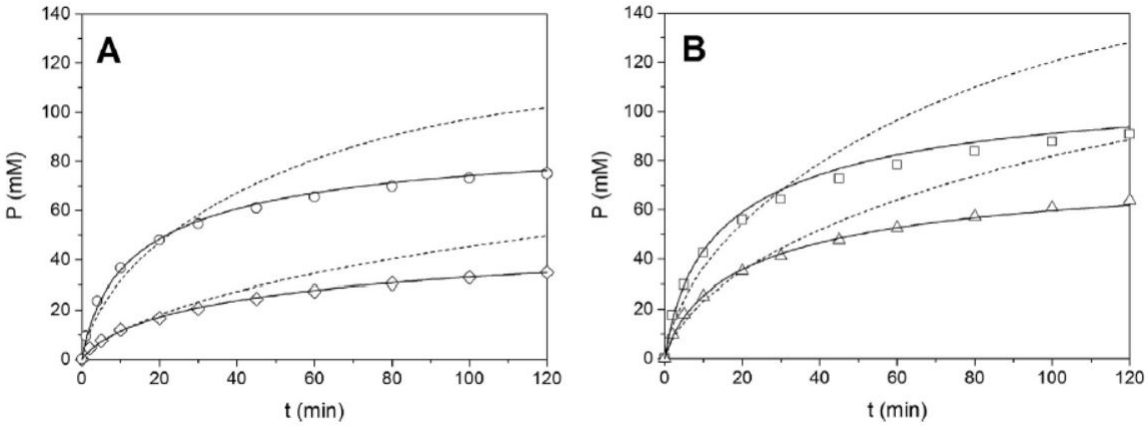


Figura 4.12: Curvas de hidrólisis experimentales (puntos) y predicciones del modelo con valores de constantes de inhibición fijas (líneas discontinuas) y constantes de inhibición variables (líneas continuas). Condiciones de operación (S_0, E_0 y T) A: 110 [mM], 1,7 [g/L], 60 [°C] (círculos); 77 [mM], 0,83 [g/L], 44 [°C] (diamantes); B: 143 [mM], 1,7 [g/L], 50 [°C] (triángulos); 143 [mM], 2,60 [g/L], 56 [°C] (cuadrados) [Valencia et al., 2015].

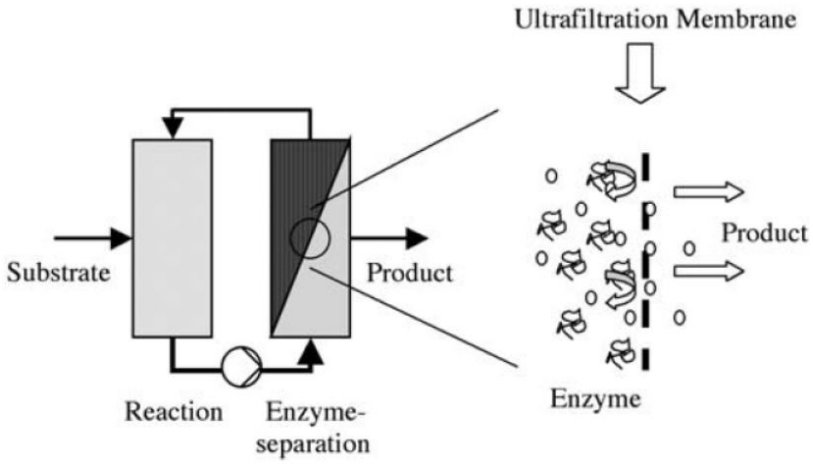


Figura 4.13: Concepto esquemático del REM [Wöltinger et al., 2005].

4.6. Reactores de membrana

La integración de una membrana en el proceso reactivo introduce una complejidad adicional en el diseño del reactor, ya que las membranas suelen tener un alto costo y fragilidad. Por consiguiente, algoritmos de control rigurosos son implementados para establecer las regiones de operación en donde la temperatura, el pH y el gradiente de presión (*upstream* y *downstream*) evitan tensiones térmicas y mecánicas excesivas [De Falco et al., 2011]. Los reactores de membrana se encuentran clasificados en tres tipos [Caro, 2008]:

- **Extractores**: Eliminación selectiva de uno o más productos del reactor, promoviendo así la reacción y desplazando el equilibrio termodinámico (favorable para reacciones limitadas reversibles).
- **Distribuidores**: Distribución de uno o más reactantes a lo largo del entorno de reacción para asegurar reacciones más uniformes y evitar los puntos fríos y calientes.
- **Contactores**: Instalación de una membrana catalítica para mejorar el contacto de los reactantes, incrementando así la actividad del catalizador (favorables para aumentar la selectividad del proceso).

La Figura 4.14 presenta los diagramas de cada una de las diferentes configuraciones y algunos ejemplos de las reacciones reversibles e irreversibles que se ven favorecidas con cada modalidad de operación. El equipo en donde la membrana esta ensamblada directamente en el ambiente reactivo es denominado reactor de membrana integrada (RMI). Cuando el proceso se realiza en equipos independientes para la reacción y la separación, es denominado reactor de membrana escalonado (RMS) [Wöltinger et al., 2005]. Desde el punto de vista teórico, se necesita un numero infinito de reactores RMS acoplados en serie para obtener la misma conversión de una unidad RMI en las

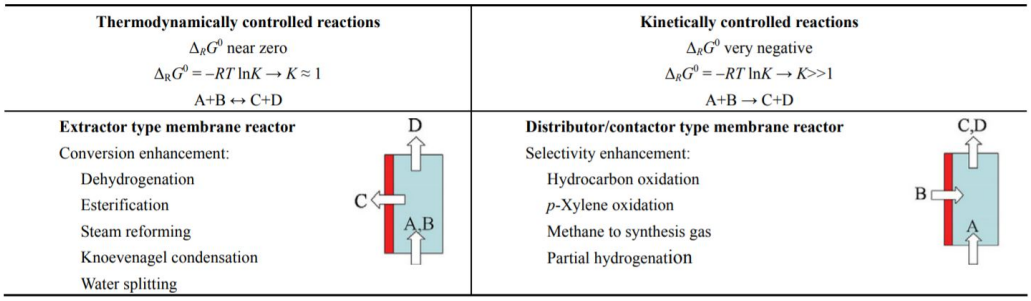


Figura 4.14: Clasificación de los reactores de membrana. A) Modalidad extractor, B) Modalidad distribuidor [Caro, 2008].

mismas condiciones (T, P, pH y S_0). Análogo a lo que sucede con las operaciones batch y continuas tradicionales. Sin embargo, los RMS pueden analizarse de forma independiente y optimizarse por separado, aumentando tanto la conversión de los reactantes como la estabilidad y vida útil de la membrana, siendo una tecnología adecuada y fiable para diferentes aplicaciones industriales [De Falco et al., 2011].

4.6.1. Reactor enzimático de membrana

La hidrólisis enzimática de proteínas son tradicionalmente operadas en modalidad batch, dadas las altas tasas de conversión que estos pueden alcanzar. Sin embargo, existen varias desventajas asociadas a los altos costos de perdida del catalizador, energía y mano de obra requerida para su funcionamiento [Mannheim & Cheryan, 1990]. Debido a que la mayoría de las enzimas solubles presentan un peso molecular en el rango de 10-150 [kDa], las membranas de ultrafiltración que excluyen las macromoléculas en el rango de 1-500 [kDa], permiten i) separar los productos de reacción, ii) mantener altos rendimientos de hidrólisis y iii) reutilizar la enzimas en diferentes lotes de producción. En este sentido, los REM puede operarse en modalidad batch, semi-continua y continua bajo las siguientes denominaciones:

- ***Reactor enzimático de membrana cíclico por lotes (CBEMR)***: El proceso de reacción es completamente desacoplado al proceso de separación, con un proceso intermedio de inactivación térmica.
- ***Reactor enzimático de membrana semicontinuo (SCEMR)***: El proceso ocurre en simultaneo, pero con la concentración dinámica del concentrado en función del tiempo de reacción.
- ***Reactor enzimático de membrana continuo (CEMR)***: El proceso ocurre en simultaneo a volumen constante, con la incorporación de una corriente adicional que repone el flux que abandona el volumen de control. Esta adición de buffer o sustrato permite mantener una viscosidad constante en el concentrado a lo largo del proceso y mantener altas tasas de reacción.

Diferentes estudios han aplicado REM con ultrafiltración para la hidrólisis y separación de almidones, pectinas, péptidos, polimeros y proteínas [Barth et al.,

2015, Bouhallab et al., 1993, Bressollier et al., 1988, Guadix et al., 2006, Guadix et al., 2007, Hatzinikolaou et al., 2005, Lozano et al., 1990, Nakajima et al., 1992, Prieto et al., 2008, Prieto et al., 2010, Sirns & Cheryan, 1992]. En el caso de las proteínas de suero de leche, [Perea & Ugalde, 1996] operaron un CEMR por 7 [h], obteniendo una disminución progresiva de la conversión, debido a la inactivación enzimática y el *fouling* que presento la membrana de 10 [kDa] utilizada. [Hatzinikolaou et al., 2005] examinaron la hidrólisis de lactosa permeada de suero ácido con galactosidasa de una cepa silvestre de *Aspergillus niger*. Desarrollando un modelo matemático para la predicción del comportamiento de un proceso CEMR a escala de laboratorio con una membrana de UF de 30 [kDa], e investigando el efecto de los diversos parámetros del proceso sobre el rendimiento global del sistema. [Guadix et al., 2006] operaron un CEMR de 2 [L] con una membrana de ultrafiltración de 3 [kDa] a pH 8.5 y T 50 [°C], alcanzando un nivel de conversión estable del 80 [%] y un incremento lineal de la productividad después de 10 [h] de operación. [Guadix et al., 2007] estudiaron un CBEMR para la producción de hidrolizados de proteína de suero de leche con Subtilisina a 60 [°C], pH 8.5, grado de hidrólisis de 15 [%] y una membrana de polietersulfona de 8 [kDa]. Calculando el numero óptimo de reutilizaciones de la enzima (5 utilizaciones) y el porcentaje máximo de ahorro de esta (60 [%]). [Prieto et al., 2008] continuó el estudio anterior para la enzima Protex 6L de *Bacillus licheniformis*, encontrando ahorro de enzima del 44 [%] y 32 [%] en comparación con las operaciones batch tradicionales a 50 [°C] y 60 [°C], respectivamente. Finalmente, [Prieto et al., 2010] incorporaron a los estudios anteriores una perspectiva de operación no isotérmica (lote a lote), encontrando que el funcionamiento óptimo no isotérmico mejora en un 11 [%] el rendimiento de la enzima, en comparación con el funcionamiento isotérmico. La Figura 4.15 presenta el diagrama P&ID del CEMR implementado en escala laboratorio. Realizando un balance de masa en el reactor (R-101) tenemos:

$$\frac{dS}{dt} = F_1 + F_3 - F_2 = F_1 - F_4 \tag{4.23}$$

Siendo necesario para el sistema que los flujos volumétricos F_1 y F_4 sean iguales, con el objetivo de mantener un volumen constante dentro del reactor. En este sentido, la tasa de dilución (D), se define como:

$$D = \frac{F_1}{V} = \frac{F_4}{V} \tag{4.24}$$

Un análisis similar en términos de la concentración de enzima en el mismo volumen de control (R-101) es:

$$V\frac{dE_2}{dt} = F_3[E_3] - F_2[E_2] + Vr_d \tag{4.25}$$

Dado que $F_3 = F_2$ y suponiendo que $E_3 = E_2$, siendo $E_2 = E_0$ en $t = 0$, tenemos (para primer orden):

$$\frac{dE_2}{dt} = -k_d[E_2] \tag{4.26}$$

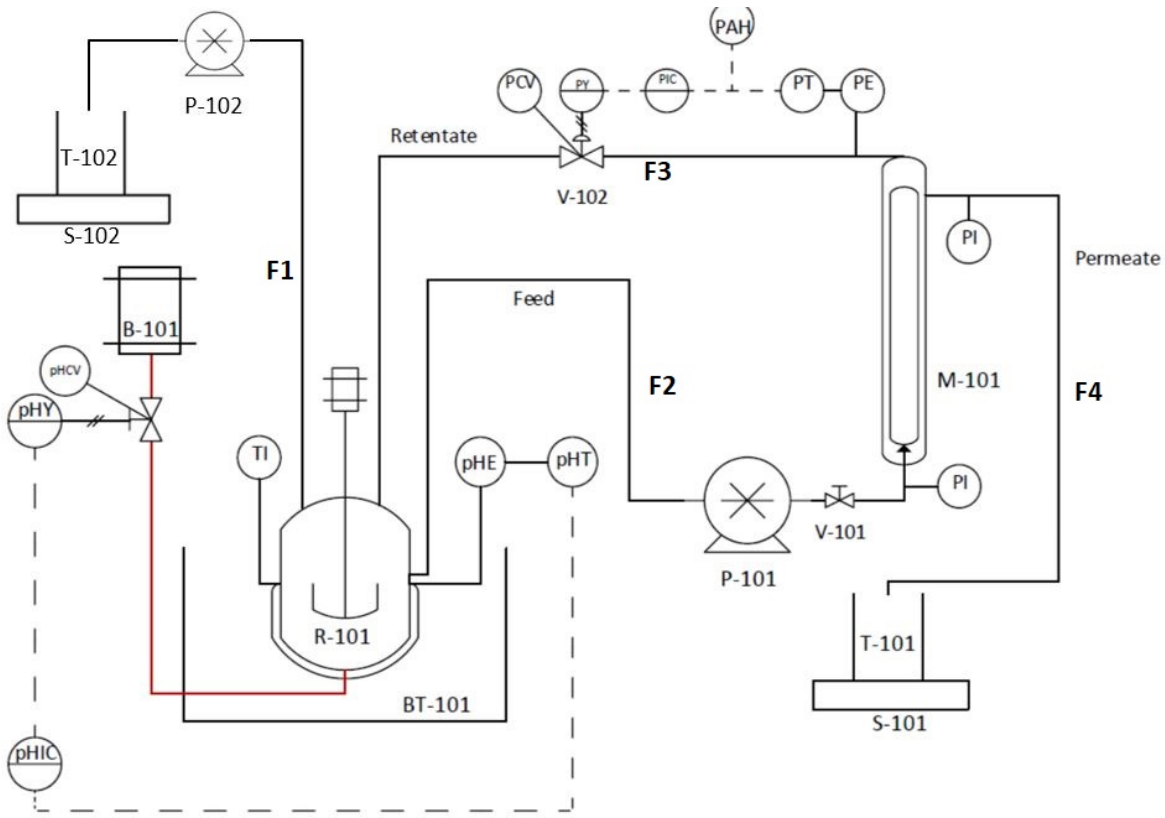


Figura 4.15: P&ID CEMR.

En el caso del producto tenemos:

$$V\frac{dP}{dt} = F_1[P_1] + F_3[P_3] - F_2[P_2] + V_r \tag{4.27}$$

Considerando inhibición competitiva y no competitiva por producto en el mecanismo de reacción (ecuación 4.20), para el termino de velocidad especifica de reacción (r), $P_1 = 0$, $P_2 = P_3$ y la relación de la ecuación 4.24, tenemos:

$$\frac{dP}{dt} = -D[P_2] + \frac{k_{cat}exp(-k_dt)[S]E_0}{K_m(1+\frac{P}{K_1}) + [S](1+\frac{P}{K_2})} \tag{4.28}$$

El desarrollo anteriormente descrito asume que: i) el volumen que se desplaza a través de la membrana de ultrafiltración (M-101) es despreciable en comparación con el volumen del reactor, ii) no hay ninguna perdida de enzima a través de la membrana de ultrafiltración y iii) que la inactivación térmica de la enzima es de primer orden. La ecuación diferencial ordinaria (EDO) 4.28, permite realizar el modelamiento de la hidrólisis enzimática en modo continuo, evaluando el desempeño del sistema conforme avanzan los diferentes lotes de sustrato alimentados al reactor.

Capítulo 5

Metodología

Para alcanzar los objetivos anteriormente descritos, la metodología será dividida en tres etapas. La primera consiste en el estudio del rendimiento de un CBEMR, para probar el efecto inhibidor de los diferentes tamaños de péptidos presentes en el APSL. La segunda en un SCEMR, para probar el efecto de la separación de los diferentes tamaños de péptidos producidos durante la hidrólisis de una solución de APSL. Finalmente, un CEMR que evaluará la productividad y el reciclaje de la enzima para los diferentes tamaños de péptidos inhibidores presentes en una solución de APSL. Para probar la hipótesis, se evaluará la velocidad de hidrólisis, la productividad total y la actividad de la enzima durante la operación de los reactores.

5.1. Primera etapa - CBEMR

La implementación de la primera etapa esta subdividida en dos secciones principales: la primera, correspondiente al estudio de la inhibición por producto obtenido desde el fraccionamiento por peso molecular de dos hidrolizados de APSL y la segunda, que concierne a la estimación empírica de los parámetros cinéticos del sistema reactivo llevada a cabo por la enzima substilisina, de nombre comercial Alcalase®(Novozymes).

5.1.1. Sección 1 - Experimentación

La Figura 5.1 presenta el diagrama conceptual de la sección 1. Inicialmente, se elaboraron hidrolizados con dos DH distintos (10 [%] y 20 [%]), cuyo DH final fue obtenido mediante la cuantificación de grupos α-amino a través de la técnica de medición con reactivo OPA. Luego, estos hidrolizados fueron separados en 4 fracciones mediante ultrafiltración, de acuerdo con los siguientes tamaños de membrana: $>$ a 10 [kDa], entre 5 y 10 [kDa], entre 1 y 5 [kDa] y $<$ a 1 [kDa]. La cantidad de grupos α-amino existentes se cuantificó mediante la técnica OPA, verificando los balances de masa y la caracterización de cada fracción. Después de esto, se agregaron volúmenes definidos de cada fracción por separado a la reacción de hidrólisis de una solución de

APSL con Alcalase®, para lograr identificar el efecto de la inhibición por producto de cada clase de tamaño en el fenómeno reactivo. Las curvas obtenidas fueron comparadas con una hidrólisis control, la cual se hizo en las mismas condiciones que las anteriores, pero sin agregar ninguna concentración de inhibidor.

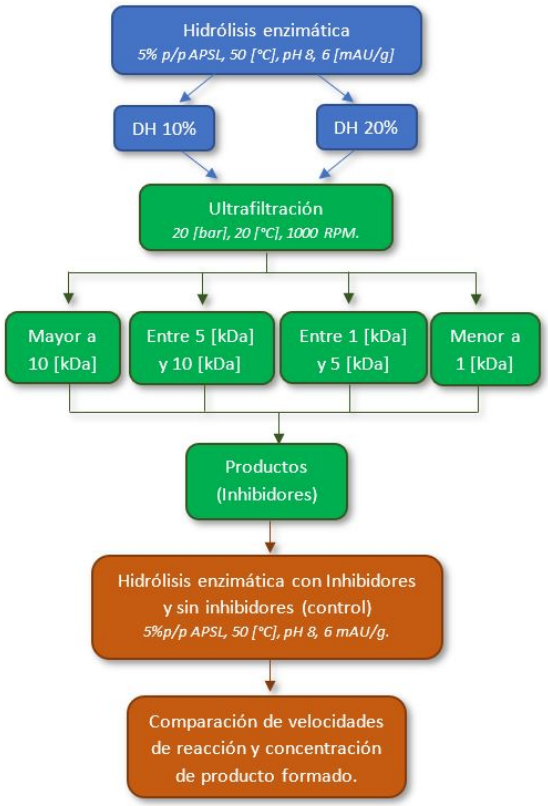


Figura 5.1: Metodología experimental CBEMR.

Ultrafiltración en módulo Batch (Celda de extremos cerrados)

Preliminarmente, se efectuó una prueba de filtrado con una solución de APSL para así determinar la presión máxima de trabajo. Se conectó un cilindro de nitrógeno a la celda batch para suministrar la presión deseada, mientras que se acopló un agitador magnético para producir un efecto de flujo cruzado en la superficie de la membrana. Las presiones testeadas fueron 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 [bar] y con el tamaño de membrana de 10 [kDa]. Una vez escogida la presión de operación se procedió al acondicionamiento de las membranas, lo cual se realizó con agua destilada como medio a filtrar hasta obtener un valor de flux constante. Las membranas fueron almacenadas refrigeradas en una solución de azida de sodio. En cada hidrolizado se agregó azida de sodio en concentración de 0,1 [%] p/p, garantizando la no proliferación bacteriana durante los procesos de filtración. Todas las soluciones fueron filtradas hasta alcanzar el 75 [%] del volumen total inicial en el permeado. Después de esto, se realizaron 4 lotes de filtración a través de la membrana de 10 [kDa], con una masa aproximada de 250

[g] en cada lote. Posteriormente, se mezclaron las soluciones del permeado obtenido de la filtración a 10 [kDa], filtrándolas a través de la membrana de 5 [kDa] en 3 lotes totales, de la misma masa. Finalmente, se juntó el permeado de las filtraciones de 5 [kDa] y se hizo pasar por la membrana de 1 [kDa] en dos lotes de la misma masa.

Balances de masa para las fracciones

Se realizó la cuantificación de los grupos α-amino a todas las fracciones obtenidas, para conocer la concentración de péptidos y/o aminoácidos presentes en cada solución. El balance parcial y global de las fracciones se ejecutó mediante las ecuaciones 5.1 y 5.2.

$$BP \Rightarrow [NH_2] * M_T = [NH_{2P}] * M_{TP} + [NH_{2R}] * M_{TR} \tag{5.1}$$

$$BG \Rightarrow [NH_{2i}] * M_{Hi} = [NH_{2_1}] * M_{P_1} + \sum_{i=1}^{n} [NH_{2i}] * M_{Ri} \tag{5.2}$$

Donde BP, BG, NH_2, M_T y M_{Hi} indican el balance global, parcial, la concentración de grupos α-amino, la masa total y la masa de hidrolizado, respectivamente (subíndices P, R y n indican permeado, concentrado y membranas 1, 5 y 10 [kDa], respectivamente).

5.1.2. Sección 2 - Calibración de parámetros

Experimentación y modelamiento

La segunda etapa buscó determinar los parámetros cinéticos y de equilibrio de V_{max}, K_m, $K_{1,0}$ y $K_{2,0}$, que corresponden a la velocidad máxima de reacción, la constante de equilibrio y las constantes de inhibición por producto a 3 temperaturas distintas (40 [°C], 50 [°C] y 60 [°C]). En el caso de V_{max} y K_m se realizaron hidrólisis cortas de $\approx$ 10 [min] variando la concentración inicial de sustrato. Tomando los datos de volumen añadido en los primeros 1.5 [min] de reacción y aplicando el método de las pendientes iniciales para obtener la velocidad inicial de reacción. Las condiciones experimentales de hidrólisis fueron: 0,3 [mAU/g] de enzima, pH 8, 40 [g] de masa total de solución, concentraciones de sustrato iniciales (en porcentaje en peso) 0,05 %; 0,075 %; 0,1 %; 0,2[%]; 0,3[%]; 0,5[%]; 0,7[%]; 1,0[%], 1,5[%], 2,0[%], concentración de NaOH de 0,05568 [N] para 40 [°C] y 0,05372 para 50 [°C] y 60 [°C]. Dado que los parámetros cinéticos y de equilibrio de la ecuación 4.20 son función de la temperatura, su comportamiento se modelo mediante las expresiones de Arrhenius (ecuación 5.3) y van't Hoff (ecuaciones 5.4 y 5.5) mediante:

$$V_{max} = A_1 exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \tag{5.3}$$

$$K_m = A_2 exp\left(\frac{\Delta H_0}{RT}\right) \tag{5.4}$$

$$K_{i,0} = A_i exp\left(\frac{\Delta H_{i,0}}{RT}\right) \tag{5.5}$$

Donde E_a es la energía de activación, R la constante de los gases ideales, T la temperatura, ΔH_0 la entalpía de reacción y A_i (A_1, A_2 y A_3) los factores preexponenciales. Para determinar los valores de $K_{i,0}$ y b_i, se realizaron hidrólisis con duplicado para S_0/K_m 10, 50, 100. Las condiciones de hidrólisis en todos los experimentos fueron de 0,3 [mAU/g] de enzima, 40 [g] de masa total de reacción, pH 8 y 2 [h] de reacción. Después de esto se aplicó el esquema gráfico tradicional postulado por Michaelis-Menten para identificar los parámetros V_{max} y K_m, correspondientes en términos operativos al valor máximo de velocidad de reacción alcanzado por el sistema reactivo y la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de esta, respectivamente. El ajuste de los parámetros se calculó a través de regresión no lineal de la velocidad inicial V_0 frente al tiempo de reacción, minimizando la suma cuadrática de las diferencias (SR^2) entre las velocidades iniciales experimentales y las predichas por el modelo del Michaelis – Menten (ecuación 4.18), de acuerdo a la función objetivo:

$$SR^2 = \sum_{i=1}^{n} (V_{exp,i} - V_{mod,i})^2 \tag{5.6}$$

El modelo de comportamiento del reactor por lotes para la hidrólisis enzimática de una solución de APSL considerado se describe en la ecuación 4.20. Este modelo se deduce de la ley de formación de producto, aplicando la hipótesis del estado pseudoestacionario a los complejos enzima – sustrato, enzima – producto y enzima – producto – sustrato. El modelo contempla la inhibición mixta por producto (competitiva y no competitiva), ya que esta es causada por la similitud (molecular) e interacción de este en los sitios activos de la enzima, ocasionando una merma del potencial catalítico al momento de reaccionar con el sustrato. Las constantes de inhibición mixta por producto se correlacionaron con la conversión de acuerdo con la ecuación 4.21. La EDO (ecuación 4.20) fue resuelta numéricamente por la rutina de integración ode15s de MATLAB® R2017a para las concentraciones adimensionales de sustrato ($C_{AS} = S_o/K_m$) 10, 50 y 100 en cada temperatura de trabajo, encontrando la aproximación infinitesimal a la solución analítica. A través del método de mínimos cuadrados, se estimaron los valores de K_i y b_n que minimizan la SR^2 entre los valores experimentales y predichos por el modelo de acuerdo con la función objetivo:

$$SR^2 = Min\left\{\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{n}\left(\frac{P_{i,j}^{mod} - P_{i,j}^{exp}}{\bar{\sigma}_i}\right)^2\right\} \tag{5.7}$$

Donde i, j y representan la corrida experimental, la EDO y la desviación estándar, respectivamente. El algoritmo de optimización global utilizado fue el de búsqueda dispersa "enhanced scatter search"(eSS), desarrollado por Egea et al. [Egea et al., 2007]

Análisis post/regresión

Una vez fueron encontrados los parámetros óptimos del sistema reactivo, se aplicaron 3 criterios paralelos e independientes para la selección de estos [Sánchez et al., 2014]. En primera instancia se realizó un test de identificabilidad, para determinar si los parámetros son linealmente independientes y cuentan con influencia en al menos una EDO. Por medio del coeficiente de correlación de Pearson (calculado para cada interacción entre parámetros en la matriz de sensibilidad), el test concluye que para valores de $|Cij| > 0.95$, uno de los parámetros debe fijarse dada su alta correlación e indeterminabilidad independiente. Después de esto se aplicó un test de sensibilidad, el cual dilucida la influencia dinámica y normalizada de cada parámetro en el modelo. Esto permite identificar las secciones experimentales de máxima información para la caracterización paramétrica y la sensibilidad normalizada de cada parámetro implícito en las EDO. El cálculo de las sensibilidades relativas facilita la comparación mediante:

$$\hat{G}_{i,j} = \frac{\theta j}{xi} \frac{\partial xi}{\partial \theta j} \tag{5.8}$$

Donde $\hat{G}$, θ y x, son los coeficientes de sensibilidad paramétrica, los parámetros del modelo y las variables independientes de las EDO, respectivamente. La puntuación normalizada de la sensibilidad paramétrica sobre cada variable se calculó según la metodología propuesta por Hao et al. 2006 [Hao et al., 2006], donde un parámetro por debajo de 0.01 en el puntaje de sensibilidad debe ser fijado. La sensibilidad dinámica relativa se calculó almacenando los resultados de la matriz de sensibilidad para cada uno de los tiempos experimentales. Finalmente, se calcularon los intervalos de confianza (CI) de los parámetros estadísticamente diferentes de cero (ecuación 5.11), cerrando así un análisis robusto sobre el sistema EDO y sus parámetros.

$$CI_j = [\hat{\theta}_j \pm 1.96\sigma_j] \tag{5.9}$$

$$\sigma_j^2 = FIM_{jj}^{-1} \tag{5.10}$$

$$FIM = G_I^T Q_I G_I \tag{5.11}$$

Donde σ_j, Q_I y G_I^T son la desviación típica del parámetro calculada utilizando la matriz de información de Fisher (FIM), la matriz de ponderación construida como la matriz de covarianza del error de medición inversa (que asume ruido blanco y no correlacionado) y la matriz de sensibilidad de las mediciones, respectivamente.

5.2. Segunda etapa - SCEMR

5.2.1. Experimentación

Esta etapa correspondió al estudio del efecto de la separación de los productos de hidrólisis enzimática de proteínas de una solución de APSL mediante UF sobre la productividad de un SCEMR (Figura 5.2). Inicialmente, se caracterizaron las membranas de UF a diferentes presiones transmembrana (PTM) para determinar la presión de operación. Después de esto se acoplaron al RMS diferentes membranas de UF para para determinar la productividad y la actividad relativa en cada escenario. Las curvas obtenidas fueron comparadas con una hidrólisis control, la cual se realizó en las mismas condiciones que las anteriores, pero con la válvula de flujo de permeado cerrada. Finalmente, La cantidad de grupos α-amino liberados se cuantificó mediante la técnica OPA (verificando los balances de masa y la caracterización de cada fracción) y la actividad proteolítica por medio de un método colorimétrico con azocaseína [Charney & Tomarelli, 1947].

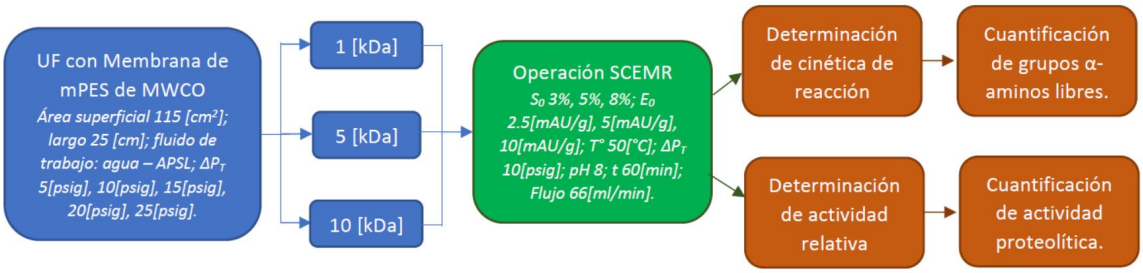


Figura 5.2: Metodología experimental SCEMR.

Caracterización Membranas Flujo Tangencial

Para determinar la presión de operación se efectuó una prueba de filtrado en lazo cerrado a distintas PTM con H_2O desionizada y una solución de APSL. Esto se consiguió identificando gráficamente la zona lineal y no lineal existente entre el flux y la PTM. Las presiones testeadas fueron 5, 10, 15, 20, 25 y 28 [psig] para las membranas de NMWCO 10 [kDa], 5 [kDa] y 1 [kDa]. Una vez seleccionada la presión de operación se procedió al acondicionamiento de las membranas, lo cual se realizó con H_2O desionizada como medio a filtrar. El acondicionamiento se realizó hasta que el flux alcanzo el estado estacionario y las membranas fueron almacenadas refrigeradas en H_2O desionizada.

Diseño de experimentos

Para eliminar la mayor parte de la variación natural y aumentar la sensibilidad de los experimentos, se eligieron las unidades experimentales de tal forma que el estudio fuera lo más homogéneo y generalizable posible. En términos matemáticos esto reduce la varianza, el error experimental y aumenta la potencia para detectar los efectos de los factores de cada tratamiento [Lawson, 2014]. El diseño de bloque completo

aleatorizado (RCB) contempla unidades experimentales en donde los bloques son lo más similares posible, y los grupos de unidades experimentales varían lo suficiente de un bloque a otro como para permitir sacar conclusiones generales de los diferentes tratamientos. El estudio del SCEMR contemplo tres factores diferentes independientes con un tratamiento de tres niveles, con el objetivo de dilucidar el efecto generado en la productividad total proceso y la actividad específica. Estos son:

- **RCB factor 1**: Concentración de sustrato (3 [%] p/p, 5 [%] p/p, 8 [%] p/p).
- **RCB factor 2**: Concentración de enzima (2.5 [mAU/g], 5 [mAU/g], 10 [mAU/g]).
- **RCB factor 3**: Volumen del reactor (0.2 [L], 0.4 [L], 1 [L]).

Dado que los bloques deben ser heterogéneos entre sí, pero homogéneos en su interior, fueron conformados por 4 variables categóricas compuestas por el control de cada tratamiento y las diferentes membranas a utilizar (10 [kDa], 5 [kDa] y 1 [kDa]). Para cada factor de tratamiento de 3 niveles (t) y 4 bloques (b) 2 réplicas, existen 24 unidades experimentales (t*b*r) que fueron consideras.

Tabla 5.1: **RCB** para todos los factores independientes (F=Factor y n=Nivel).

Experimento	**Bloque**	**F_1 (n)**	**F_2 (n)**	**F_3 (n)**
1	Control	3	2	1
2		2	1	2
3		1	3	3
4	1 [kDa]	2	3	3
5		1	2	1
6		3	1	2
7	5 [kDa]	3	1	2
8		1	3	3
9		2	2	1
10	10 [kDa]	2	1	2
11		1	3	3
12		3	2	1

Finalmente, para asegurar la aleatorización de cada tratamiento, se utilizó el método desarrollado por [de Mendiburu, 2019] implementado en R 3.6.0 mediante el paquete agricolae (función design.rcbd), obteniendo los resultados de la Tabla 5.1. Las experiencias de cada factor consideraron los niveles medios constantes de los otros factores, con el objetivo de evitar efectos de interacción entre los mismos. En el caso de los factores 1 y 2, se consideró el nivel 1 del factor 3 (V_R = 200 [mL]), con el propósito de maximizar el efecto de las variables de respuesta.

Puesta en marcha de la modalidad RMS

El montaje del SCEMR en modalidad RMS consideró el diagrama experimental de la Figura 4.15 (bomba peristáltica P-102 apagada) con membranas de fibra hueca

mPES Spectrum® de flujo tangencial, área superficial de 115 [cm^2] y largo total de 25 [cm]. La temperatura (50 [°C]), el pH (8.0), la PTM (10 [psig]), el flujo de alimentación al módulo de UF (66 [mL/min]) y el tiempo de reacción (1 [h]), fueron bloqueados para eliminar su variabilidad en el proceso. El pH se mantuvo constante por medio de un auto-titulador Mettler Toledo T50 utilizando NaOH como titulante a una concentración aproximada de 3 [N]. La temperatura fue regulada por un baño termorregulado que aseguraba la homogeneidad térmica en el reactor y en la membrana de UF. La PTM se mantuvo en el set point por medio de una válvula de control automática de contrapresión y el permeado fue masado en línea por medio de una balanza analítica (Figura 4.15 - S-101). El flujo de alimentación al módulo de UF fue regulado por la bomba peristáltica P-101 de la Figura 4.15. La reacción inició en el momento en que la primera gota de permeado salió de la línea que la transporta al recipiente de almacenamiento (Figura 4.15 - T-101). La toma de muestras se realizó en los tiempos 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 [min] para seguir la cinética de reacción, midiendo adicionalmente en el tiempo 60 [min] la concentración del permeado. Después de cada experimento las membranas fueron lavadas con Ultrasil™11 a una concentración de 0.5 [%] p/p y 50 [°C], hasta que se restableció aproximadamente el 90 [%] del flux original. Cuando esta condición no fue alcanzada, la membrana fue reemplazada por una nueva. Todas las membranas fueron testeadas previo a cada experimento, como lo indica el protocolo de test de integridad en el manual del equipo KrosFlo® KR2i Tangential Flow Filtration (TFF) System, para detectar fugas y defectos de la membrana que pueden comprometer la retención del producto por el sistema de UF.

Balance de masa

La cuantificación de los grupos α-amino se realizó para conocer la concentración de péptidos y/o aminoácidos presentes en cada concentrado y permeado. El balance de masa (BM) de cada operación se calculó para el tiempo final de reacción según:

$$P = [NH_{2P}] * M_{TP} + [NH_{2R}] * M_{TR} \tag{5.12}$$

Donde P es el total de moles de producto generado. La ecuación 5.12 asume que la densidad de la solución de APSL se mantiene en 1 [g/mL] conforme avanza el proceso de separación-reacción. La productividad total instantánea (Q) fue calculada según la ecuación 5.14.

$$Q = \frac{P}{t} \tag{5.13}$$

Siendo t el tiempo total de reacción. La actividad relativa (A_R) fue calculada normalizando la actividad de cada experimento (A_i) por la actividad de la enzima en condiciones no reactivas (A_{NR}), según:

$$A_R = \frac{A_i}{A_{NR}} \tag{5.14}$$

5.3. Tercera etapa - CEMR

La tercera etapa buscó determinar le eficiencia del CEMR en las modalidades diafiltración y fed-batch, manteniendo constantes los niveles medios de los factores del SCEMR, la temperatura, el pH y la PTM de la operación semicontinua (Figura 5.3).

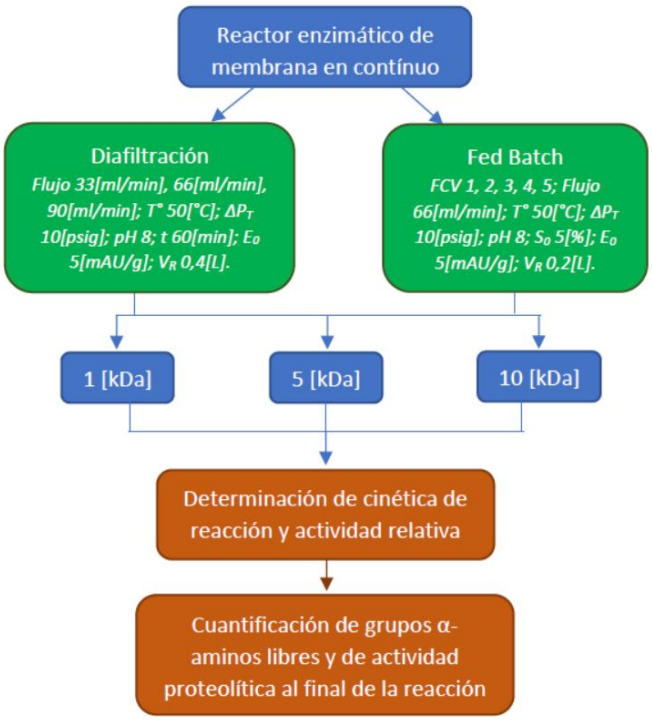


Figura 5.3: Metodología experimental CEMR.

La solución alimentada en la diafiltración fue agua desionizada y en el caso del fed-batch fue una solución de APSL a pH 8 y una concentración de 5 [%] p/p. En la diafiltración, los 3 NMWCO caracterizados en el proceso semicontinuo se expusieron a diferentes flujos de alimentación al módulo de UF (33 [mL/min], 66 [mL/min], 90 [mL/min), utilizando el diseño experimental planteado en el escenario del RCB F_3 con los objetivos de i) identificar el flujo que permite obtener la mayor productividad, ii) evidenciar si existe algún efecto en la perdida de actividad relativa de la enzima por cuenta del esfuerzo de corte que produce la bomba de alimentación al modulo de UF y iii) eliminar el efecto que se produce con la concentración del concentrado en la superficie de la membrana (polarización por concentración). El proceso fed-batch se evaluó hasta que se alcanzó un factor de concentración volumétrico (FCV) de 6 (ecuación 5.15), ya que el *fouling* de las membranas de 1 [kDa] y 5 [kDa] impidió

continuar la operación. La ecuación 5.16 presenta a la tasa de concentración del concentrado, que puede definirse como la razón entre el flux promedio del concentrado ($\bar{F}$) y el volumen del reactor V_R.

$$FCV = 1 + \frac{V_P}{V_R} \tag{5.15}$$

$$TCC = \frac{\bar{F}}{V_R} \tag{5.16}$$

Análisis de productividad

Es general, es difícil comparar el rendimiento relativo de los reactores batch con los CEMR, ya que el primero no es función del tiempo y requiere una adición de enzima por cada lote nuevo de producción (volumen del reactor), mientras que el rendimiento del CEMR es función del tiempo de reacción y sólo requiere de una carga inicial de enzima para su funcionamiento [De Eslie & Cheryan, 1981]. Un método útil diseñado para este propósito es el descrito por Cheryan et al. [Cheryan & David Deeslie, 1983], donde la productividad específica de cada reactor se define como la cantidad de producto por volumen de reemplazo y por cantidad de enzima. De esta manera, los reactores pueden compararse sobre la base del principal insumo de coste (enzima), parámetros de funcionamiento similares (sustitución de tiempo y/o volumen) y su producción [Mehaia et al., 1993]. En este sentido, la productividad de los reactores por lotes (Q_{batch}) se define como:

$$Q_{batch} = \frac{P}{E} \tag{5.17}$$

Para el reactor CEMR, la productividad esta expresada como la productividad instantánea (Q_I) y la productividad total acumulada (Q_{TA}), donde:

$$Q_I = \frac{\hat{P}Jt}{EV} = \frac{\hat{P}}{E}FCV \tag{5.18}$$

$$Q_{TA} = \sum_{i=1}^{max_{(FCV)}} Q_I \tag{5.19}$$

Donde $\hat{P}$, J, t, E y V son la concentración de producto en el permeado, el flux, el tiempo, la concentración de enzima y el volumen del reactor, respectivamente. Q_{TA} se calcula sobre todos los períodos de tiempo considerados y sus unidades son moles del hidrolizado sobre actividad enzimática ($mmol_P/mAU_E$).

5.4. Materiales y equipos

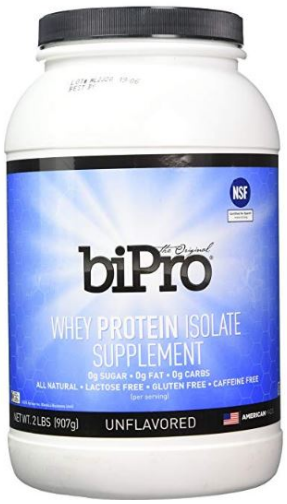
5.4.1. Primera etapa - CBEMR

Titulante

El titulante utilizado en las reacciones de hidrólisis fue NaOH de grado analítico distribuido por Winkler.

Sustrato - biPro WPI

El sustrato utilizado consistió en una solución de APSL de la marca biPro (USA - Figura 5.4), la cual proporciona proteínas aisladas sin concentraciones detectables de azúcar, carbohidratos, grasas, lactosa, gluten y cafeína. Purificado mediante un proceso de intercambio selectivo de iones, BiPro contiene todos los aminoácidos esenciales con 11 [%] de leucina y bajas cantidades de sodio y calcio.



(A)

Supplement Facts

Serving Size 1 scoop (22g)
Servings Per Container about 41

	Amount Per Serving	% Daily Value
Calories	80	
Calories from Fat	0	
Total Fat	0 g	0%*
Total Carbohydrate	0 g	0%*
Sugars	0 g	**
Protein	20 g	40%*
Calcium	10 mg	1%
Sodium	170 mg	7%
Leucine	2.5 g	**

*Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet.
**Daily Value not established.

(B)

Figura 5.4: Sustrato de estudio biPro, A) Envase y B) Tabla de contenido.

Enzima - Alcalase® Subtilisina A (E.C. 3.4.21.62)

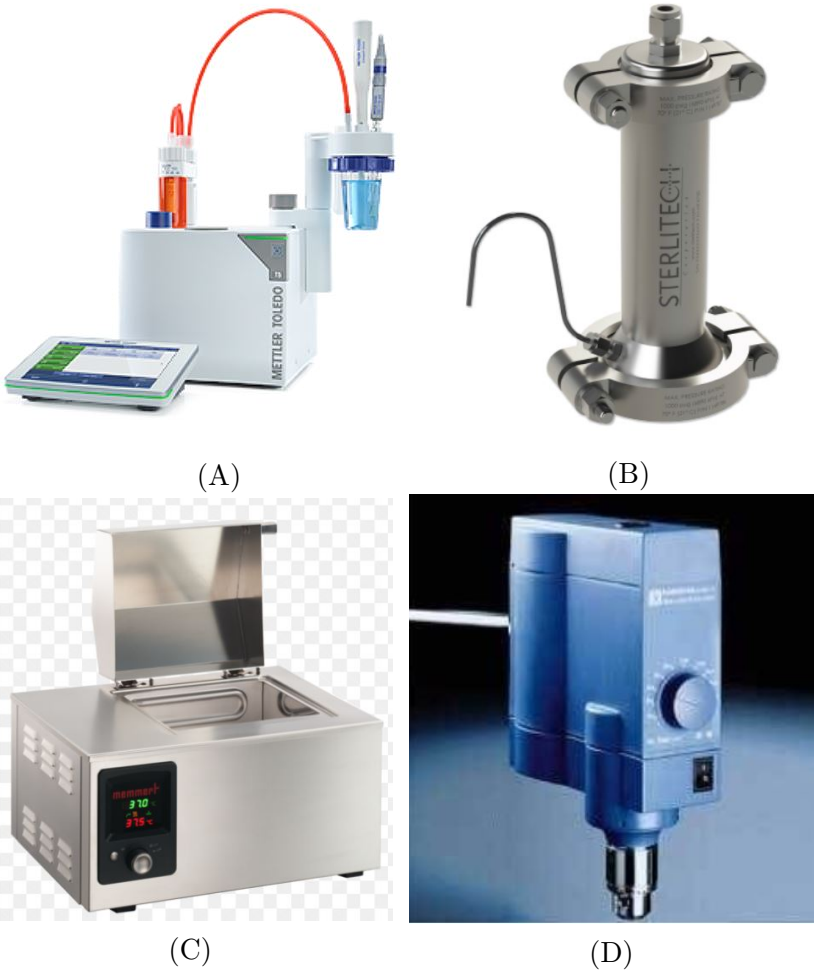
La enzima utilizada fue la Subtilisina A (E.C. 3.4.21.62) cuya fuente comercial es la Alcalase® 2.4 [L] FG, una endoproteasa de origen bacteriano que es producida por el Bacillus Licheniformis mediante fermentación sumergida y desarrollada por Novozymes. Su densidad es 1.25 [g/L] y su rango óptimo de temperatura y pH son 30-65 [°C] y 7-9, respectivamente. Actúa como una esterasa, permitiéndole catalizar la hidrólisis estereoselectiva de algunos ésteres. También hidroliza eficazmente los ésteres de aminoácidos que incluyen los ésteres de aminoácidos heterocíclicos. La proteasa comercial utilizada presenta una actividad de 3000 [mAU/g] y es un líquido de color café.

Autotitulador Mettler Toledo T50

El autotitulador utilizado fue un Mettler Toledo T50 (Figura 5.5A) cuyas especificaciones más relevantes se listan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Especificaciones técnicas Autotitulador Mettler Toledo T50.

Parámetro	Valor
Rango de medición de potenciómetro	± 2000 [mV]
Rango de medición de termocupla	-20 [°C] a 130 [°C]
Volumen de bureta	20 [mL]
Resolución de bureta	0.5 [μL]



(A) (B)

(C) (D)

Figura 5.5: Equipos del laboratorio de Biocatálisis. A) Mettler Toledo T50, B) Stirred Cell HP4750, C) Memmert WNB 7 y D) IKA Eurostar EURO-ST P CV.

Stirred Cell HP4750 Sterlitech Corporation

La celda Sterlitech HP4750 (Figura 5.5B) es una celda de extremos cerrados agitada de acero inoxidable (316L) y alta presión (69 [bar]) ideal para UF. Las especifi-

caciones más relevantes se listan en la Tabla 5.3:

Tabla 5.3: Especificaciones técnicas Autotitulador Mettler Toledo T50.

Parámetro	Valor
Diámetro de membrana	4.7-4.9 [cm]
Área activa de membrana	14.6 [cm^2]
Volumen de proceso	3 [L]
Resolución de bureta	0.5 [μL]
Presión máxima	69 [bar] (1000 [psig])
Temperatura máxima	121 [°C] a 55 [bar]
Diámetro de la celda	5.1 [cm]

Las Figuras 5.5 C-D presenta el equipo auxiliar utilizado para inactivar la enzima (Memmert WNB 7) y homogeneizar el sistema (IKA Eurostar EURO-ST P CV). La temperatura del proceso se mantuvo con el equipo Thermo Hake SC 100 y para centrifugar las muestras (análisis de actividad) se utilizó el equipo Prism C2500. El espectrofotómetro utilizado fue un Hewlett Packard 8453 (celdas de vidrio) y el equipo para congelar las muestras fue un congelador Whirlpool WVT10.

5.4.2. Segunda etapa y tercera etapa - SCEMR y CEMR

Spectrum™ KrosFlo™ Research 2i TFF System

El equipo de Filtración de Flujo Tangencial KR2i (Figura 5.6) es un sistema de bombeo automatizado ideal para procesos de filtración continua que van desde 1 [mL] a 10 [L] de volumen de trabajo. El sistema consiste en 2 bombas peristálticas digitales y una válvula de control, que mantienen flux en el rango de 0,2 [LPM] a 2,9 [LPM] por medio del masado en línea que realizan 2 balanzas conectadas al sistema. El equipo fue operado con membranas MidiKros de mPES (Polieter sulfona modificada) y las especificaciones más relevantes se listan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Especificaciones técnicas Spectrum™ KR2i.

Parámetro	Valor
Velocidad de alimentación al módulo de UF	0.1-600 [rpm]
Límites de presión de los sensores	-9.99 [psi] a 75 [psi]
Temperatura de operación	0-40 [°C]
Humedad	10-90 [%]
Presión máxima de operación de las membranas	30 [psig]
Tamaño de tubo de alimentación Masterflex	14 [L/S®]



Figura 5.6: Spectrum^{TM} KR2i.

Estrategias de control

El proceso de filtración utilizó a la PTM como variable controlada y al porcentaje de apertura de la válvula de retención como variable manipulada, en una estrategia de control proporcional-integral-derivativo (PID) implementada en el software automático del Spectrum^{TM} KrosFlo^{TM} Research 2i TFF System. La PTM varía en el tiempo producto del *fouling* en la superficie de la membrana y, por consiguiente, se mantiene constante disminuyendo el flux.

5.5. Métodos

A continuación, se detallan los métodos analíticos de cuantificación utilizados.

5.5.1. Concentración de producto - pH-Stat

Inicialmente, el sensor de pH del Mettler Toledo T50 fue calibrado con la rutina preestablecida por el fabricante con estándares de pH 7 y 10. Después de esto, el sensor y la termocupla se llevaron a la respectivas unidades experimentales para medir el punto de temperatura y pH deseado, previo al procedimiento reactivo. Una vez alcanzado el equilibrio de las condiciones requeridas para cada experimento, se agregó la enzima al biorreactor y se inició una rutina predefinida para mantener el pH en 8. La concentración de producto y el DH en los diferentes procesos de reacción-separación analizados en la primera etapa, fueron calculados mediante las ecuaciones 4.6 y 4.7, utilizando los parámetros listados en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5: Parámetros método pH-Stat y OPA.

Parámetro	**Valor**
α	0.81
h_{tot}	8.37 [mEq/$g_{proteína}$]

Con estos parámetros se puede calcular adicionalmente el volumen de titulante que debe ser añadido por el equipo para lograr un cierto DH predefinido.

5.5.2. Concentración de producto - OPA

El protocolo de análisis del método OPA [Nielsen et al., 2001] fundamentado en la sección 4.5.4, se detalla en el apéndice A.0.1. La concentración de producto y DH en las tres etapas se calculó mediante las ecuaciones 4.9 y 4.10, por medio lectura realizada en el espectrofotómetro a una absorbancia de 340 [nm].

5.5.3. Actividad enzimática

El protocolo de análisis del método de cuantificación de actividad proteolítica con azocaseína se detalla en el apéndice A.0.2. La actividad de la Subtilisina A fue determinada mediante la ecuación 5.20, por medio lectura realizada en el espectrofotómetro a una absorbancia de 430 [nm].

$$A = \frac{ABS_{Muestras} - b}{m} * f_d \tag{5.20}$$

Capítulo 6

Resultados y Discusión

6.1. Sección 1 - Experimentos CBEMR

6.1.1. Hidrólisis para filtración de extremos cerrados

La preparación de los hidrolizados de DH 10 [%] y 20 [%] se ejecutó disolviendo 50 [g] de APSL en 1 [L] de solución (concentración de 5 [%] p/p). En el caso del DH 10 [%], las condiciones reactivas de concentración de enzima, pH y temperatura fueron 3 [mAU/g], 8 y 50 [°C], respectivamente. El titulante fue NaOH con concentración 0.872 N. Para el DH 20 [%], las condiciones reactivas de concentración de enzima, pH y temperatura fueron 6 [mAU/g], 8 y 50 [°C]. El titulante fue NaOH con concentración igual a 1.625 N. Una vez terminada la hidrólisis enzimática, ambas soluciones fueron separadas en tubos de 50 [mL] y llevados a 85 [°C] en un baño termorregulado por 60 [min], asegurando la inactivación térmica de la enzima. El DH final fue determinado gracias a la cuantificación de grupos α-amino con la técnica OPA. El DH final de los hidrolizados obtenidos previo del proceso de UF se lista en la Tabla 6.1. Dado que los DH objetivo en los diseños preliminares eran 10 [%] y 20 [%], se observa un resultado acertado del proceso reactivo y de inactivación térmica previo a la cuantificación espectrofotométrica.

Tabla 6.1: Grado de hidrólisis final (técnica OPA).

P [mM]	**DH [%]**
41.0	9.8
75.8	19.6

6.1.2. Caracterización del perfil de distribución de tamaños del hidrolizado

La Figura 6.1 presenta el flux inicial (F_0) en función de la PTM para el agua y la solución de APSL en una membrana de 10 [kDa]. El intervalo de operación de

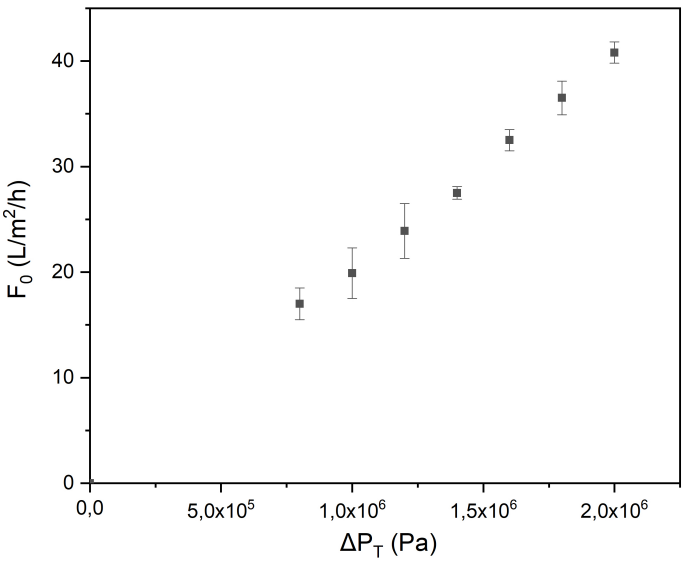


Figura 6.1: F_0 vs PTM en CBEMR para membrana de 10 [kDa]. Condiciones de operación: T = 20 [°C], pH = 8, t = 20 [min].

8-18 [bar], no se observó ningún comportamiento asintótico en este último, lo que indica que la operación CBEMR ocurre en la región controlada por la presión. Por consiguiente, para el intervalo de presiones investigado, se escogió como presión de trabajo 20 [bar], ya que presenta la mayor cantidad de masa filtrada en el menor tiempo de operación, sin sobrepasar los límites de ruptura de la membrana (30 [bar]). El modelo de la ecuación 6.1 desarrollado por Cheryan [Cheryan, 2018], permite calcular las resistencias debidas a la membrana limpia (R_M) y a la capa de polarización (R_G), respectivamente.

$$F_0 = \frac{PTM}{R_M + R_G} \tag{6.1}$$

EL parámetro R_M se calculó como la inversa de la pendiente de la recta que se ajusta al F_0 con agua desionizada (4.67e+13 $[m^{-1}]$), calculado a las mismas presiones que para la solución de APSL. R_G resultó de la diferencia entre la inversa de la pendiente de la línea recta que se ajusta al flux de la solución de APSL y R_M (1.31e+14 $[m^{-1}]$)[1]. La Figura 6.2 presenta los flux para los hidrolizados con DH 10 [%] y 20 [%] para todas las membranas analizadas. Se observa que para ambas condiciones, los mayores tiempos de filtrado fueron para las fracciones de 10 [kDa], seguidas por las de 1 [kDa] y 5 [kDa], respectivamente. En términos del caudal, se aprecia un comportamiento promedio constante para la fracción de 1 [kDa], con un decaimiento pronunciado en el caso de 5 [kDa] y 10 [kDa]. Comparando las fracciones de 10 [kDa] en ambos hidrolizados, vemos como existe un aumento en el tiempo de filtrado de aproximadamente 2 [h]; esto puede atribuirse en el caso del DH 10 [%] a que la

[1]La viscosidad del agua y de la solución de APSL para los cálculos fue de 0.001 [Pa*s], T = 20 [°C].

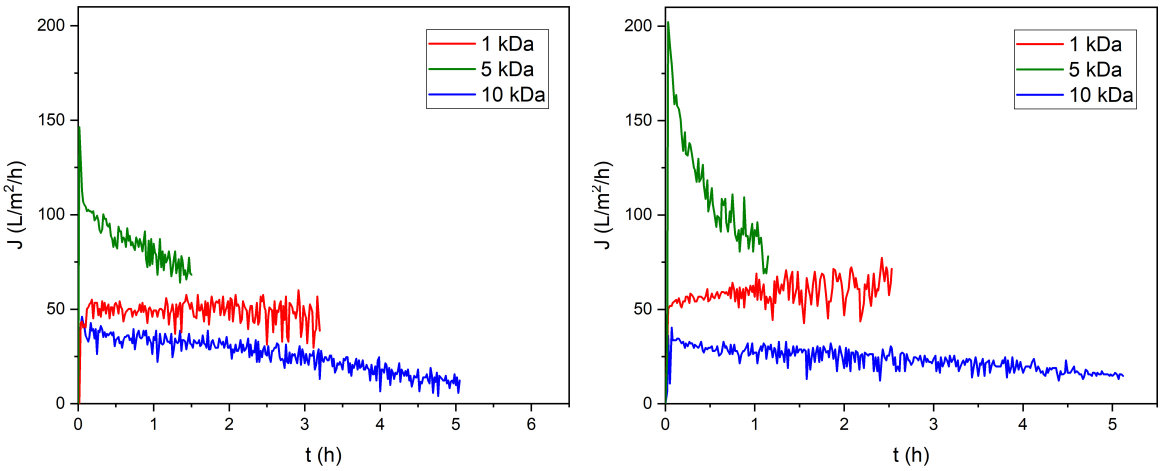


Figura 6.2: Curvas de progreso del flux vs tiempo para ultrafiltración batch a diferentes tamaños de membrana. A) DH 10 [%], B) DH 20 [%]. Condiciones de operación: T = 20 [°C], pH = 8. y ΔP_T = 20 [bar].

enzima corta el sustrato en péptidos mayores a 10 [kDa], pero estos siguen siendo lo suficientemente grandes como para no obstruir los poros de la membrana. Diferente situación a lo que sucede en el caso del DH 20 [%], en donde al parecer la concentración de péptidos menores a 10 [kDa] aumenta, saturando el flujo por la membrana y disminuyendo el flux. Finalmente, para los tamaños 1 [kDa] y 5 [kDa] el tiempo filtrado disminuyo en el DH 20 [%], esto podría deberse a que la enzima aumento la concentración de péptidos por debajo de 1 [kDa], disminuyendo la resistencia que generaban los péptidos de tamaño superior al de cada membrana y aumentando los flux de permeado.

Las Tablas 6.2 y 6.3 listan las masas, las concentraciones y el balance molar para las diferentes fracciones del hidrolizado, respectivamente. Dado que no se conoce la distribución de tamaño del sustrato y que por ende no se puede sustraer su efecto en cada fracción, el balance molar considera su aporte para todas las fracciones. Suponiendo que el hidrolizado presenta una densidad similar a la de la fase móvil (agua), el resultado de multiplicar la masa de cada hidrolizado por su concentración representa las moles de cada fracción. Al tratarse únicamente de una separación física, su sumatoria debe corresponderse con las moles obtenidas para el hidrolizado inicial. Se observa que para los dos casos estudiados los balances molares se cumplen con diferencias (Δ) inferiores al 6 [%], se atribuye esto los posibles remanentes enzimáticos que continuaron consumiendo el sustrato en los procesos de ultrafiltrado. En términos de la concentración, se observan incrementos de 13.4 [%], 49.76 [%], 65.24 [%] y 318.1 [%] para las fracciones mayores a 10 [kDa], 5 [kDa] – 10 [kDa], 1 [kDa] – 5 [kDa] y menores a 1 [kDa], respectivamente. Por consiguiente, aumentar el grado de hidrólisis triplica la concentración de las fracciones inferiores a 1 [kDa]; aumentando considerablemente las concentraciones de las clases de tamaño superiores a 1 [kDa], 5 [kDa] y, en menor medida las de 10 [kDa]. Esto se condice con el aumento de $\sim$ 1 [h]

en el tiempo de filtrado para la membrana de 10 [kDa], siendo levemente inferiores estos tiempos para las membranas de 5 [kDa] y 1 [kDa] en el hidrolizado de DH 20 [%].

Tabla 6.2: Balances molar DH 10 [%].

Fracción	**Masa [g]**	**Concentración [mM]**	**Moles [mmol]**
$\geq$ 10 [kDa]	238.3	291.5	69458.0
5 - 10 [kDa]	201.4	58.8	11839.8
1 - 5 [kDa]	125.0	23.3	2912.1
$\leq$ 1 [kDa]	435.3	2.4	1030.5
$\sum$	1000	N/A	85240.4
Inicial	1000	80.8	80736.5
Δ [%]	0	N/A	5.6

Tabla 6.3: Balances molar DH 20 [%].

Fracción	**Masa [g]**	**Concentración [mM]**	**Moles [mmol]**
$\geq$ 10 [kDa]	253.3	330.7	83753.8
5 - 10 [kDa]	183.8	88.0	16180.9
1 - 5 [kDa]	139.2	38.5	5359.2
$\leq$ 1 [kDa]	491.2	9.9	4867.2
$\sum$	1067.5	N/A	110161.0
Inicial	1021.2	112.0	114377.2
Δ [%]	4.3	N/A	3.7

6.1.3. Hidrólisis con inhibidor

Una vez caracterizadas las fracciones separadas en la ultrafiltración, estas fueron añadidas a los experimentos de hidrólisis. La cantidad de inhibidor añadido se calculó considerando agregar una concentración de 20 [mM] del hidrolizado inicial y el cálculo del volumen agregado de las distintas fracciones se realizó, de acuerdo con la proporción másica de cada fracción respecto al hidrolizado inicial; Esto quiere decir que: i) se fijó como parámetro la concentración del hidrolizado inicial, ii) se calculó la masa proporcional a añadir de esta solución y ya conociendo las masas obtenidas desde la separación de 1 [L] de hidrolizado (aproximado a 1 [kg]) en el módulo de ultrafiltración con las distintas membranas, iii) se realizó el cálculo de cuanta masa añadir para cada fracción.

Debido a que las fracciones utilizadas como inhibidor también tienen péptidos susceptibles a hidrólisis, se realizaron blancos de cada una de ellas bajo las mismas condiciones del experimento, detalladas a continuación: 5 [%] p/p de APSL, 6 [mAU/g] de enzima, 50 [°C] de temperatura, pH 8, masa total de 40 [g] y tiempo total de 1 [h]. La concentración de NaOH para los hidrolizados fue 0,87559 [N] para las hidrólisis con fracciones obtenidas desde el hidrolizado de DH 10 [%] y 0,03067

[N] para los blancos. Por otro lado, la concentración de NaOH para las hidrólisis con fracciones desde el hidrolizado de DH 20 [%] fue 0.92770 [N] y para los blancos 0,03067 [N]. Todos los experimentos fueron realizados en duplicado, y los resultados fueron contrastados con una hidrólisis control sin adición de inhibidor.

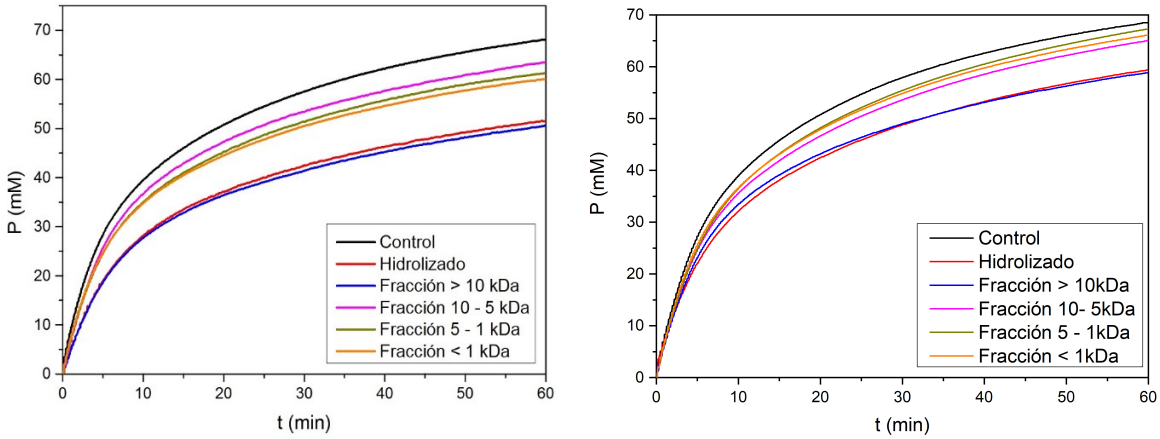
Finalmente, se realizó un experimento con el hidrolizado original como inhibidor. Esto se ejecutó "reconstruyéndolo" a partir de la proporción másica de cada fracción separada. Inicialmente, se calculó la masa a agregar de cada fracción considerando obtener 50 [g] de hidrolizado reconstruido. Luego, se agregó al experimento una cantidad definida, tal que la concentración del hidrolizado fuese de 20 [mM] en el volumen de reacción. Estos experimentos se realizaron en duplicado, y con la hidrólisis del blanco. Las masas de cada grado de hidrólisis obtenido se especifican en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4: Reconstrucción de hidrolizado original.

DH [%]	$\geq$ 10 [kDa] [g]	5-10 [kDa] [g]	5-1 [kDa] [g]	$\leq$ 1 [kDa] [g]
10	12.07	9.92	6.25	21.77
20	12.40	9.00	6.82	24.05

La Figura 6.3 presenta las curvas de progreso de hidrólisis enzimática para los DH analizados, con el efecto de inhibición causado por cada una de las fracciones ultrafiltradas. Los resultados mostraron que todas las fracciones generaron una disminución tanto de la velocidad inicial como de la extensión de la reacción, siendo mayor el efecto para el DH 10 [%] en todas las clases de tamaño y en el hidrolizado reconstruido (ver Tabla 6.5). En el caso del DH 10 [%], el mayor efecto inhibitorio de la fracción $\geq$ 10 [kDa] se explica porque esta fracción posee una concentración de péptidos de 291.5 [mM], representando el 81 [%] de todos los péptidos del hidrolizado, mientras que las fracciones restantes en orden descendente poseen el 14 [%], 3 [%] y 1 [%] de los péptidos, respectivamente. Algo similar sucede para el DH 20 [%], en donde la fracción $\geq$ 10 [kDa] representa el 76 [%] mientras que las fracciones restantes en orden descendente el 15 [%], 5 [%] y 4 [%] de los péptidos, respectivamente. En ambos escenarios, el experimento que presentó la menor concentración de producto al cabo de 1 [h] de reacción fue la fracción $\geq$ 10 [kDa] y el hidrolizado original. Esto indica que los péptidos de mayor tamaño tienen un efecto mayor en la inhibición, impidiendo la acción de la enzima sobre el sustrato. La presencia de cadenas largas de aminoácidos similares al sustrato podría generar un mayor número de interacciones moleculares con la enzima, disminuyendo la eficiencia del que el acople efectivo con el sustrato.

Para evaluar el efecto inhibitorio específico se calculó un índice de inhibición definido como la disminución de la eficiencia catalítica promedio ($\Delta\bar{E}C$) de cada fracción dividida por la concentración de péptidos en la fracción (ecuación 6.2). Los resultados indican (ver Tabla 6.5) que la fracción $\leq$ 1 [kDa] presenta el mayor índice de inhibición, ya que a pesar de su baja concentración en ambos casos de estudio, pudo lograr un efecto del 272 [%] para el DH de 10 [%] y de 26 [%] para DH 20 [%]. Por consiguiente, se concluye que la fracción predominante $\geq$ 10 [kDa] ejerció la mayor



(A) (B)

Figura 6.3: Curvas de progreso hidrólisis enzimática de proteínas de APSL 5 [%] p/p, 50 [°C], pH 8.0 y 6 [mAU/g] de Subtilisina A. Inhibidor preparado a una concentración de 20 [mM] para A) DH 10 [%] y B) DH 20 [%].

inhibición sobre la reacción de hidrólisis de proteínas. Sin embargo, el efecto inhibitorio específico fue significativa y progresivamente mayor en las fracciones de menor tamaño de péptidos.

$$I_i = \frac{\Delta \bar{E}C}{[P_{f_i}]} \tag{6.2}$$

Tabla 6.5: Perdida de velocidad inicial (PVI) e índice de inhibición (I_i).

	PVI [%]		I_i [%]	
Fracción	**DH 10** [%]	**DH 20** [%]	**DH 10** [%]	**DH 20** [%]
Hidrolizado original	35.82	18.72	–	–
$\geq$ 10 [kDa]	35.90	10.61	5.06	2.38
5 - 10 [kDa]	11.90	5.57	6.59	4.21
1 - 5 [kDa]	12.14	6.72	24.28	5.55
$\leq$ 1 [kDa]	11.83	1.94	272.06	26.05

6.1.4. Determinación de parámetros cinéticos

Parámetros V_{max} y K_m

La Figura 6.4 presenta las curvas de hidrólisis para las distintas concentraciones iniciales de sustrato en las 3 temperaturas analizadas. Se observa que a medida que aumenta la temperatura, una mayor concentración de producto resulta de la reacción para cada concentración inicial de sustrato. Esto da cuenta del incremento de la actividad proteolítica de la enzima, la cual repercute directamente en la generación de producto en el mismo intervalo de tiempo analizado. Por otra parte, se aprecia que

para las concentraciones iniciales de sustrato más bajas (0.05 [%], 0.075 y 0.1[%]), las curvas de reacción pierden rápidamente su linealidad (t $\geq$ 2 [min]), mientras que para las concentraciones iniciales de sustrato mayores (1 [%], 1.5 – 2.0 [%]) la relación es aproximadamente lineal en todo el intervalo de tiempo analizado. En el caso de las concentraciones iniciales de sustrato bajas, esto indica que la mayoría del sustrato es hidrolizado por la enzima al inicio de la reacción, quedando un remanente ínfimo no hidrolizable que rápidamente alcanza el estado estacionario. Para las concentraciones iniciales de sustrato altas, el comportamiento de las curvas denota una saturación completa de los sitios catalíticos de la enzima, resultado esto en curvas que se superponen para concentraciones iniciales de sustrato $\geq$ 0.7 [%]. Finalmente, se resalta que para las concentraciones iniciales de sustrato bajas existe una diferencia considerable entre las curvas de producto final en comparación con las concentración inicial de sustrato altas, esto se debe a la sensibilidad de la velocidad inicial, la cual tiene un mayor efecto en las reacciones con concentración inicial de sustrato bajas.

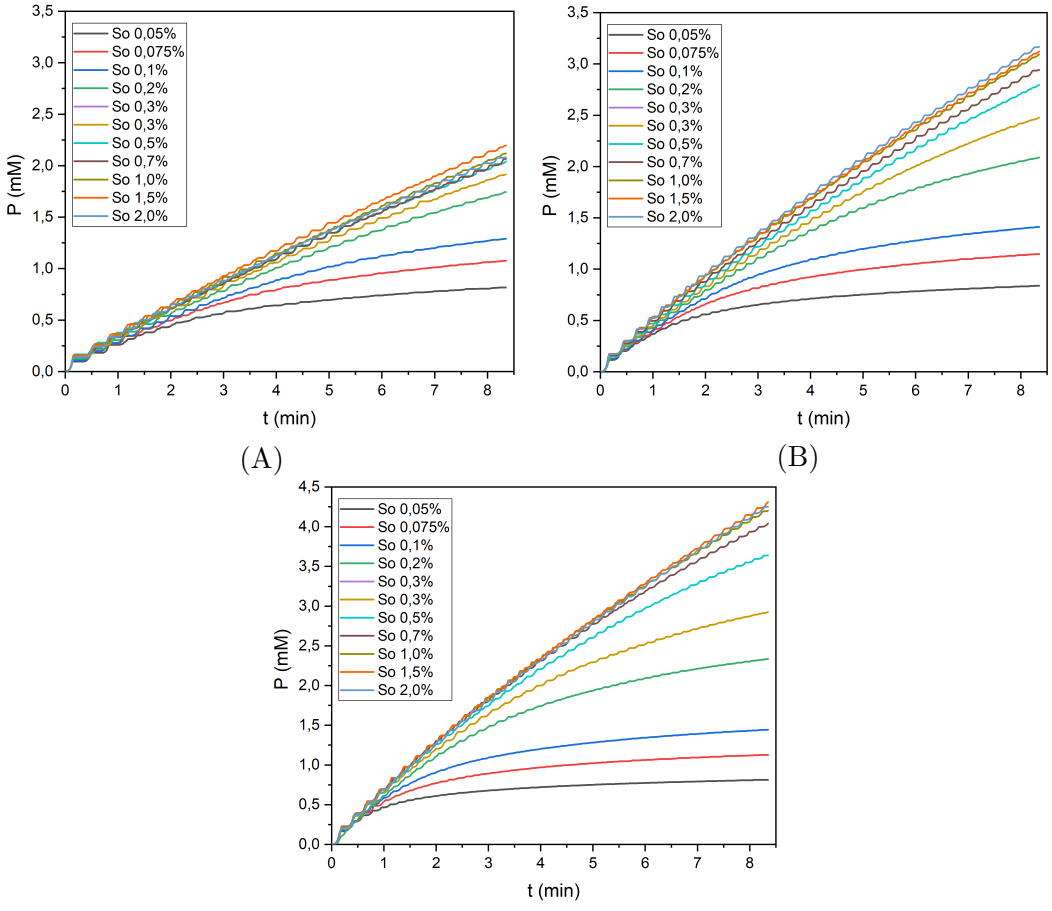


Figura 6.4: Curvas de producto vs tiempo para distintas concentraciones de sustrato inicial. A) 40 [°C], B) 50 [°C] y C) 60 [°C].

El resultado de graficar las velocidades iniciales como función de las concentraciones iniciales de sustrato se presenta en la Figura 6.5; se observa que para cada

concentración inicial de sustrato una velocidad inicial debe correlacionarse para ajustar la hipérbola rectangular de Michaelis – Menten. Aplicando regresión no lineal sobre el modelo de la ecuación 4.18 para cada una de las temperatura analizadas, se obtuvieron los parámetros de la Tabla 6.6. Al inicio de la reacción, cuando Km $\ll$ [S], la velocidad de reacción será la velocidad límite, con una cinética de orden cero con respecto a la concentración de sustrato. Esta es la condición que tecnológicamente debe buscarse en la operación del reactor por lotes, con el objetivo de obtener la máxima productividad posible. Para una concentración baja de sustrato (Km $>$ [S]), la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato (cinética de primer orden); esto implica velocidades bajas de reacción como las correspondientes a las concentraciones inferiores a la constante de disociación (0.5 [mM], 0.75 [mM] – 1 [mM]) para las temperaturas 40 [°C], 50 [°C] y 60 [°C], respectivamente. Los resultados indican una identificación robusta de los parámetros con intervalos de confianza acotados, siendo en el caso del K_m para 40 [°C] y 50 [°C] $\approx$ 20 [%] del valor nominal del parámetro y del 18 [%] para el escenario de 60 [°C].

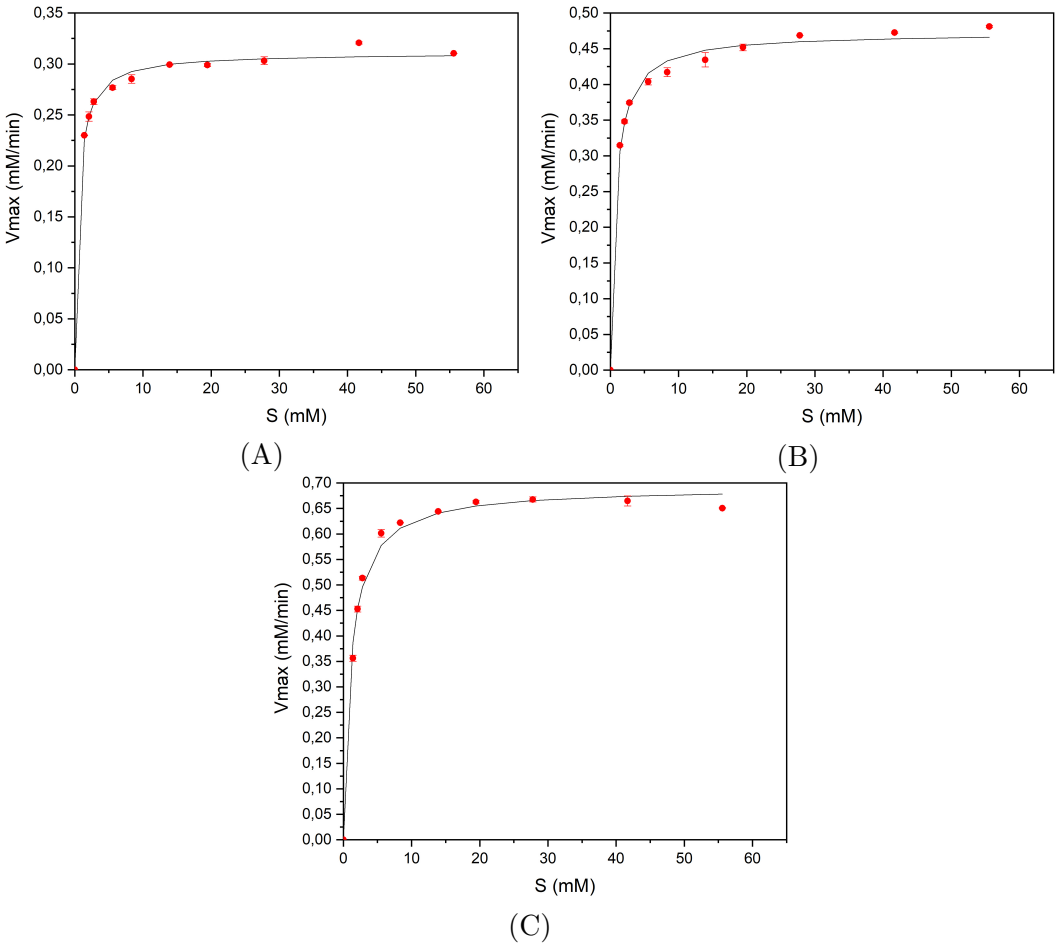


Figura 6.5: Curva de Michaelis-Menten para el ajuste de los parámetros V_{max} y K_m para una solución de APSL. A) 40 [°C], B) 50 [°C], C) 60 [°C].

Tabla 6.6: Parámetros del modelo Michaelis-Menten y estadígrafos.

Parámetro	**T = 40 [°C]**	**T = 50 [°C]**	**T = 60 [°C]**
Vmax [mM/min]	0.3109±0.007	0.4723±0.012	0.69169±0.021
Km [mM]	0.5228±0.1028	0.7541±0.1438	1.0947±0.2019
MSE	3.71E-05	1.17E-4	3.14E-4
r^2_{ad}	0.9954	0.9937	0.9924

Parámetros K_1 y K_2

La Figura 6.6 presenta los perfiles de concentración de producto del modelo EDO (ecuación 4.20) y de los datos experimentales, para las diferentes temperaturas de operación, concentraciones adimensionales de sustrato (S_o/K_m = 10, 50 y 100) con los parámetros de inhibición en función de la conversión ($f_{(X)\ \forall\ t}$). Se observa como el

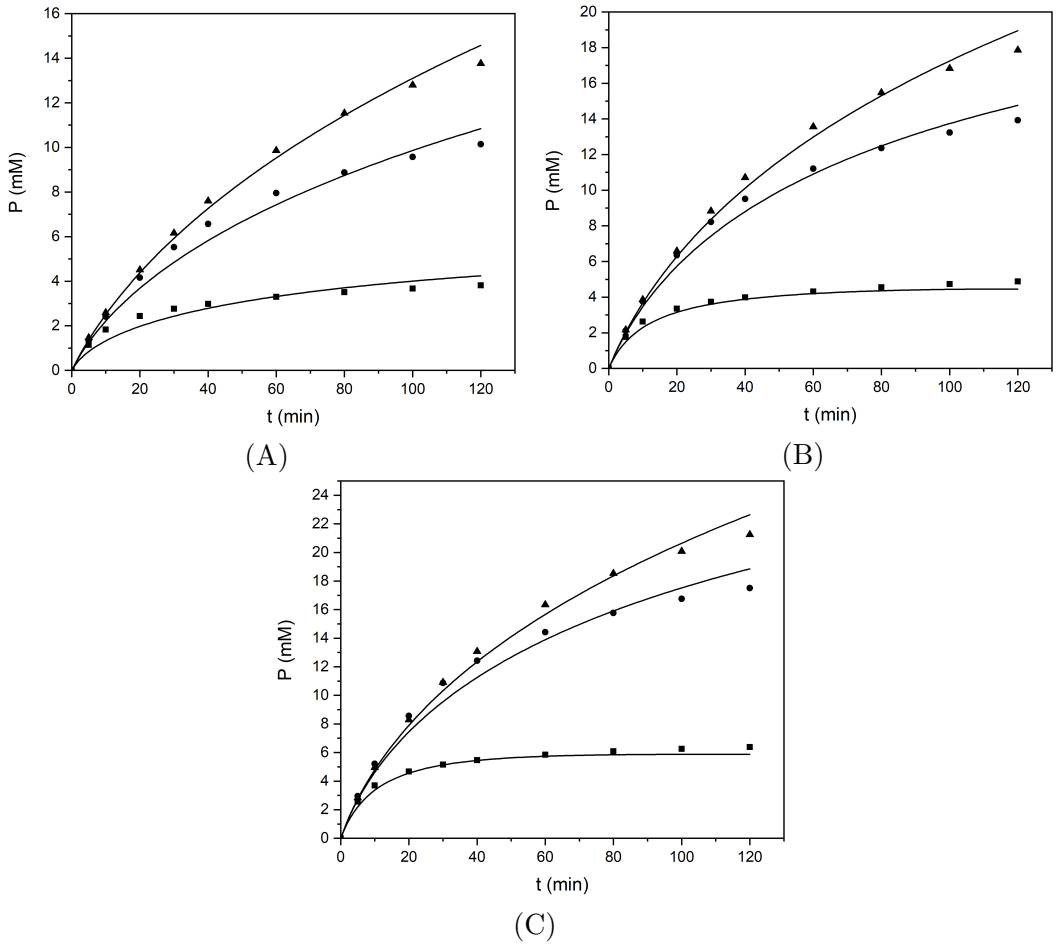


Figura 6.6: Curvas de hidrólisis experimentales (puntos) y modeladas para la formación de producto utilizando como sustrato una solución de APSL con parámetros de inhibición variables en función de la conversión. A) 40 [°C], B) 50 [°C], C) 60 [°C]. S_o/K_m = 10 (cuadrados), 50 (círculos), 100 (triángulos).

modelo logra predecir los datos experimentales en todos los escenarios simulados. La Tabla 6.7 presentan un resumen de los parámetros del modelo f_X y una comparación de las funciones objetivo para el modelo con los parámetros variables ($F_{Obj}V$) y fijos ($F_{Obj}F$) con $\approx$ 1000 evaluaciones. El análisis de significancia revela que todos los parámetros del modelo son significativos y estadísticamente diferentes del error experimental, indicando un aumento en los intervalos de confianza del parámetro competitivo K_1, a medida que pierde la capacidad predictiva del fenómeno reactivo con respecto al parámetro no competitivo K_2.

Tabla 6.7: Parámetros del modelo EDO en función de la conversión.

Parámetro	**T = 40 [°C]**	**T = 50 [°C]**	**T = 60 [°C]**
K_1 [mM]	0.1299±0.0401	0.3036±0.1616	0.7257±0.4651
K_2 [mM]	12.2982±4.1146	9.3266±2.0912	6.4060±0.4874
b_1	-0.1658±0.1022	-0.4925±0.3638	-1.3524±0.8945
b_2	-18.9318±11.8667	-15.7098±4.6636	-12.1121±3.5465
$F_{Obj}V$	21.0803	68.5857	140.6621
$F_{Obj}F$	50.1310	201.1410	439.3950

Tabla 6.8: Estadígrafos de los modelos EDO variables y fijos (MSE = Error cuadrático medio, SR^2 = Sumatoria de los residuos al cuadrado).

S_o/K_m	**Estadígrafo**	**T = 40 [°C]**	**T = 50 [°C]**	**T = 60 [°C]**
EDO parámetros variables				
10	MSE	0.0389	0.0548	0.0708
	r^2_{ad}	0.9382	0.9393	0.9514
	SR^2	4.5567	6.4137	8.2876
50	MSE	0.09624	0.2718	0.7403
	r^2_{ad}	0.9866	0.9786	0.9616
	SR^2	11.2600	31.8016	86.6107
100	MSE	0.0450	0.2596	0.3913
	r^2_{ad}	0.9969	0.9891	0.9880
	SR^2	5.2645	30.3752	45.7827
EDO parámetros fijos				
10	MSE	0.0928	0.3493	0.9191
	r^2_{ad}	0.8577	0.6261	0.3905
	SR^2	10.8623	40.8627	107.5373
50	MSE	0.2307	0.8437	1.9986
	r^2_{ad}	0.9690	0.9359	0.8998
	SR^2	26.9961	98.7143	233.8404
100	MSE	0.1049	0.5262	0.8378
	r^2_{ad}	0.9931	0.9787	0.9751
	SR^2	12.2731	61.5657	98.0226

Esto es confirmado con la Tabla 6.8, donde se listan los estadígrafos para ambos escenarios, indicando que el implementar los parámetros K_1 y K_2 en f_X, resulta en

un incremento notable en la calidad predictiva del modelamiento del reactor batch, intensificándose este efecto con el aumento de la temperatura del proceso. Esto indica que muy probablemente las constantes de inhibición por producto cambian conforme avanza la reacción, modificándose la afinidad del complejo enzima-producto a medida que aumenta la concentración de producto.

Parámetros V_{max}, K_m, K_1 y K_2 en función de la temperatura

Con la información anterior, se procedió a correlacionar las variables V_{max}, K_m, K_1 y K_2 con la temperatura, mediante las ecuaciones 5.3, 5.4 y 5.5. La Figura 6.7 presenta los perfiles del modelo junto con los datos experimentales a las diferentes temperaturas de proceso, evidenciando un comportamiento exponencial creciente para V_{max}, K_m, K_1 y decreciente en el caso de K_2. La Tabla 6.9 presenta los resultados obtenidos para todos los parámetros, indicando que tanto el MSE como el coeficiente de correlación ajustado denotan una predicción acertada del modelo. Se observa que el parámetro K_{20} presenta problemas de significancia en su parámetro factor pre-exponencial y, por consiguiente, su correlación no puede ser discriminada del error

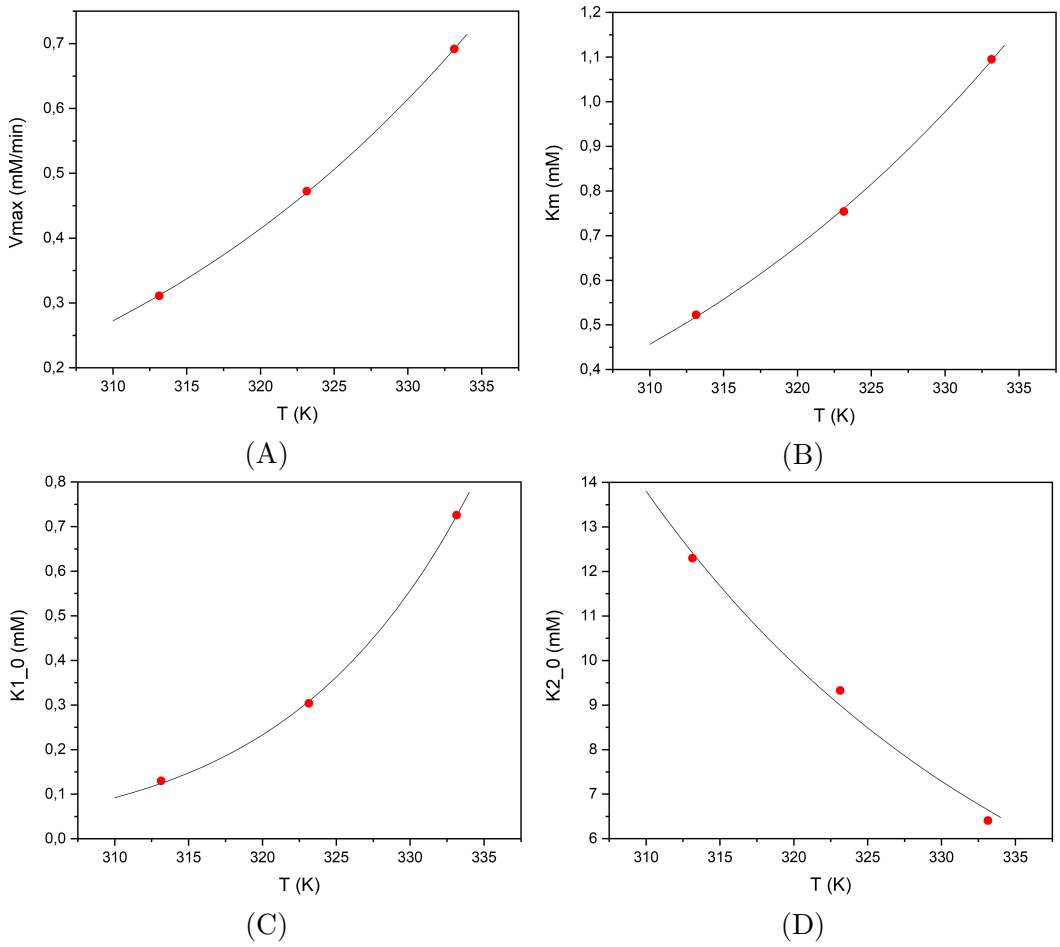


Figura 6.7: Correlación de los parámetros de los parámetros estudiados con la temperatura para una solución de APSL. A) V_{max}, B) K_m, C) K_{10}, D) K_{20}.

experimental. Para esto es necesario aumentar el número de datos experimentales, logrando un efecto en la exactitud de la estimación y disminuyendo los intervalos de confianza de todos los parámetros.

Tabla 6.9: Parámetros de los modelos de Arrhenius y van't Hoff en función de la temperatura (E_A = Energía de activación, A_0 = Factor pre-exponencial).

Parámetro	V_{max}	K_m
E_A [kJ/mol]	-34.545± 1.412	–
ΔH [mM]	–	-32.357±3.467
A_1 [kJ/mol]	12.103±3.848	–
A_2 [kJ/mol]	–	11.77±9.439
MSE	4.725E-6	7.528E-05
r^2_{ad}	0.9999	0.9991
Parámetro	K_{10}	K_{20}
ΔH [mM]	-76.474±8.342	27.14±14.080
A_i [kJ/mol]	27.286± 22.963	-7.905± 37.338
MSE	5.5218E-05	0.1801
r^2_{ad}	0.9994	0.9793

6.1.5. Análisis post/regresión

Los resultados de los los test de identificabilidad y sensibilidad para los parámetros de las tres EDO (S_o/K_m = 10, 50 y 100) en cada temperatura se presentan en la Figura 6.8. En estos k_1, k_2, k_3 y k_4 corresponden a K_{10}, K_{20}, b_1 y b_2, respectivamente. Inicialmente, el test de identificabilidad (Figuras 6.8 A, B y C - matriz de correlación) indica que los parámetros son localmente identificables, presentando correlaciones inter-paramétricas inferiores al intervalo cerrado [-0,95 0,95]. Se evidencia que el aumento de la temperatura causa un incremento en la correlación de los parámetros k_1 y k_3, la cual pasa de 0.6954 para 40 [°C] a 0.8005 y 0.9146 para 50 [°C] y 60 [°C], respectivamente. Se infiere que al aumentar la temperatura, los parámetros de inhibición competitiva pierden la capacidad de simular el comportamiento del sistema.

Las Figuras 6.8 D, E y F presentan el resultado del análisis de sensibilidad normalizada para cada EDO en las tres temperaturas analizadas. Estas indican que los parámetros k_3 y k_4 (b_1 y b_2) no tienen influencia alguna en los diferentes escenarios de simulación, por lo que iteraciones sucesivas en sus valores nominales no generará un efecto significativo en la función objetivo. Esto se condice con que al realizar minimizaciones del modelo considerando una sola EDO, los valores de estos parámetros tienden inmediatamente a las cotas inferiores y/o superiores impuestas en la rutina de optimización. Por otra parte, al incrementar la temperatura y la C_{AS}, se evidencia un aumento de la sensibilidad del parámetro k_2, igualándose y sobrepasando a la obtenida por el parámetro k_1. Se infiere que al incrementarse la concentración de sustrato en el sistema, la inhibición competitiva disminuye su efecto sobre la enzima, contrario a lo que sucede en el caso de la inhibición no competitiva que inhibe al com-

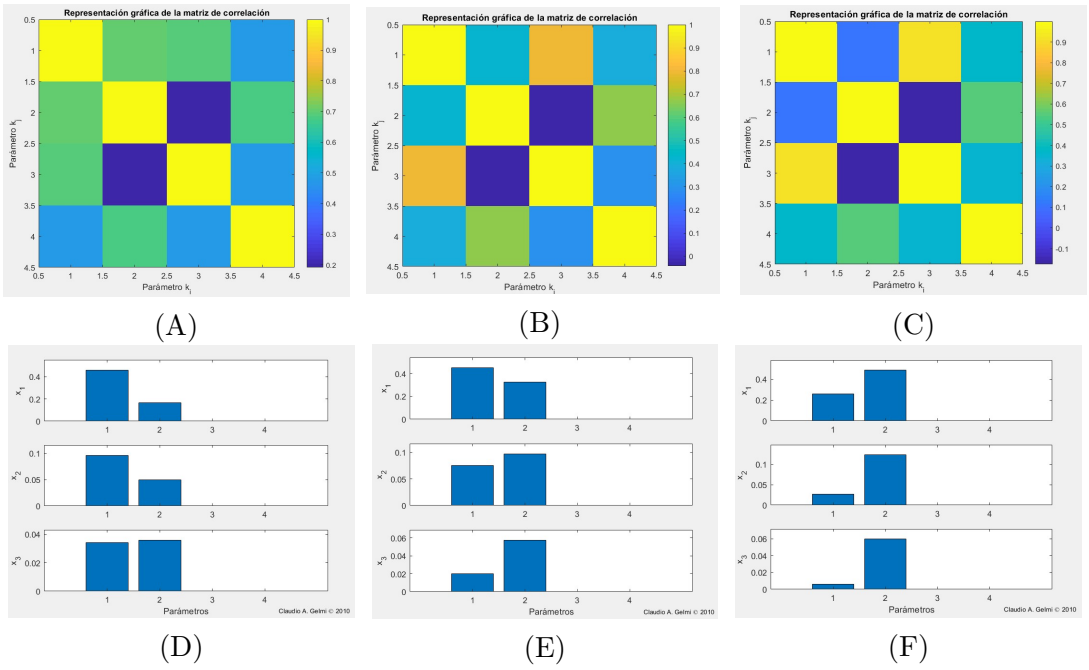


Figura 6.8: Resultados del análisis de identificabilidad (ID) y sensibilidad normalizada (SN). A) ID 40 [°C], B) ID 50 [°C], C) ID 60 [°C], D) SN 40 [°C], E) SN 40 [°C], F) SN 60 [°C].

plejo enzima-sustrato y se convierte en el fenómeno preponderante en la disminución progresiva de la curva de progreso de hidrólisis de una solución de APSL para C_{AS} igual a 100.

La Figura 6.9 muestra el comportamiento de las sensibilidades dinámicas relativas para 40 [°C], 50 [°C] y 60 [°C], respectivamente. En estas se aprecian los perfiles de comportamiento de las sensibilidades de los parámetros en función del tiempo de reacción, indicando los puntos experimentales de máxima información en donde los parámetros pueden ser identificados con mayor confiabilidad. Vemos como a una C_{AS} de 10 para las 3 temperaturas, (Figura 6.9 A, D y G) el parámetro competitivo k_1 presenta máximos de sensibilidad (40 [°C] – 100 [min], 50 [°C] – 80 [min] , 60 [°C] – 60 [min]), mientras que el parámetro no competitivo k_2 evidencia un comportamiento logarítmico para 40 [°C] y altamente no lineal para 50 [°C] y 60 [°C], respectivamente. Lo anterior indica que para concentraciones bajas de sustrato, la identificación de los parámetros requiere tomas de muestras no linealmente espaciadas, intensificando el muestreo al final de las 2 [h] de reacción, con el objetivo de entregar la máxima información posible en la predicción de los parámetros. Diferente a lo que sucede al aumentar las C_{AS}, en donde un muestro linealmente espaciado garantiza la predicción robusta de los mismos, dados los comportamientos lineales de las sensibilidades en todas las temperaturas (Figura 6.9 B, C, E, F, H e I). Los resultados se condicen con el análisis de sensibilidad normalizada, en donde no se aprecia ningún efecto de los parámetros k_3-k_4 y la sensibilidad del parámetro k_1 decrece conforme aumenta tanto la temperatura como la C_{AS}.

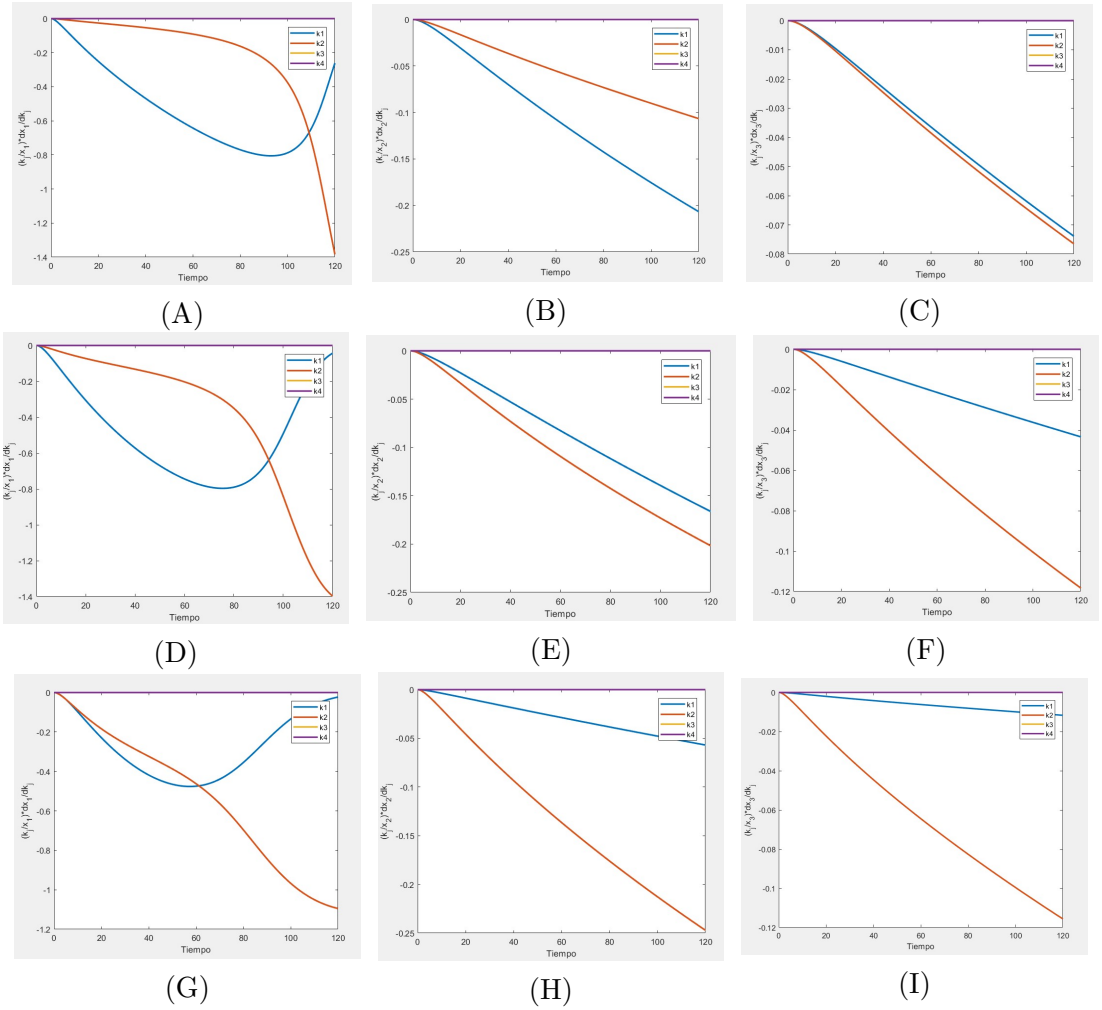


Figura 6.9: Resultados del análisis de sensibilidad dinámica relativa. A) EDO 1 - 40 [°C], B) EDO 2 - 40 [°C], C) EDO 3 - 40 [°C], D) EDO 1 - 50 [°C], E) EDO 2 - 50 [°C], F) EDO 3 - 50 [°C], G) EDO 1 - 60 [°C], H) EDO 2 - 60 [°C], I) EDO 3 - 60 [°C].

6.2. Sección 2 - Experimentos SCEMR

6.2.1. Caracterización Membranas Flujo Tangencial

La Figura 6.10 presenta los resultados de la caracterización de las membranas utilizando como fluido de trabajo agua (A) y una solución de APSL (B). En el caso del agua, se observa una correlación lineal para todas las membranas en el intervalo de presión analizado[2]. Por otra parte, la solución de APSL en el NMWCO de 10 [kDa] presentó un decaimiento de la tendencia lineal que se genera entre el flux como función de la PTM (2.05e+05 [Pa] - 0.87 [LMH]), indicando un posible punto de flux crítico y un régimen operación controlado por la transferencia de masa a esta

[2]Considerar que 0 [psig] en el equipo MidiKros equivale a 101325 [Pa].

presión. El flux límite para esta membrana fue de $\sim$ 1.15 [LMH]. Por consiguiente, se estableció como presión de trabajo 1.70e+05 [Pa] (10 [psig]) para asegurar que el el régimen de trabajo de todas las membranas estuviera controlado por la presión y que la operación mantuviera un "flux sostenible". Por otra parte, se observa la forma débil del flux crítico, ya que la pendiente conseguida por los datos de la solución de APSL en todas las clases de tamaño es menor a la obtenida con agua. Esto se debe a que la solución de APSL contiene diferentes péptidos de diferentes masas molares, que disminuyen la eficiencia del proceso de separación. La Tabla 6.10 lista los parámetros del modelo de la ecuación 6.1 desarrollado por Cheryan [Cheryan, 2018][3]. Se evidencia que existe una relación inversamente proporcional entre el NMWCO y el R_M, que se mantiene incluso para R_G. Esto puede deberse a que el sustrato utilizado contiene una mayor concentración de péptidos para las fracciones entre 5-10 [kDa] y $\geq$ 10 [kDa],

[3]La viscosidad del agua y de la solución de APSL para los cálculos fue de 0.001 [Pa*s], T = 20 [°C].

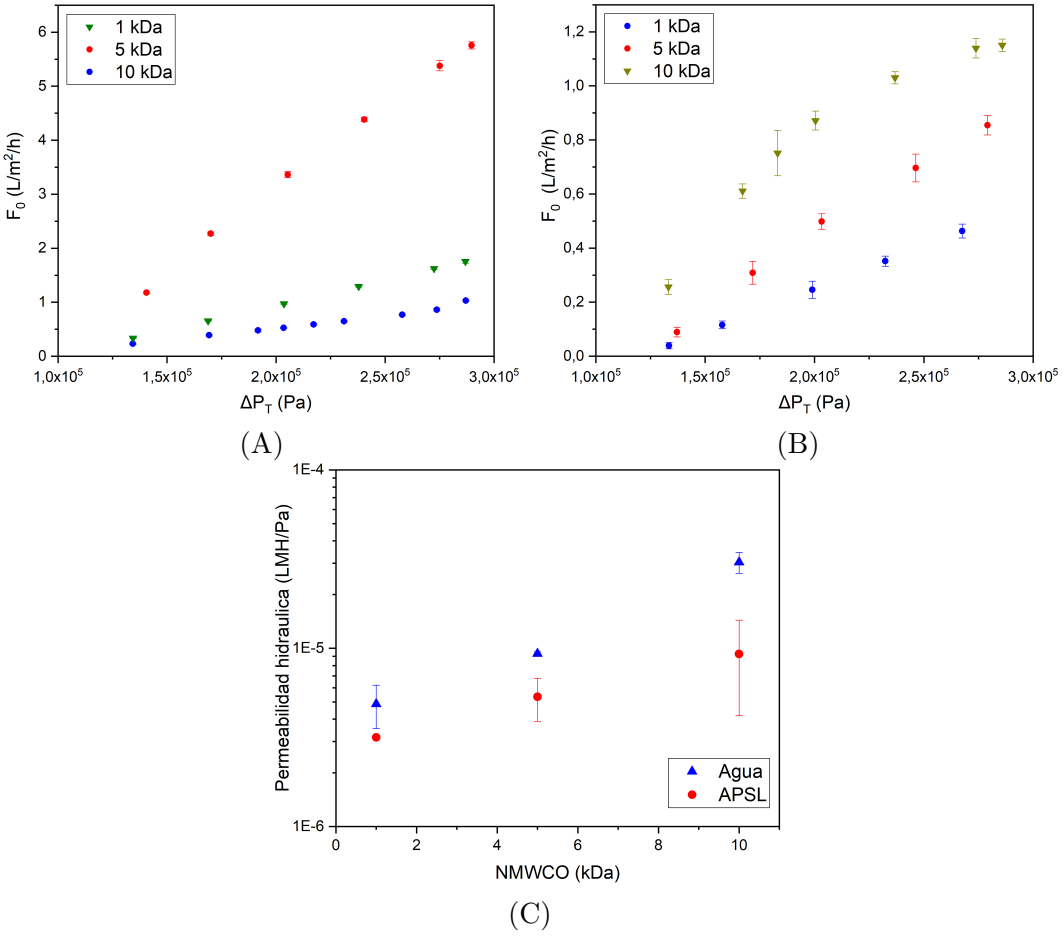


Figura 6.10: Correlación entre los $\bar{F}_0$ y la $P\bar{T}M$. A) Agua, B) Solución de APSL al 5 [%]. C) Permeabilidad hidráulica vs NMWCO con membranas MidiKros de mPES. Condiciones de operación: V_R = 0.2 [L], T = 20 [°C], pH = 8, t = 10 [min], F = 66 [mL/min].

lo que eventualmente disminuye la diferencia de R_M a R_G para las tres condiciones. Finalmente, se observa que R_G es superior a R_M para la membrana de 10 [kDa]. Esto se debe a que la solución de APSL presenta mayores concentraciones de las proteínas con tamaño $\geq$ 10 [kDa] y, por consiguiente, R_G se establece como la resistencia principal en esta modalidad.

Tabla 6.10: Caracterización de las membranas de trabajo (PH = Permeabilidad Hidráulica).

NMWCO [kDa]	**PH [LMH/Pa]**		R_M $[m^{-1}]$	R_G $[m^{-1}]$
	Agua	APSL		
1	4.868e-06	3.160e-06	7.383e+14	3.990e+14
5	9.327e-06	5.338e-06	3.854e+14	2.880e+14
10	3.036e-05	9.283e-06	1.184e+14	2.688e+14

La Figura 6.10C presenta la correlación existente entre la permeabilidad hidráulica y el NMWCO, indicando una tendencia lineal para los dos fluidos de trabajo. Esta Figura permite extra e interpolar la permeabilidad hidráulica a un NMWCO definido, con el objetivo de diseñar un proceso de separación controlado por la presión. Estimando las resistencias de la membrana y del fenómeno de colmatación de la solución del APSL en unidades MidiKros de mPES.

6.2.2. RCB F_1 - Concentración de sustrato

La Figura 6.11 presenta los resultados experimentales del RCB F_1 de tres niveles de tratamiento (S_0 = 3 [%], 5 [%] y 8 [%]). Inicialmente, se observa en los incisos A, B y C, las concentraciones de producto en el concentrado en función del tiempo de reacción. En esta se aprecia el control de cada escenario y el efecto combinado del fenómeno de separación (F_S) y de reacción (F_R) para las membranas de UF testeadas (1 [kDa], 5 [kDa], 10 [kDa]). En todas los unidades experimentales, la concentración de producto aumenta (comparado con la curva control), dado el efecto combinado de la eliminación del producto inhibidor y la reducción del volumen del concentrado (eliminación de agua del concentrado). La magnitud de este fue mayor conforme se incrementaba el NMWCO testeado, siendo el límite superior el alcanzado por la membrana de 10 [kDa]. Este último alcanzo una tendencia aproximadamente lineal para los niveles 1 y 2 (3 [%] y 5 [%]) en todo el intervalo de tiempo de proceso analizado. Como se esperaba, aumentar la concentración inicial de sustrato resultó en un incremento de la concentración efectiva del producto en el concentrado.

Con el objetivo de eliminar el efecto producido por la eliminación de agua del concentrado, se multiplicaron las concentraciones de producto por el volumen de concentrado efectivo en cada uno de los tiempos de muestreo, obteniendo los resultados de las Figuras 6.11 D, E y F. En estas se aprecia como las moles de producto en el concentrado para las membranas de UF de 5 [kDa] y 10 [kDa], disminuyen parabólicamente en el nivel 1 (nivel 2 únicamente 10 [kDa]) e hiperbólicamente en los 6 escenarios adicionales para todas las membranas. Lo anterior, se encuentra direc-

tamente relacionado con la TCC (Tabla 6.11), ya que cuando esta alcanza el valor de la unidad, todo el volumen inicial del reactor se encuentra en el permeado. Por lo anterior, se puede afirmar que el F_S gobierna en los escenarios en donde la TCC es $\geq$ a 0.3484 [1/h], valor alcanzado por la membrana de 10 [kDa] en el último nivel, donde se evidencia un merma de este efecto.

Tabla 6.11: Tasas de concentración para el **RCB $\mathbf{F}_1$**.

Niveles (S_0)	**Tasa de concentración [1/h]**		
	1 [kDa]	5 [kDa]	10 [kDa]
3 [%]	0.2445	0.4351	0.7543
5 [%]	0.1326	0.2301	0.5215
8 [%]	0.0970	0.1850	0.3484

Sin embargo, todos los escenarios fueron afectados en menor medida por el F_S, ya que en todos se evidenció una menor cantidad de moles comparado con la curva control. Por otra parte, se observa como aumentar la concentración de sustrato al inicio de la reacción, disminuye el efecto del F_S y la concentración de producto en el permeado (Figuras 6.11 G, H e I). Esto se contrasta con el aumento del efecto de polarización que ocurre en la superficie de la membrana conforme se incrementan los niveles, lo cual incide en la disminución del flux y, por consiguiente, en la magnitud del efecto del F_S. Finalmente, las Figuras 6.11 J, K y L, presentan los flux filtrados por el método de [Songling Cao & R. Russell Rhinehart, 1995] con un $\lambda = 0.1$. Se evidencia como para todos los niveles, el flux para las membrana de 5 [kDa] y 10 [kDa] aumenta conforme avanza la reacción. Esto debido a que la hidrólisis por Alcalase® genera un aumento progresivo de los péptidos contenidos en mayor proporción en la solución de APSL (β-lactoglobulina y α-lactoalbúmina, Tablas 4.2 y 4.4), lo cual disminuye la resistencia por colmatación que estos ejercen en la superficie de la membrana y aumentan el flux hacia el permeado, dada la migración de los péptidos menores a estas clases de tamaño. Esto presente una consecuencia directa en el flux crítico de estas clases de tamaño, ya que al ser el concentrado químicamente diferente al sustrato original y al producto de una separación sin reacción, las curvas de flux vs PTM se desplazan dada la disminución progresiva de la resistencia impuesta por los péptidos de mayor clase de tamaño. Se presume que esto no ocurre para la membrana de 1 [kDa], ya que al parecer (por un tema probabilístico con respecto a la concentración inicial), la enzima escinde los péptidos de las moléculas de mayor tamaño y después de 20 [min] de reacción, continua con los de esta clase de tamaño. Por otra parte, se observa como el aumentar la concentración de sustrato, disminuye considerablemente el flux para todas las membranas, corroborando lo discutido anteriormente con respecto al efecto de polarización por concentración. La Tabla 6.12 presenta un resumen de los resultados promedio de la productividad ($\bar{Q}$) y de la actividad relativa ($\bar{A}_R$) para cada bloque del RCB F_1. Ambos indicadores fueron tomados al final de la reacción y consideran la suma de las concentraciones en el concentrado y permeado para mantener el balance de masa en moles. En términos de la productividad, la cual es directamente proporcional a las moles totales del producto obtenido en concen-

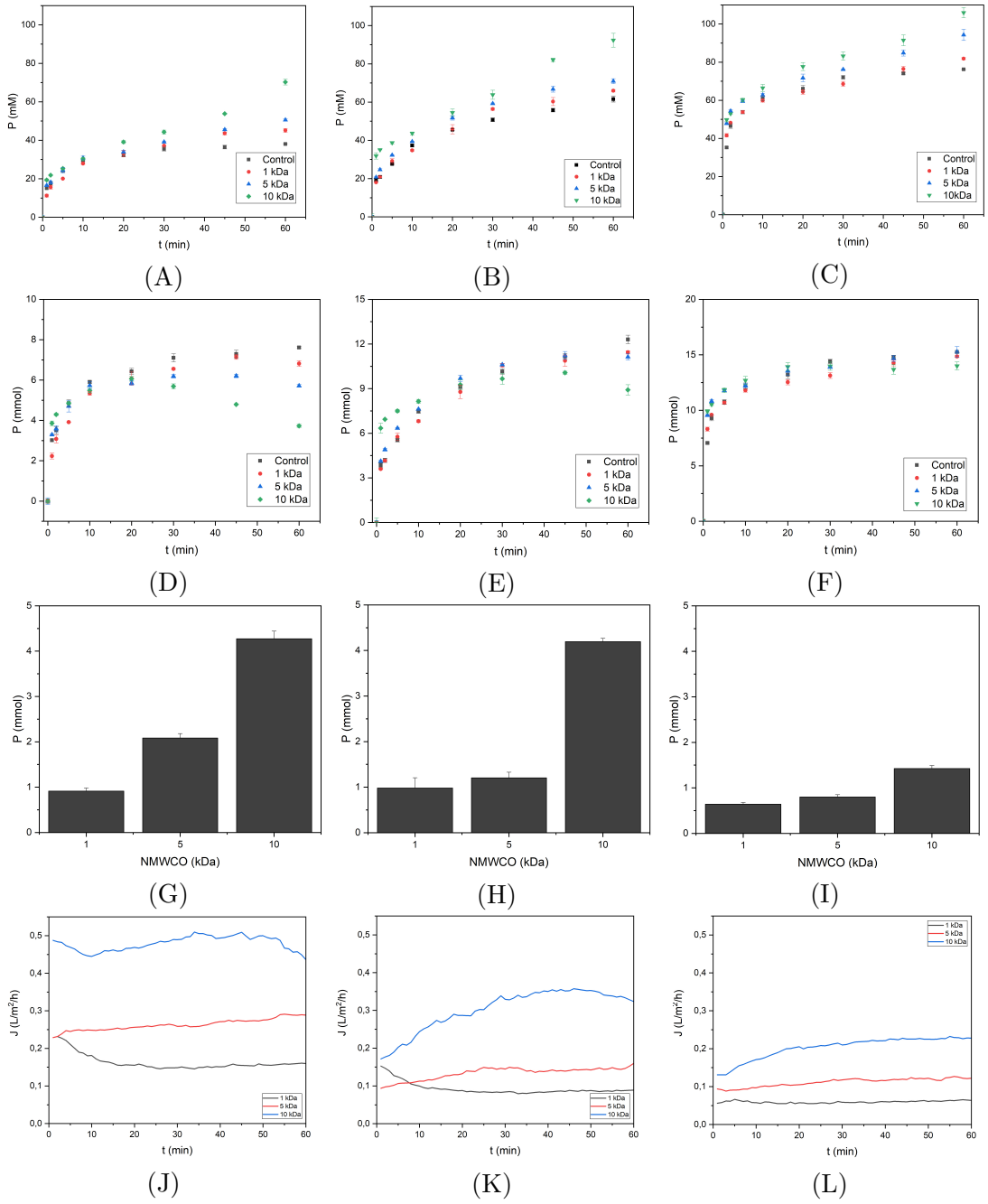


Figura 6.11: Resultados experimentales **RCB** $\mathbf{F}_1$. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (3 [%], 5 [%] y 8 [%]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: $E_0 = 5$ [mAU/g], $V_R = 0.2$ [L], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

trado y permeado, se observa como las modalidades SCEMR, presentan una posible asociación positiva por tratamiento comparado con la obtenida por el reactor batch (control) para cada escenario.

Tabla 6.12: Resultados para el **RCB** $\mathbf{F}_1$ concentración de sustrato. Niveles de F_1 (1 = 3 [%], 2 = 5 [%] y 3 = 8 [%]). Condiciones de operación: $E_0 = 5$ [mAU/g], $V_R = 0.2$ [L], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

Bloque	$\mathbf{F}_1$ **(n)**	$\bar{Q}$ **[mmol/h]**	$\bar{A}_R$ **[%]**
Control	1	7.61	81.41
	2	12.30	84.93
	3	15.25	98.02
1 [kDa]	1	7.73	79.76
	2	12.42	88.73
	3	15.50	98.08
5 [kDa]	1	7.80	77.08
	2	12.33	87.14
	3	16.07	96.46
10 [kDa]	1	8.00	77.69
	2	13.11	87.70
	3	15.42	97.25

El aumento de la concentración de sustrato del tratamiento 1 al 2, representó un aumento en la productividad de todos los bloques de $\approx 60[\,\%]$, mientras que del 2 al 3 de $\approx 20[\,\%]$. Esta disminución en el efecto de la productividad dado el aumento de la concentración de sustrato se encuentra íntimamente relacionada con la polarización por concentración del hidrolizado de la solución de APSL en la superficie de la membrana de UF y se condice con la disminución observada de los flux. En el caso de la actividad relativa se evidenció un incremento de esta conforme aumentó la concentración de sustrato en cada bloque, efecto conocido en la literatura como modulación positiva por sustrato. En ambos indicadores (productividad y actividad), los resultados de los bloques difieren debido a que cada uno contiene tratamientos diferentes y, por consiguiente, su diferencia se evaluó por medio de un análisis de varianza ANOVA. Dado que las observaciones están divididas por 4 variables categóricas, la aplicación del análisis ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, permitió determinar si existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos y bloques presentes en cada RCB. Anterior a la aplicación del ANOVA, fueron validadas las condiciones de independencia, normalidad y homocedasticidad. Inicialmente, para la independencia de las observaciones, el diseño RCB fue construido como se explicó en el apartado de la Tabla 5.1 para garantizar el cumplimiento de este supuesto. En el caso de la normalidad y la homocedasticidad, las Tablas 6.13 y 6.14 presentan los resultados para los test de Shapiro-Wilk (shapiro.test [Royston, 1982]) y varianza (var.test) desarrollados en R, para los diferentes bloques y niveles de tratamiento. Los resultados de la Tabla 6.13 indican *p-value* ≥ 0.05, lo cual indica que se cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad para la productividad y de normalidad

para la actividad relativa, evidenciando que los bloques de actividad relativa del RCB F_1 no son homocedasticos. Esto se debe a las diferencias existentes entre los niveles de tratamiento y al aumento de la actividad relativa conforme aumenta la concentración de sustrato, fenómeno exógeno independiente a la homogeneidad del bloque.

Tabla 6.13: Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F_1** en los bloques (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza).

Bloque	TN-Q	TV-Q	TN-A_R	TV-A_R
1	0.7494	0.1264	0.3867	0.0258
2	0.7730	0.1227	0.9769	0.0235
3	0.8936	0.1102	0.9583	0.0211
4	0.5899	0.1297	0.9746	0.0207

Tabla 6.14: Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F_1** en los niveles de tratamiento (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza).

Niveles	TN-Q	TV-Q	TN-A_R	TV-A_R
1	0.8606	0.0066	0.6264	0.5008
2	0.0293	0.0767	0.6989	0.7296
3	0.3294	0.0622	0.3606	0.4111

Para los test aplicados a los niveles (Tabla 6.14), se evidenció que los datos de productividad en los niveles 2 y 1 no cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. En el caso de la normalidad, esto se debe a que los resultados de estos indicadores son próximos en términos nominales para el control, 1 [kDa] y 5 [kDa] pero distantes para 10 [kDa] (12.30 [mmol/h] - 12.42 [mmol/h] - 12.33 [mmol/h] - 13.11 [mmol/h]), lo cual el test penaliza rechazando la hipótesis nula. Sucediendo algo similar para la homocedasticidad en el nivel 1 (7.61 [mmol/h] - 7.73 [mmol/h] - 7.80 [mmol/h] - 8.00 [mmol/h]).

Tabla 6.15: Resultados del test ANOVA para la productividad del **RCB F_1**.

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
Tratamiento	2	122.87	61.43	690.21	8.11E-08	***
Bloque	3	0.37	0.12	1.37	0.338	
Residuos	6	0.53	0.09			

Debido a que la mayor parte de los test realizados a los bloques y niveles cumplen con los supuestos anteriormente descritos, se procedió a la aplicación del análisis ANOVA para la productividad y la actividad relativa, presentando los resultados en las Tablas 6.15 y 6.16. En ambos escenarios el test ANOVA entrega un *p-value* menor a 0.05 en los niveles de tratamiento estudiados. Luego, con un 5 [%] de significancia, es posible rechazar la hipótesis nula y afirmar que la media de todos los tratamientos

es diferente. Esto implica que los diferentes niveles de tratamiento pueden analizarse de forma independiente, para buscar una diferencia significativa en sus categorías.

Tabla 6.16: Resultados del test ANOVA para la actividad relativa del **RCB** $\mathbf{F}_1$.

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
Tratamiento	2	685.4	342.7	137.54	9.73E-06	***
Bloque	3	6.3	2.1	0.84	0.5	
Residuos	6	14.9	2.5			

Para proceder con el análisis ANOVA por nivel de tratamiento, se validaron nuevamente los supuesto para las réplicas de cada categoría, obteniendo los resultados de la Figura 6.12. Las Figuras 6.12 A-F presentan los resultados visuales del gráfico de probabilidad Q-Q plot (quantile-quantile plot), indicando que todos los set de datos cumplen con el supuesto de normalidad, al comparar la distribución de los datos obtenidos con la distribución normal tradicional. En el caso de las varianzas (Figura 6.12 G-L), se evidencia que los datos pueden considerarse semejantes para todos los set de datos analizados. Esto pese a que el proceso presenta una fuerte variabilidad debido al *fouling* irreversible que sufren las membranas de UF y a la acción de control que ejerce la válvula conforme la viscosidad del concentrado aumenta para mantener la PTM predefinida.

Los resultados de los análisis ANOVA para cada nivel de tratamiento en términos de la productividad y de la actividad relativa se presenta en la Tabla 6.17. En esta se evidencia como ninguno de los tratamientos para el RCB de sustrato presenta diferencias significativas entre las variables categóricas que la contienen (*p-value* $\geq$ 0.05), obteniendo el menor *p-value* para el escenario de productividad de 5 [%], en donde se infiere que la diferencia significativa se encuentra entre el control y el SCEMR de 10 [kDa]. Esto puede ocurrir debido a que el F_S gobierna en todos los escenarios, disminuyendo las moles de producto en el concentrado (con respecto al control) e impidiendo que la productividad del proceso aumente por cuenta de la incorporación de la membrana de UF.

La Figura 6.13 presenta los resultados gráficos para cada tratamiento y categoría, confirmando lo obtenido en el análisis ANOVA. En el caso de la productividad, se evidencia como disminuir la concentración de sustrato resulta en un aumento de la concentración de producto en el permeado para todas las membranas de UF. Esto se relaciona directamente con la disminución de la resistencia que ejerce el sustrato en la superficie de la membrana para pasar al permeado, logrando un aumento del flux y, por ende, de la tasa de concentración. Por otra parte, cuando la concentración inicial de sustrato aumenta, la productividad del proceso también lo hace, debido a que hay una mayor concentración de péptidos disponibles para hidrólisis enzimática de proteínas.

Finalmente, para la actividad relativa se observa como la concentración de 3 [%] fue la que mayor actividad perdió con respecto al control y como la enzima logra

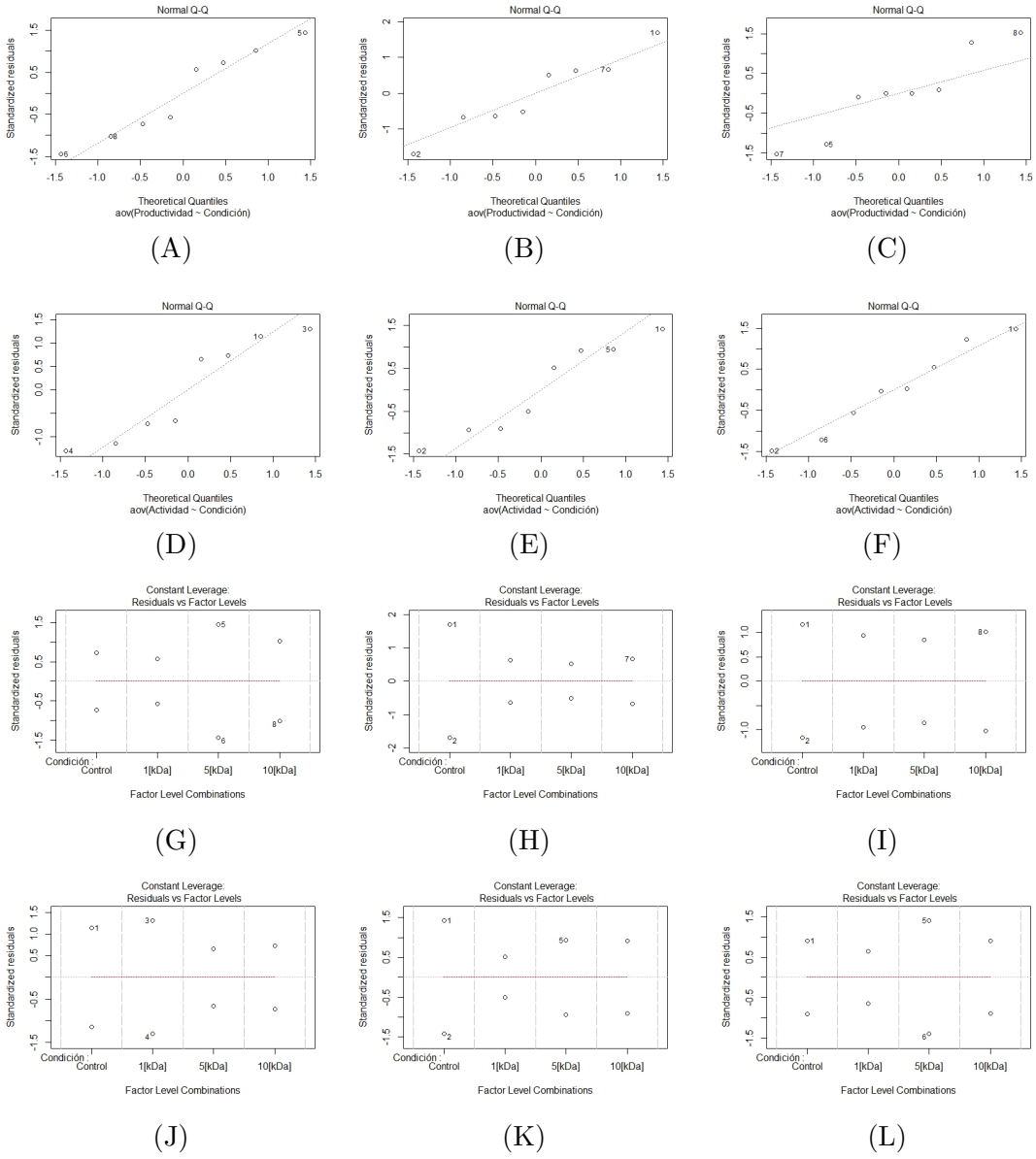
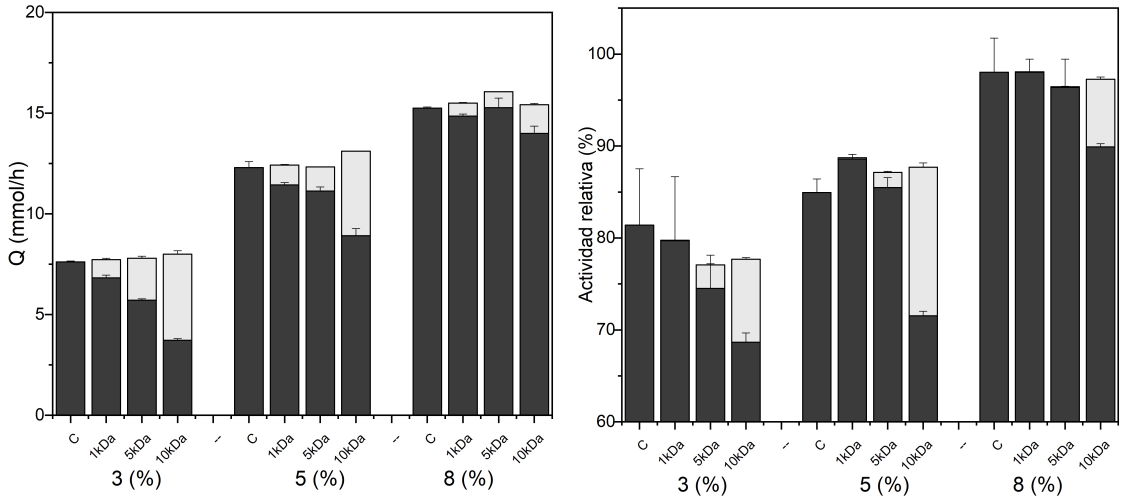


Figura 6.12: Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento del **RCB $\mathbf{F_1}$** para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (3 [%], 5 [%] y 8 [%]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles.

atravesar la membrana de 10 [kDa], en menor medida a 5 [kDa] y en ningún caso a 1 [kDa] (en los 3 niveles de tratamiento). Lo primero puede deberse a la rápida disminución de la concentración de sustrato en el concentrado, afectando negativamente a la modulación positiva de la actividad enzimática.



(A) (B)

Figura 6.13: Resultados experimentales **RCB $\mathbf{F}_1$** concentración de sustrato. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles de F_1 (1 = 3 [%], 2 = 5 [%] y 3 = 8 [%]). Condiciones de operación: $E_0 = 5$ [mAU/g], $V_R = 0.2$ [L], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]

Tabla 6.17: Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del **RCB $\mathbf{F}_1$** concentración de sustrato. Niveles de F_1 (1 = 3 [%], 2 = 5 [%] y 3 = 8 [%]). Condiciones de operación: $E_0 = 5$ [mAU/g], $V_R = 0.2$ [L], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
	Productividad - S_0 3 [%]					
Condición	3	0.1581	0.0527	0.499	0.703	
Residuos	4	0.4222	0.1055			
	Productividad - S_0 5 [%]					
Condición	3	0.8840	0.2947	3.845	0.113	
Residuos	4	0.3065	0.0766			
	Productividad - S_0 8 [%]					
Condición	3	0.759	0.2530	0.294	0.829	
Residuos	4	3.442	0.8604			
	Actividad relativa - S_0 3 [%]					
Condición	3	23.52	7.84	0.138	0.932	
Residuos	4	226.96	56.74			
	Actividad relativa - S_0 5 [%]					
Condición	3	15.45	5.149	2.359	0.213	
Residuos	4	8.73	2.182			
	Actividad relativa - S_0 8 [%]					
Condición	3	3.50	1.166	0.124	0.941	
Residuos	4	37.57	9.392			

6.2.3. RCB F_2 - Concentración de enzima

La Figura 6.14 presenta los resultados experimentales del RCB F_2 de tres niveles de tratamiento (E_0 = 2.5 [mAU/g], 5 [mAU/g] y 10 [mAU/g]). De igual forma que en el análisis anterior, se observa en los incisos A, B y C, las concentraciones de producto en el concentrado en función del tiempo de reacción. En esta se aprecia como aumentar la concentración de enzima del nivel 1 al 2, resulta en un incremento de la concentración de péptidos escindidos en el concentrado para todos los SCEMR. Este efecto no fue conseguido al pasar del nivel 2 al 3, en donde se logró un incremento en la velocidad inicial del reacción, pero no así en la concentración final de producto. Esto indica que hay una concentración máxima de enzima que logra aumentar significativamente la velocidad de reacción del proceso, pero que finalmente el fenómeno de inhibición por producto se impone y limita la concentración final de producto que puede alcanzarse. Por otra parte, se observa el mismo comportamiento descrito en los experimentos de sustrato, en donde el SCEMR de 10 [kDa] alcanzó un aumento lineal de la concentración conforme avanzaba la hidrólisis enzimática de proteínas en todos los escenarios experimentales.

Las Figuras 6.14 D, E y F presentan la dinámica de las moles en el concentrado conforme avanza la reacción. En estas se aprecia como para el SCEMR de 10 [kDa] el perfil parabólico de disminución de moles en el concentrado aumenta conforme se incrementa a E_0. Esto se condice con los valores de la TCC de la Tabla 6.18, en donde la membrana de UF obtuvo los mayores valores de concentración y, por ende, una mayor cantidad de péptidos hidrolizados migraron hacia el permeado. En el caso del SCEMR de 5 [kDa], solo se evidenció este efecto para el nivel 3, en donde la TCC fue de 0.3289 [1/h], valor aproximado al establecido en el análisis de sustrato. Nuevamente, todos los escenarios fueron afectados en menor medida por el F_S, ya que las moles en el concentrado disminuyeron en comparación con la curva control.

Tabla 6.18: Tasas de concentración para el **RCB F_2**

Niveles (E_0)	**Tasa de concentración [1/h]**		
	1 [kDa]	5 [kDa]	10 [kDa]
2.5 [mAU/g]	0.1549	0.2889	0.4735
5.0 [mAU/g]	0.1326	0.2301	0.5215
10 [mAU/g]	0.1885	0.3289	0.5412

En términos de la concentración del permeado al final de la reacción (Figuras 6.14 G, H e I), se observa como aumentar E_0 genera un incremento en las moles de producto para cada variable categórica del nivel 1 al 2, pero no así del 2 al 3; contrastante lo anteriormente discutido para los concentrados. Finalmente, las Figuras 6.14 J, K y L, presentan los flux filtrados para los tres niveles. Se observa como para todos los niveles y SCEMR, el flux decrece en su punto de partida conforme aumenta E_0. Al comparar el nivel 1 con el 2 y el 1 con el 3, vemos una disminución de 57.6 [%] y 41.7 [%] para los SCEMR de 5 [kDa] y de 34.6 [%] y 57.1 [%] para los SCEMR de 10 [kDa]. En

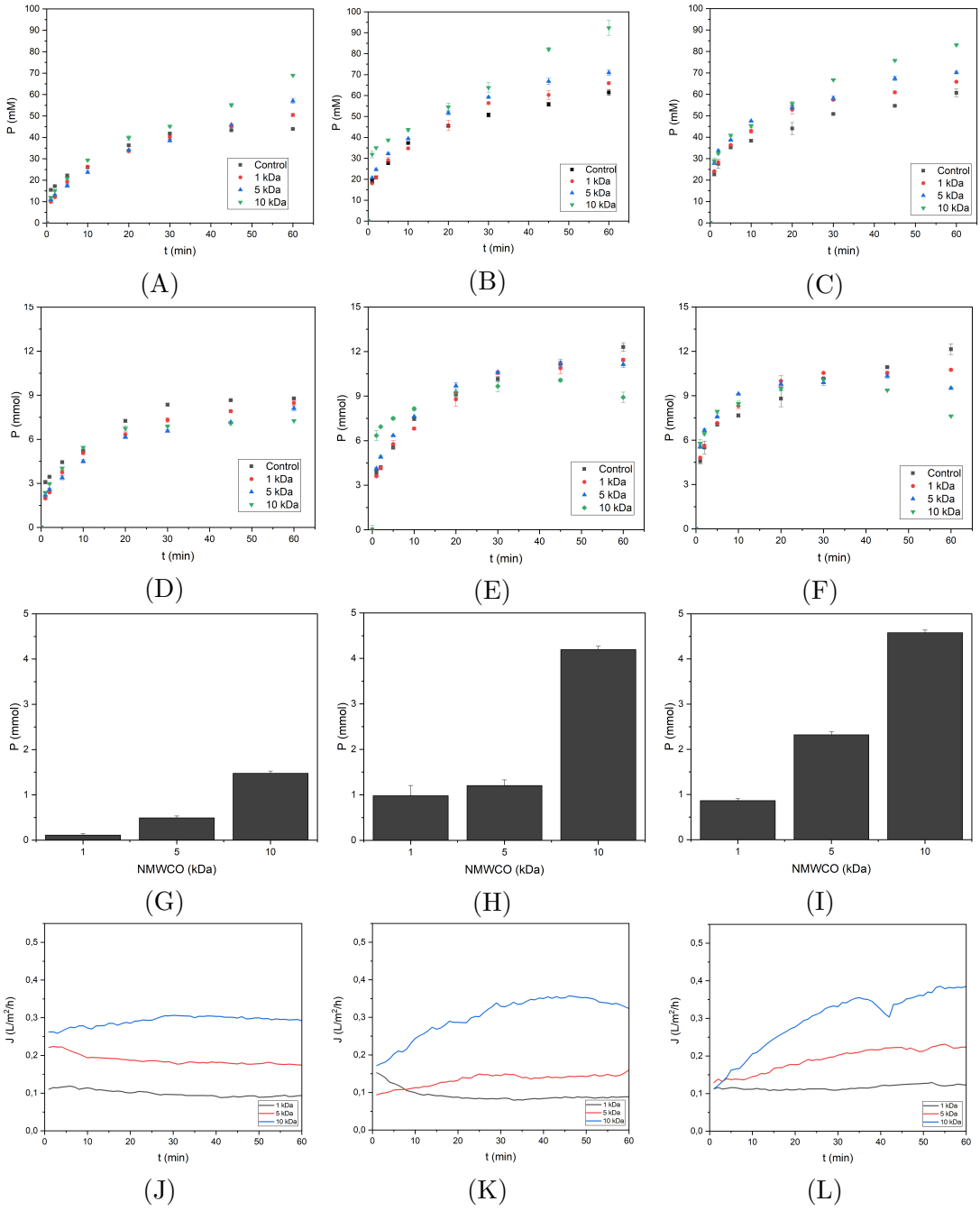


Figura 6.14: Resultados experimentales **RCB F_2**. Cada columna corresponde a un nivel de F_2 (2.5 [mAU/g], 5 [mAU/g] y 10 [mAU/g]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $V_R = 0.2$ [L], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

el caso del nivel 1 (experimentos 2.5 [mAU/gr] Figura 6.14J), la dinámica del flux es relativamente constante para todos los SCEMR, lo cual no sucede para los niveles 2 y 3, en donde los SCEMR de 5 [kDa] y 10 [kDa] presentan un aumento de flux conforme avanza la reacción. Los resultados para el tiempo final de la reacción al comparar el nivel 2 con el 1 y el 3 con el 1, indican un aumento de 8.7 [%] y 27.8 [%] para los SCEMR de 5 [kDa] y de 10.8 [%] y 31.8 [%] para los SCEMR de 10 [kDa]. Esto indica que el aumento de la concentración de la enzima mejoró la eficiencia del proceso de separación y, por consiguiente, se obtuvo una mayor concentración de producto UF en el permeado. Lo anterior, no ocurre para la membrana de 1 [kDa], ya que el aumento de E_0 no genera un incremento de los péptidos separados por debajo de esta clase de tamaño. Similar al análisis para el sustrato, la Tabla 6.19 lista los resultados promedio de la productividad ($\bar{Q}$) y de la actividad relativa ($\bar{A_R}$) para cada bloque del RCB F_2. En términos de la productividad, se observa como las modalidades SCEMR no presentan una asociación clara por tratamiento, aumentando su valor nominal de los niveles 1 a 2 y disminuyendo del nivel 2 al 3.

Tabla 6.19: Resultados para el **RCB $\mathbf{F_2}$** concentración de enzima. Niveles de F_2 (1 = 2.5 [mAU/g], 2 = 5 [mAU/g] y 3 = 10 [mAU/g]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], V_R = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

Bloque	**F_2 (n)**	$\bar{Q}$ **[mmol/h]**	$\bar{A_R}$ **[%]**
Control	1	8.79	81.96
	2	12.30	84.93
	3	12.14	93.66
1 [kDa]	1	8.59	86.70
	2	12.42	88.73
	3	11.62	92.19
5 [kDa]	1	8.60	84.00
	2	12.33	87.14
	3	11.84	93.91
10 [kDa]	1	8.74	85.65
	2	13.11	87.70
	3	12.21	93.24

Esto último sucede debido a que el producto si bien aumenta en el permeado del nivel 3, disminuye en mayor medida en su concentrado, afectando negativamente a su productividad (E_0 igual a 10 [mAU/g]). Para el caso de la actividad relativa se observa que i) existe una disminución de la pérdida de actividad del control conforme aumenta E_0 para todos los tratamientos y que ii) todos los SCEMR evidenciaron un aumento de la actividad relativa comparados con el control de cada tratamiento (excluyendo los SCEMR de 1 [kDa] y 10 [kDa] en el tercer nivel,). Se infiere que esto ocurre porque la enzima migra a la superficie de la membrana de UF y estabiliza su estructura, lo que en consecuencia, aumenta su vida útil.

La validación de los supuesto de normalidad y homocedasticidad previo al análisis

ANOVA de los resultados del RCB F_2, se presenta en las Tablas C.1 y C.2. En estas se puede ver como la mayor parte de los set de datos analizados cumplen con los supuestos y validan la hipótesis nula, salvo en el análisis por niveles en un caso de normalidad y 2 de homocedasticidad de las varianzas. Por consiguiente, se procede a la aplicación del análisis de varianza.

Similar a lo sucedido en el RCB F_1, los resultados del análisis ANOVA (Tablas C.3 y C.4) indican diferencia significativa entre los tratamientos con un *p-value* menor a 0.05 para los set de datos de productividad y actividad relativa. Luego, con un 5 [%] de significancia, es posible rechazar la hipótesis nula y afirmar que la media de todos los tratamientos es diferente. Por consiguiente, se procedió a realizar el análisis por tratamiento para evidenciar si existe diferencia significativa entre las variables categóricas que lo constituyen. Los resultados de la validación de los supuestos del análisis ANOVA por nivel de tratamiento para las réplicas de cada categoría, se presentan en la Figura C.1. Las Figuras C.1 A-F presentan los resultados visuales del gráfico de probabilidad Q-Q plot (quantile-quantile plot), indicando que todos los set de datos cumplen con el supuesto de normalidad.

En el caso de las varianzas (Figura C.1 G-L), se evidencia que los datos pueden considerarse con variabilidad semejante para todos los set de datos analizados. La Tabla C.5 presenta los resultados de los análisis ANOVA para cada nivel de tratamiento en términos de la productividad y de la actividad relativa. En esta se evidencia como ninguno de los tratamientos para el RCB de enzima presenta diferencias significativas entre las variables categóricas que la contienen (*p-value* ≥ 0.05), obteniendo nuevamente el menor *p-value* para el escenario de productividad de 5 [mAU/g].

La Figura 6.15 presenta los resultados gráficos obtenidos para cada tratamiento y categoría de estudio en el RCB F_2. En el caso de la productividad, se evidencia como aumentar la concentración de enzima resulta en un aumento de la concentración de producto en el permeado para todas las membranas de UF. Esto era de esperarse, dado que a una mayor concentración inicial de enzima se espera un aumento de la velocidad inicial de la reacción, teniendo este un efecto positivo en la concentración de producto en el permeado, mas no en las moles finales obtenidas en el proceso.

Finalmente, para la actividad relativa, se observa i) como el SCEMR de 10 [kDa] fue el que permitió el mayor paso de enzima al permeado (siendo este efecto mayor para la E_0 de 10 [mAU/g]) y ii) un efecto de modulación positivo por cuenta de las membranas de UF con respecto al control de cada tratamiento, que disminuye conforme aumenta la concentración inicial de enzima en el reactor. Se infiere que esto ocurre porque al aumentar la concentración de E_0, su inactivación térmica disminuye y la enzima satura los sitios disponibles en la superficie de la membrana para estabilizarse, lo que hace que el efecto de modulación pierda relevancia y la actividad relativa del control iguale a la de los SCEMR.

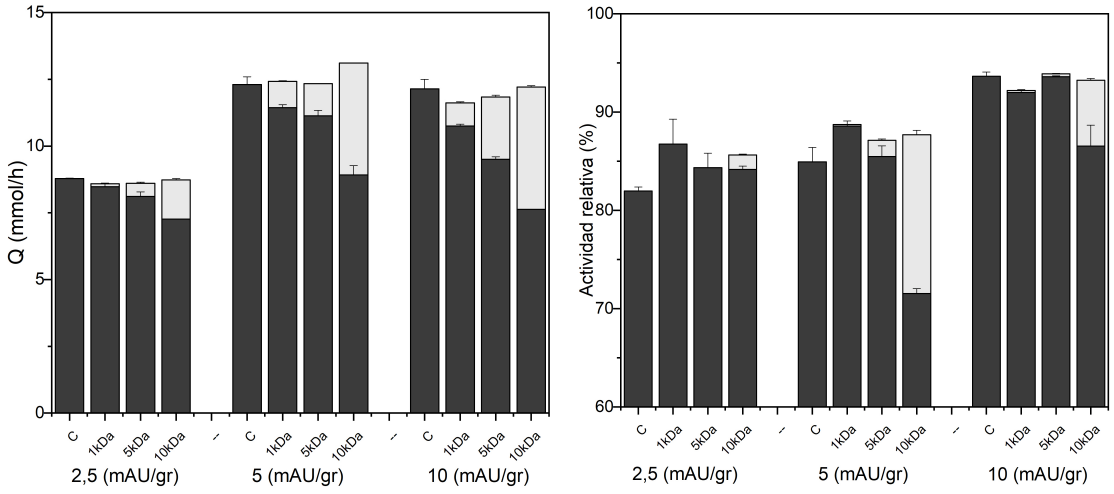


Figura 6.15: Resultados experimentales **RCB F_2** concentración de enzima. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles de F_2 (1 = 2.5 [mAU/g], 2 = 5 [mAU/g] y 3 = 10 [mAU/g]). Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $V_R = 0.2$ [L], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min]..

6.2.4. RCB F_3 - Volumen del reactor

La Figura 6.16 presenta los resultados experimentales del RCB F_3 en los tres niveles de tratamiento ($V_R = 0.2$ [L], 0.4 [L] y 1 [L]). Los incisos A, B y C, muestran las concentraciones de producto en el concentrado en función del tiempo de reacción. Se evidencia como aumentar el volumen del reactor resulta en un disminución del efecto del F_S, ya que los perfiles de concentración de producto se superponen con el perfil del control batch en los niveles 2 y 3 anterior a los 30 [min] de reacción. Para los tiempos de reacción 45 [min] y 60 [min] en los niveles 2 y 3, se aprecia como la concentración de producto en el concentrado aumenta, pero con una menor incidencia del F_S en todos los SCEMR. Esto se debe a que la TCC disminuye dado el incremento del volumen del reactor (Tabla 6.20), logrando una disminución del efecto de la inhibición causada por el producto de la reacción y, por consiguiente, un aumento de la concentración de

Tabla 6.20: Tasas de concentración para el **RCB F_3**

Niveles (V_R)	**Tasa de concentración [1/h]**		
	1 [kDa]	5 [kDa]	10 [kDa]
0.2 [L]	0.1326	0.2301	0.5215
0.4 [L]	0.0878	0.1180	0.3547
1.0 [L]	0.0435	0.1471	0.1925

péptidos hidrolizados. Nuevamente se observa el perfil de concentración lineal para el SCEMR de 10 [kDa] conforme avanza la hidrólisis enzimática de proteínas, siendo el límite superior de concentración en todos los escenarios experimentales.

Las Figuras 6.16 D, E y F presentan la dinámica de las moles en el concentrado conforme avanza la reacción. En estas se aprecia como aumentar el volumen del reactor i) elimina los perfiles parabólicos para los SCEMR de 10 [kDa] - 5 [kDa] que se habían evidenciado en los experimentos de sustrato y enzima y ii) como las moles en el concentrado del nivel 3 superponen a las moles del control en todos los SCEMR. Esto sucede debido a que la disminución de la TCC en el reactor de 1 [L], merma el efecto de la separación por sobre la reacción. Logrando una mayor cantidad de moles efectivas de producto en el concentrado y, por consiguiente, un aumento en la productividad de todos los SCEMR.

Para las concentraciones del permeado al final de la reacción (Figuras 6.16 G, H e I), se evidencia como aumentar el V_R genera un incremento en las moles de producto ultrafiltrado para el nivel 3 (comparado con el 1 y 2). Esto debido a que la concentración en el concentrado no aumenta por cuenta del F_S y, por consiguiente, la polarización por concentración en la superficie de la membrana disminuye, aumentando el paso de producto hacia el permeado en todos los SCEMR. Finalmente, las Figuras 6.16 J, K y L, presentan los flux filtrados para los tres niveles. Indicando que el aumento del volumen del reactor permite alcanzar mayores flux para los SCEMR de 5 [kDa] y 10 [kDa]. Esto repercute positivamente en el aumento de la concentración de péptidos hidrolizados hacia el permeado y confirma lo anteriormente discutido con respecto a la disminución de la resistencia impuesta por el fenómeno de polarización por concentración en la membrana de UF. El mayor efecto se apreció para el SCEMR de 10 [kDa], en donde al flux final aumento en un 144 [%] para el nivel 2 y 205 [%] para el nivel 3.

La Tabla 6.21 lista los resultados promedio de la productividad ($\bar{Q}$) y de la actividad relativa ($\bar{A_R}$) para cada bloque del RCB F_3. En términos de la productividad, se observa un incremento tanto por bloque como por tratamiento estudiado. Esto indica que acrecentar el volumen del reactor no solo consigue un aumento efectivo de la productividad del proceso por tratamiento estudiado, sino que también entre los diferentes SCEMR que lo contienen. Para el caso de la actividad relativa, se evidencia como todos los SCEMR obtienen una menor perdida de actividad comparada con el control de cada tratamiento. Esto puede deberse a la estabilización de la enzima en la superficie de la membrana y a que las moles de producto en el reactor se mantienen similares a las del control, logrando un efecto de modulación positivo por cuenta de la combinación de ambos efectos. La validación de los supuesto de normalidad y homocedasticidad previo al análisis ANOVA de los resultados del RCB F_3, se presenta en las Tablas C.6 y C.7. Se aprecia como los set de datos por bloques de productividad no son homocedasticos. Esto ocurre debido a que el incremento de productividad en el reactor de 1 [L] es superior en términos numéricos al conseguido con los reactores de 0.2 [L] y 0.4 [L], lo que hace que el test de varianza rechace la hipótesis nula e indique diferencia entre el radio de la varianzas. Para el caso de los niveles, 11 análisis cumplen

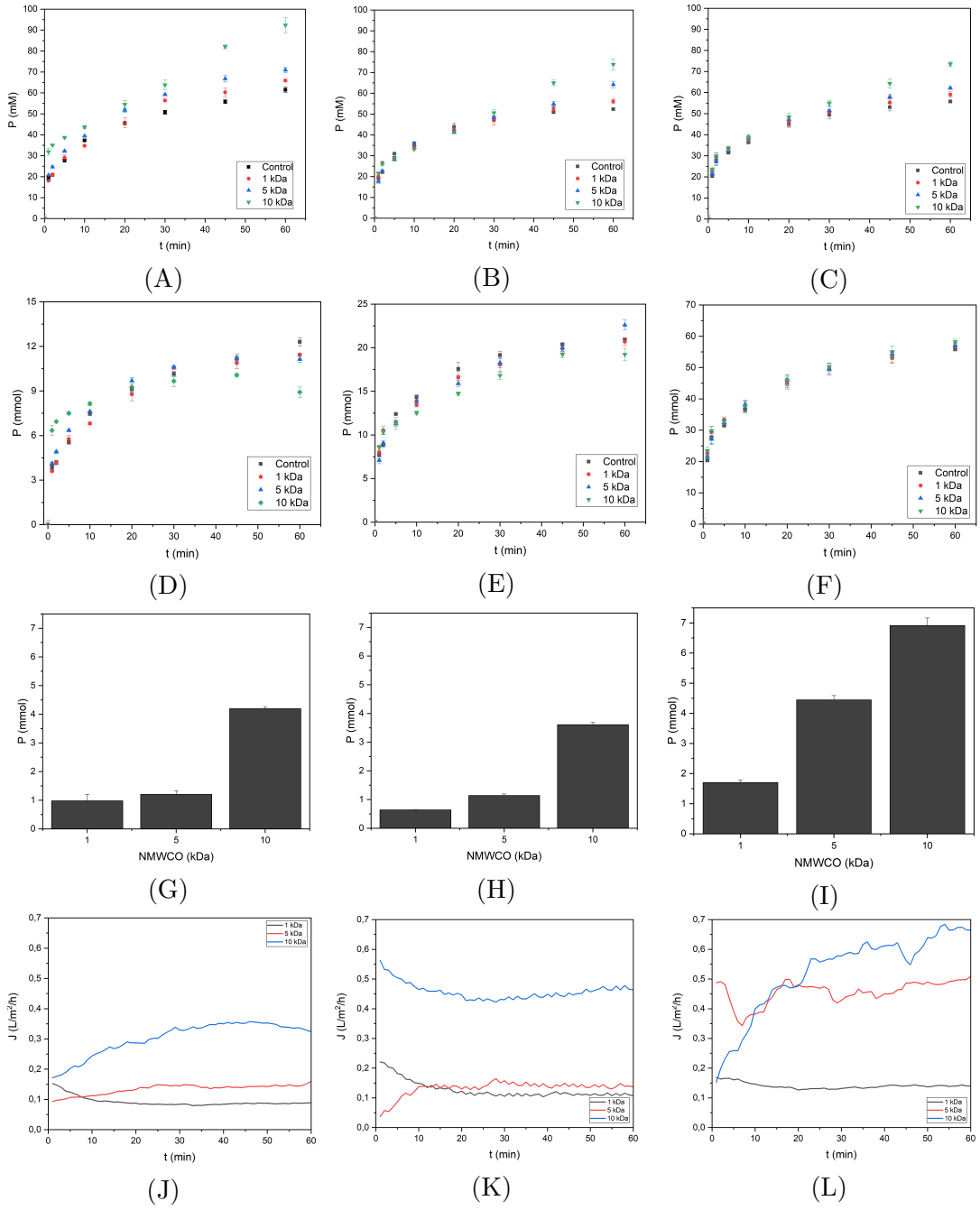


Figura 6.16: Resultados experimentales **RCB F_3**. Cada columna corresponde a un nivel de F_3 (0.2 [L], 0.4 [L] y 1 [L]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

con el test y se valida la hipótesis nula, exceptuando al nivel 1 de la productividad que se no pasa el test de normalidad dada la proximidad de los valores nominales del

control, 1 [kDa] y 5 [kDa] y su diferencia con 10 [kDa]. Por consiguiente, se procede a realizar el análisis de varianza ANOVA.

Tabla 6.21: Resultados para el **RCB $\mathbf{F_3}$** volumen del reactor. Niveles de F_3 (1 = 0.2 [L], 2 = 0.4 [L] y 3 = 1 [L]). Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

Bloque	**F_3 (n)**	$\bar{Q}$ **[mmol/h]**	$\bar{A_R}$ **[%]**
Control	1	12.30	84.93
	2	20.94	85.88
	3	55.79	87.78
1 [kDa]	1	12.42	88.73
	2	21.34	92.73
	3	58.55	89.55
5 [kDa]	1	12.33	87.14
	2	23.75	94.57
	3	61.54	86.58
10 [kDa]	1	13.11	87.70
	2	22.83	97.55
	3	65.12	94.46

Los resultados del análisis ANOVA para el RCB F_3 se listan en las Tablas C.8 y C.9. Estos indican diferencia significativa para los tratamientos de productividad, pero no así para los de actividad relativa. Por consiguiente, con un 5 [%] de significancia, es posible rechazar la hipótesis nula y afirmar que la media de todos los tratamientos de productividad es diferente, pero no así los de actividad relativa. Esto último demuestra que para estas condiciones de operación, la actividad relativa se mantiene relativamente constante en todos los procesos de reacción-separación. Sin embargo, debido a que el resultado de la prueba es cercano al nivel de significancia utilizado (*p-value* 0.0646), se procedió a realizar el análisis de tratamientos en ambas variables.

La validación de los supuestos del análisis ANOVA por nivel de tratamiento para las réplicas de los resultados de la Tabla 6.21, se presentan en la Figura C.2. Las Figuras C.2 A-F presentan los resultados visuales del gráfico de probabilidad Q-Q plot (quantile-quantile plot), indicando que todos los set de datos cumplen con el supuesto de normalidad. En términos de las varianzas (Figura C.2 G-L), se evidencia que los datos pueden considerarse con variabilidad semejante para todos los set de datos analizados. La Tabla C.10 presenta los resultados de los análisis ANOVA para cada nivel de tratamiento en términos de la productividad y de la actividad relativa.

Se demuestra como con una prueba estadística F de 7.28 y un valor-F de p < a 0.05, se rechaza la hipótesis nula a un 5 [%] de nivel de significancia. Concluyendo que hay suficiente evidencia estadística para decir que existe al menos un SCEMR que se diferencia del reactor control del proceso y, por consiguiente, aumenta la productividad del proceso. En términos de la actividad relativa, vemos que el nivel de

tratamiento 2 (0.4 L), estuvo cercano al nivel de significancia estipulado; se infiere que esta diferencia se dio entre el control y el SCEMR de 10 [kDa]. Por lo anterior, se procede a realizar un análisis post-hoc para determinar específicamente la categoría que presenta la diferencia significativa.

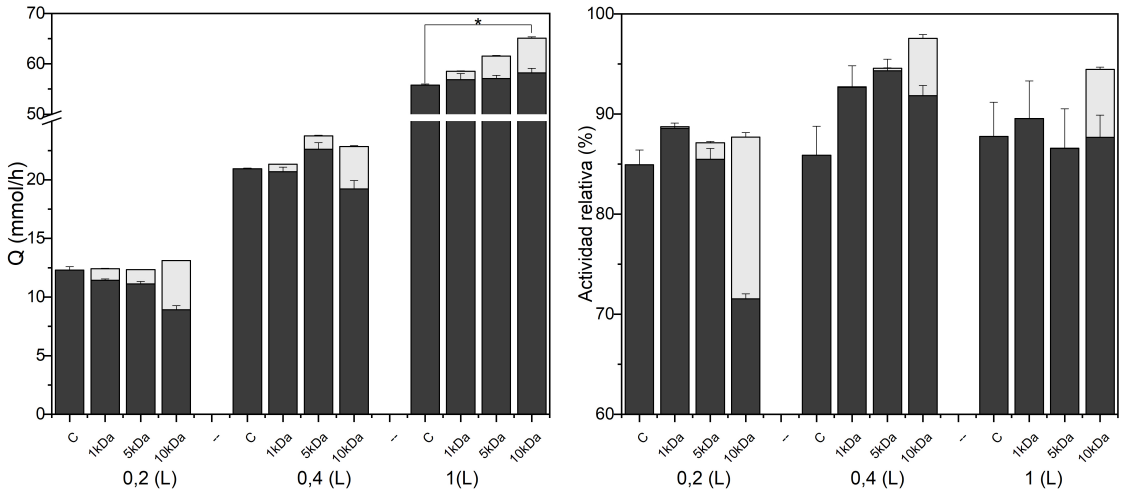
Para el análisis post-hoc se escogió el test de Tukey implementado en R (TukeyHSD), debido a que realiza la inferencia estadística de forma simultánea para todas las variables categóricas contenidas en el estudio y calcula los intervalos de confianza de la estimación. Los resultados se presentan en la Tabla 6.22, indicando que la diferencia significativa se encuentra entre el control y el SCEMR de 10 [kDa], seguida por el SCEMR de 5 [kDa]. Por consiguiente, implementar una membrana de UF de 10 [kDa] en un SCEMR de 1 [L] para la hidrólisis enzimática de proteínas de APSL, aumenta significativamente la productividad del proceso comparado con un reactor operado en modalidad batch.

Tabla 6.22: Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad en nivel de tratamiento del 3 **RCB** $\mathbf{F_3}$ (VCC = variables categóricas de comparación).

VCC	**Dif.**	**L. inf.**	**L. sup.**	***p-value* adj**	**Sig. code**
1[kDa]-Control	4.9709	-5.4463	15.3880	0.3402	
5[kDa]-Control	7.9571	-2.4601	18.3742	0.1127	
10[kDa]-Control	11.5385	1.1214	21.9557	0.0358	*
5[kDa]-1[kDa]	2.9862	-7.4310	13.4034	0.6748	
10[kDa]-1[kDa]	6.5677	-3.8495	16.9848	0.1865	
10[kDa]-5[kDa]	3.5815	-6.8357	13.9986	0.5598	

La Figura 6.17 presenta los resultados de los análisis experimentales y estadísticos para el escenario de volumen. En términos de la productividad, se observa como acrecentar el volumen del reactor consigue aumentar la concentración de producto en los permeados de los SCEMR. Esto debido a la disminución del efecto generado por el F_S que concentra al sustrato y al producto, aumentando la polarización por superficie de la membrana. Finalmente, para la actividad relativa, se observa como una menor concentración de enzima llega al permeado conforme se incrementa el volumen del reactor. Se infiere que esto sucede debido a que la enzima al encontrarse en un mayor volumen de reacción debe recircularse una mayor cantidad de veces por el sistema, disminuyendo la probabilidad de depositarse en la superficie de la membrana y pasar al permeado. Con los resultados obtenidos se procedió a aumentar el volumen de reactor para validar si una diferencia significativa podría encontrarse para los SCEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa]. Esto se realizó en las mismas condiciones de operación con un V_R de 2 [L] a 1 [h] y 3 [h] de operación, obtenido los resultados de la Figura 6.18. Los incisos A y B presentan las concentraciones para cada uno de los SCEMR con sus respectivos controles, para los diferentes tiempos de operación.

Se observa como existe un primer punto de divergencia a la 60 [min] de reacción entre los diferentes perfiles de concentración (Figura 6.18A), el cual es amplificado en el experimento de 3 [h] de operación (Figura 6.18B). Dado que las TCC de estos



(A) (B)

Figura 6.17: Resultados experimentales **RCB $\mathbf{F_3}$** volumen del reactor. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles de F_3 (1 = 0.2 [L], 2 = 0.4 [L] y 3 = 1 [L]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

escenarios es lo suficientemente baja como para suponer una disminución del efecto del F_S (Tabla 6.23), se infiere que el aumento de concentración de producto se da por cuenta de la disminución de la inhibición por producto, estando la reacción controlada por el F_R.

Tabla 6.23: Tasas de concentración para V_R **2 [L]**.

Niveles (t)	**Tasa de concentración [1/h]**		
	1 [kDa]	5 [kDa]	10 [kDa]
1 [h]	0.0256	0.0654	0.1014
3 [h]	0.0284	0.0258	0.1071

Las Figuras 6.18 B y C, presentan la dinámica del producto de hidrólisis en el concentrado para las dos escenarios estudiados. A diferencia de los experimentos de V_R de 1 [L], se observa que a partir de 1 [h] de operación, existe un aumento de las moles para todos los SCEMR que se intensifica conforme avanza el tiempo de la reacción. Esto indica que el proceso se hace más eficiente conforme aumentan el tiempo de reacción, en especial para los SCEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa] que obtuvieron la mayor cantidad de moles a las 3 [h] de operación. Para el caso de los permeados de la reacción (6.18 E y F), se observa como el aumento del tiempo de la reacción resulto en un incremento de las moles de producto en el permeado para todos los SCEMR. En el caso del SCEMR de 5 [kDa] para las 3 [h] de operación, se esperaba una mayor cantidad de moles al final del proceso. Se infiere que esto no sucedió debido a que la membrana no se encontraba en condiciones óptimas de limpieza, lo que puede

contrastarse con el perfil del flux de la Figura H, el cual fue menor para todo el intervalo de tiempo analizado. Finalmente, las Figuras 6.18 G y H denotan que el aumento del volumen del reactor y del tiempo de reacción, resultó en los mayores flux obtenidos para el SCEMR de 10 [kDa], encontrándose una asociación positiva lineal conforme avanza el proceso reactivo.

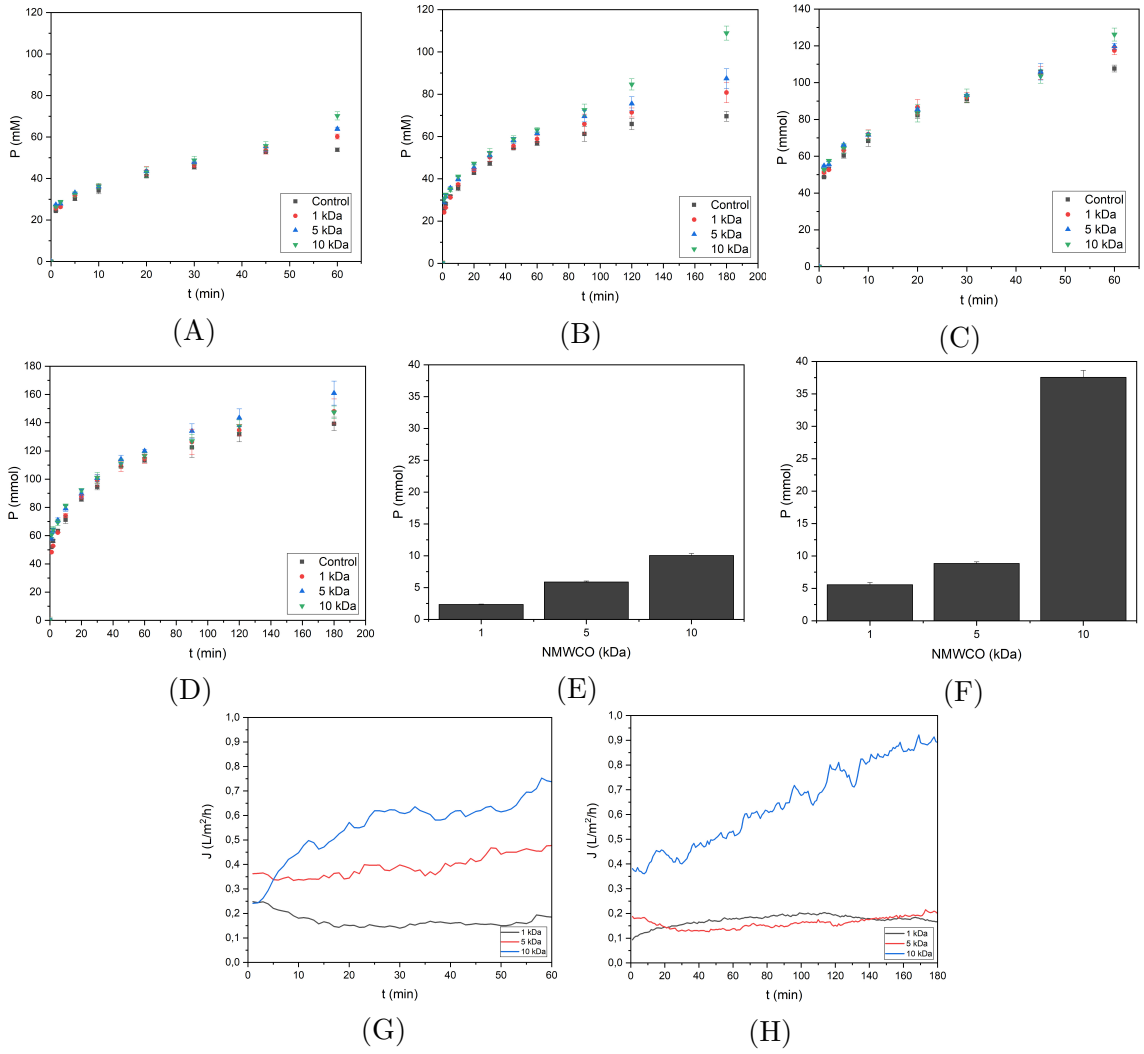


Figura 6.18: Resultados experimentales V_R de **2 [L]**. Cada columna corresponde a un tiempo diferente de operación (1 [h] y 3 [h]). **A-B)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **C-D)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **E-F)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **G-H)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, F = 66 [mL/min].

La Tabla 6.24 presenta los resultados promedio de la productividad ($\bar{Q}$) y de la actividad relativa ($\bar{A_R}$) para los dos niveles del tratamiento. En términos de la productividad, se observa un incremento tanto por bloque como por tratamiento estudiado. Esto indica que acrecentar el volumen del reactor aumenta la productividad

del proceso y que este efecto se mantiene aun cuando el tiempo del reacción se triplica. Para el caso de la actividad relativa se evidencia como los SCEMR a las 3 [h] de operación, se ven fuertemente afectados por la inactivación térmica de la enzima. Esto puede deberse a que la enzima reacciona con una mayor cantidad de moles de producto afectando negativamente a la modulación positiva en todos los escenarios SCEMR.

Tabla 6.24: Resultados para V_R **2 [L]**. Niveles del tiempo de reacción (1 = 1 [h] y 2 = 3 [h]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, F = 66 [mL/min].

Bloque	**F(n)**	Q **[mmol/h]**	$\bar{A_R}$ **[%]**
Control	1	107.68	98.16
	2	47.28	83.84
1 [kDa]	1	119.90	95.13
	2	51.17	82.87
5 [kDa]	1	125.65	99.22
	2	55.73	81.66
10 [kDa]	1	136.20	97.46
	2	58.05	80.34

La validación de los supuestos para la realización del análisis ANOVA por nivel de tratamiento para las réplicas de los resultados de la Tabla 6.24, se presentan en la Figura C.3. Las Figuras C.3 A-D muestran los resultados visuales del gráfico de probabilidad Q-Q plot (quantile-quantile plot), indicando que todos los set de datos cumplen con el supuesto de normalidad. En términos de las varianzas (Figura C.3 E-H), se evidencia que los datos pueden considerarse con variabilidad semejante para todos los set de datos analizados, resaltando que la menor variabilidad se presentó para el SCEMR de 10 [kDa] en el set de datos de productividad a las 3 [h] de operación (Figura C.3F). La Tabla C.11 presenta los resultados de los análisis ANOVA para cada nivel de tratamiento en términos de la productividad y de la actividad relativa.

El análisis indica en términos de la productividad para 1 [h] y 3 [h] de operación, con una prueba estadística F de 32.76 y 17.78 un valor-F de p $\ll$ a 0.05, un rechazo de la hipótesis nula a un 5 [%] de nivel de significancia. Concluyendo que hay suficiente evidencia estadística para decir que existe al menos un SCEMR que se diferencia del reactor control del proceso en ambos escenarios. En términos de la actividad relativa, se acepta la hipótesis nula en los dos escenarios. Por lo anterior, se procede a realizar un análisis post-hoc para determinar específicamente la categoría que presenta la diferencia significativa.

Los resultados del análisis post-hoc por la metodología de Tukey se presentan en las Tablas 6.25 y 6.26, indicando que la diferencia significativa se encuentra en el primer escenario entre los tres SCEMR y el control del proceso y, en la segunda, entre los SCEMR de 5 [kDa] - 10 [kDa] y el control. Por consiguiente, la implementación de los SCEMR en un reactor de 2 [L] para la hidrólisis enzimática de proteínas de APSL,

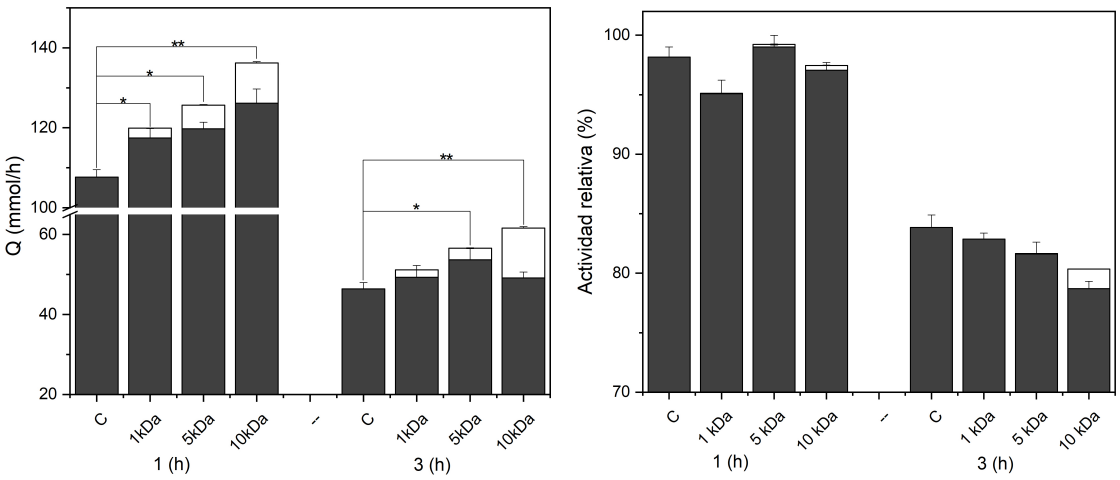
aumenta significativamente la productividad del proceso enzimático comparado con un reactor operado en las mismas condiciones en modalidad batch, condición que se mantiene aun cuando el tiempo de reacción se incrementa de 1 [h] a 3 [h] de proceso.

Tabla 6.25: Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del V_R de **2 [L]** en el nivel de tratamiento 1 (1 [h] - VCC = variables categóricas de comparación).

VCC	**Dif.**	**L. inf.**	**L. sup.**	***p-value* adj**	**Sig. code**
1[kDa]-Control	12.2175	0.2647	24.1704	0.0466	*
5[kDa]-Control	17.9666	6.0137	29.9195	0.0124	*
10[kDa]-Control	28.5121	16.5593	40.4650	0.0022	**
5[kDa]-1[kDa]	5.7491	-6.2038	17.7019	0.3352	
10[kDa]-1[kDa]	16.2946	4.3417	28.2475	0.0175	*
10[kDa]-5[kDa]	10.5455	-1.4074	22.4984	0.0740	.

Tabla 6.26: Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del V_R **2 [L]** en el nivel de tratamiento 2 (3 [h] - VCC = variables categóricas de comparación).

VCC	**Dif.**	**L. inf.**	**L. sup.**	***p-value* adj**	**Sig. code**
1[kDa]-Control	4.7729	-4.2413	13.7871	0.2771	
5[kDa]-Control	10.2023	1.1880	19.2165	0.0333	*
10[kDa]-Control	15.2317	6.2174	24.2459	0.0081	**
5[kDa]-1[kDa]	5.4294	-3.5849	14.4436	0.2081	
10[kDa]-1[kDa]	10.4588	1.4446	19.4730	0.0306	*
10[kDa]-5[kDa]	5.0294	-3.9848	14.0436	0.2477	



(A) (B)

Figura 6.19: Resultados experimentales para V_R **2 [L]**. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles del tiempo de reacción (1 = 1 [h] y 2 = 3 [h]). Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, F = 66 [mL/min].

La Figura 6.19 presenta los resultados de los análisis experimentales y estadísticos para el escenario de V_R de 2 [L]. En términos de la productividad, se observa como aumentar el tiempo de reacción resulta en una disminución de la productividad del proceso. Esto debido a que la concentración y las moles efectivas de producto no se triplicaron, dada la limitación que existe en el proceso por cuenta de los enlaces peptídicos máximos disponibles para hidrólisis en el sustrato. Sin embargo, en ambos escenarios los SCEMR lograron una mayor cantidad de moles de producto y, por consiguiente, aumentaron la productividad global del proceso. Finalmente, para la actividad relativa, se observa como en los SCEMR hubo una mayor pérdida de actividad enzimática a la 3 [h] de reacción. Se asume que esto pudo ocurrir por cuenta del efecto combinado de la inactivación térmica de la enzima y del aumento del *fouling* en la superficie de la membrana conforme avanzaba la reacción, causando una disminución de actividad relativa cercana al nivel de significancia establecido para decretar diferencia significativa.

6.3. Sección 3 - Experimentos CEMR

6.3.1. Diafiltración

La Figura 6.20 presentan los resultados experimentales del reactor CEMR operado en modalidad diafiltración en los tres niveles de tratamiento para el flujo de alimentación (F_A) al modulo de UF (33.3 [mL/min], 66.6 [mL/min] y 90.0 [mL/min]). Los incisos A, B y C, muestran las concentraciones de producto en el concentrado en función del tiempo de reacción, evidenciando como: i) al ser el volumen de reacción constante, la concentración en el reactor presenta los perfiles parabólicos que en la modalidad SCEMR se obtenían en el perfil dinámico de las moles de producto, ii) todos los escenarios el límite superior es la concentración obtenida por el control y iii) todos los CEMR aumenta ligeramente su concentración en el concentrado en el paso del nivel 1 al 2, pero no así del 2 al 3. Esto puede deberse a que el modulo tiene una capacidad máxima de flujo axial de producto hacia el permeado y, por consiguiente, aumentar la velocidad de alimentación al modelo no genera una disminución de la concentración de producto en el concentrado.

Las Figuras 6.20 D, E y F presentan la dinámica de las moles del producto de la reacción en el concentrado para cada uno de los escenarios estudiados. En estas se aprecia como: i) las moles en el retento presentan un perfil igual al de la concentración dada la naturaleza isocórica del sistema y ii) como en los tres escenarios el CEMR de 10 [kDa] presentó un perfil parabólico en la dinámica de las moles de producto de la reacción. Esto ultimo se condice con las tasas de dilución del concentrado (TDC - definida en términos matemáticos igual a la TCC) presentadas en la Tabla 6.27. En donde su valores nominales indican que aproximadamente el 50 [%] del volumen de reactor al final de la reacción fue reemplazado por agua desionizada, causando la disminución parabólica de la concentración de producto en el concentrado. Para las concentraciones del permeado al final de la reacción (Figuras 6.20 G, H e I), se evi-

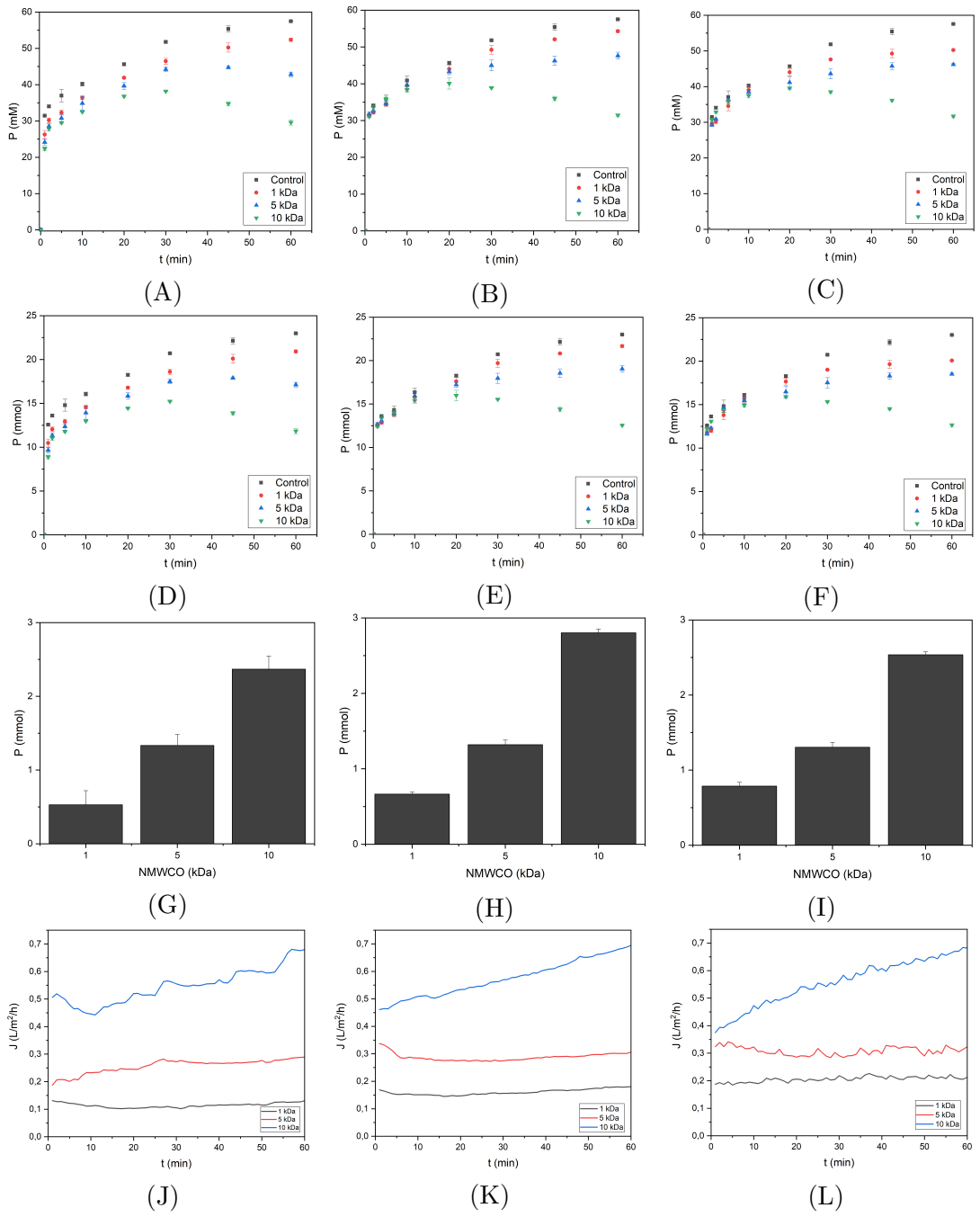


Figura 6.20: Resultados experimentales CEMR en modalidad diafiltración. Cada columna corresponde a un nivel de flujo de alimentación al modulo de UF (33 [mL/min], 66 [mL/min] y 90 [mL/min]). **A-B-C)** Concentración del producto en el concentrado en función del tiempo. **D-E-F)** Moles del producto en el concentrado en función del tiempo. **G-H-I)** Moles del producto en el permeado al final de la reacción. **J-K-L)** Flux en función del tiempo. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min] y $V_R = 0.4$ [L].

Tabla 6.27: Tasas de dilución para el $\mathbf{F}_A$

Niveles (F)	**Tasa de dilución [1/h]**		
	1 [kDa]	5 [kDa]	10 [kDa]
33 [mL/min]	0.0913	0.2175	0.4582
66 [mL/min]	0.1300	0.2268	0.4875
90 [mL/min]	0.1675	0.2467	0.4822

dencia como se consigue un incremento de la concentración de producto al aumentar el F_A del nivel 1 al 2, pero no así del 2 al 3. Esto se condice con lo anteriormente discutido con respecto a la capacidad máxima de flujo axial de las membranas de UF. Finalmente, las Figuras 6.20 J, K y L, presentan los flux filtrados para los tres niveles. Indicando una reproducibilidad de los flux de permeado para los CEMR de 10 [kDa] y 5 [kDa] en los 3 niveles. Se observa como el flux para el CEMR de 1 [kDa] aumenta conforme aumenta el flujo de alimentación al modulo de UF. Esto sucede debido a que en la modalidad diafiltración, se anula el efecto de la concentración del concentrado producto del F_S y, por consiguiente, el volumen fresco de agua que ingresa al sistema diluye la concentración de producto en el seno de la separación, lo que combinado con el aumento del flujo de alimentación, merman la resistencia producida por el *fouling* y causan un aumento progresivo del flux conforme avanza la reacción.

La Tabla 6.28 lista los resultados promedio de la productividad ($\bar{Q}$) y de la actividad relativa ($\bar{A_R}$) para cada bloque de los experimentos de diafiltración. En términos de la productividad, se observa un incremento para los CEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa]

Tabla 6.28: Resultados para experimentos diafiltración. Niveles del flujo de alimentación (1 = 33 [mL/min], 2 = 66 [mL/min] y 3 = 90 [mL/min]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min] y V_R = 0.4 [L].

Bloque	**F(n)**	$\bar{Q}$ **[mmol/h]**	$\bar{A_R}$ **[%]**
Control	1	22.98	90.83
	2	23.10	90.55
	3	23.02	90.99
1 [kDa]	1	23.39	89.17
	2	25.20	98.13
	3	23.48	88.32
5 [kDa]	1	23.82	84.29
	2	25.06	85.67
	3	24.72	85.11
10 [kDa]	1	22.16	91.46
	2	22.75	91.06
	3	22.64	95.01

comparados con el control, y una disminución para el de 10 [kDa] en todos los escenarios. Esto ultimo debido a las altas tasas de dilución que afectaron negativamente al proceso de hidrólisis enzimática de proteínas. Para el caso de la actividad relativa, se observa como los CEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa] presentan una leve perdida de actividad comparado con el control. En el caso del reactor de 10 [kDa], esta fue ligeramente superior en todos los escenarios. La validación de los supuestos para la realización del análisis ANOVA por nivel de tratamiento para las réplicas de los resultados de la Tabla 6.28, se presentan en la Figura C.4. Las Figuras C.4 A-F muestran los resultados visuales del gráfico de probabilidad Q-Q plot (quantile-quantile plot), indicando que todos los set de datos cumplen con el supuesto de normalidad. En términos de las varianzas (Figuras C.4 G-L), se demuestra que los datos pueden considerarse con variabilidad semejante para todos los set de datos analizados. La Tabla C.12 lista los resultados de los análisis ANOVA para cada nivel de tratamiento en términos de la productividad y de la actividad relativa.

El análisis indica en términos de la productividad que para los niveles 1 y 2 del experimento (33.3 [mL/min] y 66.6 [mL/min] de flujo de alimentación a la membrana de UF), con una prueba estadística F de 8.87 y 30.4 un valor-F de p $\ll$ a 0.05, rechazando de la hipótesis nula a un 5 [%] de nivel de significancia. Concluyendo que hay suficiente evidencia estadística para decir que existe al menos un CEMR en modalidad diafiltración que se diferencia del reactor control del proceso en ambos escenarios. En términos de la actividad relativa, se acepta la hipótesis nula en todos los casos. Por lo anterior, se procede a realizar un análisis post-hoc para determinar específicamente la categoría que presenta la diferencia significativa.

Los resultados del análisis post-hoc por la metodología de Tukey se presentan en las Tablas 6.29 y 6.30, denotando que la diferencia significativa se encuentra en el primer escenario entre los CEMR de 1 [kDa] y 10 [kDa] y, en la segunda, entre i) los CEMR de 1 [kDa] - 5 [kDa] y el control y, ii) entre los CEMR 1 [kDa] - 5 [kDa] y 10 [kDa]. Por consiguiente, implementar un CEMR en modalidad diafiltración a un F_A de 66.6 [mL/min] para la hidrólisis enzimática de proteínas de APSL, aumenta significativamente la productividad de la hidrólisis enzimática de proteínas comparado con un reactor operado en las mismas condiciones en modalidad batch. Este resultado

Tabla 6.29: Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del F_A en el nivel de tratamiento 1 (33.3 [mL/min] - VCC = variables categóricas de comparación).

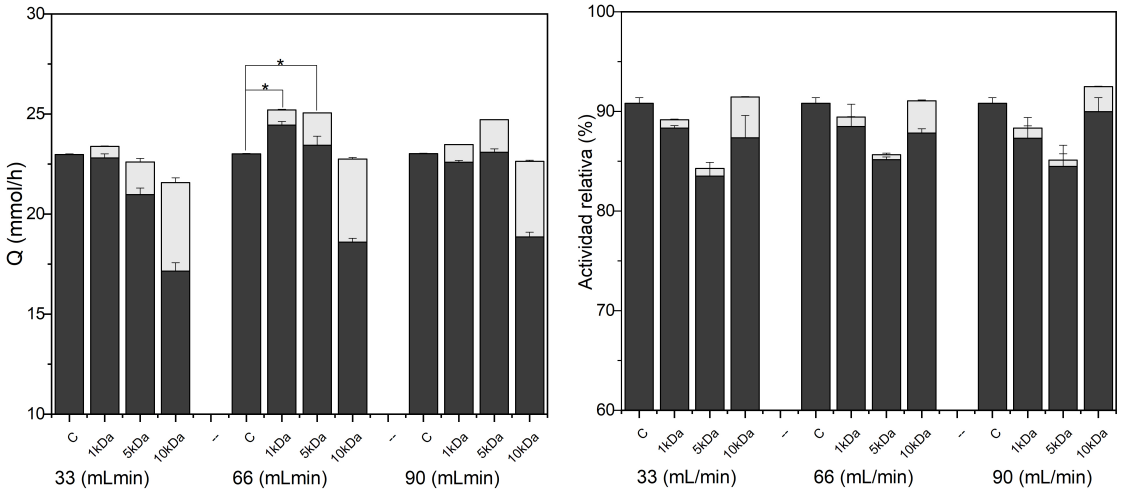
VCC	**Dif.**	**L. inf.**	**L. sup.**	***p-value* adj**	**Sig. code**
1[kDa]-Control	0.4099	-1.0978	1.9176	0.7052	
5[kDa]-Control	-0.3740	-1.8817	1.1337	0.7537	
10[kDa]-Control	-1.4105	-2.9182	0.0972	0.0617	.
5[kDa]-1[kDa]	-0.7839	-2.2916	0.7239	0.2877	
10[kDa]-1[kDa]	-1.8204	-3.3281	-0.3127	0.0267	*
10[kDa]-5[kDa]	-1.0365	-2.5442	0.4712	0.1499	

es bastante interesante debido a que inicialmente se consideraba que únicamente la PTM tendría un efecto significativo en la concentración total de producto resultante del proceso de UF; lo cual indica que el F_A al modulo de UF es una variable relevante que debe caracterizarse detalladamente con el objetivo de optimizar los procesos CEMR y SCEMR.

Tabla 6.30: Resultados del test TukeyHSD en R para la productividad del F_A en el nivel de tratamiento 2 (66.6 [mL/min] - VCC = variables categóricas de comparación).

VCC	**Dif.**	**L. inf.**	**L. sup.**	***p-value* adj**	**Sig. code**
1[kDa]-Control	2.1982	0.8336	3.5628	0.0096	**
5[kDa]-Control	2.0555	0.6909	3.4201	0.0122	*
10[kDa]-Control	-0.2548	-1.6194	1.1098	0.8685	
5[kDa]-1[kDa]	-0.1427	-1.5073	1.2219	0.9710	
10[kDa]-1[kDa]	-2.4530	-3.8177	-1.0885	0.0064	**
10[kDa]-5[kDa]	-2.3104	-3.6750	-0.9458	0.0080	**

La Figura 6.21 presenta un resumen de los resultados estadísticos y experimentales obtenidos para el CEMR en modalidad diafiltración. En el caso de la productividad, se observa como en los tres escenarios la misma proporción de producto pasa hacia el permeado (siendo levemente superior en el nivel 1) y como los retentados del nivel 2 (66 [mL/min]) son superiores para los CEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa]. Logrando estas modalidades diferenciarse del control del proceso y aumentar significativamente la productividad del proceso. Finalmente, se evidencia como la actividad relativa



(A) (B)

Figura 6.21: Resultados experimentales diafiltración. A) Productividad, B) Actividad relativa (Negro - asociado al concentrado, Gris - asociado al permeado). Niveles del flujo de alimentación (1 = 33 [mL/min], 2 = 66 [mL/min] y 3 = 90 [mL/min]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min] y V_R = 0.4 [L].

se mantiene constante en los 3 niveles de tratamiento para cada una de las variables categóricas que lo constituyen, siendo adicionalmente consistentes sus concentraciones tanto en concentrado como en permeado. Esto sugiere que no existe efecto alguno de perdida de actividad de la enzima por cuenta del esfuerzo de corte que produce la bomba de alimentación al modulo de UF.

6.3.2. Fed-batch

La Figura 6.22 presentan los resultados experimentales del reactor CEMR operado en modalidad fed-batch para los 3 NMWCO (1 [kDa], 5 [kDa] y 10 [kDa]). Los incisos A, B y C, muestran las concentraciones y las moles de producto en el concentrado en función del tiempo de reacción, evidenciando que al ser el proceso isocórico por medio de una alimentación continua de sustrato fresco, los perfiles de producto en modalidad CEMR son levemente inferiores a los del control en todos los escenarios, tendiendo a medida que el FCV aumenta a la concentración de producto obtenida en el control. Generalmente, el criterio para alcanzar el estado estacionario se establece entre los 4 a 6 tiempos de residencia, siendo el primero en términos del FCV 5. Por consiguiente, los valores de la concentración en FCV 6 pueden considerarse en estado estacionario, siendo estos similares e incluso superiores (CEMR 5 [kDa]) a los alcanzados por el

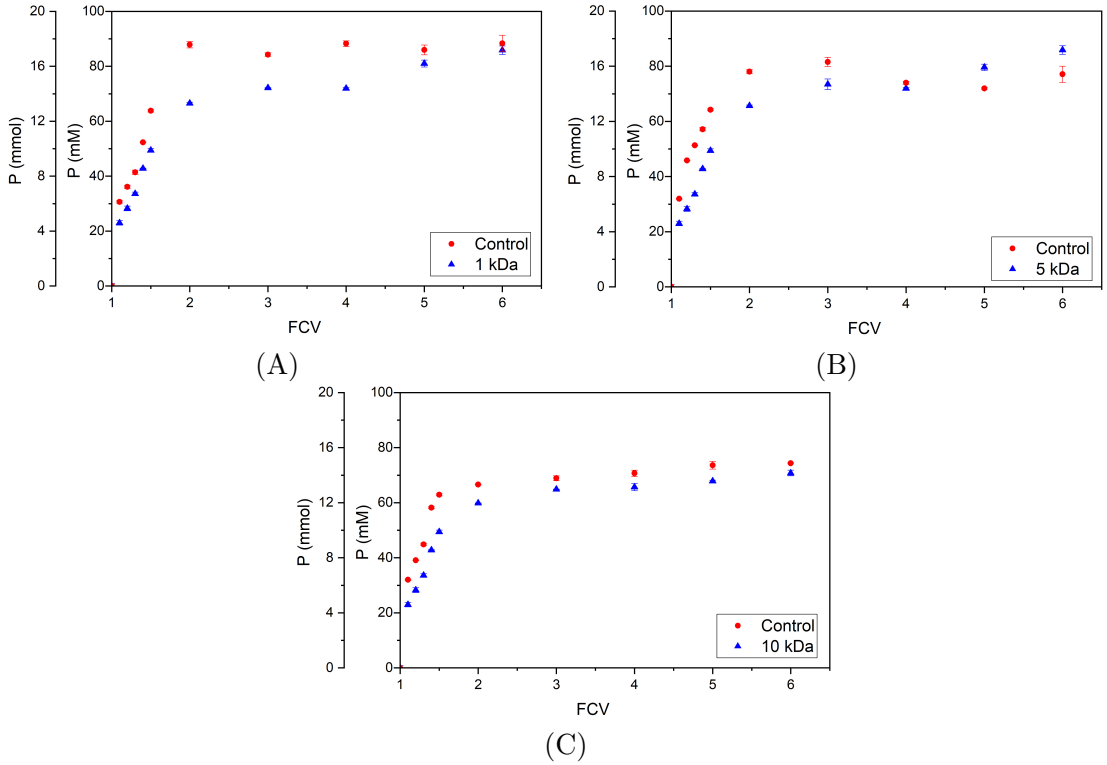


Figura 6.22: Concentración y moles de producto en CEMR operado en modalidad fed-batch como función del FCV. **A)** CEMR 1 [kDa]. **B)** CEMR 5 [kDa]. **C)** CEMR 10 [kDa]. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L].

control. Esto se debe a que el efecto de la inhibición por producto disminuye en la modalidad CEMR producto de la remoción de los péptidos hidrolizados por la membrana de UF, los cuales se acumulan en la modalidad batch y causan el estancamiento de la concentración obtenida. Se infiere que la concentración de producto en los CEMR en el intervalo FCV 2 a 6, aumenta única y exclusivamente por cuenta de la disminución del efecto de la inhibición por producto, ya que el *fouling* de todas las membranas aumentó conforme avanzaba la reacción, afectando el flux en todos los escenarios estudiados (Figura 6.23C). El ensuciamiento de la membrana de UF conforme avanza la reacción es el elemento más importante en la estabilidad del CEMR. Esto se debe a que la fracción de sustrato no hidrolizado por encima del NMWCO de la membrana de UF se enriquece, aumentando la probabilidad de ser adsorbido en la superficie de la membrana y consiguiendo reducciones significativas en el flux. Este efecto fue confirmado en el estudio de [Perea & Ugalde, 1996], en donde en un análisis FPLC del concentrado después de 10 [h] de reacción, se detectó el aumento de la concentración de péptidos de alto peso molecular (34 [kDa], 67 [kDa] y 110 [kDa]). Sugiriendo que esta modalidad puede ser mejorada en términos operativos utilizando pasos previos de prefiltración e incorporando cócteles enzimáticos capaces de hidrolizar todos los sustratos de proteínas presentes en las proteínas de suero de leche. La Tabla 6.31 lista la TDC de cada uno de los CEMR, indicando tasas similares para los escenarios de 1 [kDa] - 5 [kDa] y una mayor para el caso de 10 [kDa]. Esto último indica que a medida que una mayor cantidad de moles de producto abandona el reactor, la enzima logra interactuar con el sustrato fresco de una forma mas eficiente y, por consiguiente, aumentar la concentración de producto en el concentrado, disminuyendo la diferencia con respecto a la concentración obtenida por el control.

Tabla 6.31: Tasa de dilución del concentrado para el CEMR en modalidad fed-batch

NMWCO [kDa]	**TDC [1/h]**
1	0.1922
5	0.1889
10	0.4948

Las Figuras 6.23 A-B presenta los resultados de las concentraciones de producto y la cantidad de moles en el permeado con respecto al FCV. Se aprecia como la mayor concentración se alcanzó para el CEMR de 5 [kDa], seguida por 1 [kDa] y finalizando con 10 [kDa]. Esto se condice con los valores nominales de las TDC de la Tabla 6.31, que eventualmente diluyen la concentración de moles que migran hacia el concentrado. En términos de la cantidad de moles, se evidencia como existe un incremento lineal en el permeado conforme avanza la reacción. Esto indica que el proceso CEMR es superior en términos productivos a la modalidad batch, ya que la productividad de este ultimo es independiente al FCV, requiriendo por cada ciclo de operación la adición nueva de enzima y de sustrato. Lo que impide la reutilización de la enzima y, por consiguiente, disminuye la eficiencia del proceso y eleva sus costos de producción. La Figura 6.23C presenta los flux filtrados en función del tiempo de reacción, indicando la disminución progresiva del flux dado el aumento del efecto del

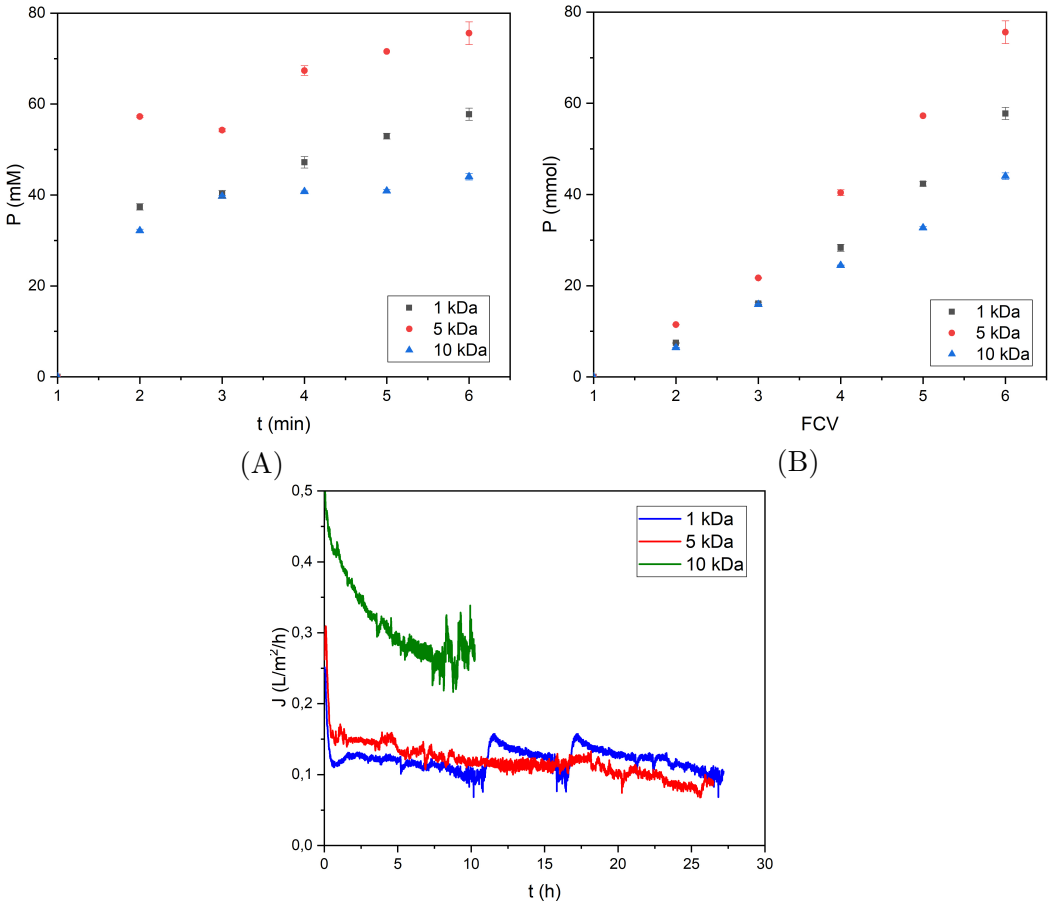


Figura 6.23: Resultados experimentales CEMR operado en modalidad fed-batch. **A)** Concentración de producto en el permeado en función del FCV. **B)** Moles de producto en el permeado en función del FCV. **C)** Flux en función del tiempo de reacción. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L].

fouling en la superficie de la membrana.

Tabla 6.32: Tiempos de vida media

Escenario	**Reactor**	$t_{1/2}$ **[h]**
1	Control	51.3
	CEMR 1 [kDa]	56.0
2	Control	60.0
	CEMR 5 [kDa]	81.9
3	Control	27.4
	CEMR 10 [kDa]	34.8

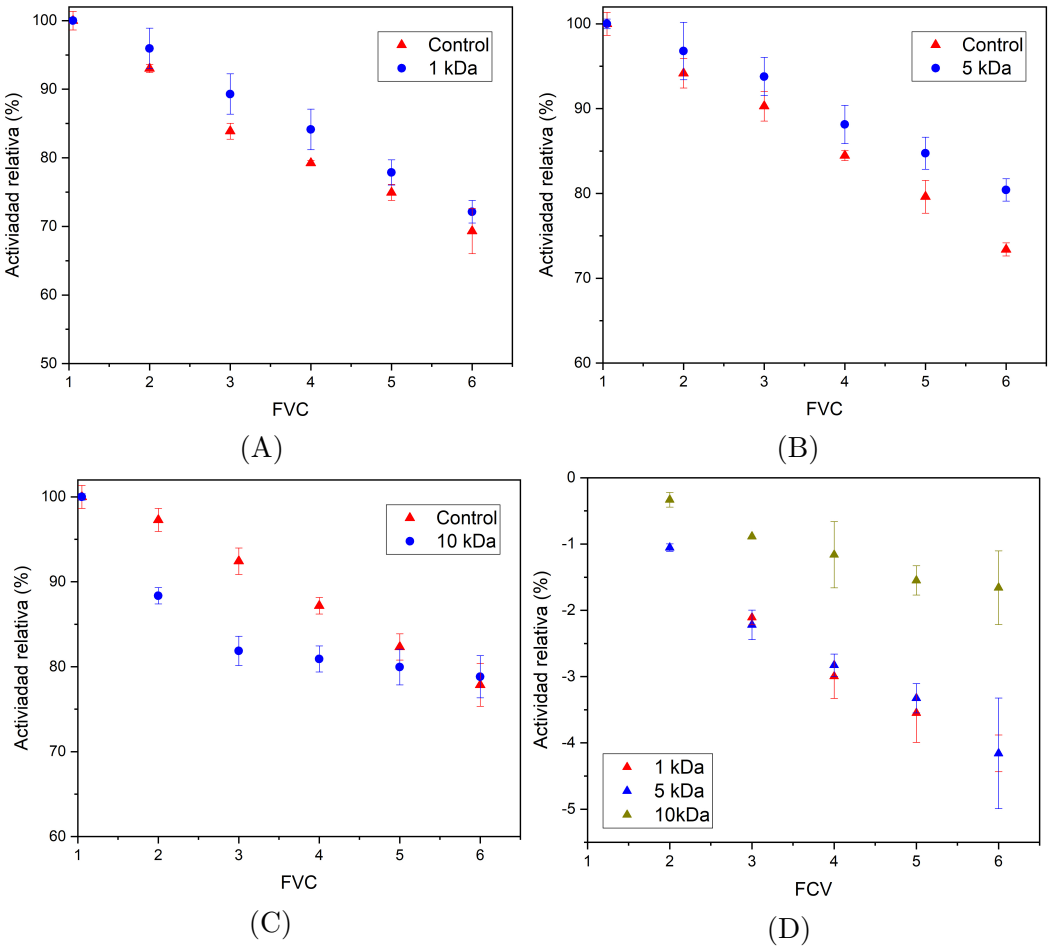


Figura 6.24: Actividad relativa en CEMR operado en modalidad fed-batch como función del FCV. **A)** CEMR 1 [kDa], **B)** CEMR 5 [kDa], **C)** CEMR 10 [kDa], **D)** Actividad en permeados. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, $F_A = 66.6$ [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L].

La Figura 6.24 presenta los resultados de la actividad relativa para cada uno de los CEMR con su respectivo control. Se observa como la mayoría de los escenarios presentaron una inactivación térmica de primer orden conforme avanzaba la reacción, con excepción del CEMR de 10 [kDa], el cual siguió una trayectoria asintótica alrededor del 79 [%] de actividad relativa a partir del FCV 3. En el caso de los CEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa], los cuales obtuvieron la mayor cantidad de producto en el permeado, se aprecia una disminución en la perdida de la actividad relativa de la enzima comparado con su respectivo control. Se infiere que esto puede deberse a que la enzima se encuentra reaccionando con mayores cantidades de producto, lo que impide su perdida de actividad por cuenta de la inhibición por producto que sufre en el control. Para el CEMR de 10 [kDa] se cree que la alta TDC obliga a la enzima a migrar a la superficie de la membrana, estabilizando su estructura y manteniendo su actividad. Esto se condice con el perfil del flux de la Figura 6.23C, el cual presenta un perfil de comportamiento similar al obtenido por la actividad relativa. La Tabla 6.32 presenta

los tiempos de vida media de la enzima para cada escenario experimental, siendo calculados como el $\frac{ln(2)}{k_d}$. En esta se aprecia como los CEMR aumentan la vida útil de la enzima, maximizándose este efecto en el escenario del CEMR de 5 [kDa] en donde se obtiene un aumento del 36.5 [%], con respecto al control del proceso. Finalmente, la Figura 6.23D muestra la actividad medida para los permeados en función de la FCV. Los valores negativos indican que no se presento actividad relativa en el permeado para ningún escenario sobre el límite de cuantificación y, por consiguiente, la enzima se encontraba confinada en su totalidad en el reactor.

La Figura 6.25 A-B presenta los resultados del rendimiento de los CEMR y los coeficientes de tamizado como función del FCV. El primero definido como el cociente entres la productividades obtenidas para el CEMR y el control y, el segundo, como el cociente entre las moles obtenidas en el permeado con respecto a las del concentrado. Estos indicadores señalan con precisión el rendimiento de los sistemas de membrana de múltiples etapas con concentración. En el caso del rendimiento, vemos una tendencia de aumento lineal para todos los CEMR, siendo el de 5 [kDa] 5.3 veces más eficiente que el control de su escenario, 4.4 veces el de 1 [kDa] y 4.2 del de 10 [kDa] para el FCV final, respectivamente. Esto denota el potencial productivo de esta modificación a nivel de proceso y permite postular a la estrategia de operación CEMR, como una modificación robusta e indispensable para establecer un proceso de hidrólisis enzimática de proteínas que disminuye i) los costos operativos (reutilización de la enzima en 5 ciclos de operación), ii) los costos de mano de obra de un reactor batch y iii) los gastos energéticos, entregando un producto purificado de tamaño especifico de manera continua para procesos ulteriores de secado *downstream*. Observando los coeficientes de tamizado (Figura 6.25B), se destaca como el CEMR de 5 [kDa] permite obtener concentraciones 4.9 superiores a las del concentrado en estado estacionario,

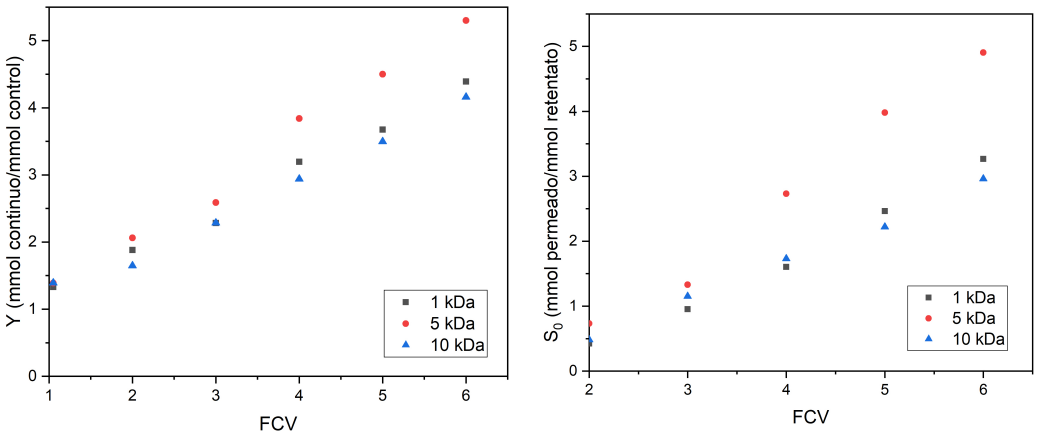


Figura 6.25: Resultados experimentales CEMR operado en modalidad fed-batch. **A)** Rendimiento en función del FCV. **B)** Coeficientes de tamizado en función del FCV. Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, F_A = 66.6 [mL/min] y V_R = 0.2 [L].

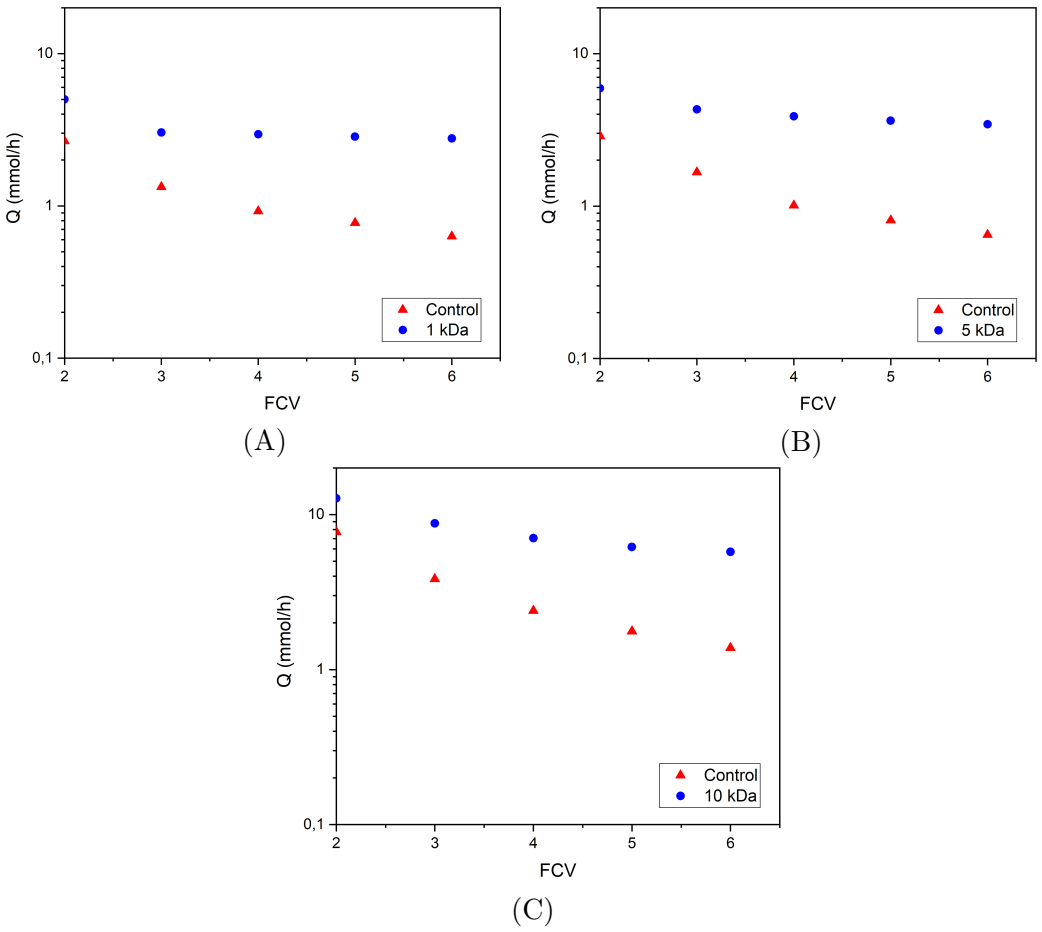


Figura 6.26: Productividad total vs FCV para CEMR operado en modalidad fed-batch. **A)** CEMR 1 [kDa]. **B)** CEMR 5 [kDa]. **C)** CEMR 10 [kDa]. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, F_A = 66.6 [mL/min] y $V_R = 0.2$ [L].

3.3 el de 1 [kDa] y 3.0 el de 10 [kDa], respectivamente. Siendo un indicador de alto valor agregado, ya que el proceso no solo permite hidrolizar la solución de APSL, sino también incrementar su concentración en las clases de tamaño de interés de manera sostenida en el tiempo, garantizando una producción constante que solo se detendría cuando la enzima pierda totalmente su actividad o cuando sea necesario realizar una limpieza exhaustiva de la membrana de UF.

Finalmente, la Figura 6.26 muestra los perfiles de la productividad total acumulada en función del FCV para los 3 CEMR y sus respectivos controles. Se aprecia como i) los perfiles de productividad de los controles para todos los escenarios decrece conforme aumenta el FCV y ii) como en el caso de las concentraciones, la productividad se mantiene relativamente constante conforme avanza el proceso de reacción-separación para todos los CEMR, alcanzando para el FCV 6 un aumento de la productividad total acumulada del sistema de 439 [%], 530 [%] y 416 [%] para los CEMR de 1 [kDa], 5 [kDa] y 10 [kDa], respectivamente (comparado con la operación batch de cada con-

dición). Esto se debe al aumento lineal de las moles obtenidas en el permeado, lo cual establece una política de productividad sostenible en el CEMR incluso cuando la enzima a perdido actividad por cuenta de la inactivación térmica y la membrana permeabilidad a causa del *fouling* en su superficie. En este sentido, la limitación principal del proceso estaría dictada por el *fouling* ocurrido en la superficie de la membrana de UF, la cual para los CEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa] impidió continuar con la operación por encima de un FCV de 6, momento en el cual se alcanzó un tiempo aproximado de reacción de 27 [h] consecutivas. En este punto el proceso debe ser interrumpido y las membranas de UF debe ser sometidas a un protocolo de limpieza exhaustivo que restablezca el flux, con el objetivo de alcanzar operaciones con un tiempo total de proceso superior al calculado en la Tabla 6.32, el cual representa el tiempo en donde la enzima a perdido el 50 [%] de su actividad relativa. Consiguiendo con esto una maximización del uso de la enzima en la hidrólisis enzimática de proteínas de APSL y una optimización global de los recursos del proceso.

Capítulo 7

Conclusiones

En términos generales se resuelve de esta investigación que la separación de los productos de hidrólisis y el reciclaje de la enzima utilizando un reactor de membrana, aumenta significativamente la productividad del proceso de la hidrólisis enzimática de proteínas aisladas de suero de leche. La mayor incidencia del aumento de productividad ocurrió sobre la modalidad CEMR, la cual posee valores de productividad total acumulada muy superiores a los obtenidos en la modalidad batch tradicional. Esta diferencia se explica por la disminución del efecto de la inhibición por producto y por el confinamiento total de la enzima en el reactor, factores preponderantes que garantizan una implementación factible a escala industrial.

Desde el punto de vista de la modalidad SCEMR, se concluye que la disminución de la tasa de concentración del concentrado evidenció un aumento significativo en la productividad del proceso. El mayor efecto se consiguió en un volumen de reactor de 2 [L]. Esta diferencia significativa se explica porque el sistema es controlado por la reacción, siendo el proceso de separación el responsable de la disminución del efecto de la inhibición por producto, actor principal en la disminución de la velocidad de las reacciones enzimáticas.

Finalmente, la modalidad CBEMR permitió identificar el efecto de la inhibición por producto generado por las diferentes clases de tamaño presentes en la solución de APSL. La mayor incidencia sobre la velocidad de reacción se presentó por los péptidos presentes en la fracción ≥ 10 [kDa]. Esta se explica porque la solución de APSL se encuentra compuesta principalmente por péptidos mayores a esta clase de tamaño, que una vez son hidrolizados impiden la acción de la enzima sobre el sustrato.

De los objetivos específicos se concluye que:

- Se caracterizaron los productos de reacción en términos de contenido de proteínas, contenido de enlaces peptídicos y susceptibilidad a hidrólisis enzimática.
- Se caracterizó el efecto de la concentración del sustrato, la concentración de enzima y la temperatura en la hidrólisis enzimática de APSL.

- Se determinó la permeabilidad del producto y la retención de las enzimas en las membranas de ultrafiltración en las tres modalidades de operación.
- Se determinó el efecto del sustrato en el ensuciamiento de la membrana en las modalidades CBEMR y SCEMR.
- Se determinó el efecto de la separación de los productos de hidrólisis y del reciclaje de enzimas en la velocidad de hidrólisis y en la productividad.
- Se modeló el rendimiento del CEMR en términos de la inactivación térmica de la enzima y el CBEMR en términos de la velocidad de reacción.
- Se optimizó la productividad y el reciclaje de las enzimas en la modalidad CEMR.

Capítulo 8

Proyecciones

Uno de los mayores desafíos de este proyecto corresponde a la validación de los resultados obtenidos a escala piloto, en donde las variables críticas de proceso tienen mayor complejidad de control y la inversión requerida para la adquisición de esta tecnología es un factor decidor, incluso considerando el aumento de la productividad y la reutilización de la enzima. Por otro lado, la aplicación de este proceso para otros sustratos permitiría ampliar la caracterización del proceso de ultrafiltración con enzimas proteolíticas, encontrando correlaciones entre la naturaleza de las materias primas y las condiciones de operación.

En esta misma línea, se hace necesario el modelamiento de los sistemas SCEMR y CEMR por medio de fluidodinámica computacional (*Computational fluid dynamics* - CFD), lo que permitiría caracterizar detalladamente el comportamiento del sistema experimental, encontrar un óptimo global para las condiciones de operación definidas y predecir el comportamiento del sistema frente a nuevos escenarios experimentales.

Por otra parte, debe evaluarse el desempeño del proceso CEMR operando con membranas de UF de diferentes NMWCO en paralelo. Esto indicaría si es posible aumentar el tiempo límite de operación para los CEMR de 1 [kDa] y 5 [kDa] ($\approx$ 27 [h] debido al efecto del *fouling* en la superficie de la membrana) y si esto conseguiría un aumento en la productividad del global del proceso.

Finalmente, se considera crucial la cuantificación e identificación de los péptidos obtenidos en la reacción y en la separación mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). De esta forma es posible comprobar el balance de masa por componente, identificar los péptidos inhibidores que afectan a la enzima y definir el rango de tamaño de los productos a extraer. Mejorando así el desempeño de la enzima, dilucidando las concentraciones especificas de los péptidos bioactivos de cada sustrato y completando una caracterización robusta del sistema.

Bibliografía

[Abdelhedi et al., 2016] Abdelhedi, O., Jridi, M., Jemil, I., Mora, L., Toldrá, F., Aristoy, M. C., Boualga, A., Nasri, M., & Nasri, R. (2016). Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: Protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. *Food Research International*, 86, 9–23.

[Adjonu et al., 2013] Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1435–1443.

[Adler-Nissen, 1979] Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262.

[Adler-Nissen et al., 1983] Adler-Nissen, J., Eriksen, S., & Olsen, H. S. (1983). Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 32(3-4), 411–423.

[ADPI, 2019] ADPI (2019). Whey Protein Concentrate (WPC) Standard Book. *American Dairy Products institute*, (pp. 16–17).

[Akal, 2017] Akal, C. (2017). *Benefits of whey proteins on human health.* Elsevier Inc.

[Albornoz et al., 2019] Albornoz, L. L., Marder, L., Benvenuti, T., & Bernardes, A. M. (2019). Electrodialysis applied to the treatment of an university sewage for water recovery. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 102982.

[Arango & Sanches, 2012] Arango, O. & Sanches, L. (2012). Tratamiento De Aguas Residuales De La Industria Láctea En Sistemas Anaerobios Tipo Uasb. *Revista Faculta de Ciencias Agropecuarias*, 7(2), 24–31.

[Aroon et al., 2010] Aroon, M. A., Ismail, A. F., Montazer-Rahmati, M. M., & Matsuura, T. (2010). Morphology and permeation properties of polysulfone membranes for gas separation: Effects of non-solvent additives and co-solvent. *Separation and Purification Technology*, 72(2), 194–202.

[Aspevik et al., 2016] Aspevik, T., Egede-Nissen, H., & Oterhals, Å. (2016). A systematic approach to the comparison of cost efficiency of endopeptidases for the hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) by-products. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), 421–431.

[Atkinson & Robertson, 1979] Atkinson, A. B. & Robertson, J. S. (1979). Captropil in the Treatment of Clinical Hypertension and Cardiac Failure. *The Lancet*, (pp. 836–839).

[Atkinson & Prinz, 2002] Atkinson, S. & Prinz, F. B. (2002). The implications of scab ng is now moving into other. *Fuel Cells*, (141), 10–12.

[Baldasso et al., 2011] Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination journal*, 278, 381–386.

[Balti et al., 2010] Balti, R., Nedjar-Arroume, N., Adjé, E. Y., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (Sepia officinalis) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3840–3846.

[Barth et al., 2015] Barth, M., Wei, R., Oeser, T., Then, J., Schmidt, J., Wohlgemuth, F., & Zimmermann, W. (2015). Enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate fi lms in an ultra fi ltration membrane reactor. *Journal of Membrane Science*, 494(029), 182–187.

[Beaulieu et al., 2013] Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bonnet, C., Bryl, P., & Carbonneau, M. É. (2013). Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (Cancer irroratus) by-products. *PharmaNutrition*, 1(4), 149–157.

[Bouhallab et al., 1993] Bouhallab, S., Mollé, D., Léonil, J., Bouhallab, S., Mollé, D., & Léonil, J. (1993). Continuous hydrolysis of Beta-casein in a membrane reactor : Preparation of bioactive peptide. *Biotechnology letters*, 15(7), 697–702.

[Bouhallab & Touzé, 2007] Bouhallab, S. & Touzé, C. (2007). Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides. *Le Lait*, 75(3), 251–258.

[Bressollier et al., 1988] Bressollier, P., Petit, J. M., & Julien, R. (1988). Enzyme Hydrolysis of Plasma Proteins in a CSTR Ultrafiltration Reactor: Performances and Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(7), 650–658.

[Bucs et al., 2018] Bucs, S., Farhat, N., Kruithof, J. C., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C., & Vrouwenvelder, J. S. (2018). Review on strategies for biofouling mitigation in spiral wound membrane systems. *Desalination*, 434(January), 189–197.

[Cabero et al., 1999] Cabero, M. L., Riera, F. A., & Álvarez, R. (1999). Rinsing of ultrafiltration ceramic membranes fouled with whey proteins: Effects on cleaning procedures. *Journal of Membrane Science*, 154(2), 239–250.

[Caro, 2008] Caro, J. (2008). Catalysis in Micro-structured Membrane Reactors with Nano-designed Membranes. *Chinese Journal of Catalysis*, 29(11), 1169–1177.

[Chakka et al., 2015] Chakka, A. K., Elias, M., Jini, R., Sakhare, P. Z., & Bhaskar, N. (2015). In-vitro antioxidant and antibacterial properties of fermentatively and enzymatically prepared chicken liver protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8059–8067.

[Chalamaiah et al., 2012] Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020–3038.

[Charney & Tomarelli, 1947] Charney, J. & Tomarelli, R. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of biological chemistry*, 171, 501–505.

[Chellappan et al., 2006] Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bhat, S. G., & Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine Engyodontium album BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(4), 956–961.

[Chen et al., 1996] Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1996). Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619–2623.

[Cheryan, 2018] Cheryan, M. (2018). Ultrafiltration and Microfiltration Handbook.

[Cheryan & David Deeslie, 1983] Cheryan, M. & David Deeslie, W. (1983). Soy protein hydrolysis in membrane reactors. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(6), 1112–1115.

[Cooke et al., 2000] Cooke, M., Hill, E., Tw, S., & Poole, C. F. (2000). *Encyclopedia of Separation Science*.

[Corbatón-Báguena et al., 2018] Corbatón-Báguena, M. J., Álvarez-Blanco, S., & Vincent-Vela, M. C. (2018). Evaluation of fouling resistances during the ultrafiltration of whey model solutions. *Journal of Cleaner Production*, 172, 358–367.

[De Eslie & Cheryan, 1981] De Eslie, W. D. & Cheryan, M. (1981). Continuous Enzymatic Modification of Proteins in an Ultrafiltration Reactor. *Journal of Food Science*, 46(4), 1035–1042.

[De Falco et al., 2011] De Falco, M., Marrelli, L., & Iaquaniello, G. (2011). *Membrane Reactors for Hydrogen Production Processes*. Springer-Verlag London.

[de Mendiburu, 2019] de Mendiburu, F. (2019). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. Technical report.

[Demers-Mathieu et al., 2013] Demers-Mathieu, V., Gauthier, S. F., Britten, M., Fliss, I., Robitaille, G., & Jean, J. (2013). Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*, 28(2), 94–101.

[Ebrahimabadi et al., 2010] Ebrahimabadi, A. H., Ebrahimabadi, E. H., Djafari-Bidgoli, Z., Kashi, F. J., Mazoochi, A., & Batooli, H. (2010). Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of Stachys inflata Benth from Iran. *Food Chemistry*, 119(2), 452–458.

[Egea et al., 2007] Egea, J. A., Rodríguez-Fernández, M., Banga, J. R., & Martí, R. (2007). Scatter search for chemical and bio-process optimization. *Journal of Global Optimization*, 37(3), 481–503.

[Elias et al., 2006] Elias, R. J., Bridgewater, J. D., Vachet, R. W., Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006). Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of β-lactoglobulin in food lipid dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9565–9572.

[Elsevier, 2019] Elsevier (2019). Scopus data base. Sitio Web, disponible en https://www.scopus.com/, (accedido 2019-01-10).

[Emani, 2018] Emani, S. (2018). Ultrafiltration for the Treatment of Acute Heart Failure. *Heart Failure Clinics*, 14(4), 517–524.

[FitzGerald et al., 2004] FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health: Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134(4), 974–979.

[Foegeding & Mleko, 2002] Foegeding, E. A. & Mleko, S. (2002). Whey protein products. *US Patent 6,383,551*, (pp. 1957–1960).

[Galiano et al., 2018] Galiano, F., Briceño, K., Marino, T., Molino, A., Christensen, K. V., & Figoli, A. (2018). Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications. *Journal of Membrane Science*, 564(May), 562–586.

[Gauthier et al., 2006] Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315–1323.

[Germano et al., 2003] Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., & Soccol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from Penicillium sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 246–251.

[Gill et al., 1996] Gill, I., López-Fandiño, R., Jorba, X., & Vulfson, E. N. (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(3), 162–183.

[Giménez et al., 2009] Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976–983.

[Girgih et al., 2014] Girgih, A. T., Alashi, A., He, R., Malomo, S., & Aluko, R. E. (2014). Preventive and treatment effects of a hemp seed (Cannabis sativa L.) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Nutrition*, 53(5), 1237–1246.

[Guadix et al., 2006] Guadix, A., Camacho, F., & Guadix, E. M. (2006). Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *Journal of Food Engineering*, 72, 398–405.

[Guadix et al., 2007] Guadix, E. M., Prieto, C. A., Guadix, A., & Gonza, P. (2007). A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *Journal of Food Engineering*, 78, 257–265.

[Guo et al., 2009] Guo, H., Sun, J., He, H., Yu, G. C., & Du, J. (2009). Antihepatotoxic effect of corn peptides against Bacillus Calmette-Guerin/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2431–2435.

[Guzmán et al., 2007] Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: Chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 279–314.

[Hajkova et al., 2011] Hajkova, D., C. Sekhar Rao, K., & Miyagi, M. (2011). Recent Technological Developments in Proteolytic 18O Labeling. *Current Proteomics*, 8(1), 39–46.

[Hancock & Lehrer, 1998] Hancock, R. E. & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 82–88.

[Hao et al., 2006] Hao, H., Zak, D. E., Sauter, T., Schwaber, J., & Ogunnaike, B. A. (2006). Modeling the VPAC2-activated cAMP/PKA signaling pathway: From receptor to circadian clock gene induction. *Biophysical Journal*, 90(5), 1560–1571.

[Hartmann & Meisel, 2007] Hartmann, R. & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163–169.

[Hatzinikolaou et al., 2005] Hatzinikolaou, D. G., Katsifas, E., Mamma, D., Karagouni, A. D., Christakopoulos, P., & Kekos, D. (2005). Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable Beta-galactosidase from Aspergillus niger. *Biochemical Engineering Journal*, 24, 161–172.

[Hirsh et al., 2004] Hirsh, J., Guyatt, G., & Schünemann, H. (2004). The Seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest*, (pp. 172S–173S).

[Hobman, 1992] Hobman, P. (1992). Ultrafiltration and Manufacture of Whey. *Whey and Lactose Processing*, (pp. 195–230).

[Hosomi et al., 2010] Hosomi, R., Fukao, M., Fukunaga, K., Okuno, M., Yagita, R., Kanda, S., Nishiyama, T., & Yoshida, M. (2010). Effect of Fish Protein and Peptides on Lipid Absorption in Rats. *Trace Nutrients Research*, 27, 21–27.

[Howard & Udenigwe, 2013] Howard, A. & Udenigwe, C. C. (2013). Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. *Food and Function*, 4(1), 40–51.

[Imafidon et al., 1997] Imafidon, G. I., Farkye, N. Y., & Spanier, A. M. (1997). Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(7), 663–689.

[Issaoui & Limousy, 2018] Issaoui, M. & Limousy, L. (2018). Low-cost ceramic membranes: Synthesis, classifications, and applications. *Comptes Rendus Chimie*, (pp. 1–13).

[Ito et al., 1986] Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., & Tatematsu, M. (1986). Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10-11), 1071–1082.

[Jelen, 2000] Jelen, P. (2000). Whey processing. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (pp. 2739–2745).

[Jia et al., 2010] Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., & He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1), 336–342.

[Johnson & Goody, 2011] Johnson, K. A. & Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis - Menten Paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264–8269.

[Karpińska et al., 2001] Karpińska, M., Borowski, J., & Danowska-Oziewicz, M. (2001). The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry*, 72(1), 5–9.

[Kilara & Vaghela, 2018] Kilara, A. & Vaghela, M. (2018). Whey proteins. In Elsevier Ltd. (Ed.), *Proteins in Food Processing* (pp. 97–126). Second edition.

[Kong et al., 2008] Kong, X., Zhou, H., Hua, Y., & Qian, H. (2008). Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity. *European Food Research and Technology*, 227(2), 511–517.

[Korhonen, 2006] Korhonen, H. J. (2006). Technological and health aspects of bioactive components of milk. *International Dairy Journal*, 16(11), 1227–1228.

[Koros et al., 1996] Koros, W., MA, Y., & Shimidzu, T. (1996). Terminology for Membranes and Membrane Processes. *Journal of Membrane Science*, 120(7), 149–159.

[Kristinsson et al., 2000] Kristinsson, H. G., Rasco, B. A., Pigott, R. G. M., & Resources, S. (2000). Fish Protein Hydrolysates : Production , Biochemical , and Functional Properties. 40(1), 43–81.

[Kumar et al., 2016] Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139, 20–25.

[Lassoued et al., 2015] Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M. C., Nasri, M., & Toldrá, F. (2015). Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens. *Journal of Proteomics*, 128, 8–17.

[Lassoued et al., 2014] Lassoued, I., Trigui, M., Ghlissi, Z., Nasri, R., Jamoussi, K., Kessis, M., Sahnoun, Z., Rebai, T., Boualga, A., Lamri-Senhadji, M., Nasri, M., & Barkia, A. (2014). Evaluation of hypocholesterolemic effect and antioxidant activity of Boops boops proteins in cholesterol-fed rats. *Food and Function*, 5(6), 1224–1231.

[Lawson, 2014] Lawson, J. (2014). *Design and Analysis of Experiments with R*, volume 35. Chapman and Hall.

[Laye et al., 1995] Laye, I., Karleskind, D., & Morr, C. V. (1995). Chemical and volatile organic compounds composition of whey protein concentrate. *Developments in Food Science*, 37(C), 769–784.

[Lee et al., 2015] Lee, M., Wu, Z., & Li, K. (2015). *Advances in ceramic membranes for water treatment*.

[Lee et al., 2010] Lee, S. H., Qian, Z. J., & Kim, S. K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96–102.

[Li et al., 2019] Li, S., Yan, Z., Luo, Z., Xu, Y., Huang, F., Zhang, X., Yi, X., & Yue, T. (2019). Mechanics of the Formation, Interaction, and Evolution of Membrane Tubular Structures. *Biophysical Journal*, 116(5), 884–892.

[Liu, 2016] Liu, S. (2016). *Bioprocess engineering - Kinetics, Sustainability, and Reactor Design*. Syracuse, NY, USA: Elsevier, 2 edition.

[Lozano et al., 1990] Lozano, P., Manjon, A., Iborra, J. L., Manuel, C., & Romojaro, F. (1990). Kinetic and operational study of a cross-flow reactor with immobilized pectolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 499–505.

[Lutz, 2015] Lutz, H. (2015). *Ultrafiltration for Bioprocessing - Development and Implementation of Robust Processes*. 1 edition.

[Mah et al., 2014] Mah, S. K., Chang, C. C. H., Wu, T. Y., & Chai, S. P. (2014). The study of reverse osmosis on glycerin solution filtration: Dead-end and cross-flow filtrations, transport mechanism, rejection and permeability investigations. *Desalination*, 352, 66–81.

[Mannheim & Cheryan, 1990] Mannheim, A. & Cheryan, M. (1990). Continuous Hydrolysis of Milk Protein in a Membrane Reactor. 55(2), 381–385.

[Martínez-araiza et al., 2012] Martínez-araiza, G., Castaño-tostado, E., Amaya-llano, S. L., Regalado-gonzález, C., Martínez-vera, C., & Ozimek, L. (2012). Modeling of Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2596–2601.

[Matzinos & Álvarez, 2002] Matzinos, P. & Álvarez, R. (2002). Effect of ionic strength on rinsing and alkaline cleaning of ultrafiltration inorganic membranes fouled with whey proteins. *Journal of Membrane Science*, 208(1-2), 23–30.

[Mc Sweeney & O Mahony, 2003] Mc Sweeney, P. L. H. & O Mahony, J. A. (2003). *Advanced Dairy Chemistry*. Third edition.

[Mehaia et al., 1993] Mehaia, M. A., Alvarez, J., & Cheryan, M. (1993). Hydrolysis of whey permeate lactose in a continuous stirred tank membrane reactor. *International Dairy Journal*, 3(2), 179–192.

[Mehta & Zydney, 2005] Mehta, A. & Zydney, A. L. (2005). Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes. 249, 245–249.

[Meussen et al., 2014] Meussen, B. J., van Zeeland, A. N. T., Bruins, M. E., & Sanders, J. P. M. (2014). A Fast and Accurate UPLC Method for Analysis of Proteinogenic Amino Acids. *Food Analytical Methods*, 7(5), 1047–1055.

[Mohammadi et al., 2008] Mohammadi, S., Kaghazchi, T., & Kargari, A. (2008). A model for metal ion pertraction through supported liquid membranes. *Desalination*, 219(1-3), 324–334.

[Moreno & Cuadrado, 1993] Moreno, M. C. M. & Cuadrado, V. F. (1993). Enzymic Hydrolysis of Vegetable Proteins: Mechanism and Kinetics. *Process Biochemistry*, 28, 481–490.

[Morr, 1989] Morr, C. (1989). Beneficial and Adverse Effects of Water-Protein Interactions in Selected Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, 72(2), 575–580.

[Moulik et al., 2016] Moulik, S., Nazia, S., Vani, B., & Sridhar, S. (2016). *Pervaporation separation of acetic acid/water mixtures through sodium alginate/polyaniline polyion complex membrane*, volume 170.

[Nakajima et al., 1992] Nakajima, M., Shojp, T., & Nabetani, H. (1992). Protease Hydrolysis of Water Soluble Fish Proteins using a Free Enzyme Membrane Reactor. *Process Biochemistry 27*, 27, 155–160.

[Nakamura et al., 1995] Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano, T. (1995). Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *Journal of Dairy Science*, 78(4), 777–783.

[Nakano et al., 2006] Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., Kwak, C.-j., Ikemura, K., Takaoka, M., Moriguchi, S., Iino, T., Kusumoto, A., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y., & Matsumura, Y. (2006). Antihypertensive Effect of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Sesame Protein Hydrolysate in Spontaneously Hypertensive Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5), 1118–1126.

[Nasri et al., 2012] Nasri, R., Amor, I. B., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., Châabouni, M. K., & Nasri, M. (2012). Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133(3), 835–841.

[Nedjar-Arroume et al., 2006] Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G., & Guillochon, D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 27(9), 2082–2089.

[Nielsen et al., 2001] Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646.

[Nilsson et al., 2005] Nilsson, B. L., Soellner, M. B., & Raines, R. T. (2005). Chemical Synthesis of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34(1), 91–118.

[Pellegrini et al., 1997] Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klauser, S., Hunziker, P., & Von Fellenberg, R. (1997). Identification and isolation of a bactericidal domain chicken egg white lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 82(3), 372–378.

[Peng et al., 2009] Peng, X., Xiong, Y. L., & Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, 113(1), 196–201.

[Pentair, 2019] Pentair (2019). Pentair - Beer Membrane Filtration System - Beverage Filtration Solutions.

[Perea & Ugalde, 1996] Perea, A. & Ugalde, U. (1996). Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 29–34.

[Phadatare et al., 1993] Phadatare, S. U., Deshpande, V. V., & Srinivasan, M. C. (1993). High activity alkaline protease from Conidiobolus coronatus (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(1), 72–76.

[Pihlanto et al., 2010] Pihlanto, A., Virtanen, T., & Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20(1), 3–10.

[Prieto et al., 2008] Prieto, C. A., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2008). Influence of temperature on protein hydrolysis in a cyclic batch enzyme membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 217–223.

[Prieto et al., 2010] Prieto, C. A., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2010). Optimal operation of a protein hydrolysis reactor with enzyme recycle. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 24–30.

[Ramírez, 2012] Ramírez, J. S. (2012). Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. *Publicaciones e Investigación*, 6, 69.

[Reif, 2006] Reif, O. W. (2006). Microfiltration membranes: Characteristics and manufacturing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 98, 73–103.

[Rodrigues & Teixeira, 2009] Rodrigues, L. & Teixeira, J. (2009). Potential Applications of Whey Proteins in the Medical Field. In C. Press (Ed.), *Engineering Aspects of Milk and Dairy Products* chapter 10, (pp. 221–252).

[Rouquié et al., 2019] Rouquié, C., Dahdouh, L., Ricci, J., Wisniewski, C., & Delalonde, M. (2019). Immersed membranes configuration for the microfiltration of fruit-based suspensions. *Separation and Purification Technology*, 216(January), 25–33.

[Royston, 1982] Royston, J. P. (1982). An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Applied Statistics*, 31(2), 115–124.

[Rutherfurd, 2010] Rutherfurd, S. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis.pdf. *Journal of AOAC International*, 93(5), 1515–1522.

[Saavedra & Romero, 2010] Saavedra, A. & Romero, J. (2010). Aspectos generales sobre procesos y tecnologiís De membranas.

[Saleh & Gupta, 2016] Saleh, T. A. & Gupta, V. K. (2016). Membrane Classification and Membrane Operations. *Nanomaterial and Polymer Membranes*, (pp. 55–82).

[Sánchez et al., 2014] Sánchez, B., Soto, D., Jorquera, H., Gelmi, C., & Pérez-Correa, J. (2014). HIPPO: An Iterative Reparametrization Method for Identification and Calibration of Dynamic Bioreactor Models of Complex Processes. *Industrial & Enginering Chemistry Research*, 53, 18514–18525.

[Shen et al., 2012] Shen, Q., Guo, R., Dai, Z., & Zhang, Y. (2012). Investigation of enzymatic hydrolysis conditions on the properties of protein hydrolysate from fish muscle (Collichthys niveatus) and evaluation of its functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(20), 5192–5198.

[Shimizu et al., 2009] Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y., & Yamamoto, J. (2009). Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research*, 123(5), 753–757.

[Siddiqui et al., 2018] Siddiqui, F. A., She, Q., Fane, A. G., & Field, R. W. (2018). Exploring the differences between forward osmosis and reverse osmosis fouling. *Journal of Membrane Science*, 565, 241–253.

[Silveira et al., 2013] Silveira, S. T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2013). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β-lactoglobulin. *Food Chemistry*, 141(2), 1072–1077.

[Singh, 2015] Singh, R. (2015). *Membrane Technology and Engineering for Water Purification*, volume 1. Colorado Springs, 2 edition.

[Singh & Geetanjali, 2016] Singh, R. & Geetanjali (2016). Whey Proteins and Their Value-Added Applications. In *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products* (pp. 303–313). Elsevier Inc.

[Sirns & Cheryan, 1992] Sirns, K. A. & Cheryan, M. (1992). Hydrolysis of Liquefied Corn Starch in a Membrane Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 960–967.

[Smithers, 2008] Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704.

[Songling Cao & R. Russell Rhinehart, 1995] Songling Cao & R. Russell Rhinehart (1995). An efficient method for on-line identification of steady state. *Journal of process control*, 5(6), 363–374.

[Sousa et al., 2004] Sousa, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L., Almeida, P. I., & Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 147–153.

[Spruck et al., 2013] Spruck, M., Hoefer, G., Fili, G., Gleinser, D., Ruech, A., Schmidt-Baldassari, M., & Rupprich, M. (2013). Preparation and characterization of composite multichannel capillary membranes on the way to nanofiltration. *Desalination*, 314, 28–33.

[Surya Murali et al., 2010] Surya Murali, R., Sridhar, S., Sankarshana, T., & Ravikumar, Y. V. (2010). Gas permeation behavior of pebax-1657 nanocomposite membrane incorporated with multiwalled carbon nanotubes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(14), 6530–6538.

[Taddei et al., 1986] Taddei, C., Aimar, P., Daufin, G., & Sanchez, V. (1986). Etude du transfert de matière lors de l'ultrafiltration de lactosérum doux sur membrane minérale. *Le Lait*, 66(4), 371–390.

[Taddei et al., 1988] Taddei, C., Aimar, P., Daufin, G., & Sanchez, V. (1988). Factors affecting fouling of an inorganic membrane during sweet whey ultrafiltration. *Le Lait*, 68(2), 157–176.

[Tomatsu et al., 2013] Tomatsu, M., Shimakage, A., Shinbo, M., Yamada, S., & Takahashi, S. (2013). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from soya milk. *Food Chemistry*, 136(2), 612–616.

[Tsugita & Scheffler, 2008] Tsugita, A. & Scheffler, J.-J. (2008). A new rapid method for acid hydrolysis of protein. *Proceedings of the Japan Academy. Ser. B: Physical and Biological Sciences*, 58(1), 1–4.

[Tunga et al., 2003] Tunga, R., Shrivastava, B., & Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of Aspergillus parasiticus. *Process Biochemistry*, 38(11), 1553–1558.

[Udenigwe & Rouvinen-Watt, 2015] Udenigwe, C. C. & Rouvinen-Watt, K. (2015). The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9303–9313.

[Valencia et al., 2014] Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264.

[Valencia et al., 2015] Valencia, P. L., Flores, S. A., Pinto, M. J., & Almonacid, S. F. (2015). Analysis of the operational strategies for the enzymatic hydrolysis of food proteins in batch reactor. *Journal of Food Engineering*, 176, 1–7.

[Valencia et al., 2019] Valencia, P. L., Solis, T., Rojas, P., Ibañez, F., Astudillo-Castro, C., Pinto, M., & Almonacid, S. (2019). Proteolytic susceptibility of food by-product proteins: An evaluation by means of a quantitative index. *Process Biochemistry*, 77(August 2018), 63–69.

[Voigt et al., 2019] Voigt, I., Richter, H., Stahn, M., Weyd, M., Puhlfürß, P., Prehn, V., & Günther, C. (2019). Scale-up of ceramic nanofiltration membranes to meet large scale applications. *Separation and Purification Technology*, (April 2017), 329–334.

[Wei & Zhimin, 2006] Wei, Q. & Zhimin, H. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein : mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308–314.

[Wisniak, 2013] Wisniak, J. (2013). Thomas Graham. II. Contributions to diffusion of gases and liquids, colloids, dialysis, and osmosis. *Educacion Quimica*, 24(EXTRAORD. 2), 506–515.

[Wöltinger et al., 2005] Wöltinger, J., Karau, A., & Leuchtenberger, W. (2005). Membrane Reactors at Degussa. *Advances in Biochemical Engineering*, 92, 289–316.

[Wu et al., 2019] Wu, B., Zhang, Y., Mao, Z., Tan, W. S., Tan, Y. Z., Chew, J. W., Chong, T. H., & Fane, A. G. (2019). Spacer vibration for fouling control of submerged flat sheet membranes. *Separation and Purification Technology*, 210, 719–728.

[Wu & Ding, 2001] Wu, J. & Ding, X. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 501–506.

[Wu et al., 2018] Wu, Y., Xiao, C., Liu, H., & Huang, Q. (2018). Fabrication and characterization of novel foaming polyurethane hollow fiber membrane. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, (pp. #pagerange#).

[Xia et al., 2003] Xia, Y., Lu, Y., Kamata, K., Gates, B., & Yin, Y. (2003). Macroporous materials containing three-dimensionally periodic structures. *Chemistry of Nanostructured Materials*, 1, 69–100.

[Yang et al., 2009] Yang, R., Zhang, Z., Pei, X., Han, X., Wang, J., Wang, L., Long, Z., Shen, X., & Li, Y. (2009). Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (Oncorhynchus keta) in mice. *Food Chemistry*, 113(2), 464–470.

[Yang et al., 2007] Yang, W. G., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18(4), 449–451.

[Yoon, 2015] Yoon, S.-H. (2015). *Membrane bioreactor processes principles and applications*, volume 1.

[Zall, 1992] Zall, R. R. (1992). Sources and composition of whey and permeate. In Elsevier Science Publishers (Ed.), *Whey and Lactose Processing* (pp. 1–72).

[Zhang, 2016] Zhang, S. B. (2016). In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 202, 1–8.

[Zhao et al., 2007] Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42(12), 1586–1591.

Apéndice A

Protocolos de preparación de reactivos y análisis de muestras

A.0.1. Análisis OPA

Preparación de reactivo OPA

A continuación, se detallan los pasos a seguir para la preparación de 200 [mL] del reactivo:

- Pesar 7,62 [g] de Sodio tetraborato decahidrato y 200 [mg] de Sodio dodecilsulfato (SDS).
- Diluir en 150 [mL] de agua destilada en un vaso precipitado de 500 [mL], con agitador magnético y a temperatura de aproximadamente de 50 [°C].
- Pesar 160 [mg] de O-ftaldialdehído (OPA) y disolver en 4 [mL] de etanol al 99 [%] con agitación.
- Mezclar las soluciones, agregar 0.176 [mg] de Ditiotreitol (DTT) y esperar la disolución total del reactivo.
- Aforar a 200 [mL] con agua destilada.
- Almacenar en botella schott ambar para evitar su contacto con la luz.

Preparación de estándar de Serina

La curva de calibración para la cuantificación de la solución OPA se realiza con un estándar de serina (Figura A.1). El estándar es preparado en diluciones en el intervalo de 0 a 100 [mg/L], obteniendo absorbancias aproximadas entre 0 [nm] y 0,7 [nm]. A 200 [μL] de cada uno de los estándares de serina se le agregan 1.5 [mL] de reactivo OPA, esperando 2 [min] para realizar la lectura a 340 [nm] en el espectrofotómetro.

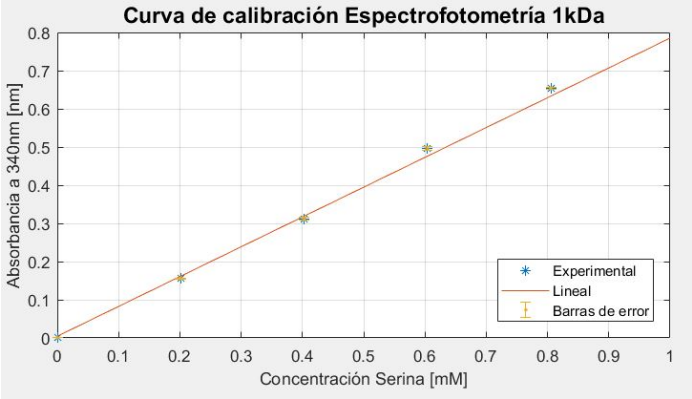


Figura A.1: Curva de calibración para reacción de serina con OPA

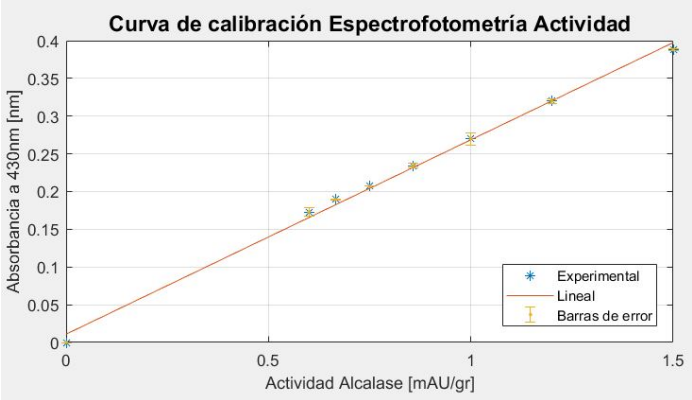


Figura A.2: Curva de calibración para la medición de actividad proteolítica con azocaseína

Análisis OPA para determinación de grupos aminos libres

Inicialmente, se realiza la dilución del APSL 100 o 200 veces según corresponda y se procede a tomar 200 [μL] más 1,5 [mL] del reactivo OPA, esperando 2 [min] para realizar la lectura en el espectrofotómetro a 340 [nm].

A.0.2. Actividad proteolítica con azocaseína

Preparación de azocaseína

- Pesar 0.250 [g] de azocaseína.
- Disolver con 100 [mL] de tampón fosfato con agitación y calentamiento suave.
- Separar lo que se va a usar y congelar el resto en porciones de 10 [mL].

Ensayo de Actividad

- Incubar 1 [ml] de azocaseína 0.25 [%] en tubo eppendorf a 37 [ºC].
- Agregar 50-100 [μL] de solución de proteasa (Alcalase® diluida 1000 veces).
- dejar 5 [min] de reacción.
- Agregar 500 [μl] de TCA 10 [%].
- Centrifugar a 10000 [g] por 10 [min].
- Mezclar 1 [mL] de sobrenadante con 1 [mL] de NaOH 2 [N].
- Medir absorbancia a 430 [nm] y realizar conversión por medio de la curva de calibración de la Figura A.2.

Apéndice B

Péptidos bioactivos

B.0.1. Actividad anticoagulante

Los anticoagulantes son diagnosticados con el objetivo de disminuir el poder de coagulación de la sangre y prevenir el crecimiento de los coágulos. Los anticoagulantes sintéticos convencionales son inhibidores inespecíficos que están asociados con desventajas en términos de seguridad, salud y comodidad de uso [Hirsh et al., 2004]. Se ha reportado actividad anticoagulante en hidrolizados enzimáticos de proteína de clara de huevo [Yang et al., 2007], proteínas de pescado [Nasri et al., 2012], proteína de maní [Zhang, 2016], carne de cerdo [Shimizu et al., 2009], caseína [Bouhallab & Touzé, 2007], entre otras. Purificados mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) para su análisis y comercialización.

B.0.2. Actividad antimicrobiana

La contaminación microbiana es un problema crítico para las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas [Ebrahimabadi et al., 2010]. El uso desmedido de antibióticos en estas industrias ha contribuido a la aparición de microorganismos patógenos inmunes a las sustancias antimicrobianas convencionales. Los péptidos antimicrobianos se presentan como una alternativa sostenible a los antibióticos convencionales, ya que consisten en 12 a 50 residuos de aminoácidos catiónicos (al menos dos cargas positivas catiónicas como residuos de Arg y Lys) hidrofóbicos y generalmente anfipáticos [Hancock & Lehrer, 1998], que se insertan en la pared celular aniónica y en las membranas fosfolípidas de los microorganismos, alterándolas y provocando la lisis bacteriana. Diferentes fuentes alimentarias como la hemoglobina [Nedjar-Arroume et al., 2006], la lisozima de pollo [Pellegrini et al., 1997], la proteína de suero [Demers-Mathieu et al., 2013], los subproductos del cangrejo [Beaulieu et al., 2013], entre otras, pueden producir péptidos antimicrobianos efectivos contra las factorías celulares *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Salmo-*

nella enteritidis. Postulándose como una alternativa sostenible de inocuidad, en las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas.

B.0.3. Actividad hipotensiva

La hipertensión es catalogada como una de la principales enfermedades cardiovasculares que afecta alrededor del 30 [%] de la población adulta en el mundo [Atkinson & Robertson, 1979]. Medicamentos sintéticos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina como el captopril, el lisinopril y el enalapril, se utilizan para tratar y prevenir la hipertensión, presentando efectos secundarios indeseables como tos seca, pérdida del gusto, insuficiencia renal y angioedema [Atkinson & Robertson, 1979]. Péptidos cortos inhibidores (2 a 20 residuos) de la enzima convertidora de angiotensina obtenidos mediante hidrólisis enzimática de proteínas de sésamo [Nakano et al., 2006], gelatina de pepino de mar [Zhao et al., 2007], leche [Pihlanto et al., 2010], germen de trigo [Jia et al., 2010], atún [Lee et al., 2010], sepia [Balti et al., 2010] y leche de soja [Tomatsu et al., 2013], pueden ser formulados para tratar la hipertensión, aumentando su actividad inhibitoria conforme disminuye el peso molecular promedio de sus fracciones peptídicas [Wu & Ding, 2001]. Presentándose como un tratamiento alternativo que carece de los efectos secundarios generados por los productos sintéticos.

B.0.4. Actividad hipocolesterolémica

El efecto reductor del colesterol de los hidrolizados producidos tras la hidrólisis enzimática de proteínas, ha sido demostrado en estudios in vitro, mejorando el perfil lipídico sérico en diferentes matrices animales [Hosomi et al., 2010, Lassoued et al., 2014, Udenigwe & Rouvinen-Watt, 2015] . Este efecto podría explicarse por la presencia de algunos péptidos bioactivos hidrofóbicos potentes, que se unen a los ácidos biliares por la interacción hidrofóbica con las estructuras de anillos tetracíclicos, contribuyendo al aumento de la eliminación del colesterol [Howard & Udenigwe, 2013].

B.0.5. Actividad antioxidante

Para evitar y/o disminuir la oxidación de los lípidos en los alimentos y proveer una protección extracelular en el cuerpo humano, es importante inhibir la oxidación de los lípidos y la formación de radicales libres en los alimentos y en el organismo. Los antioxidantes butilhidroxianisol y el butilhidroxitolueno, son los productos sintéticos más utilizados para la conservación de productos alimenticios [Karpińska et al., 2001]. Aunque estos antioxidantes exhiben una mayor actividad antioxidante comparada con los naturales (α-tocopherol, ácido ascórbico, entre otros), se tienen indicios de

que son los responsables del daño hepático y de la carcinogénesis [Ito et al., 1986]. Los productos de reacción de la hidrólisis enzimática de la proteína de suero [Peng et al., 2009], el hígado de pollo [Chakka et al., 2015], la leche de caseína de camella [Kumar et al., 2016], gelatina de piel de rayo espinoso [Lassoued et al., 2015], entre otros, presentan actividades antioxidantes in vitro en diferentes matrices animales, atribuidas probablemente a los efectos cooperativos de varios mecanismos, incluyendo: i) la quelación de iones metálicos, ii) la eliminación de radicales libres, ii) la inhibición de la peroxidación de lípidos, iii) la eliminación de compuestos que contienen oxígeno y iv) la transferencia de electrones individuales [Chen et al., 1996], potenciando su aplicación como antioxidante natural sostenible.

B.0.6. Actividad inmunomoduladora

La función inmunitaria desempeña un papel fundamental en la prevención y control de las enfermedades crónicas. Sin embargo, hay pocas estrategias disponibles para modular efectivamente la respuesta inmunológica. Diferentes investigaciones han informado sobre la actividad inmunomoduladora de hidrolizados de proteínas preparadas a partir de proteínas de suero [Gauthier et al., 2006], de salmón [Yang et al., 2009] y de soja [Kong et al., 2008]. Proponiendo mecanismos por los cuales los péptidos inmunomoduladores estimulan el sistema inmunológico, incluyendo la proliferación de linfocitos [FitzGerald et al., 2004], la actividad de las células asesinas naturales, la síntesis de anticuerpos y la regulación de la citoquinina [Hartmann & Meisel, 2007].

Apéndice C

Análisis estadísticos

C.0.1. RCB F_2 - Concentración de enzima

Tabla C.1: Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F_2** en los bloques (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza).

Bloque	TN-Q	TV-Q	TN-A_R	TV-A_R
1	0.0768	0.4043	0.4705	0.0527
2	0.3802	0.3931	0.7148	0.2294
3	0.2334	0.3917	0.6023	0.0751
4	0.3765	0.3154	0.5044	0.1216

Tabla C.2: Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F_2** en los niveles de tratamiento (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza).

Niveles	TN-Q	TV-Q	TN-A_R	TV-A_R
1	0.3176	0.0015	0.8531	0.4604
2	0.0293	0.0767	0.6989	0.7296
3	0.5293	0.0301	0.4607	0.4027

Tabla C.3: Resultados del test ANOVA para la productividad del **RCB F_2**.

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
Tratamiento	2	34.68	17.34	368.76	5.26e-07	***
Bloque	3	0.41	0.14	2.94	0.12	
Residuos	6	0.28	0.047			

Tabla C.4: Resultados del test ANOVA para la actividad relativa del **RCB F_2**.

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
Tratamiento	2	158.99	79.49	38.091	0.0004	***
Bloque	3	9.72	3.24	1.552	0.2955	
Residuos	6	12.52	2.09			

Tabla C.5: Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del **RCB F_2** concentración de enzima. Niveles de F_2 (1 = 2.5 [mAU/g], 2 = 5 [mAU/g] y 3 = 10 [mAU/g]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], V_R = 0.2 [L], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

	GL	**Sum Sq**	**Mean Sq**	**F value**	**Pr(>F)**	**Sig. code**
	Productividad - E_0 2.5 [mAU/g]					
Condición	3	0.0577	0.0192	0.776	0.565	
Residuos	4	0.0991	0.0248			
	Productividad - E_0 5 [mAU/g]					
Condición	3	0.8840	0.2947	3.845	0.113	
Residuos	4	0.3065	0.0766			
	Productividad - E_0 10 [mAU/g]					
Condición	3	0.4512	0.1504	1.354	0.376	
Residuos	4	0.4442	0.1110			
	Actividad relativa - E_0 2.5 [mAU/g]					
Condición	3	25.61	8.535	1.556	0.331	
Residuos	4	21.94	5.485			
	Actividad relativa - E_0 5 [mAU/g]					
Condición	3	15.45	5.149	2.359	0.213	
Residuos	4	8.73	2.182			
	Actividad relativa - E_0 10 [mAU/g]					
Condición	3	3.428	1.143	0.222	0.877	
Residuos	4	20.588	5.147			

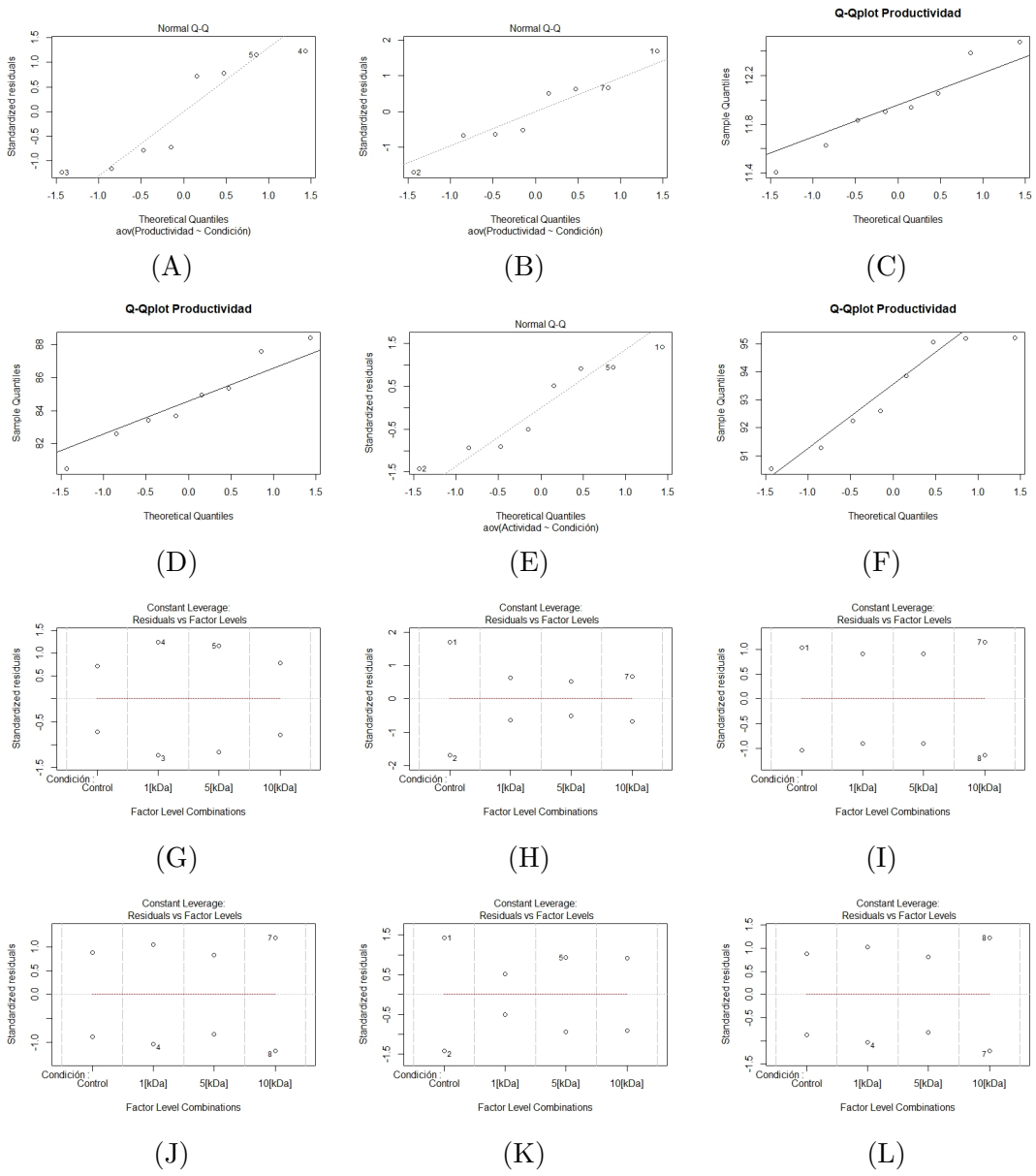


Figura C.1: Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento del **RCB** $\mathbf{F_2}$ para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (2.5 [mAU/g], 5 [mAU/g] y 10 [mAU/g]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles.

C.0.2. RCB F_3 - Volumen del reactor

Tabla C.6: Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F_3** en los bloques (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza).

Bloque	TN-Q	TV-Q	TN-A_R	TV-A_R
1	0.3604	0.0038	0.6420	0.6458
2	0.3500	0.0033	0.3749	0.3669
3	0.4267	0.0030	0.1190	0.0957
4	0.3375	0.0026	0.5960	0.0758

Tabla C.7: Valores de probabilidad (*p-value*) de los test de validación de los supuestos del **RCB F_3** en los niveles de tratamiento (TN = Test normalidad, TV = Test de varianza).

Niveles	TN-Q	TV-Q	TN-A_R	TV-A_R
1	0.0293	0.0767	0.6989	0.7296
2	0.5671	0.9852	0.6737	0.0536
3	0.9640	0.0952	0.4522	0.1391

Tabla C.8: Resultados del test ANOVA para la productividad del **RCB F_3**.

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
Tratamiento	2	5089	2544.3	613.772	1.15e-07	***
Bloque	3	29	9.6	2.318	0.175	
Residuos	6	25	4.1			

Tabla C.9: Resultados del test ANOVA para la actividad relativa del **RCB F_3**.

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
Tratamiento	2	62.07	31.034	4.476	0.0646	.
Bloque	3	75.63	25.210	3.636	0.0836	.
Residuos	6	41.60	6.933			

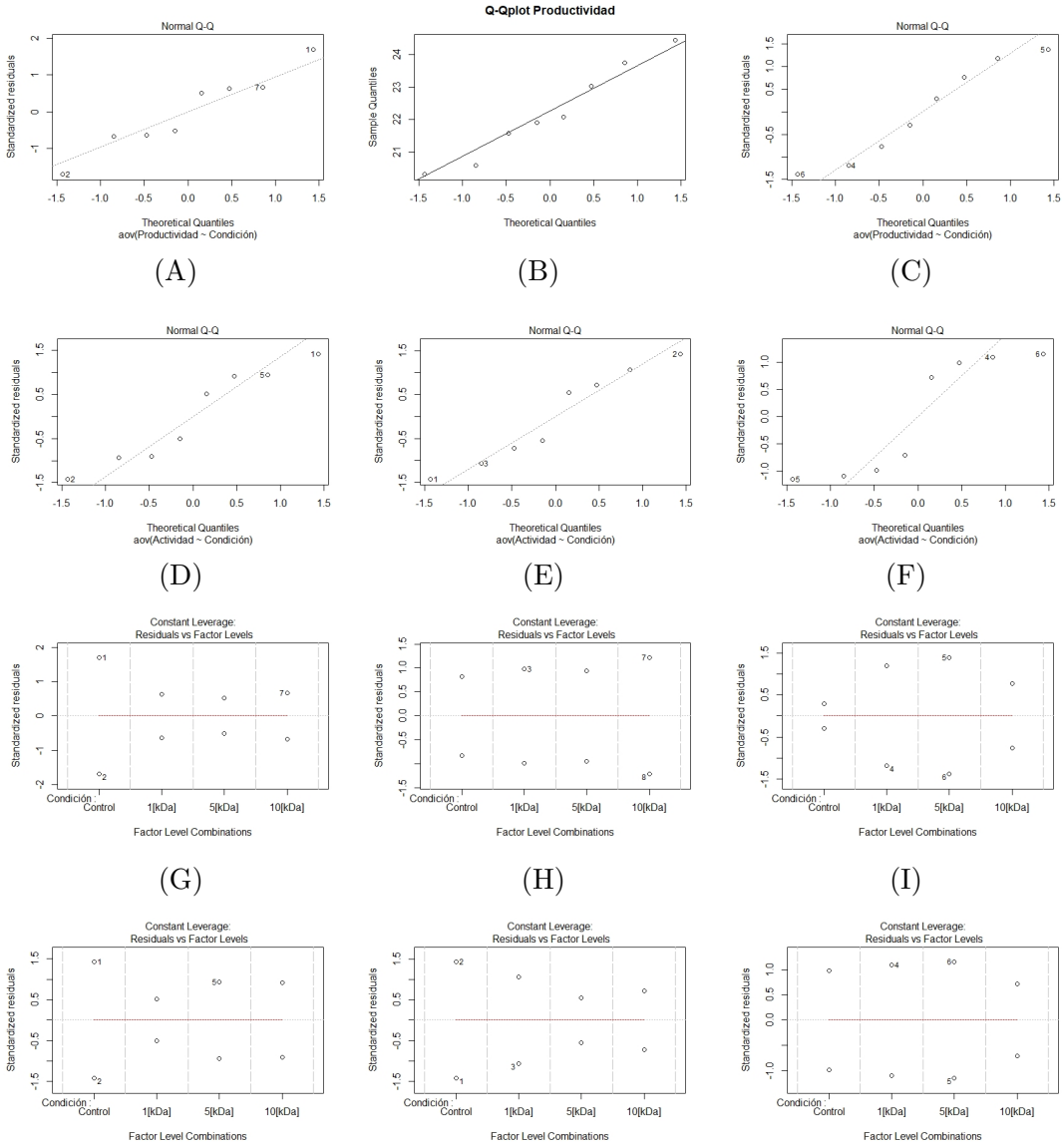


Figura C.2: Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento del **RCB $\mathbf{F_3}$** para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (0.2 [L], 0.4 [L] y 1 [L]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles.

Tabla C.10: Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del **RCB F_3** volumen del reactor. Niveles de F_3 (1 = 0.2 [L], 2 = 0.4 [L] y 3 = 1 [L]). Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
	Productividad - V_R 0.2 [L]					
Condición	3	0.8840	0.2947	3.845	0.113	
Residuos	4	0.3065	0.0766			
	Productividad - V_R 0.4 [L]					
Condición	3	10.235	3.412	2.964	0.161	
Residuos	4	4.604	1.151			
	Productividad - V_R 1 [L]					
Condición	3	143.02	47.67	7.28	0.0425	*
Residuos	4	26.19	6.55			
	Actividad relativa - V_R 0.2 [L]					
Condición	3	15.45	5.149	2.359	0.213	
Residuos	4	8.73	2.182			
	Actividad relativa - V_R 0.4 [L]					
Condición	3	146.95	48.98	5.97	0.0586	.
Residuos	4	32.82	8.21			
	Actividad relativa - V_R 1 [L]					
Condición	3	72.05	24.02	1.009	0.476	
Residuos	4	95.24	23.81			

Tabla C.11: Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento del V_R de **2 [L]**. Condiciones de operación: S_0 = 5 [%], E_0 = 5 [mAU/g], T = 50 [°C], ΔP_T = 10 [psig], pH = 8, t = 60 [min], F = 66 [mL/min].

	GL	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	Sig. code
	Productividad - t_{op} 1 [h]					
Condición	3	847.4	282.46	32.76	0.00283	**
Residuos	4	34.5	8.62			
	Productividad - t_{op} 3 [h]					
Condición	3	261.51	87.17	17.78	0.00891	**
Residuos	4	19.61	4.90			
	Actividad relativa -t_{op} 1 [h]					
Condición	3	13.777	4.592	3.387	0.135	
Residuos	4	5.424	1.356			
	Actividad relativa - t_{op} 3 [h]					
Condición	3	18.098	6.033	3.696	0.119	
Residuos	4	6.529	1.632			

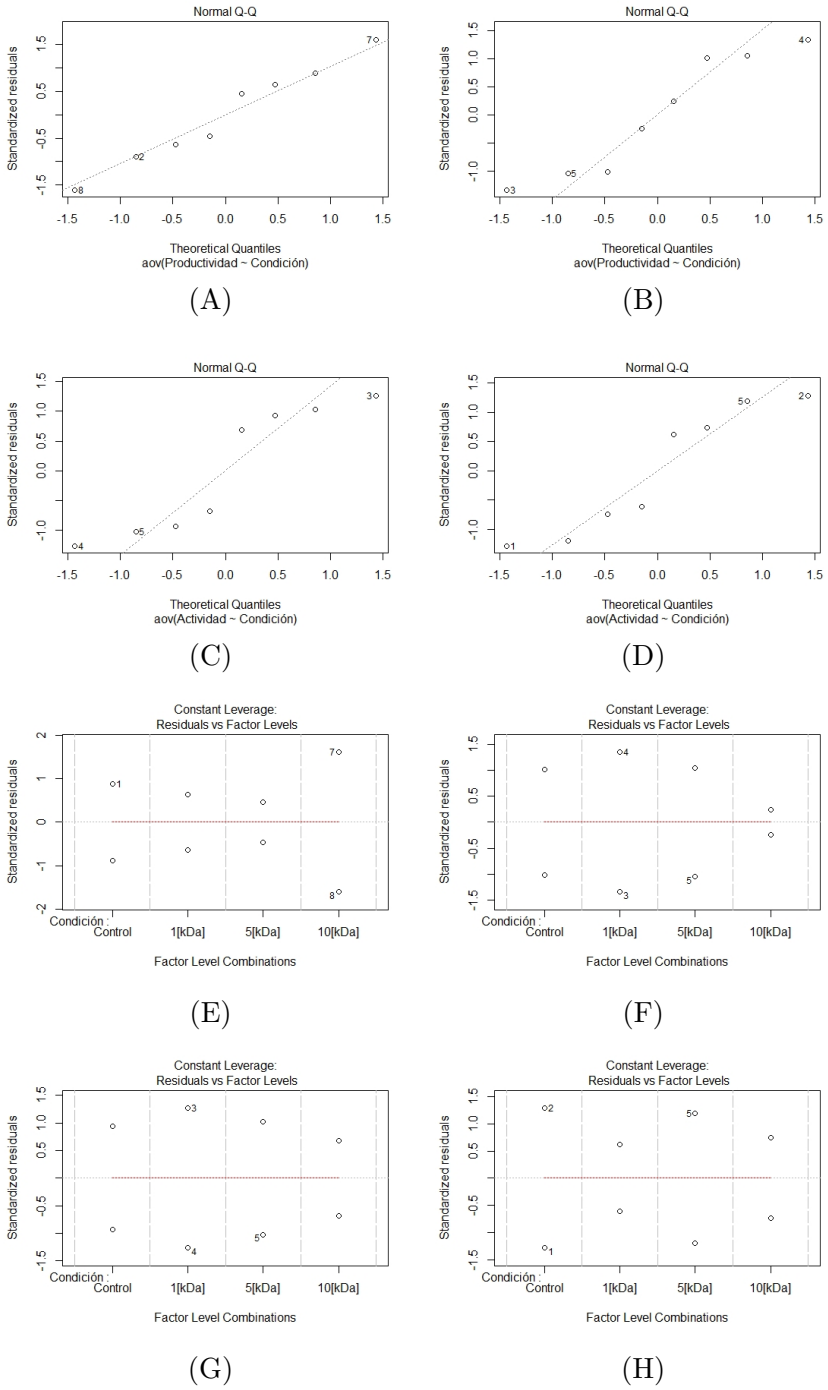


Figura C.3: Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento de los experimentos de V_R para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel (1 [h] y 3 [h]). **A-B)** Q-Q plot productividad. **C-D)** Q-Q plot actividad relativa. **E-F)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **G-H)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles.

C.0.3. RCB F_2 - Diafiltración

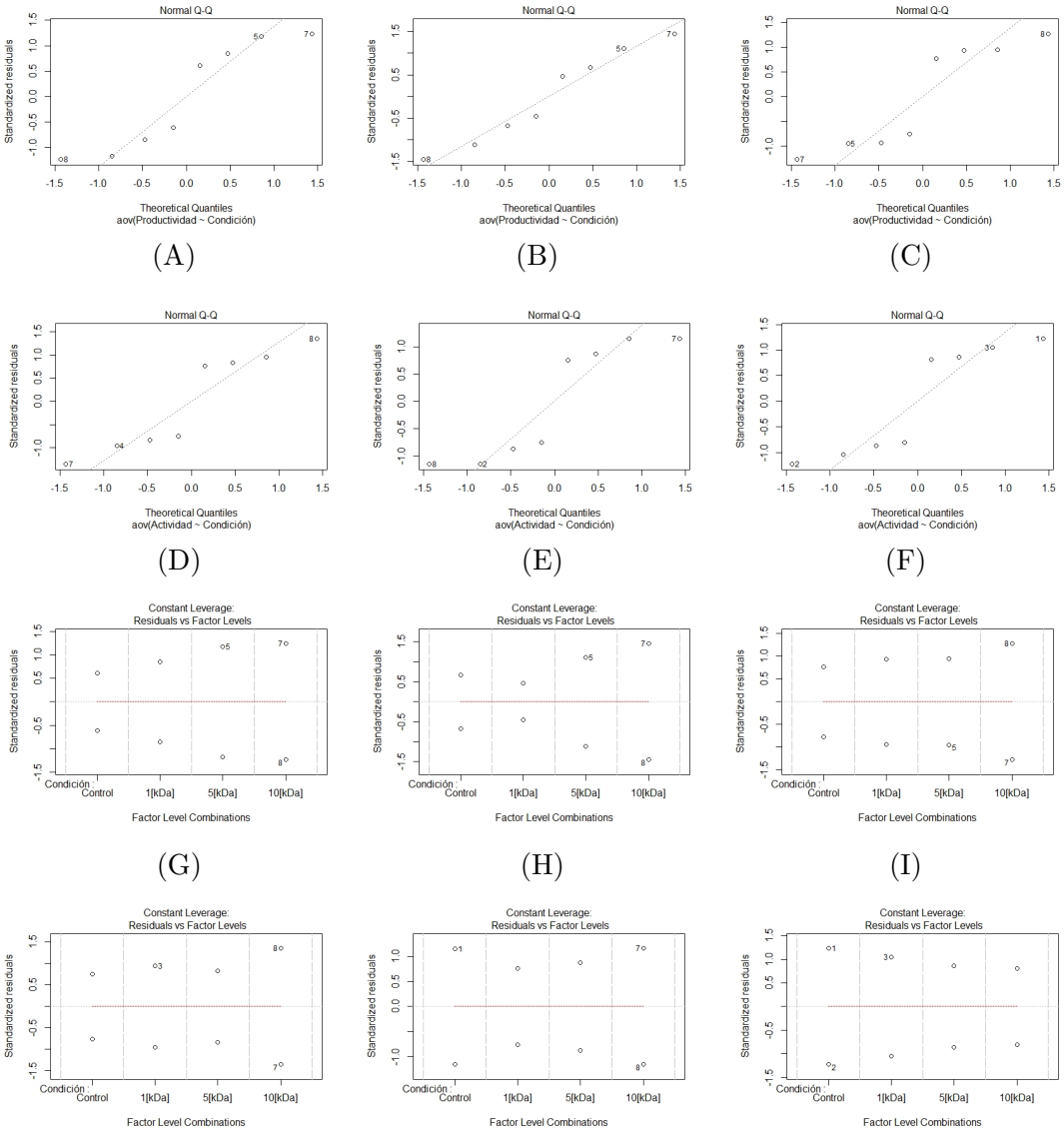


Figura C.4: Validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad por nivel de tratamiento de los experimentos de diafiltración para la productividad y la actividad relativa. Cada columna corresponde a un nivel de F_1 (33.3 [mL/min], 66.6 [mL/min] y 90.0 [mL/min]). **A-B-C)** Q-Q plot productividad. **D-E-F)** Q-Q plot actividad relativa. **G-H-I)** Leverage plot para productividad - residuos vs factores de los niveles. **J-K-L)** Leverage plot para actividad relativa - residuos vs factores de los niveles.

Tabla C.12: Resultados del test ANOVA para la productividad y actividad relativa por nivel de tratamiento para los experimentos de diafiltración. Condiciones de operación: $S_0 = 5$ [%], $E_0 = 5$ [mAU/g], T = 50 [°C], $\Delta P_T = 10$ [psig], pH = 8, t = 60 [min] y $V_R = 0.4$ [L].

	GL	**Sum Sq**	**Mean Sq**	**F value**	**Pr(>F)**	**Sig. code**
	Productividad - F_A 33.3 [mL/min]					
Condición	3	3.650	1.2167	8.87	0.0306	*
Residuos	4	0.549	0.1372			
	Productividad - F_A 66.6 [mL/min]					
Condición	3	10.249	3.416	30.4	0.0033	**
Residuos	4	0.449	0.112			
	Productividad - F_A 90.0 [mL/min]					
Condición	3	4.897	1.6324	2.262	0.223	
Residuos	4	2.886	0.7215			
	Actividad relativa - F_A 33.3 [mL/min]					
Condición	3	63.22	21.074	3.723	0.118	
Residuos	4	22.64	5.661			
	Actividad relativa - F_A 66.6 [mL/min]					
Condición	3	37.30	12.432	4.457	0.0914	.
Residuos	4	11.16	2.789			
	Actividad relativa - F_A 90.0 [mL/min]					
Condición	3	61.99	20.664	3.277	0.141	
Residuos	4	25.22	6.306			