

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
QUÍMICA



ESTUDIO DE LA ULTRAFILTRACIÓN DE
PROTEÍNAS MODELO CON MEMBRANAS CERÁMICAS

TESIS DOCTORAL

RUBÉN IBÁÑEZ LORENTE

2007



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA
18071 - GRANADA

Granada, 21 de mayo de 2007

ENCARNACIÓN JURADO ALAMEDA, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada

CERTIFICA

que la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA ULTRAFILTRACIÓN DE PROTEÍNAS MODELO CON MEMBRANAS CERÁMICAS" ha sido realizada para aspirar al Grado de Doctor en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada por el Ingeniero Químico RUBÉN IBÁÑEZ LORENTE bajo la dirección de la Profesora Titular EMILIA MARÍA GUADIX ESCOBAR y el Profesor Ayudante Doctor ANTONIO MARÍA GUADIX ESCOBAR.



Encarnación Jurado Alameda
DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO



Rubén Ibáñez Lorente
DOCTORANDO



Emilia María Guadix Escobar
DIRECTORA DE LA TESIS



Antonio María Guadix Escobar
DIRECTOR DE LA TESIS

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Emilia M^a. Guadix Escobar y Antonio M^a. Guadix Escobar por su dedicación, dirección, orientación e interés en mi formación. Así como, por su empeño que ha hecho posible que este trabajo de investigación saliera adelante.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador.

A la doctora Eva Sorensen y demás miembros del Department of Chemical Engineering de University College London por su apoyo durante mi estancia en dicho centro.

A mi compañera M^a Carmen Almécija con la que he compartido largos días de trabajo y que siempre estuvo dispuesta a prestarme ayuda de manera desinteresada.

A todos los compañeros del Departamento de Ingeniería Química, en especial a Rosa Fuentes y Antonio Carmona por su inestimable colaboración.

A mi familia y a Mariu por su fe en mí que siempre me ha empujado a seguir adelante. Sin su cariño, estímulo y comprensión, este trabajo no hubiera sido posible.

A mis padres, mi hermano y Mariu

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2.1. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS | 7 |
| 2.1.1. Métodos cromatográficos | 8 |
| 2.1.2. Precipitación selectiva | 9 |
| 2.1.3. Filtración con tecnología de membranas | 11 |
| 2.2. TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS | 12 |
| 2.2.1. Descripción fenomenológica | 12 |
| 2.2.2. Procesos de separación conducidos por presión | 13 |
| 2.2.3. Materiales | 16 |
| 2.2.4. Módulos de membrana | 18 |
| 2.2.5. Limpieza | 23 |
| 2.3. FILTRACIÓN TANGENCIAL DE ALTA RESOLUCIÓN | 29 |
| 2.4. PRINCIPALES MODELOS EN FILTRACIÓN DE PROTEÍNAS | 50 |
| 2.4.1. Modelos hidrodinámicos | 50 |
| 2.4.2. Modelo de la capa de polarización | 54 |
| 2.4.3. Modelo de presión osmótica | 59 |
| 2.4.4. Modelo de resistencias en serie | 60 |
| 2.4.5. Modelos de colmatación o fouling | 61 |
| 2.5. REDES NEURONALES ARTIFICIALES | 68 |
| 2.5.1. Fundamentos | 68 |
| 2.5.2. Aplicación a procesos de membrana | 79 |
| 2.6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN | 87 |

| | |
|--|------------|
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 89 |
| 3.1. PROTEÍNAS MODELO | 91 |
| 3.1.1. β -lactoglobulina | 91 |
| 3.1.2. BSA | 92 |
| 3.1.3. Lisozima | 93 |
| 3.2. MEMBRANAS | 95 |
| 3.3. DISPOSITIVO DE FILTRACIÓN | 98 |
| 3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 100 |
| 3.4.1. Disoluciones unitarias | 100 |
| 3.4.2. Mezcla de proteínas | 101 |
| 3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS | 103 |
| 3.6. REDES NEURONALES ARTIFICIALES | 105 |
| 3.6.1. Arquitectura de la red | 105 |
| 3.6.2. Variables de entrada y salida | 105 |
| 3.6.3. Algoritmo de aprendizaje | 106 |
| 3.6.4. Funcionamiento de la red | 107 |
| 4. RESULTADOS | 109 |
| 4.1. CONSIDERACIONES PREVIAS | 111 |
| 4.1.1. Tratamiento de los resultados | 111 |
| 4.2. SISTEMAS EXPERIMENTALES | 115 |
| 4.2.1. Sistema Lisozima-membrana de 50 kDa | 115 |
| 4.2.2. Sistema Lisozima-membrana de 300 kDa | 127 |
| 4.2.3. Sistema β -lactoglobulina-membrana de 300 kDa | 138 |
| 4.2.4. Sistema BSA-membrana de 300 kDa | 149 |
| 4.2.5. Sistemas Binarios y Ternario | 150 |

| | |
|--|------------|
| 5. DISCUSIÓN | 161 |
| 5.1. CONSIDERACIONES PREVIAS | 163 |
| 5.1.1. Cálculo del radio efectivo de la proteína | 163 |
| 5.1.2. Evolución temporal del flujo de filtrado | 165 |
| 5.1.3. Transporte de proteína a través de la membrana | 168 |
| 5.2. SISTEMAS EXPERIMENTALES | 170 |
| 5.2.1. Sistema lisozima-membrana de 50 kDa | 170 |
| 5.2.2. Sistema lisozima-membrana de 300 kDa | 183 |
| 5.2.3. Sistema β -lactoglobulina-membrana de 300 kDa | 199 |
| 5.2.4. Sistema BSA-membrana de 300 kDa | 211 |
| 5.2.5. Sistemas binarios y ternario | 212 |
| 5.2.6. Análisis de las interacciones | 230 |
| 5.3. MODELADO MEDIANTE REDES NEURONALES | 234 |
| 5.3.1. Redes propuestas | 234 |
| 5.3.2. Tratamiento de los datos de la red | 235 |
| 5.3.3. Red RN1: lisozima-caudal de filtrado | 236 |
| 5.3.4. Red RN2: lisozima-transmisión observada | 241 |
| 5.3.5. Red RN3: β -lactoglobulina-transmisión observada y caudal de filtrado | 245 |
| 5.3.6. Red RN4: Binaria-caudal de filtrado | 251 |
| 5.3.7. Red RN5: Binaria-transmisión observada | 255 |
| 6. CONCLUSIONES | 259 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 263 |
| SUMMARY OF THE THESIS | S-1 |

1. RESUMEN

En las investigaciones realizadas recientemente en los sectores biotecnológico y farmacéutico, se ha mostrado un especial interés en el diseño de procesos para el fraccionamiento de mezclas complejas de proteínas. Desafortunadamente, las técnicas bien establecidas existentes en el laboratorio para este propósito, tales como cromatografía y precipitación selectiva, presentan elevados costes de instalación y operación al ser implantadas a escala industrial. Como alternativa, podemos encontrar resultados prometedores en el campo de la tecnología de membranas, especialmente en la filtración tangencial de alta resolución. Esta técnica permite la separación de proteínas de similar peso molecular, basándose en el control de las interacciones proteína-membrana y proteína-proteína, mediante la selección de las condiciones físico-químicas de operación, principalmente pH y fuerza iónica

Con estos antecedentes, el objetivo principal del trabajo de investigación recogido en esta Tesis Doctoral ha sido el estudio experimental del proceso de filtración tangencial de alta resolución con proteínas modelo. Para ello se han empleado tres proteínas con diferente peso molecular y punto isoeléctrico: BSA (PM 69000, PI 4.9), β -lactoglobulina (PM 18300, PI 5.2) y lisozima (PM 14300, PI 10.7). Para estas proteínas y sus mezclas se ha llevado a cabo la ultrafiltración a 30 ° C a través de membranas cerámicas tubulares de un tamaño de corte entre 50 y 300 kDa en el modo de recirculación total. La evolución del caudal de filtrado y transporte de proteína ha sido analizada en función del tamaño de poro, pH, fuerza iónica, velocidad de circulación y presión transmembrana.

El comportamiento de los sistemas está fuertemente influenciado por la relación entre el punto de carga cero de la membrana y el punto isoeléctrico de la proteína, los cuales determinan las interacciones electrostáticas que tienen lugar. Para la interpretación de los resultados, se han desarrollado modelos matemáticos mecanísticos y empíricos. Para describir la evolución del flujo de filtrado, se han aplicado modelos combinados de colmatación que incluyen bloqueo completo y bloqueo estándar (en los casos en los que existe transmisión) o formación de torta (en caso contrario). En cuanto al paso de proteína a

través de la membrana, se han calculado la velocidad máxima de transporte y el tiempo al que ésta se produce mediante funciones hiperbólicas y sigmoidales.

Finalmente, el empleo de redes neuronales artificiales ha permitido la predicción del flujo del filtrado y la transmisión de proteína. Mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt, se ha llevado a cabo el entrenamiento de cada red con el 70 % de los datos experimentales con el objetivo de encontrar los valores óptimos de pesos y biases que minimizan el error cuadrático medio. Como método para evitar el sobreajuste, se ha simultaneado la validación con el 15 % de los datos, mientras que el 15 % restante se ha destinado a prueba para verificar la capacidad de generalización de la red.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

La separación de proteínas es un campo importante dentro de una industria en constante crecimiento como es la industria de los bioprocesos. Esto se debe fundamentalmente a que muchos bioproductos son proteínas y existe un gran interés, tanto científico como comercial, en su purificación y concentración (Müller et al., 2003).

Los concentrados y los aislados de proteínas se usan como aditivos en la industria agroalimentaria. Sin embargo, la enorme variabilidad, tanto en la composición como en la funcionalidad, de estos productos no ha permitido aprovechar todo su potencial. Además, las características nutricionales, terapéuticas y funcionales que presentan las proteínas de manera individual se ven mermadas e incluso eliminadas en estos productos debido a las interacciones entre sus componentes y las degradaciones sufridas durante el proceso de producción. Ante esta situación y debido al amplio rango de potenciales aplicaciones de las proteínas individuales, se ha generado un gran interés en el desarrollo de procesos que permitan la obtención de purificados con propiedades funcionales y biológicas bien definidas (Zydney, 1998).

Así, el reto científico y técnico es encontrar una técnica de separación que permita la obtención de productos de elevada pureza con degradación mínima junto con una alta productividad y unos costes adecuados para su comercialización. Este objetivo no es fácil de cumplir como demuestra el hecho de que ninguna de las técnicas actuales se ha conseguido implantar para la producción a gran escala.

Los métodos que se han utilizado para el fraccionamiento de proteínas se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- Métodos cromatográficos.
- Precipitación selectiva.
- Filtración con tecnología de membranas.

2.1.1. Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos implican el paso de una fase móvil a través de un medio (fase inmóvil) capaz de adsorber los componentes de una disolución de manera selectiva. La velocidad de paso de cada componente es inversamente proporcional a la intensidad de la interacción con la fase inmóvil. Todos los procesos cromatográficos se basan en la utilización de una columna que contiene un material que puede adsorber de manera selectiva moléculas basándose en alguna diferencia en su estructura química. El material usado en la columna así como el método de elución utilizado depende de la base en la que se fundamente la separación (Mathews, Van Holde y Ahern, 2000). A continuación se describen los métodos cromatográficos más utilizados para este fin.

Cromatografía de intercambio iónico.

Se usa para separar moléculas tomando como principio la carga eléctrica de las mismas. Se utilizan resinas de intercambio iónico que pueden ser polianiónicas o policationicas. Las proteínas que tengan igual carga que la resina pasarán sin adsorberse sobre la misma y podrán ser encontradas en las primeras fracciones que se recojan. Las proteínas con carga contraria a la resina, se unirán a la misma. La fuerza de la unión será función del valor de la carga. Teniendo en cuenta que la adición de sales tiende a desestabilizar las interacciones electrostáticas establecidas entre las proteínas y la fase inmóvil, se aplicará un gradiente de sal después de recoger las primeras fracciones. Al aumentar la concentración de sal, los iones con carga igual a las proteínas enlazadas a la resina podrán competir mejor por los puntos de enlace, lo que provoca que las proteínas débilmente enlazadas comiencen a desprenderse y se recojan a continuación, y las más fuertemente enlazadas se eluyan sólo cuando el gradiente de sal empleado sea muy alto.

Cromatografía por afinidad.

La cromatografía por afinidad es un tipo de cromatografía muy específica, ideal para separar una o varias proteínas de una mezcla compleja. Muchas proteínas muestran interacciones importantes con otras moléculas, como por ejemplo las interacciones de las enzimas con análogos de sus sustratos o con cofactores. Por lo tanto, utilizando las moléculas adecuadas covalentemente asociadas a una matriz de material inerte, se puede atrapar la proteína objetivo, mientras que el resto de las proteínas pasan a través de la

columna sin ningún tipo de interacción. Después, las proteínas capturadas se pueden liberar mediante la utilización de un tampón que contenga las moléculas utilizadas en la matriz en estado libre, o algún tipo de reactivo que pueda eliminar la interacción.

Filtración en gel.

Es un tipo de cromatografía en el que el principio de separación es el tamaño molecular más que las propiedades químicas. En este caso, la columna se rellena con cuentas de un gel poroso. La porosidad del gel se selecciona de manera que las moléculas más pequeñas puedan entrar en los poros mientras que las más grandes no. Por tanto, las moléculas más grandes se moverán más rápidamente por la columna ya que sólo pueden fluir por los intersticios entre las cuentas de gel y se recogerán en las primeras fracciones.

Cromatografía líquida de alta resolución.

La cromatografía es un proceso lento. En los procesos normales sólo se aplican pequeñas presiones para obligar a los fluidos a pasar a través de la columna y la elución tarda muchas horas. Este proceso consume tiempo y además puede producir el deterioro de materiales delicados. Adicionalmente, la muestra tiende a dispersarse por difusión mientras pasa por la columna lo que afecta a la resolución. Para resolver todos estos problemas surge la cromatografía líquida de alta resolución que aplica grandes presiones para obligar a la disolución a pasar rápidamente a través de la columna. El hecho de aplicar grandes presiones (137-207 bar) ha obligado a elaborar resinas para columnas que sean no compresibles y columnas metálicas de gran resistencia. De esta manera, separaciones que antes requerían horas se pueden hacer ahora en minutos y con mayor resolución.

Autores como Turhan y Etzel (2004), Schlatterer et al. (2004) y Heeboll-Nielsen et al. (2004) han usado estos métodos para el fraccionamiento de proteínas

2.1.2. Precipitación selectiva.

Es uno de los métodos más simples y antiguos de separar proteínas a partir de una mezcla. La estabilidad estructural de una proteína globular depende de una serie de interacciones químicas. La conformación final se debe a un equilibrio de estas fuerzas: interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van de Waals y los entrecruzamientos covalentes (uniones disulfuro). La conformación de una proteína

funcional es parcialmente estable pero cualquier cambio en el ambiente que la rodea puede dar lugar a modificaciones en su estructura y a una pérdida de la función, cuando esto se produce se dice que la proteína sufre una desnaturalización. Una vez desnaturalizadas, las proteínas se pueden agregar fácilmente y, según las condiciones, precipitar. La técnica de precipitación selectiva se basa pues, en crear unas condiciones donde la proteína de interés no se desnaturalice mientras que los otros componentes se desnaturalicen y precipiten. Para conseguir esto se pueden utilizar cambios en la temperatura, en la fuerza iónica, en el pH o disolventes orgánicos. Aunque el principio de cada uno de ellos es distinto, no son independientes entre sí, por ejemplo la desnaturalización por temperatura depende fuertemente del pH y viceversa, y en el caso de fraccionamiento por disolventes orgánicos, el pH y fuerza iónica deben ser cuidadosamente seleccionados. Este método ha sido utilizado por autores como Outinen et al. (1996), Bramaud et al. (1997), Hinrichs (2004) para el fraccionamiento de proteínas.

Precipitación por efecto de la temperatura.

Muchas proteínas se desnaturalizan por efecto de la temperatura ya que el calor afecta a las interacciones débiles como los enlaces de hidrógeno. Esto da lugar a un cambio abrupto y a la pérdida de la estructura en una parte de la proteína desestabilizando el resto.

Precipitación por efecto de la fuerza iónica.

Muchas proteínas se insolubilizan en presencia de altas concentraciones de sal, especialmente de sales polivalentes, que realizan una contribución importante a la fuerza iónica. Pero lo que es más interesante, es que la solubilidad cambia mucho de una proteína a otra con la fuerza iónica, lo que permite separarlas mediante una adecuada selección de la misma.

Precipitación por efecto del pH.

Cuando se somete a una proteína a valores extremos de pH se produce su desnaturalización porque hay áreas de la molécula que adquieren carga dando lugar a repulsiones, mientras que en otras áreas se pierden cargas que estaban involucradas en mantener la estabilidad de la estructura.

Precipitación por efecto de disolventes orgánicos.

Existen disolventes orgánicos miscibles con el agua (etanol o acetona) que producen una serie de efectos que, combinados, dan lugar a la precipitación de proteínas. La desnaturalización se debe a que las moléculas de los disolventes interfieren con las interacciones hidrofóbicas en el interior de las proteínas lo que desestabiliza la estructura.

2.1.3. Filtración con tecnología de membranas

La separación de proteínas con membranas ha generado mucha expectación en los últimos años en campos biotecnológicos muy diversos porque presenta una serie de ventajas con respecto a otras técnicas de fraccionamiento (Irritan et al. 1997, Prádanos et al. 1996, Ghosh y Cui, 2000):

- Requiere condiciones de operación suaves.
- Permite purificar de manera eficiente a bajas temperaturas, por lo que se puede utilizar con sustancias termolábiles, además, los productos obtenidos conservan su funcionalidad al no ser sometidos a desnaturalización química.
- El producto está libre de contaminantes añadidos durante el proceso de separación.
- Es una tecnología fácilmente escalable.

Para llevar a cabo esta técnica de separación se utilizan membranas semipermeables junto con la aplicación de una fuerza impulsora (normalmente presión), de manera que unas moléculas pasan a través de la membrana con facilidad mientras que otras quedan retenidas. En los siguientes puntos se realizará una descripción más detallada de esta técnica.

2.2. TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS

2.2.1. Descripción fenomenológica

A la hora de llevar a cabo la separación de componentes de una mezcla mediante tecnología de membranas se recurre a la filtración tangencial. Esta técnica se diferencia de la filtración convencional en que el flujo de alimentación es tangencial a la superficie de la membrana, produciéndose la separación debido a la acción de una fuerza impulsora que puede ser de distinta naturaleza (un gradiente de concentración, presión parcial, potencial eléctrico o presión). El elemento principal de esta tecnología es la membrana, que se puede definir como “una barrera selectiva entre dos fases, que restringe y/o dificulta el paso de unas sustancias y favorece el paso de otras”.

En el proceso de filtración, una corriente de entrada (corriente de alimentación) da lugar a dos corrientes de salida (corriente de filtrado y de retenido). La corriente de retenido es la porción de la corriente de entrada que no pasa a través de la membrana y que se enriquece en los productos que experimentan una mayor dificultad para atravesarla. Por otra parte, la corriente de filtrado es la porción que atraviesa la membrana estando, por tanto, enriquecida en los componentes cuyo transporte a través de la membrana se encuentra favorecido (Figura 2.1).

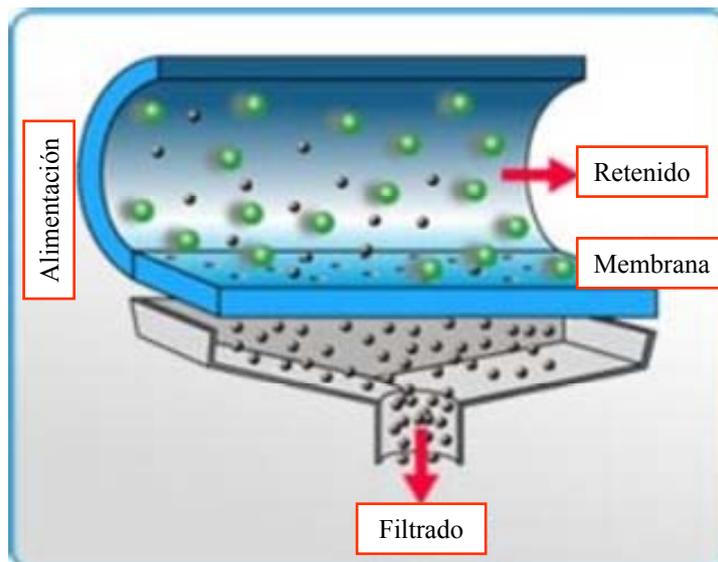


Figura 2.1 Proceso genérico de membrana

Durante la filtración y a consecuencia de la aplicación de la fuerza impulsora, se produce una transmisión de materia hacia la superficie de la membrana, lo que da lugar a un aumento de la concentración de los solutos en las proximidades de dicha superficie por la retención total o parcial de los mismos por parte de la membrana. Esta acumulación de solutos origina una resistencia adicional debida a la presión osmótica y/o a efectos hidrodinámicos dando lugar a una reducción del flujo de filtrado (Saksena y Zydney, 1997). Esta resistencia, conocida como concentración de polarización, es reversible y desaparece cuando cesa la transferencia de materia. La concentración de polarización se ve muy afectada por las condiciones de operación (Barba et al, 1997). Adicionalmente y como consecuencia del paso de solutos a través de la membrana, se produce una colmatación por el depósito de precipitados, partículas, proteínas, sales, etc. en la superficie o en el interior de los poros de la membrana. Esta colmatación o fouling genera una resistencia adicional de tipo irreversible que se suma a las resistencias anteriores y que también contribuye al descenso del flujo de filtrado con el tiempo. El fouling, al contrario que la concentración de polarización, depende más de la membrana y de las propiedades de la disolución que se esté filtrando, es decir, de las interacciones soluto-soluto y soluto-membrana (Barba et al, 1997). La colmatación de la membrana sólo puede ser eliminada mediante la realización de ciclos periódicos de limpieza que permiten a la membrana recuperar sus características filtrantes originales.

2.2.2. Procesos de separación conducidos por presión.

Dentro de los procesos de separación con membranas destacan los procesos que tienen como fuerza impulsora una diferencia de presión. Como se aprecia en la Figura 2.2, estos procesos se pueden agrupar en cuatro categorías atendiendo a las moléculas o partículas que separan y por tanto al tamaño de poro:

- Microfiltración.
- Ultrafiltración.
- Nanofiltración.
- Ósmosis Inversa.

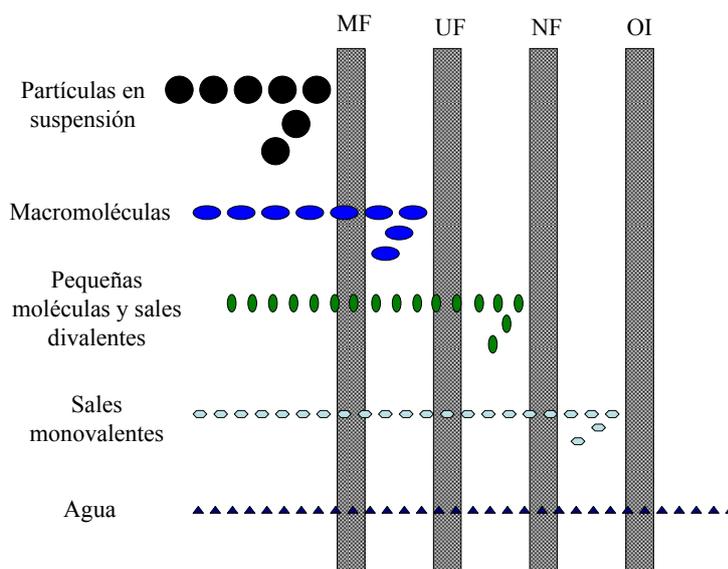


Figura 2.2 Procesos de membrana conducidos por presión

Microfiltración.

Se utiliza para separar partículas con un tamaño comprendido entre 0.05 y 10 μm . Las presiones de trabajo utilizadas oscilan entre los 0.5 y 3 bar. Las partículas se retienen en función de sus dimensiones (tamaño y forma) siendo el proceso de membrana que se parece más a la filtración convencional.

Se suele usar para retener sólidos en suspensión y por tanto se emplea como etapa de limpieza, de concentración o como pretratamiento para la nanofiltración o la ósmosis inversa. Otras aplicaciones incluyen la esterilización en frío de bebidas y productos farmacéuticos, la clarificación de zumos, vino o cerveza, tratamiento de aguas, etc.

Ultrafiltración.

Se emplea para retener moléculas de tamaño relativamente grande, comprendidas en el rango de 2 a 100 nm (proteínas, polímeros, etc.), mientras las moléculas pequeñas (sales, disolventes orgánicos de bajo peso molecular, etc.) pasan libremente. El mecanismo de separación es similar al de microfiltración. El tamaño de poro de las membranas empleadas en esta técnica oscila entre 0.001 y 0.1 μm . y las presiones empleadas están comprendidas entre 1 y 10 bar.

Su principal aplicación es como etapa de concentración o purificación en la industria láctea (leche, suero, producción de queso, obtención de concentrados proteicos). También se usa en la industria metalúrgica, en la industria textil y en la potabilización de aguas, así como en el tratamiento de aguas residuales. Una aplicación de especial interés de la ultrafiltración es el fraccionamiento de macromoléculas, como por ejemplo las proteínas de la leche.

Nanofiltración.

Se utiliza para retener moléculas de bajo peso molecular (200-100 Da) e iones multivalentes como el calcio. Es, por tanto, un proceso intermedio entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa. El tamaño de poro, en este caso, está comprendido entre 0.005 y 0.0005 μm , oscilando las presiones aplicadas entre 3 y 20 bares. En esta técnica, el proceso de separación está marcado por la difusión de los elementos y el flujo a través de los poros.

La nanofiltración encuentra su aplicación en la eliminación de pequeñas moléculas como proteínas, enzimas, antibióticos, tintes, herbicidas, pesticidas e insecticidas, en la reducción de la dureza de aguas y en el tratamiento de aguas residuales.

Ósmosis inversa.

Con esta técnica se pueden retener moléculas de muy bajo peso molecular tales como las sales, siendo su mecanismo fundamental la difusión. El tamaño de poro en este caso es menor a 0.0005 μm , oscilando las presiones aplicadas entre 10 y 50 bares. Al ser el tamaño de poro tan reducido, sólo moléculas orgánicas de muy pequeño tamaño y solutos sin carga pueden pasar a través de la membrana junto con el agua.

La ósmosis inversa se aplica principalmente en la desalinización de agua de mar, la producción de agua ultrapura, la concentración de zumos, azúcares, leche y en el tratamiento de aguas residuales.

2.2.3. Materiales

En el mercado se puede encontrar membranas fabricadas en una gran variedad de materiales. En general se pueden clasificar en dos grandes familias: membranas poliméricas u orgánicas y membranas inorgánicas (Cheryan, 1998).

Membranas poliméricas.

Son aquellas membranas cuya capa activa está fabricada con un material polimérico. Para poder usar un material polimérico en la fabricación de membranas es necesario que esté disponible, es decir, que sea un polímero de uso corriente en la industria. Además, debe ser químicamente estable en las condiciones de operación y se le tiene que dar forma fácilmente. Finalmente debe contar con la aprobación pertinente para su uso con alimentos y agua potable (Scott y Hughes, 1996).

Las membranas poliméricas están muy desarrolladas y son muy competitivas gracias a sus propiedades de separación y aceptables costes. Pueden ser hidrófilas, si están hechas de materiales altamente polares con alta afinidad por el agua (ésteres celulósicos, poliamidas alifáticas, etc.), o hidrófobas, si se componen de materiales apolares con baja afinidad por el agua (polietileno, polipropileno, etc.). El primer tipo de material utilizado en la fabricación de membranas fue el acetato de celulosa. Es un material barato y fácil de obtener, que presenta una buena resistencia a la colmatación cuando hay grasas y proteínas presentes. Sin embargo es poco resistente al cloro, a pH extremos y a la temperatura por lo que no puede soportar limpiezas severas. Teniendo en cuenta estos problemas, se han utilizado otros polímeros para fabricar membranas. Así, membranas de poliamida se usan para ósmosis inversa y nanofiltración. Este material es químicamente mucho más estable pero se colmata fácilmente y tiene baja tolerancia al cloro. También se han usado polisulfonas y polietersulfonas que presentan buena estabilidad química y térmica aunque no tienen gran tolerancia a los agentes oxidantes y PVDF que es más resistente a los agentes oxidantes. Además, existen otros polímeros que se usan para la fabricación de membranas, pero en la mayoría de los casos los fabricantes se muestran reticentes a proporcionar información detallada sobre ellos.

Membranas inorgánicas.

Al igual que para el caso de los materiales poliméricos, existe una gran variedad de materiales para la fabricación de membranas inorgánicas. La introducción de este tipo de membranas en el mercado dio lugar a la apertura de nuevos campos de aplicación de la tecnología de membranas gracias a sus innumerables ventajas (Cheryan, 1998). Los materiales con que se fabrican las membranas inorgánicas se pueden clasificar en:

- Materiales cerámicos: Se han usado un gran número de materiales cerámicos para la fabricación de membranas. Entre las más destacadas podemos citar dos: membranas formadas por un soporte poroso de carbono y capa activa de óxido de zirconio y membranas con una base de α -alúmina con capa activa de γ -alúmina.
- Vidrios: Se usan normalmente en forma de membranas de fibra hueca, estando disponibles para un rango de poro comprendido entre los 10 y los 90 nm. Han encontrado su principal aplicación en la industria biotecnológica debido a que permiten reducir las pérdidas de producto gracias a la gran resistencia a la adsorción que presentan.
- Acero: Las membranas se fabrican a partir de acero inoxidable sinterizado, presentándose normalmente en configuración tubular. Se caracterizan por su alta resistencia, lo que permite usarlas en ambientes muy agresivos. En contrapartida, presentan la desventaja de que sólo están disponibles para tamaños de poro elevados, lo que las hace aptas únicamente para la microfiltración.

Como se indicó anteriormente, las membranas inorgánicas presenta una serie de ventajas sobre las membranas orgánicas que las hace muy versátiles, entre ellas podemos destacar (Cheryan, 1986 y Cheryan, 1998):

- Tanto la membrana como el soporte poseen un alto grado de resistencia química y a los disolventes. Muy pocos productos químicos pueden dañarlas. Quizá la mejor propiedad de este tipo de membranas es que pueden soportar dosis altas de cloro (hasta 2000 ppm en algunos casos) y el cloro a pH alcalino es un agente de limpieza extremadamente eficiente.

- Alta resistencia a la degradación por abrasión.
- Límites de pH de aplicación amplios, aunque los fabricantes especifican un rango de pH de utilización de 0.5 a 13, se han aplicado en el rango entre 0-14.
- Son estables térmicamente soportando temperaturas de hasta 350 °C.
- Soportan la aplicación de altas presiones, normalmente se limitan a 150 bar pero este límite se debe a la resistencia de la carcasa y de los sellos que se utilizan para montarlas.
- Tienen una vida útil mayor que las membranas orgánicas, soportando limpiezas frecuentes.
- Soportan la técnica de backflushing.

Sin embargo también tienen inconvenientes, entre los que destacan los siguientes (Cheryan, 1986 y Cheryan, 1998):

- Son quebradizas, siendo especialmente sensibles a las vibraciones.
- La variedad de tamaño de corte disponible es ligeramente menor.
- Requieren mayor capacidad de bombeo con objeto de trabajar a las velocidades recomendadas (2-6 m/s).
- Tienen precios elevados.

2.2.4. Módulos de membrana

Un módulo es la unidad de membrana más simple que se puede usar en la práctica, está formado por la membrana, las estructuras de soporte, la entrada para la alimentación y las salidas para el filtrado y el retenido. A la hora de diseñarlos se siguen los siguientes criterios (Luque, 1999):

- No deben ser caros de fabricar.
- Deben proporcionar el soporte adecuado para evitar que las membranas se dañen.

- Deben ser estancos.
- Sus condiciones hidrodinámicas deben favorecer la transferencia de materia, minimizar la concentración de polarización y reducir el consumo energético.
- De limpieza y ensamblado fácil.

El principal problema es que muchos de estos criterios se oponen, por lo que según el caso se ha tenido que llegar a soluciones de compromiso priorizando unos requisitos sobre otros.

Los diseños de los módulos se basan en dos tipos de configuraciones de membrana: plana y tubular. A nivel industrial, son cuatro diseños los que han encontrado una mayor aplicación: módulos tubulares, de fibra hueca, planos y enrollados en espiral. Los tubulares y de fibra hueca se basan en configuraciones de membrana tubulares mientras que los planos y enrollados en espiral se basan en configuraciones de membrana plana. A continuación se realiza una descripción más detallada de estos módulos.

Módulos tubulares.

Son, quizá, el diseño más antiguo de uso industrial de equipos con membranas. Los sistemas tubulares tienen canales internos relativamente grandes, con diámetros que varían entre 3 y 25 mm y longitudes entre 25 cm y varios metros. El diámetro de los tubos es, esencialmente, un compromiso entre el tamaño óptimo para conseguir el mínimo consumo de energía (que puede ser tan pequeño como 1 mm de diámetro o menor) y el costo de fabricar las membranas y el soporte de los tubos para diámetros tan pequeños. Las membranas se introducen en una carcasa de PVC o de acero inoxidable, existiendo la posibilidad de unirlos en grupos dentro de un único cartucho. La alimentación circula por el interior de los tubos, pasando el filtrado a través de la membrana y recogándose en el espacio que queda entre el exterior de la membrana y la carcasa (Figura 2.3).

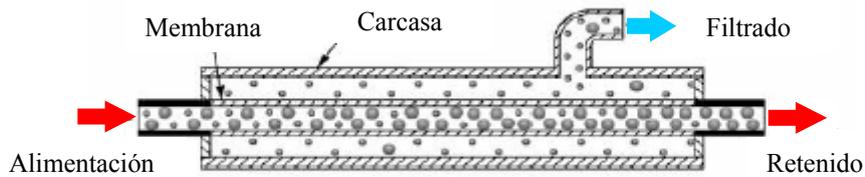


Figura 2.3 Módulo tubular.

Estos módulos operan en régimen turbulento con velocidades que oscilan entre 2 y 6 m/s y son capaces de manejar corrientes de alimentación con partículas bastante grandes. Gracias a su diseño y al alto Reynolds se pueden limpiar mediante sistemas C.I.P. Además, las membranas son fácilmente reemplazables lo que reduce los costes de sustitución. Entre los inconvenientes destaca la menor relación área superficial-volumen que se traduce en un mayor requerimiento de espacio

Módulos de fibra hueca.

Comparado con otras geometrías, esta configuración es relativamente reciente. El tipo de membrana que se utiliza es básicamente una membrana tubular, pero con la diferencia de que la membrana tiene la forma de un tubo autoportante con una capa de “piel” muy densa en el interior del mismo. Cada fibra tienen un tamaño de poro muy uniforme, existen disponibles fibras con diámetros comprendidos entre 0.19 y 1.25 mm. Las fibras tienen un espesor transversal de entorno a 200 μm . Este tipo de membranas se presentan en forma de haces, los cuales pueden contener entre 50 y 30000 fibras individuales (dependiendo del diámetro de la fibra y del cartucho). Los haces se introducen en carcasa hidráulicamente simétricas, con una configuración de carcasa y tubos análoga a la de los intercambiadores de calor, que se sellan en cada extremo. Generalmente la alimentación circula por el interior de las fibras, recogiendo el filtrado en el exterior de las mismas y en el interior de la carcasa. Cada carcasa está provista de una entrada para la alimentación, una salida para el retenido y un par de salidas para el filtrado (Figura 2.4). Existe también la posibilidad de que la alimentación circule por el exterior de las fibras y el filtrado se recoja en el interior. Esta forma de operación se usa sobretodo en ósmosis inversa.

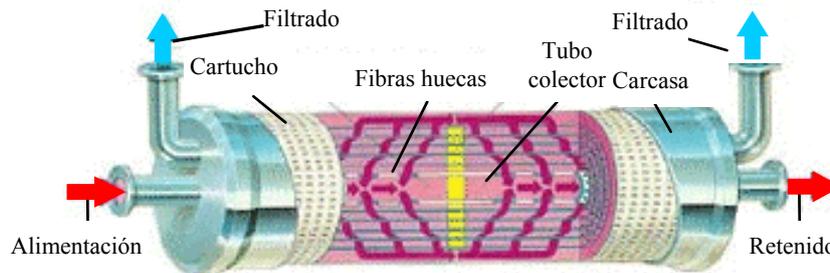


Figura 2.4 Módulo de fibra hueca con filtrado en carcasa.

En los módulos de fibra hueca, la velocidad de operación recomendada es de 0.5-2.5 m/s, lo que se traduce en que se opera en régimen laminar. Dentro de las fibras, las fuerzas cortantes son muy altas debido a la combinación de canales estrechos y alta velocidades. Entre sus ventajas se cuentan que su relación área superficial-volumen es la más alta, además las caídas de presión son pequeñas, siendo las más económicas en términos de consumo de energía. También permiten el lavado en contracorriente que mejora en gran medida su limpieza (esto es posible debido a que las fibras son autoportantes). Por el contrario, no pueden soportar grandes presiones de trabajo lo que supone un inconveniente para ciertos procesos y limita el flujo de filtrado. Además, el pequeño diámetro de las fibras hace que se taponen fácilmente, por lo que hay que prefiltrar la alimentación. Finalmente, los costes de sustitución son elevados.

Módulo plano.

Esta configuración es una de las primeras que aparecieron en el mercado. El módulo está formado por placas rígidas planas en las que se coloca la membrana. Una rejilla de drenaje se coloca entre la membrana y la placa para formar el canal de filtrado. La membrana se sella alrededor de los bordes pero se deja un sistema para drenar el filtrado, normalmente un tubo, otra membrana y otro separador para el filtrado se colocan en la otra cara de la placa. Las placas se colocan unas encima de otras o unas a lado de las otras, según sea un almacenamiento vertical u horizontal, formando cartuchos y los cartuchos se colocan en carcasas rectangulares de acero inoxidable. La alimentación, que se bombea de forma paralela a la membrana, se distribuye a lo largo de los diferentes canales en un extremo, y el retenido se recoge en el extremo opuesto (Figura 2.5).

Estos módulos se caracterizan porque, por el diseño de los canales, se debería trabajar en régimen laminar pero se introducen elementos en el interior de los mismos para fomentar la turbulencia. Además, la sustitución de las membranas “in situ” es fácil, finalmente, se encuentran en una posición intermedia en términos de densidad de empaquetamiento, coste y consumo energético.

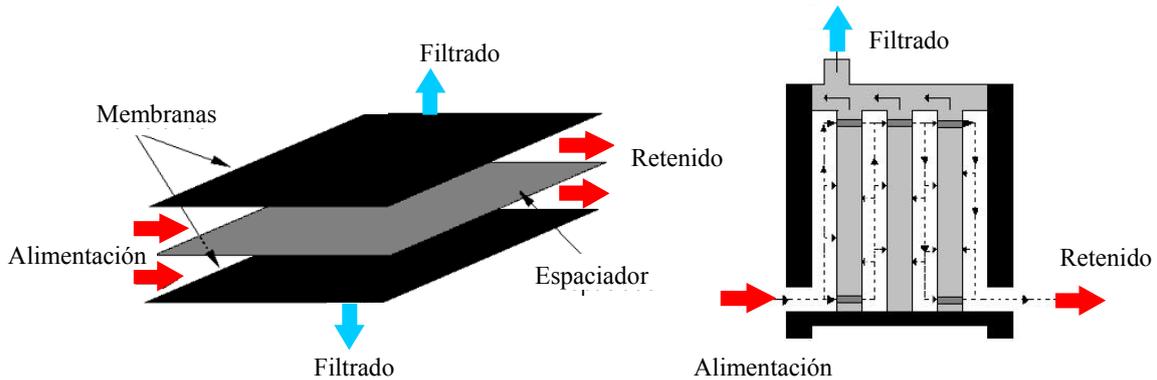


Figura 2.5 Módulo plano

Enrolladas en espiral.

Este módulo es el más compacto y barato. Como en el caso del módulo plano, los elementos tienen forma plana. En este caso, dos membranas se colocan juntas con sus partes activas una frente a otra, se separan por un material tipo malla y se pegan por tres de sus lados. El cuarto lado se fija alrededor de un tubo central perforado. Otro espaciador del mismo tipo que el anterior y de espesor adecuado se coloca alrededor de la envoltura y todo el sistema se enrolla alrededor del tubo central en una configuración espiral. La alimentación se bombea longitudinalmente por la unidad, el filtrado es forzado a pasar entre las láminas de membrana para llegar al canal de filtrado y de manera espiral hacia el tubo colector central perforado. La membrana se coloca dentro de carcasa de PVC o de acero inoxidable, pudiendo contener cada carcasa varias membranas en serie (Figura 2.6).

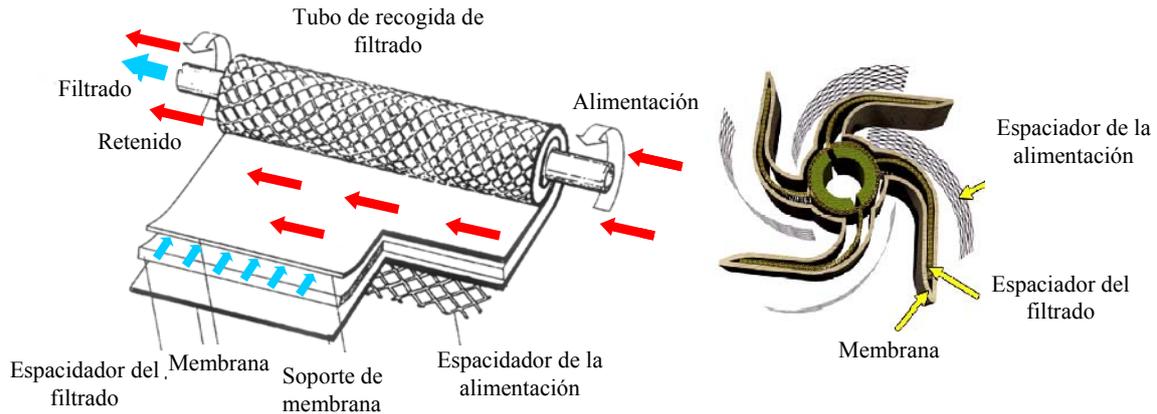


Figura 2.6 Configuración enrollada en espiral.

En los módulos enrollados en espiral, el grosor del canal de alimentación se controla colocando un espaciador en forma de malla en su interior, los espaciadores más usados varían entre 0.76 mm y 1.1 mm. La ventaja de usar grosores tan pequeños es que se puede disponer de una mayor relación área de filtración-volumen, con valores entre 650-1000 m^2/m^3 . Sin embargo, en ocasiones se recurre a usar mayor grosor porque, aunque reduce la relación área-volumen, es adecuado para minimizar las pérdidas de carga y reducir el taponamiento del canal de alimentación. Son muy económicos desde el punto de vista energético. Estos módulos operan en régimen turbulento pues aunque las velocidades usadas (10-60 cm/s) determinan un flujo laminar (Reynolds entre 100-1300), la presencia de los espaciadores en el interior del canal de alimentación provoca el cambio de régimen. Por el contrario, los espaciadores dan lugar a caídas de presión importantes y crean espacios muertos justo detrás de la malla en la dirección del flujo, lo que se traduce en problemas de limpieza. Por ello, estos módulos dan mejores resultados cuando se trabaja con corrientes de alimentación relativamente limpias.

2.2.5. Limpieza

La limpieza es una parte esencial del proceso de filtración con membranas. Durante la operación, las membranas se colmatan produciéndose un descenso en el rendimiento. Llegado a un nivel mínimo aceptable, los agentes responsables de la colmatación deben eliminarse mediante el proceso de limpieza. La limpieza de las membranas se puede considerar hasta cierto punto un “arte” ya que en muchas ocasiones la elección del procedimiento adecuado para cada aplicación es fruto de pruebas de ensayo-error (Zeman y Zydny, 1996). Esto se debe a que aunque se conocen los principios básicos de los distintos

procedimientos de limpieza, existen pocos estudios cuantitativos que comparen la eficacia de los distintos protocolos para diferentes sistemas de filtración. En términos generales, la limpieza puede ser de distinta naturaleza: física, química y biológica o sanitaria. Para ello se requieren tres tipos de energía (Cheryan, 1998):

- Química: En forma de detergentes o agentes de limpieza. La limpieza es, esencialmente, una reacción físico-química. Los agentes de limpieza solubilizan o dispersan las sustancias contaminantes.
- Térmica: En forma de calor, debido a la naturaleza de la acción de los agentes químicos, su eficiencia se incrementará con la temperatura.
- Mecánica: En forma de alta velocidad en las conducciones y en ocasiones elementos de fricción, cuando los agentes químicos no son lo bastante efectivos.

El efecto de estas energías en la eficiencia de la limpieza depende de un cuarto factor, el tiempo de limpieza.

Limpieza física.

Algunos de los agentes que colmatan la membrana pueden eliminarse de manera eficiente por medios mecánicos. De hecho, es normal que cualquier proceso de limpieza comience con un enjuague de agua para eliminar las sustancias presentes y eliminar las capas de la superficie de la membrana, reduciéndose el consumo posterior de agentes químicos.

En el caso más simple, la limpieza física se puede realizar haciendo circular la corriente de alimentación a través del módulo de membrana sin aplicar presión transmembrana. Para componentes adheridos con mayor fuerza, la corriente de proceso se puede sustituir por una solución de enjuagado que se hace circular a través de la membrana a alta velocidad. Para hacer el enjuagado mucho más eficiente se realiza a presión transmembrana cero (se evita así que se vuelvan a depositar sólidos en suspensión como consecuencia del flujo de filtración convectivo).

En algunos módulos de membranas se puede utilizar el back-flushing o limpieza invertida. Este tipo de limpieza consiste en usar periódicamente una presión transmembrana negativa de manera que se invierte el flujo pasando líquido desde la cámara de filtrado a la de

retenido. Se puede realizar durante el proceso de filtración o de forma separada como un proceso de limpieza independiente combinándolo con un aclarado o una solución de limpieza química. Es una técnica muy efectiva para eliminar la suciedad por torta e incluso también puede eliminar contaminantes del interior de la membrana.

Una variación de esta estrategia es la de presión transmembrana pulsante. En esta técnica se aplica periódicamente una presión negativa (usualmente durante un segundo por cada 10-30 segundos de operación). Es extremadamente eficaz para eliminar torta, sin embargo, las proteínas depositadas o adsorbidas tienden a fijarse con mayor fuerza.

Otro método mecánico es el empleo de bolas de goma para membranas tubulares. También se pueden usar bolas de esponja que presenta una gran efectividad para eliminar contaminantes biológicos y orgánicos de la superficie de la membrana. Sin embargo estas técnicas no son efectivas para eliminar los contaminantes presentes en el interior de los poros.

Limpieza química.

Los mecanismos de acción de los agentes empleados en la limpieza química son muy variados: desplazamiento de los contaminantes de la membrana (por adsorción competitiva de surfactantes), solubilización (agentes emulsificantes o dispersantes) o modificación química (saponificación, oxidación, quelación, etc.) El mecanismo predominante depende tanto de la naturaleza del agente de limpieza como del contaminante, aunque normalmente se usan agentes formulados específicamente para usar los tres mecanismos anteriormente indicados. De forma general se pueden clasificar los agentes de limpieza en ácidos, básicos, surfactantes, quelantes y enzimas.

Agentes ácidos:

Son ideales para eliminar sales de calcio (carbonato y fosfato) y óxidos metálicos. Estos contaminantes se disuelven gracias a la reacción con el ácido para formar la sal soluble. Los ácidos clorhídrico y sulfúrico son los más usados y baratos, aunque muchos módulos de membrana y el acero inoxidable se pueden dañar si se usan altas concentraciones. El ácido nítrico es un oxidante muy fuerte que puede nitrificar algunos compuestos orgánicos, lo que resulta especialmente útil para la limpieza de muchos contaminantes orgánicos y biológicos, sin embargo, tiene el inconveniente de ser muy corrosivo. Cuando se quiere

usar un agente menos corrosivo se puede recurrir al ácido fosfórico, este ácido es un agente quelante muy fuerte especialmente eficaz al eliminar cationes metálicos, además permite controlar muy bien el pH durante la limpieza. Su punto débil está en que es muy caro si se compara con los otros. Por último, también se puede recurrir a ácidos orgánicos.

Agentes básicos:

Son agentes muy efectivos para la limpieza de sílice, coloides inorgánicos y contaminantes orgánicos y biológicos. Los mecanismos de acción de estos agentes son muy variados: neutralizando materiales ácidos, saponificando grasas y emulsionando coloides. Existe una gran variedad de agentes de limpieza básicos con diferentes ventajas e inconvenientes. El más simple es la sosa cáustica, este agente es muy efectivo para llevar a cabo saponificaciones. El carbonato sódico es el más económico y presenta como ventaja la creación de una alta reserva básica provocada por su disociación. Presenta el problema de que puede formar sales insolubles de calcio que pueden dar lugar a depósitos de carbonato cálcico en la superficie de la membrana durante el proceso de limpieza. Los fosfatos son muy efectivos a la hora de dispersar partículas coloidales gracias a la carga múltiple de los iones fosfato. Por el contrario, presentan el problema de que se pueden hidrolizar para formar fosfatos más simples y que tienden a formar sales insolubles con metales divalentes. El hipoclorito sódico también se usa como agente alcalino, normalmente combinado con otras bases; es un buen agente desinfectante pero su uso está limitado ya que no todos los materiales de membrana tienen gran resistencia al cloro.

Surfactantes:

Son muy efectivos ya que desplazan a los contaminantes de la superficie de la membrana, emulsifican grasas y solubilizan contaminantes hidrófobos incorporándolos en las micelas de surfactante. Los surfactantes están disponibles en un amplio rango de estructuras que pueden presentar grupos hidrofílicos negativos (aniónicos), neutros (no iónicos) o positivos (catiónicos). Como surfactantes típicos aniónicos se pueden citar sulfonatos, sulfatos y fosfatos. Los sulfonatos son muy estables a la oxidación y a la hidrólisis, y moderadamente efectivos en presencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Los sulfatos son más hidrófilos, sin embargo presentan estabilidad limitada en medios ácidos y alcalinos ya que en ambos ambientes puede sufrir hidrólisis. Finalmente, los fosfatos se usan poco ya que sus sales de calcio y magnesio son insolubles en agua. La mayoría de los surfactantes aniónicos tienen un pH

óptimo para limpieza en torno a 10.5, por ello generalmente se usan con una base para mantener el pH alcalino. Los surfactantes no iónicos no se ven afectados por la presencia de cationes metálicos por lo que son muy adecuados en aguas duras y son estables en medios ácidos y básicos. Generalmente se usan en combinación con otros agentes para aumentar la eliminación de contaminantes orgánicos. Por último los surfactantes catiónicos pueden usarse con agentes de limpieza ácidos y, normalmente, son insolubles en medios básicos. Se adsorben fuertemente en membranas negativamente cargadas, lo que es un problema importante para algunos sistemas.

Agentes quelantes:

Forman complejos con los átomos metálicos mucho más solubles en agua por lo que son muy efectivos para eliminar cationes metálicos y por tanto, reducir la formación de sales metálicas de ácidos grasos que son insolubles. Esto permite a los ácidos grasos permanecer en disolución acuosa durante el proceso de limpieza. El más efectivo es el EDTA.

Enzimas:

Tienden a ser agentes caros pero son importantes en las formulaciones de limpieza para membranas que no pueden soportar temperaturas altas, agentes químicos agresivos o valores de pH extremos. Las enzimas pueden degradar proteínas (proteasas), almidones (amilasas), grasas (lipasas) y celulosa (celulasas). Las proteasas son las más usadas en la limpieza de membranas debido a la importancia de la colmatación por proteínas en muchos sistemas. Las enzimas proteolíticas rompen los enlaces peptídicos de las proteínas en sitios específicos y los fragmentos polipeptídicos resultantes son más fáciles de eliminar ya que tienen un menor tamaño y número de puntos de interacción.

Limpieza sanitaria: desinfección y esterilización.

El objeto de la desinfección es reducir la concentración microbiana a niveles aceptables. Por su parte, la esterilización, da lugar a la desactivación de todos los microorganismos de manera que no puedan crecer y reproducirse. Estos métodos de limpieza sanitaria no son útiles sin una limpieza previa. El hipoclorito es el desinfectante más empleado para la desinfección de membranas, también se usan otros agentes oxidantes fuertes como el peróxido de hidrógeno y el ácido peracético. El bisulfito sódico, agente reductor, es usado en membranas que pueden degradarse por la acción de agentes oxidantes. La esterilización

con vapor se usa con frecuencia en la industria farmacéutica, con mínimos de exposición de 15 minutos a 121 °C y 1 atmósfera de presión. Las membranas también pueden esterilizarse con óxido de etileno o clorofluorocarbonos, aunque requieren un largo periodo de incubación.

2.3. FILTRACIÓN TANGENCIAL DE ALTA RESOLUCIÓN

La filtración tangencial es una técnica que está limitada a la separación de solutos con relación de tamaño de 10 (Cherkasov y Polotsky, 1996). Esto limita su aplicación en el campo de la biotecnología principalmente a tres aplicaciones: separación de mezclas de proteínas con células, perfusión y clarificación de proteínas o recuperación de células (van Reis et al., 1997), sin embargo no permite el fraccionamiento de mezclas de proteínas. Las limitaciones que impiden su aplicación al fraccionamiento son de diversa índole, entre ellas destacan la concentración de polarización que reduce la selectividad, la colmatación de la membrana o las interacciones proteína-proteína. Durante los años 90, se realiza un importante esfuerzo investigador que trata de eliminar estas limitaciones y conseguir usar la filtración tangencial para el fraccionamiento de solutos de tamaño molecular similar. Fruto de ese esfuerzo es el desarrollo de una nueva técnica de filtración tangencial denominada filtración tangencial de alta resolución. Esta técnica se puede definir como una operación unitaria bidimensional ya que explota tanto los mecanismos estéricos como las interacciones electrostáticas mediante una adecuada selección del ambiente fisicoquímico. La filtración tangencial de alta resolución podría realizar de manera simultánea purificación, concentración e intercambio iónico, permitiendo que varias etapas de separación se combinen en una sola operación fácilmente escalable y con una reducción adicional del coste (van Reis y Zydney, 2001).

La filtración tangencial de alta resolución puede emplearse para separar proteínas de similar tamaño con una alta selectividad, para ello se siguen las siguientes premisas:

- Para aumentar la resolución, se trabaja a valores de presión transmembrana en los que el flujo de filtrado es dependiente de la presión (van Reis et al., 1997).
- Se optimiza el fraccionamiento manipulando las propiedades físico-químicas de la membrana y de las proteínas (Nyström et al., 1998). La carga de la membrana, el volumen hidrodinámico y el coeficiente de difusión de la proteína se alteran mediante cambios en el pH, la fuerza iónica y las sustancias tampón (Sanksena y Zydney, 1994). Esto modifica tanto las interacciones proteína-membrana como proteína-proteína (Howell et al., 1999).

- La selectividad se puede mejorar mediante la manipulación de las propiedades superficiales de la membrana para modificar la exclusión de determinadas especies al alterarse las interacciones proteína-membrana (Ghosh y Cui, 1998).
- Se trabaja en modo diafiltración (Zydney y van Reis, 2001). En este modo, la impureza (o el producto) es lavado del retenido a la vez que se añade disolución tampón al tanque de alimentación con un caudal igual al del filtrado. La adición del tampón permite mantener una adecuada concentración de proteína en el retenido durante toda la operación, minimiza el ensuciamiento y reduce los fenómenos de desnaturalización y/o agregación.

En resumen, la filtración tangencial de alta resolución ha demostrado ser una técnica muy prometedora para llevar a cabo las separaciones necesarias en el campo de la biotecnología (Van Reis y Zydney, 2001), e industria farmacéutica (Sirkar, 2001). Esto se ha traducido en la realización de un gran número de investigaciones con el objeto de poder comprender los distintos fenómenos involucrados en el proceso y desarrollar al máximo esta tecnología. La gran mayoría de estos trabajos se ha centrado en el estudio de la filtración de proteínas individuales (con el objeto de poder entender las interacciones proteína-membrana), de la filtración de mezclas binarias y ternarias (para entender las interacciones proteína-proteína), y en el planteamiento de modelos que permitan predecir el desarrollo de un proceso de filtración, es decir, conocer la evolución del flujo de filtrado y de la transmisión de solutos. A continuación se resumen algunos de los trabajos más relevantes en este campo.

Fane et al. (1983) realizaron un trabajo sobre la ultrafiltración de BSA con membranas retentivas para varios pHs (rango 2-10) y fuerzas iónicas. Para ello usaron membranas de poliestersulfona de 20 y 30 kDa. Los resultados mostraban que el flujo variaba con el pH, observándose un mínimo en el punto isoeléctrico de la proteína. La presencia de sales mejoraba el flujo a pH 5 y lo empeoraba en los extremos, lo que daba lugar a que el mínimo flujo obtenido se desplazase a pH 2 para una concentración de 0.2 M NaCl.

Van Den Berg y Hanemaaijer (1987) estudiaron la influencia del equilibrio monómero-dímero para la β -lactoglobulina en el rechazo y en la presión osmótica. Para los experimentos de rechazo usaron membranas de 30 kDa. Los resultados mostraron un aumento del rechazo al aumentar la concentración de proteína, lo que se podía explicar por un aumento del grado de asociación pero no de manera exclusiva, ya que también podía

contribuir la adsorción de proteína y el bloqueo de poros. Los efectos del pH sobre la presión osmótica mostraron un mínimo a pH 4.5, es decir, en las proximidades del punto isoeléctrico.

Clark et al. (1991) investigaron los factores que influían en el flujo de filtrado, la adsorción y el fouling durante la ultrafiltración de BSA. Para ello usaron membranas inorgánicas de tamaño de poro medio de 40, 350 y 1000 Å. Los resultados de la investigación indicaban que el flujo de filtrado era función de la concentración, la presión transmembrana y la velocidad tangencial. También mostraban que, para bajas concentraciones de proteína, el rechazo de la misma aumentaba al disminuir el tamaño de poro y aumentar la velocidad tangencial. Por otra parte la adsorción en el material de la membrana mostraba una clara dependencia con el pH, presentado un máximo en el punto isoeléctrico.

Grund et al. (1992) investigaron el efecto de la concentración de proteína, la presión transmembrana, el ambiente iónico y el tipo de membrana sobre la transmisión y el flujo de filtrado en estado estacionario para BSA y BSA-FAP (pobre en ácidos grasos). Para ello usaron dos membranas de polisulfona con tamaño de corte de 30 kDa y 100 kDa respectivamente. En ambos casos un aumento de la concentración provocó una reducción en el flujo de filtrado (hasta del 43 % para la BSA-FAP al pasar de 2% w/v a 6.5 w/v). El aumento de la presión transmembrana condujo a un aumento no lineal del flujo de filtrado independientemente de cual fuese la concentración. Los resultados sugerían que la presencia de ácidos grasos promovía la agregación de la BSA y afectaba también a las interacciones con la membrana. Los efectos de la agregación en el flujo y la transmisión dependían, a su vez, del tipo de membrana y de la fuerza iónica.

Zydney (1992) estudió los efectos de la concentración en la transmisión a través de membranas de ultrafiltración. Desarrolló un modelo de capa estática que tenía en cuenta las interacciones soluto-soluto. Los resultados mostraron que estas interacciones aumentaban la tasa de difusión del soluto desde la membrana, un efecto que daba lugar a un aumento de la transmisión.

Balakrishnan et al. (1993) investigaron la transmisión de varias proteínas (citocromo c, lisozima y mioglobina) y un péptido (el antibiótico bacitracin) a través de membranas hidrofílicas de poliacrilonitrilo con tamaños de corte de 10 y 100 kDa. Para la membrana de 10 kDa, la tendencia en la transmisión en función de la presión transmembrana se explicó

con un método basado en la combinación de la concentración de polarización y la termodinámica irreversible. En el caso de la membrana de 100 kDa se obtuvieron transmisiones de hasta el 120 % para el citocromo c y la lisozima. Este fenómeno se explicó modificando la teoría de la concentración de polarización o con un razonamiento similar al mecanismo de flujo capilar-adsorción preferencial de Sourirajan para ósmosis inversa.

Ko et al. (1993) estudiaron los efectos de las propiedades y estructura de la proteína adsorbida en la colmatación de membranas. Las proteínas usadas fueron BSA y β -lactoglobulina. Las membranas seleccionadas fueron tres, una de policarbonato recubierta de PVP de 0.015 μm , y las dos restantes de celulosa regenerada con tamaños de corte de 5 kDa y 100 kDa. Los resultados se ajustaron con el modelo de resistencias con tres parámetros que permitía calcular la resistencia debida a la presión osmótica y a la adsorción. También se desarrolló un método analítico que permitía determinar los depósitos de proteína bajo condiciones estáticas y de ultrafiltración. Se apreció un importante impedimento estérico en el caso de la membrana de policarbonato debido al recubrimiento de PVP que afectó de manera importante a los depósitos de proteína. La matriz hidrofílica de las membranas de celulosa regenerada actuó como una reserva de agua que hidrató de manera continuada la capa de proteína adsorbida, dando lugar a una menor resistencia debida al fouling. Finalmente, el tamaño relativo de los poros con respecto a la proteína mostró tener efecto sobre las propiedades y la estructura de la capa adsorbida y de la resistencia ofrecida por el fouling.

Millesime et al. (1994) estudiaron la influencia de las interacciones iónicas en la ultrafiltración de proteínas. Para ello se investigó las interacciones entre membranas de polisulfona sulfonada (40 y 100 kDa) y polietersulfona (40 kDa) con lisozima y BSA después de la deposición de PVI sobre las mismas (de espesor entre 10 y 40 nm). Los experimentos se hicieron a pH 7 y fuerza iónica entre 15 mM y 1 M de KCl. Para bajas fuerzas iónicas, se apreció una diferencia significativa en el rechazo experimentado por las proteínas en función de si la membrana estaba modificada o no. Esto se explicó por el efecto contraión. Para fuerzas iónicas altas, tanto el rechazo de proteína como el flujo de filtrado fueron similares para las membranas modificadas y no modificadas, debido a la adsorción de proteína sobre la membrana y las interacciones entre la proteína adsorbida y la proteína libre.

Nyström et al. (1994) estudiaron la adsorción de BSA con membranas de polisulfona (50 kDa) y polisulfona-zirconio (60 y 40 kDa) mediante valores de flujo y corriente de potencial. A valores altos y bajos de pH, la proteína y la membrana tenían la misma carga, con lo que ambas se repelían, disminuyendo la adsorción. En los casos en los que se producía adsorción, ésta modificaba la carga de la membrana.

Pujar y Zydney (1994) investigaron el efecto de la influencia de la fuerza iónica en la filtración de BSA (en el intervalo de 1.5 mM a 150 mM NaCl). Para ello utilizaron membranas de polietersulfona con un tamaño de corte de 100 kDa. Se apreció que un incremento de la fuerza iónica producía un importante aumento de la transmisión (hasta 100 veces mayor para 150 mM con respecto a la transmisión a 1.5 mM). Este efecto se explicó por la disminución del apantallamiento electrostático.

Millesime et al. (1995) realizaron un trabajo a cerca de la influencia de la fuerza iónica en la transmisión de lisozima y BSA con membranas de zirconio de 150 kDa a pH 7. La transmisión se ajustó con un modelo controlado por la fuerza iónica, dependiente del término $I^{-1/2}$. Posteriormente la membrana fue modificada, por adición de PVI en su superficie, y la transmisión adquirió forma de U en función de $I^{-1/2}$. El máximo de la curva se debía a las interacciones de las sales con la proteína y el polímero que recubría la superficie de la membrana.

Bowen et al. (1996) estudiaron suspensiones de proteínas en las que las repulsiones electrostáticas eran muy importantes. Desarrollaron un modelo basado en una descripción hidrodinámica simple pero teniendo en cuenta la dependencia de la presión osmótica y del coeficiente de difusión con los parámetros físico-químicos. A continuación se comprobaron las predicciones del modelo con datos experimentales de la ultrafiltración de BSA para distintos valores de pH (mayores que pH 6 para impedir agregaciones) y fuerza iónica con membranas de polietersulfona de 4 kDa. Se observó que el modelo ajustaba los datos correctamente para valores moderados de pH y fuerza iónica pero que para valores altos tenía tendencia a la sobreestimación .

Oppenheim et al (1996) realizaron un estudio sobre el recubrimiento de la superficie interna de las membranas durante la ultrafiltración de proteínas. Como proteína modelo usaron BSA, filtrándola a diferentes valores de pH (5 y 7) y fuerza iónica (0.05 y 0.15 M NaCl) con membranas de polisulfona de 100 kDa, en periodos de 1 a 4 horas. Los resultados

obtenidos se compararon con distintos modelos de recubrimiento. Los resultados mostraron importantes depósitos de proteína producidos en los primeros instantes del proceso de ultrafiltración. Para pH 7, la proteína parecía comportarse como si estuviese alojada en una capa muy fina sobre la superficie de la membrana. A pH 5 y baja fuerza iónica la proteína se encontraba alojada y adsorbida a lo largo de toda la estructura de la membrana.

Prádanos et al. (1996) realizaron un trabajo sobre el descenso del flujo y la retención de proteínas de distinto peso molecular. Las proteínas elegidas fueron pepsina (36 kDa), BSA (68 kDa), lipasa (80 kDa), γ -globulina (150 kDa) e invertasa (270 kDa). La membrana seleccionada para el trabajo fue una membrana inorgánica con un tamaño de poro nominal de 0.02 μm y las filtraciones se realizaron a presión constante de 5 kPa. La deposición de las proteínas tanto en la superficie como en el interior de los poros se analizó con distintos modelos cinéticos. Los resultados mostraron un descenso de flujo inicial muy intenso debido a bloqueo externo que luego era seguido por deposición interna (para las proteínas parcialmente retenidas) o formación de torta (para las proteínas totalmente retenidas).

Barba et al. (1997) estudiaron la filtración de BSA a distintas concentraciones mediante membranas planas de polisulfona con un tamaño de corte de 10 kDa. Se usó el modelo osmótico de presión-adsorción para analizar la contribución de ambos fenómenos. Los resultados mostraron que, al comienzo de la filtración, la caída experimentada en el flujo estaba determinada por el fouling de la membrana, mientras que para el resto del experimento estaba determinada por la presión osmótica.

Saksena y Zydney (1997) desarrollaron un modelo general para el transporte másico en los procesos de ultrafiltración. A continuación, aplicaron el modelo a la filtración de BSA e IgG a través de membranas totalmente retentivas de polietersulfona con un tamaño de corte de 30 kDa. También se realizaron experimentos donde existiese transmisión de BSA, para ello se emplearon membranas de 100 kDa. El modelo dio una buena descripción de la dependencia del flujo con la presión, especialmente en mezclas de proteínas donde las interacciones soluto-soluto son importantes. Además fue capaz de predecir la reducción en la transmisión de BSA causada por la presencia de IgG.

Van Reis et al (1997) establecieron que la filtración tangencial de alta resolución era una técnica que permitía la separación de solutos de pesos moleculares similares. En su estudio realizaron experimentos de ultrafiltración de mezclas de BSA y de inmunoglobulina

mediante membranas orgánicas de polietersulfona con un tamaño de corte de 300 kDa. Los resultados mostraron que la mejor selectividad se obtenía cuando se trabajaba a pH cercanos al punto isoelectrico de la proteína más permeable. Finalmente llegaron a fraccionar monómeros y dímeros de BSA, para ello idearon un proceso en dos etapas con membranas orgánicas de polietersulfona de 150 kDa y de celulosa regenerada de 10 kDa.

Bellara y Cui (1998) desarrollaron un modelo para describir la ultrafiltración de proteínas a través de membranas tubulares. Para ello combinaron un modelo hidrodinámico con la aproximación de Maxwell-Stefan esbozada por Wesselingh y Vonk en 1995. El modelo fue probado mediante el empleo de datos experimentales obtenidos por la ultrafiltración de BSA a través de una membrana de 20 kDa para valores de pH de 7.4 y 5.4 y fuerza iónica de 0.15 M de NaCl. Durante la prueba del modelo se realizaron simulaciones considerando y sin considerar las interacciones viscosas en la capa límite de concentración de polarización. En general, el modelo describía cualitativamente el proceso de ultrafiltración para diferentes situaciones, sin embargo, para valores altos de la presión transmembrana, las interacciones viscosas se exageraban y el modelo subestimaba el flujo de filtrado. En esas condiciones, el uso del modelo sin tener en cuenta estas interacciones viscosas daba mejor resultado.

Ghosh y Cui (1998) comprobaron que la transmisión de un soluto a través de una membrana no dependía sólo del tamaño de la proteína, sino de otros factores como las interacciones soluto-soluto y soluto-membrana. Para ello filtraron BSA y lisozima tanto de manera individual como mezclándolas con membranas de polisulfona de 50 kDa. Los resultados mostraron que la transmisión de las proteínas era distinta si estaban en mezcla. Para todos los pH analizados (5.2, 6, 7, 8, 8.8) la transmisión de la lisozima fue mayor en la mezcla, mientras que para la BSA ocurría lo contrario. Por otra parte la selectividad del proceso de fraccionamiento de la mezcla a bajas concentraciones mostraba una clara dependencia con el pH variando de 3.3 a pH 5.2 a 220 a pH 8.8. El pretratamiento de la membrana mediante la adsorción de mioglobina mejoró la transmisión de lisozima observándose un incremento en la transmisión de entre un 20 y un 60%. Esta mejora se debía a que la mioglobina actuaba como una pantalla que impedía la formación de una capa de lisozima en la membrana, evitando la repulsión de la lisozima por sí misma. El pretratamiento también mejoró el flujo de filtrado.

Lucas et al. (1998) estudiaron la ultrafiltración de lisozima con membranas de zirconio parcialmente modificadas por adición de polietilenimina con un tamaño de corte de 150 kDa. Para mostrar el papel de las interacciones electrostáticas durante la ultrafiltración de proteínas modelo se investigó el sistema proteína-membrana-disolvente mediante cambios en el ambiente físico-químico (se usaron distintos electrolitos, fuerza iónica y pH). La transmisión de lisozima varió entre un 0 y un 100 % en función del pH, fuerza iónica y el electrolito. La mayor transmisión se obtuvo al pH correspondiente al punto isoeléctrico de la proteína.

Nyström et al (1998) realizaron una investigación sobre la filtración de mezclas de proteínas globulares (lisozima, mioglobina, conalbúmina, BSA, lactoferrina y ovoalbúmina) con pesos moleculares comprendidos entre 15 kDa y 80 kDa y puntos isoeléctricos entre 4.6 y 11 a través de membranas de distintos materiales y comportamiento hidrofóbico e hidrofílico (celulosa regenerada, polisulfona, polietilen-tereftalato y policarbonato, con tamaños de corte: 30, 50, 100 y 200 kDa y 0.19 y 0.20 μm). Con ello querían mostrar como las propiedades fisicoquímicas de las membranas y las proteínas afectan al proceso de filtración. Los resultados mostraron que los mejores pH para el fraccionamiento eran aquellos en que una proteína estaba en su punto isoeléctrico debido que podía atravesar la membrana, mientras que la otra proteína no podía por repulsión electrostática con la membrana. Cuando se emplearon sales, el volumen hidrodinámico de las proteínas que estaban lejos de su punto isoeléctrico se vio reducido como consecuencia del apantallamiento de las cargas, lo que dio lugar a una disminución de la selectividad. Se observó que la mayoría de las proteínas necesitaban una presión mínima para atravesar la membrana, aumentando la transmisión con la presión. Por otra parte, la transmisión decrecía al aumentar la velocidad de flujo. Concluyeron así que se podían obtener muy buenas selectividades, incluso para proteínas de parecido tamaño, mediante la optimización de las condiciones de operación.

Pujar y Zydney (1998) investigaron la influencia de la fuerza iónica en la filtración de dextranos y BSA, para ello emplearon una membrana de polietersulfona con un tamaño de corte de 100 kDa. Los resultados mostraron que el tamaño efectivo de la proteína variaba linealmente con la longitud de Debye, es decir, de manera inversa a la raíz cuadrada de la fuerza iónica de la disolución. Se emplearon distintos modelos teóricos para cuantificar los

resultados y se observó la similitud existente entre la ultrafiltración y la cromatografía por exclusión de tamaño.

Burns y Zydney (1999) plantearon un trabajo que tenía por objetivo obtener un mayor entendimiento de los efectos del pH en la transmisión de un amplio rango de proteínas globulares con diferentes cargas superficiales y distinto peso molecular. Las proteínas seleccionadas fueron citocromo-C, mioglobina, α -quimitripsinógeno, pulmozima, BSA en forma monomérica y dímera, ovotransferrina, E25 y anti-CD11a. Para las filtraciones se emplearon membranas orgánicas de polietersulfona con tamaños de corte de 30 y 100 kDa. Los resultados mostraron que la máxima transmisión se alcanzaba en las proximidades del punto isoeléctrico y disminuía a valores de pH por encima y por debajo del mismo. Este comportamiento estaba controlado por la carga de la proteína. También se observó la importancia de este efecto cuando la proteína y la membrana poseían importantes diferencias en sus características superficiales, así, por ejemplo el α -quimitripsinógeno (que presenta carga positiva a pH mayores que 9) experimentaba una fuerte atracción con la membrana (negativa a pH comprendidos entre 5 y 9), lo que daba lugar a la aparición de un segundo máximo de transmisión a pH 5.5.

Howell et al. (1999) realizaron un trabajo sobre la transmisión de BSA con membranas orgánicas de distintos materiales y tamaños de corte: polietersulfona de 50 kDa y 100 kDa y polisulfona (0.2 μ m). Los experimentos se realizaron en condiciones controladas de flujo y bajas presiones transmembrana para un Reynolds de 248. Los pHs utilizados fueron 4.9 (punto isoeléctrico de la proteína), 3.5 y 8. Los resultados mostraron que para la membrana de 50 kDa, la transmisión permaneció baja y cuando se incremento el flujo paso a paso, se produjo un importante aumento en la misma, sin embargo la concentración de proteína se midió en la superficie de la membrana y no aumentó bruscamente. Todo esto sugirió que para flujos mayores se podía producir un cambio en la conformación de la molécula de BSA. Este comportamiento no se apreció en la membrana de 0.2 μ m. Finalmente también se observó que, bajo las mismas condiciones de operación, la transmisión en el punto isoeléctrico era mucho mayor para los otros valores de pH ensayados.

Menon y Zydney (1999) estudiaron la influencia del pH, la fuerza y la composición iónica en la transmisión de BSA a través de una membrana de polietersulfona de 100 kDa. Los

resultados obtenidos pusieron de manifiesto la importancia de las condiciones fisico-químicas de la disolución en el proceso de filtración.

Perkins et al. (1999) desarrollaron un modelo de película dinámica para describir la variación de flujo en función de la difusividad del soluto, la viscosidad de la disolución y la velocidad tangencial. El modelo intenta superar algunas de las limitaciones del modelo de película estática al tener en cuenta como el coeficiente de materia es afectado por los parámetros de operación. El modelo fue comprobado usando los datos para la filtración de un anticuerpo monoclonal (160 kDa). Se midió la variación del flujo con la presión transmembrana para distintas concentraciones del anticuerpo y velocidades tangenciales, a pH 5 y 150 mM de NaCl a través de una membrana PLTK-C de 30 kDa. En todos los casos, la diferencia entre el coeficiente de transferencia de materia calculado experimentalmente y el estimado por el modelo era menor del 11 % (con el modelo de película estática era mayor del 79%) mejorando así la descripción del proceso de ultrafiltración.

Ricq et al. (1999) investigaron la influencia del pH, la fuerza iónica y la naturaleza de la sal (NaCl o CaCl₂) en la filtración de β -lactoglobulina y lisozima, dos proteínas que tienen diferente tamaño y características eléctricas. Para ello utilizaron una membrana inorgánica con un tamaño de corte de 150 kDa. Los resultados mostraron que las proteínas contribuían a la carga neta del sistema y que la transferencia de proteína a través de membranas minerales estaba gobernada por fenómenos de exclusión estérica e iónica. También se apreció que la repulsión iónica provocaba un descenso de la transmisión que dependía de la carga neta de la membrana, que a su vez era función de la composición de la disolución.

Ghosh y Cui (2000) estudiaron la separación de lisozima de la clara del huevo de gallina empleando para ello membranas de polisulfona de 50 kDa tanto vírgenes como pretratadas con mioglobina. Los resultados mostraron que la transmisión de lisozima era un 26% mayor cuando se usaba la membrana pretratada. La transmisión de las otras proteínas de la clara dependía de la presión transmembrana, así un aumento de la misma se traducía en un descenso de la transmisión. Todo esto mostraba la necesidad de una adecuada selección de la forma de operación, ya que la pureza de la lisozima obtenida podía variar del 18% a 20 kPa de presión transmembrana a más del 96% para 120 kPa.

Ghosh et al. (2000) discutieron la purificación de lisozima a partir de clara de huevo de gallina mediante el uso de un módulo de ultrafiltración de fibra hueca con membrana de

polisulfona con un tamaño de corte de 30 kDa. Los resultados mostraron que la lisozima transmitía de manera preferencial por la membrana mientras que las otras proteínas eran retenidas. Al mejorar la hidrodinámica del sistema se producía un aumento del flujo de filtrado mientras que la transmisión de lisozima permanecía inalterada, dando lugar a un aumento de la productividad, sin embargo estas mejoras hidrodinámicas no afectaban a la pureza de la lisozima obtenida.

Huisman et al. (2000) realizaron un trabajo sobre la influencia de las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana durante la ultrafiltración de BSA con membranas poliméricas de polisulfona con tres tamaños de corte 30, 100 y 300 kDa. Para realizar el estudio se midió el flujo, el potencial de la corriente y la transmisión de proteína a distintos valores de pH. Los resultados mostraron que las interacciones proteína-membrana influían en el comportamiento del fouling al comienzo de la filtración., posteriormente las interacciones proteína-proteína pasaban a determinar el proceso. Se empleó la microscopía electrónica para obtener imágenes de las superficies de las membranas tras la filtración. Dichas imágenes revelaron que las membranas se encontraban recubiertas totalmente por una capa de proteína y que la estructura de esta capa dependía extraordinariamente del pH. En particular, se apreciaron estructuras muy abiertas con alta permeabilidad en valores de pH por debajo del punto isoeléctrico, lo que daba lugar a altos valores de flujo y de transmisión.

Jones y O'Melia (2000) estudiaron el efecto de las características químicas de la disolución (pH, fuerza iónica y concentración) en la adsorción de BSA y ácido húmico en membranas de celulosa regenerada con tamaño de corte de 30 kDa durante experimentos de ultrafiltración. Se observó que la adsorción era mayor para los valores de pH inferiores y que disminuía al aumentar el pH. Por otro lado, el aumento en la fuerza iónica reducía la repulsión electrostática entre partículas de igual carga (aumentando la adsorción) y disminuía la atracción entre materiales con carga contraria (disminuyendo la adsorción). Se apreció que las interacciones entre el material que se adsorbe y la superficie de la membrana afectaban a la tasa de adsorción. Finalmente se concluyó que controlando las interacciones electrostáticas se podía reducir la adsorción en la membrana y por tanto reducir el fouling para tiempos largos de operación.

Rabiller-Baudry et al. (2000) estudiaron la filtración de lisozima para distintos valores de pH y fuerza iónica mediante una membrana de zirconio modificada con polietilamina con un tamaño de corte de 150 kDa. Los resultados mostraron que el potencial zeta y la movilidad electroforética de la proteína dependían del pH, la fuerza iónica y la naturaleza del electrolito. Utilizaron un modelo de convección-difusión que incluía los fenómenos electroforéticos para ajustar los datos experimentales. Este modelo permitió definir un número adimensional (análogo al Peclet) que comparaba el transporte de proteína debido a fuerzas electrostáticas y el debido a la convección.

Shukla et al. (2000) planearon un trabajo orientado a entender la importancia relativa de los principales parámetros de operación en el fraccionamiento de macrosolutos de peso molecular similar. Para ello, investigaron la separación de dos proteínas de parecido peso molecular BSA (69 kDa) y hemoglobina bovina (67 kDa) mediante ultrafiltración. Se emplearon tres membranas de materiales diferentes, celulosa regenerada, polisulfona modificada y poliacrilonitrilo modificado. Todas tenían un tamaño de corte de 100 kDa. La separación fue estudiada en función del pH y la fuerza iónica de la alimentación. Se observó que en las mismas condiciones hidrodinámicas del sistema, la membrana de poliacrilonitrilo mostraba la mayor resolución y el mínimo fouling (pH 6.8, 0.15 M).

Babu y Gaikar (2001) ultrafiltraron BSA con membranas de triacetato de celulosa y celulosa regenerada con tamaños de corte de 20 kDa y 30 kDa respectivamente. Los resultados indicaban que la membrana de triacetato de celulosa era más vulnerable al fouling que la membrana de celulosa regenerada (hidrofilica). El descenso de flujo que se observó, se atribuyó a la concentración de polarización y a la adsorción de proteína. Se realizó una caracterización del fouling midiendo la resistencia de los depósitos con flujo de filtrado de agua pura, esto mostró que los depósitos de la membrana de triacetato de celulosa eran los que mayor resistencia ofrecían. La presencia de sales aumentaba la resistencia de los depósitos, mientras que el aumento de temperatura la disminuía.

Bowen y Williams (2001) investigaron la influencia de las condiciones físico-químicas en la tasa de filtrado durante la ultrafiltración de proteínas, tanto de manera teórica como experimental. Las proteínas seleccionadas para el estudio fueron BSA y lactoferrina humana recombinante. Todos los experimentos se llevaron a cabo con membranas de polietersulfona de 4 kDa de tamaño de corte. Se planteó un modelo que tenía en cuenta los

efectos de la variación de la presión osmótica, el coeficiente de difusión y la viscosidad a través del módulo. Los resultados mostraron que el modelo ajustaba adecuadamente los resultados experimentales. Se observó que, en contra de la hipótesis normalmente asumida, los efectos de la variación de la viscosidad y de la variación del coeficiente de difusión eran significativos y comparables en magnitud.

Burns y Zydney (2001) comprobaron la validez de los modelos teóricos disponibles con los datos obtenidos de la filtración de ovotransferrina a través de membranas de polietersulfona de 100 kDa. Explicaron la influencia del pH y la fuerza iónica y el máximo local de transmisión encontrado a pH 9 y a fuerza iónica intermedia.

Chaufer y Rabiller-Baudry (2001) estudiaron el sistema lactoferrina-lisozima. Para ello, primero las estudiaron por separado con objeto de elaborar una estrategia adecuada para su separación. En este trabajo se usaron membranas inorgánicas de distinto tamaño de corte (300 kDa, 150 kDa) y diferente carga. Este trabajo concluía que los solutos cargados se adsorbían en la membrana debido al flujo convectivo y como consecuencia de ello la membrana adquiría una carga similar a la del soluto en disolución. También se apreció la existencia del mecanismo de exclusión electrostática junto con el mecanismo estérico para los solutos cargados. Se observó que la transmisión de las proteínas no dependía de sus respectivas cargas con respecto a la carga inicial de la membrana y que aumentaba con la fuerza iónica. Estos autores ajustaron los datos con un modelo basado en mecanismos de convección, difusión y migración electroforética. Con respecto al proceso de fraccionamiento se observó que la máxima selectividad se obtenía cuando la proteína objetivo estaba cerca de la neutralidad.

Jones y O'Melia (2001) centraron su investigación en la adsorción de solutos en membranas durante procesos de ultrafiltración. Como solutos a filtrar escogieron BSA y ácido húmico y las membranas empleadas fueron membranas orgánicas de celulosa regenerada (30 kDa y 100 kDa) y de diacetato de celulosa (50 kDa). Los experimentos se llevaron a cabo variando las condiciones de pH (4.7 y 10) y fuerza iónica (1 mM y 0.2 M). Utilizaron el modelo de resistencias en serie para calcular las resistencias tanto de fouling reversible como del irreversible, estas resistencias se compararon para ensayos estáticos y dinámicos con objeto de determinar el efecto del flujo convectivo y las interacciones electrostáticas en el fouling. Los resultados mostraron que las fuerzas convectivas tendían a

aumentar la cantidad de material acumulado cerca de la membrana. Por su parte, las interacciones electrostáticas jugaban un papel muy importante afectando tanto a la resistencia reversible como a la irreversible. Finalmente, tanto la resistencia reversible como la irreversible eran mayores en el punto isoeléctrico de la proteína y disminuían para valores de pH mayores.

Mignard y Glass (2001) realizaron experimentos de ultrafiltración de BSA con módulos de fibra hueca de polisulfona y un tamaño de corte de 30 kDa, con lo que la proteína era rechazada por completo. Plantearon un modelo con el objeto de predecir el efecto del pH (valores de pH 5, 7, 9) y la fuerza iónica (0.01 M, 0.1 M y 1 M) en el fouling y éste predijo adecuadamente la resistencia total al flujo.

Rabiller-Baudry et al. (2001) filtraron lisozima y lactoferrina tanto de manera individual como en mezcla. Se usaron membranas inorgánicas de 300 kDa químicamente modificadas con grupos de pirofosfato (aniónico) o etilendiamina (catiónico). Los resultados mostraron que para la mezcla, la máxima selectividad se logró con la membrana modificada con etilendiamina, consiguiendo una pureza de lisozima en el filtrado próxima al 100 %. Esto se debía a la transmisión prácticamente nula de la lactoferrina en el rango de fuerza iónica de 0-100 mM a pH 7.

Chan et al. (2002) realizaron experimentos de ultrafiltración de mezclas binarias usando dos estrategias, una manteniendo el flujo constante y otra con cambio en el flujo por etapas, con el objeto de identificar el flujo crítico aparente cuando se produce un fouling rápido. Las proteínas seleccionadas fueron γ -globulina, lisozima, BSA y β -lactoglobulina. Los experimentos se llevaron a cabo con una membrana de celulosa regenerada de 30 kDa a pH 4 y fuerza iónica 0.1 M de NaCl. Se observó que para las mezclas de γ -globulina/lisozima y BSA/lisozima, la proteína de mayor tamaño era la que controlaba el comportamiento del flujo crítico, mientras que el rechazo de la proteína menor presentaba un mínimo cercano al punto del flujo crítico aparente. Los resultados también indicaban la formación de una capa dinámica de especies retenidas como la principal responsable del rápido aumento de la presión transmembrana. Las medidas de los depósitos sobre la membrana indican que estaban formados mayoritariamente por las proteínas de menor tamaño (las que se transmitían).

Darnon et al. (2002) realizaron una comparación entre la ultrafiltración de proteínas individuales y mezclas. Para ello se filtró β -lactoglobulina y una mezcla vitamina B-12 y la citada proteína y finalmente una mezcla compleja en la que a las dos anteriores se le sumaba un extracto de levadura. Las membranas empleadas fueron una orgánica de celulosa regenerada (10 kDa) y otra inorgánica de óxido de zirconio (15 kDa). Los resultados mostraron que si bien cuando se filtraba la proteína sola se producía una capa dinámica, cuya resistencia y selectividad estaban condicionadas por las interacciones proteína-membrana, la presencia de otras especies en disolución daba lugar a una alteración de esta capa, produciéndose cambios en el flujo y la selectividad.

Magueijo et al. (2002) investigaron la ultrafiltración de lisozima a diferentes fuerzas iónicas (0.01 M, 0.1 M y 0.5 M) con objeto de observar su influencia en el flujo de filtrado y en el rechazo. Se utilizaron membranas de acetato de celulosa con un tamaño de corte de 10 kDa que proporcionaban un rechazo del 98%. Experimentalmente, se observó que se producía un descenso en el flujo de filtrado al aumentar la fuerza iónica, mientras que el rechazo sólo descendía ligeramente. El flujo de filtrado y el rechazo se mostraron prácticamente invariables ante cambios de la velocidad de circulación de la alimentación. Finalmente se realizaron simulaciones dinámicas por ordenador con el objeto de predecir la velocidad de filtrado y la concentración de polarización.

Noordman et al. (2002) estudiaron el efecto del pH y la fuerza iónica en la ultrafiltración de proteínas. En este caso, la proteína empleada fue BSA y se varió el pH en el rango 3-8 y la fuerza iónica con NaCl desde 5 a 150 mM. En la investigación se usaron membranas de polietersulfona de 30 kDa. Los resultados mostraron una dependencia de los flujos con las condiciones de operación, produciéndose un aumento al disminuir la fuerza iónica. El flujo mínimo se encontró en el punto isoeléctrico de la proteína. Para valores de pH por encima del punto isoeléctrico se observó rechazo de los iones cloruros debido a la repulsión entre éstos y las proteínas cargadas negativamente. A pH 3 (inferior al punto isoeléctrico), los iones cloruros eran atraídos por la proteína, cargada positivamente. Los rechazos y flujos obtenidos se describieron mediante un modelo basado en la teoría de transferencia de materia de Maxwell-Stefan que tiene en cuenta los efectos electrostáticos.

Paris et al. (2002) afrontaron la descripción y modelado de los fenómenos de transporte que tienen lugar en los procesos de ultrafiltración. Para ello filtraron dextrano T500 a través de

membranas tubulares de 50 kDa. Todos los experimentos se llevaron a cabo en flujo tangencial laminar y en condiciones de estado estacionario. Plantearon un modelo bidimensional basado en soluciones numéricas de las ecuaciones convectivas y difusivas, que mejoró los resultados de los modelos tradicionales. Para concentraciones bajas, los resultados no fueron muy buenos, sin embargo, en el resto de los casos, los flujos predichos y los experimentales eran similares. Por otra parte, la influencia de la velocidad, la concentración inicial, la presión transmembrana y la longitud de la membrana estaban bien descritas. Finalmente, los resultados dejaron patentes la importancia de la longitud de la membrana.

Cheang y Zydney (2003) investigaron la filtración con membranas para la separación de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, para ello utilizaron membranas de celulosa regenerada (30 kDa) y polietersulfona (50 kDa). Los resultados mostraron selectividades superiores a 55 cuando se usaba la membrana de celulosa regenerada a un pH de 5.5 y una fuerza iónica de 50 mM. Se diseñó un proceso de diafiltración para la separación; a 16 diavolumenes, se consiguió un retenido de β -lactoglobulina con un factor de purificación de 100 y una recuperación del 90 %. La α -lactoalbúmina se obtuvo en el filtrado con un factor de purificación de 10 y casi un 99 % de rendimiento. Finalmente se planteó un modelo que ajustaba adecuadamente los datos experimentales.

Ghosh et al. (2003) investigaron la influencia del pH y fuerza iónica sobre la transmisión de un grupo de proteínas (lisozima, BSA, 1H anticuerpo monoclonal, HSA y HIgG). Para los experimentos se emplearon membranas de polietersulfona con diferente tamaño de corte (30 kDa, 100 kDa y 300 kDa). Como resultados más significativos, en el caso de la lisozima y membrana de 30 kDa se obtuvo que la transmisión máxima se obtenía a valores de pH entre 6.5 y 10, en vez de en el punto isoeléctrico. Este hecho se trató de explicar por la posible dimerización de la proteína. En el caso de la BSA y empleando la membrana de 100 kDa, se observó que la transmisión era mínima a pH 5.8, constante a valores de pH entre 8.7 y 7.5, y máxima entorno a su punto isoeléctrico.

Müller et al. (2003) estudiaron la ultrafiltración de lisozima y mioglobina tanto de forma unitaria como en mezcla binaria a través de membranas de acetato de celulosa de 30 kDa en un módulo de canal fino en espiral. Se observó que la selectividad aumentaba con la velocidad tangencial y disminuía con la presión transmembrana. Los resultados mostraron

que la separación de las proteínas era posible a pesar de tener tamaño y peso molecular similar (se alcanzaron factores de separación de hasta 2.5), pero que se requería una elección cuidadosa de las condiciones de pH y fuerza iónica.

Cheang y Zydney (2004) diseñaron una estrategia para la separación de α -lactoalbumina y β -lactoglobulina en una mezcla real por ultrafiltración. El fraccionamiento se consiguió mediante el empleo en serie de dos membranas de celulosa regenerada de tamaños de corte de 100 kDa y 30 kDa. Se estudiaron dos estrategias: en una primero se usaba la membrana de mayor tamaño de corte y en la otra se hacía lo contrario. En ambos casos la α -lactoalbúmina se enriqueció más de 10 veces y se alcanzó un rendimiento del 90 %.

Kanani et al. (2004) realizaron un estudio de fraccionamiento de dos proteínas con similar peso molecular en el que emplearon BSA como agente facilitante del proceso. Las proteínas seleccionadas fueron lisozima y mioglobina, que se filtraron a través de membranas de polietersulfona con un tamaño de corte de 30 kDa a pH 9. Los resultados mostraron que cuando se filtraba lisozima y mioglobina sin presencia de BSA, la lisozima tenía mayor transmisión que la mioglobina. Sin embargo, en presencia de BSA, la lisozima era retenida y la transmisión de la mioglobina aumentaba dando lugar a que la selectividad se invirtiera. El descenso de la transmisión de la lisozima se explicó por la interacción electrostática con la BSA, y el aumento de la mioglobina se atribuyó al efecto Donan.

Yen et al. (2004) realizaron un análisis del descenso en el flujo de filtrado que se produce durante la ultrafiltración de disoluciones de macromoléculas. Para este análisis tuvieron en cuenta los balances de masa y de momento junto con el modelo de resistencias en serie. En la parte experimental, ultrafiltraron dextrano T500 a través de membranas cerámicas tubulares de tamaño de corte de 15 kDa, a varias concentraciones de alimentación, presiones transmembrana y caudal de alimentación. Los resultados mostraron que la resistencia de la capa de fouling y la debida a la concentración de polarización disminuían al aumentar la velocidad tangencial, mientras que aumentaban al aumentar la concentración de la alimentación. Con respecto a modelo propuesto, éste ajustó adecuadamente los datos de flujo.

Filipe y Ghosh (2005) estudiaron los efectos de las interacciones proteína-proteína en procesos de fraccionamiento mediante ultrafiltración. Para ello usaron distintas mezclas binarias: BSA-lisozima, mioglobina-lisozima, HIgG-lisozima y BSA-mioglobina. Las

membranas seleccionadas fueron membranas de polietersulfona de 30 kDa y 50 kDa y membranas de PVDF con un tamaño de corte de 0.2 μm . Las mezclas se eligieron de manera que una de la proteína se transmitía con mucha mayor facilidad que la otra que era retenida total o parcialmente. Se apreció que la proteína con mayor dificultad para pasar a través de la membrana ejercía un efecto sobre la transmisión de la otra que era función de la naturaleza de las interacciones entre ellas, es decir, de si las citadas interacciones eran asociativas, repulsivas o neutras. Finalmente se observó que la naturaleza de las interacciones existentes dependía tanto de las proteínas involucradas como del pH y la fuerza iónica.

Magueijo et al. (2005) se centraron en el modelado de la transferencia de materia y del flujo de la ultrafiltración de lisozima con la presencia de NaCl (con concentraciones entre 0 y 0.5 M) para valores del pH entre 5.4 y 7.1. Para ello eligieron membranas orgánicas de acetato de celulosa con un tamaño de corte de 30 kDa. Los resultados mostraron que un aumento en la concentración de la sal provocaba un descenso en el coeficiente de rechazo de la proteína. Esto se podía explicar por la disminución del radio hidrodinámico de la proteína provocado por el aumento de la concentración de iones de la sal. El modelo planteado (con distintas hipótesis sobre la transferencia de materia) permitió la predicción de los flujos de filtrado y el cálculo de la concentración de polarización.

Metsämuuronen y Nyström (2005) investigaron el efecto de la relación de tamaños entre la proteína y la membrana durante la ultrafiltración. Para realizar este estudio se usaron membranas hidrofílicas de celulosa regenerada con tres tamaños de corte distintos (10 kDa, 30 kDa y 100 kDa). Como proteínas se emplearon BSA, hemoglobina, α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, lisozima, mioglobina y ovoalbúmina y además se utilizó leche desnatada. En cuanto al pH empleado fue para cada proteína el de su punto isoeléctrico y para la leche 7.4. Se observó que el flujo crítico aumentó principalmente con el aumento del tamaño de poro de la membrana. Los flujos críticos más bajos se obtuvieron con la membrana de 10 kDa debido a que tenía una permeabilidad muy baja y se alcanzaron además a presiones transmembrana muy altas (1.7-2.3 bar). En el caso de la membrana de 100 kDa se observaron ligeros descensos en el flujo crítico al aumentar el peso molecular de la proteína. En relación a la leche desnatada, fue necesario diluirla para apreciar la aparición de un flujo crítico, una vez hecho esto y comparando con los resultados de las proteínas

individuales, se llegó a la conclusión de que la β -lactoglobulina era el agente de colmatación más importante.

Rao y Zydney (2005) investigaron el efecto provocado por la adición de un pequeño ligando altamente cargado que se unía selectivamente a una proteína sobre la transmisión de la misma. Como proteína de estudio escogieron BSA y como ligando tinte azul cibacron. Para poder estudiar las interacciones electrostáticas se seleccionaron membranas de celulosa regenerada con distintas carga y tamaño de corte: neutras de 30 kDa y 100 kDa y negativa de 100 kDa. Los resultados mostraron que al añadir 1 g/L del ligando a una disolución de 8 g/L de BSA se producía una reducción de la transmisión de la proteína de más de 2 órdenes de magnitud con la membrana negativa. El efecto anterior se podía neutralizar al añadir sal o usando la membrana neutra. Los datos se ajustaron satisfactoriamente usando modelos de reparto de esferas cargadas en poros cargados y teniendo en cuenta la variación de carga de la proteína debida al ligando y la fuerza iónica.

Zulkali et al. (2005) estudiaron el efecto del pH, la fuerza iónica y la presión en el fraccionamiento de proteínas. Como proteína de estudio eligieron BSA, filtrándola en distintas condiciones de pH (3.5-8), fuerza iónica (1.3-5 g/L de NaCl) y presión (2-4 bar) con una membrana de polietersulfona de 30 kDa. A la hora de plantear el trabajo, se realizó un diseño experimental basado en la metodología de las superficies de respuesta y se aplicó la misma para el análisis de los datos obtenidos. Los resultados mostraron que los flujos eran mayores para las menores fuerzas iónicas y el pH más elevado (pH 8) debido al apantallamiento de cargas y a la repulsión electrostática de proteínas con similar carga. En cuanto a la presión, en los valores más altos se observó una reducción del flujo debida a un aumento de la densidad de la concentración de polarización y, además, que favorecía el rechazo.

Mehta y Zydney (2006) investigaron el efecto de la densidad de carga de la membrana sobre el transporte de proteína y la permeabilidad hidráulica. El soluto elegido fue citocromo c y se emplearon membranas de celulosa con tamaño de corte de 30 kDa modificadas mediante la adición de una amina cuaternaria. Los resultados mostraron que la transmisión de la proteína disminuía 100 veces al variar el potencial zeta de la membrana desde 0.3 a 6.6 mV. Se emplearon los modelos de partición y de flujo para la explicación de

los resultados, constituyendo el primer análisis cuantitativo de los efectos de la densidad de carga de la membrana en la ultrafiltración.

Teng et al. (2006) realizaron un trabajo sobre los factores que afecta al rechazo de proteínas en mezclas binarias durante ultrafiltración tangencial. Para ello eligieron como proteínas modelo lisozima y BSA y las filtraron, con y sin ultrasonidos, mediante membranas de polisulfona y PVDF de 30 kDa. Los experimentos se realizaron para distintos valores de pH (4.9-11), presión (2-4 atm), concentración de NaCl (0.01-1 g/L) y potencia de ultrasonidos (180-250 W). Los resultados mostraron que la membrana de polisulfona ofrecía un mayor flujo y menor rechazo de lisozima que la membrana de PVDF. En valores de pH cercanos al punto isoeléctrico de la lisozima se obtuvo un bajo rechazo para la misma, especialmente cuando se aplicaban bajas presiones y fuerzas iónicas. La utilización de ultrasonidos mejoraba los flujos de filtrado, y esta mejora era mayor al aumentar la potencia de los mismos. Este fenómeno se relacionó con el cambio de tamaño molecular de las proteínas bajo irradiación de ultrasonidos.

Almécija et al. (2007) investigaron el uso de membranas de ultrafiltración para el fraccionamiento de suero clarificado, centrándose en el efecto del pH. Para ello emplearon membranas cerámicas tubulares de 300 kDa. Obtuvieron los mayores flujos a pH 3,9 y 10, mientras que los flujos mínimos se presentaron cerca del punto isoeléctrico de las proteínas mayoritarias (4 y 5). Las transmisiones de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina mostraron cambios como consecuencia de las interacciones electrostáticas y estéricas que se establecían en función de las condiciones de operación. BSA, IgG y lactoferrina quedaron retenidas con mejoras de la pureza de hasta el 60% para pH 9.

De la Casa et al. (2007) estudiaron la influencia del pH en el rango 4-8 y de la concentración de cloruro sódico hasta 25 mM sobre la microfiltración tangencial de una proteína modelo, BSA. Utilizaron una membrana cerámica tubular con un tamaño de poro de 0.14 μm . La evolución del caudal de filtrado y la transmisión de proteína con el tiempo se midió a 45 °C, una velocidad tangencial de 3.5 m/s y una presión transmembrana de 100 kPa. Para explicar la evolución del filtrado se utilizó el modelo de resistencias en serie. La máxima transmisión se obtuvo para el punto isoeléctrico de la proteína, también se obtuvo una transmisión significativa para el punto de carga cero de la membrana. Para los valores de pH 4 y 8 se obtuvo transmisión nula. El máximo caudal de filtrado se observó a pH 7 y

el mínimo en el punto isoeléctrico. Finalmente la adición de sal dio lugar a una mejora tanto en la transmisión como en el caudal de filtrado.

2.4. PRINCIPALES MODELOS EN FILTRACIÓN DE PROTEÍNAS

El diseño y operación de procesos de filtración con membranas requiere de modelos que puedan predecir el rendimiento y la evolución de la separación. Esto ha dado lugar a que gran parte de la investigación realizada en este campo tenga por objetivo el planteamiento de modelos matemáticos que sean capaces de describir el sistema. Estos modelos, aunque han ayudado a entender los fenómenos que tienen lugar durante la filtración, se caracterizan porque o bien tienen un alto contenido empírico o bien están muy limitados y no se pueden aplicar a otros procesos con confianza. A continuación se pasa a describir los modelos más usuales utilizados en el análisis de filtración de macromoléculas con membranas.

2.4.1. Modelos hidrodinámicos.

El flujo de soluto y solvente en los modelos hidrodinámicos se evalúa por la resolución directa de ecuaciones de movimiento para un soluto bien definido (normalmente se asume que es esférico) en un poro bien definido (normalmente cilíndrico) (Zeman y Zydney, 1996).

Transporte de disolvente.

La velocidad de filtración, U_F , a través de una membrana modelo formada por un conjunto uniforme de poros cilíndricos se puede expresar mediante la ley de Hagen-Poiseuille:

$$U_F = \frac{r_p^2 \Delta P}{8\mu \delta_M} \quad [2.1]$$

Donde ΔP es la diferencia de presión transmembrana, r_p el radio de poro, μ la viscosidad del disolvente y δ_M el grosor de la membrana.

La ecuación 2.1 sólo es válida en ausencia de presión osmótica o efectos de rechazo de soluto. Normalmente, esta ecuación se escribe con un factor de tortuosidad, τ , en el denominador para tener en cuenta, de manera cualitativa, la morfología de poros interconectados y tortuosos de la mayoría de las membranas. La tortuosidad refleja la relación entre el grosor de la membrana y la longitud del camino que sigue el fluido al atravesar dicha membrana.

La permeabilidad hidráulica de la membrana, L_p , se define como:

$$L_p = \frac{J_F}{\Delta P} = \frac{\chi \cdot r_p^2}{8\mu \delta_M} \quad [2.2]$$

Donde la segunda expresión es válida para una membrana con poros cilíndricos uniformes. El término J_F es el flujo volumétrico de filtrado, que es igual a $\chi \cdot U_F$, donde χ es la porosidad de la membrana (la fracción de área de la membrana ocupada por poros cilíndricos).

Tal y como se ha definido la permeabilidad hidráulica, ésta muestra una gran dependencia del radio del poro. Esta dependencia tiene una gran importancia a la hora de entender el transporte de disolvente. Para estudiar este efecto, hay que tener en cuenta que las membranas no tienen un tamaño de poro uniforme por lo que habrá que considerar una distribución de poros de distinto radio. La velocidad de filtración media, U_{FM} , a través de una membrana con una distribución de poros cilíndricos y rectos viene dada por:

$$U_{FM} = \frac{\int_0^{\infty} U_F N(r) \pi r^2 dr}{\int_0^{\infty} N(r) \pi r^2 dr} \quad [2.3]$$

Donde $N(r)$ es el número de poros de radio r y U_F viene dada por la ecuación 2.1. Para expresar la distribución de tamaños de poro, en estudios previos se ha empleado una función de densidad de probabilidad dada por (Zydney et al., 1994):

$$f_R(r) = \frac{1}{r\sqrt{2\pi h}} \exp \left[-\frac{\left(\ln \frac{r}{r_{pm}} + \frac{h}{2} \right)^2}{2h} \right] \quad [2.4]$$

En la que el término h se expresa en función del radio de poro medio, r_{pm} , y de la desviación estándar, σ , de la distribución de tamaño de poros:

$$h = \ln \left[1 + \left(\frac{\sigma}{r_{pm}} \right)^2 \right]$$

Esta función de densidad de probabilidad es adecuada para el estudio de distribuciones de tamaño de poros en membranas ya que únicamente considera tamaños de poro positivos.

Por último, la presencia de diferentes solutos en la alimentación altera el flujo de fluido ya que modifican la viscosidad de la disolución de filtrado, las características de los poros al reducirlos y generan presión osmótica. Todo esto contribuye a alterar la velocidad de filtración dada por la expresión 2.1.

Transporte del soluto:

El flujo de soluto por el interior del poro de una membrana, N_s , es igual a la suma de la contribución convectiva y difusiva:

$$N_s = K_C U_F C_S - K_D D_S \frac{dC_S}{dz} \quad [2.5]$$

Donde C_S es la concentración de soluto en el poro promediada en dirección radial, D_S es el coeficiente de difusión binaria del soluto en disolución libre, y z es la posición axial en el poro. Los coeficientes K_C y K_D son los coeficientes de retraso para el transporte convectivo y difusivo, respectivamente. Estos factores surgen de la resistencia que ejercen las paredes del poro sobre las moléculas de soluto y dependen de los tamaños relativos del soluto y del poro, así como de las interacciones de largo alcance (electrostáticas) entre el soluto y las paredes del poro.

La concentración de soluto en los poros de la membrana, en la entrada ($z = 0$) y en la salida ($z = \delta_M$) del poro (Figura 2.7) se considera que está en equilibrio con la correspondiente concentración externa de solutos, C_W y C_F (Zeman y Zydney, 1996):

$$\phi = \frac{C_{S,z=0}}{C_W} = \frac{C_{S,z=\delta_M}}{C_F} \quad [2.6]$$

Donde C_W es la concentración de soluto en la capa límite de alimentación adyacente a la membrana, C_F es la concentración en el filtrado y ϕ el coeficiente de partición de equilibrio

entre la disolución externa y el poro de membrana. La ecuación 2.6 es válida cuando $\delta_M/r_p \gg 1$.

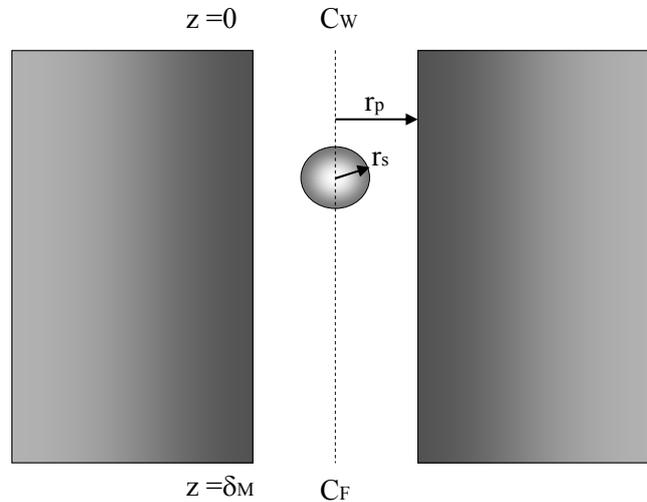


Figura 2.7 Representación esquemática de un soluto esférico en el interior de un poro cilíndrico

En muchos sistemas experimentales, la variación de la concentración externa de soluto es relativamente lenta en comparación con los tiempos característicos para la difusión o la convección del soluto en los poros de la membrana. Por tanto, el perfil de la concentración de soluto dentro de la membrana se puede considerar que está en un estado cuasi-estacionario. En estas condiciones, el flujo de soluto es independiente de la posición axial y la ecuación 2.5 se puede integrar a lo largo de la membrana (asumiendo que las propiedades del poro son independientes de la posición axial, z). De esta forma obtenemos la ecuación 2.7, que nos indica el flujo de soluto en términos de las concentraciones externas que son fácilmente medibles:

$$N_s = \phi K_c U_F \left[\frac{C_w \exp(\text{Pe}_m) - C_f}{\exp(\text{Pe}_m) - 1} \right] \quad [2.7]$$

Donde Pe_m es el número de Peclet de la membrana y se calcula como sigue:

$$\text{Pe}_m = \left(\frac{U_F \delta_M}{D_s} \right) \left(\frac{\phi K_c}{\phi K_D} \right) = \left(\frac{J_F \delta_M}{D_s} \right) \left(\frac{\phi K_c}{\chi \phi K_D} \right) \quad [2.8]$$

Para altas velocidades de filtración, $Pe_m \rightarrow \infty$, el flujo de soluto está gobernado enteramente por la convección, por lo que la ecuación 2.7 se simplifica a:

$$N_s = \phi K_c U_F C_w \quad [2.9]$$

Cuando el proceso está controlado por la difusión, $Pe_m \rightarrow 0$, el flujo de soluto se hace proporcional a la diferencia de concentración de soluto a través de la membrana, por lo que en este caso la ecuación 2.7 se simplifica a:

$$N_s = \frac{\phi K_D D_s}{\delta_M} (C_w - C_F) \quad [2.10]$$

El coeficiente de transmisión, Tr_a , se define como la relación entre la concentración de soluto en el filtrado, C_F , y la concentración del mismo en la capa límite a la entrada del poro, C_w . Este coeficiente se puede evaluar con la siguiente expresión:

$$Tr_a = \frac{C_F}{C_w} = \frac{Tr_\infty \exp(Pe_m)}{Tr_\infty + \exp(Pe_m) - 1} \quad [2.11]$$

Este coeficiente de transmisión depende de la velocidad de filtración. Tr_a es igual al coeficiente asintótico de transmisión, Tr_∞ , cuando el $Pe_m \rightarrow \infty$, e igual a la unidad cuando $Pe_m \rightarrow 0$. Esto es independiente de las características de la membrana pero hay que asumir que ésta es parcialmente permeable al soluto como mínimo.

2.4.2. Modelo de la capa de polarización

Uno de los factores críticos en cualquier proceso de filtración tangencial es el transporte de soluto en la solución adyacente a la membrana (Figura 2.8). El flujo a través de la membrana provoca que exista un transporte convectivo de soluto hacia la superficie de la misma. Si la membrana rechaza parcial o totalmente al soluto se origina un aumento de la concentración de éste en la superficie de la membrana. Este fenómeno da lugar a un gradiente de concentración que varía entre la concentración en la superficie de la membrana y la concentración en el seno de la corriente de alimentación. La capa donde se produce este gradiente es lo que se conoce como capa de polarización. Por otra parte, el gradiente de concentración da lugar a un transporte difusivo de soluto en sentido contrario. Finalmente se alcanza un equilibrio entre el soluto que es transportado convectivamente hacia la

membrana, el soluto que es transportado por difusión hacia el seno de la alimentación y el soluto que es transmitido por la membrana.

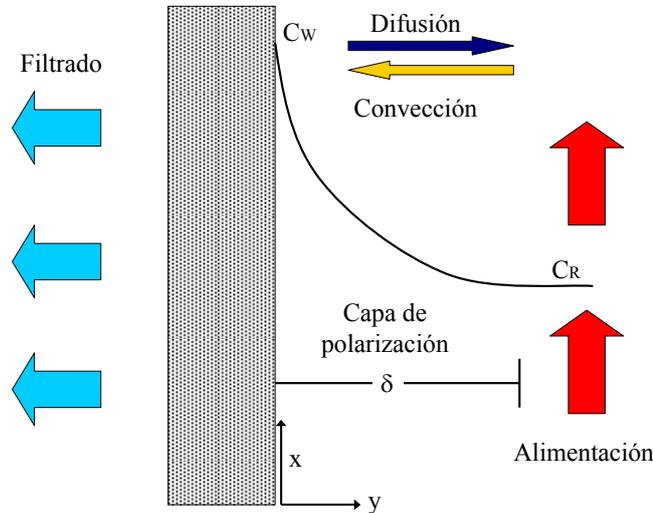


Figura 2.8 Representación esquemática del transporte de soluto en la capa de polarización

Se puede describir el perfil de concentraciones de soluto mediante ecuaciones de conservación de materia:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x}(U_{Fx} \cdot C) + \frac{\partial}{\partial y}(U_{Fy} \cdot C) = \frac{\partial}{\partial y} \left(D_s \frac{\partial C}{\partial y} \right) \quad [2.12]$$

Donde U_{Fx} es la velocidad del fluido en dirección tangencial (x), U_{Fy} es la velocidad del fluido en dirección transmembrana (y), C es la concentración local de soluto y D_s es el coeficiente de difusión binario del soluto.

Se supone que la tasa de difusión de soluto en la dirección x es despreciable en relación con la tasa de convección en la dirección tangencial, ya que el Peclet axial en muchos sistemas de ultrafiltración y microfiltración es mayor a 10000. Para resolver la ecuación 2.12 se consideran las siguientes condiciones límites en la superficie de la membrana ($y = 0$):

$$U_{Fy} = -J_F \quad [2.13]$$

$$U_{Fy} \cdot C_w - \left(D_s \frac{\partial C}{\partial y} \right)_w = -N_s \quad [2.14]$$

Estas condiciones recogen la continuidad en el flujo de filtrado y soluto en la interfase entre la disolución y la membrana. Los términos negativos en la parte derecha en ambas ecuaciones ponen de manifiesto que la velocidad transmembrana U_{Fy} es en el sentido negativo de la dirección y , aunque el flujo de filtrado, J_F , y el flujo de soluto N_S , son usualmente considerados como valores positivos.

Con el objeto de simplificar el estudio, tradicionalmente se ha empleado una solución aproximada basada en el concepto del coeficiente de transferencia de materia para el soluto, K .

$$K = \frac{-\left(D_s \frac{\partial C}{\partial y}\right)_w}{C_w - C_R} \quad [2.15]$$

El coeficiente de transferencia de materia se define como la relación entre el flujo difusivo de soluto en la superficie de la membrana y la fuerza impulsora total. Sustituyendo la ecuación 2.15 en las condiciones límites en la superficie de la membrana, 2.13 y 2.14, se obtiene la siguiente expresión para el flujo de filtrado en términos de la fuerza impulsora total:

$$J_F = K \left(\frac{C_w - C_R}{C_w - C_F} \right) \quad [2.16]$$

Donde el flujo a través de la membrana ha sido evaluado como:

$$N_S = J_F \cdot C_F \quad [2.17]$$

La ecuación 2.16 parece implicar que el flujo de filtrado es linealmente dependiente de la relación entre concentraciones. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el coeficiente K es en si mismo una función de los perfiles de concentración, ya que es la derivada de la concentración en la dirección y y está afectada por la magnitud del flujo de filtrado en cualquier sistema.

Normalmente no es posible obtener expresiones rigurosas que recojan los efectos de la velocidad del flujo en el coeficiente de transferencia de materia. Por ello, tradicionalmente se ha usado un análisis aproximado en el que la capa límite de concentración se modela

como una capa estática. Teniendo en cuenta esto y mediante integración de la ecuación 2.12 en la dirección y , se puede llegar a obtener la ecuación clásica de la capa límite:

$$U_{Fy} C - D_S \frac{\partial C}{\partial y} = -N_S \quad [2.18]$$

Esta expresión es válida para capas de concentración límite relativamente delgadas. Si se asume que la velocidad transversal, U_{Fy} , y el flujo de soluto, N_S , son independientes de y , e iguales a sus valores en la superficie de la membrana, usando las ecuaciones 2.13 y 2.17 e integrando la ecuación 2.18 desde 0 a y , y de C_W a C se obtiene:

$$\frac{C - C_F}{C_W - C_F} = \exp\left(\frac{-J_F \cdot y}{D_S}\right) \quad [2.19]$$

Ecuación que sólo es válida en la capa límite, desde $y = 0$ a $y = \delta$. Se puede aplicar una condición límite final $C = C_R$ para $y = \delta$, lo que permite obtener una expresión para el flujo de filtrado en términos de concentración de soluto, difusividad del mismo y el espesor de la capa límite:

$$J_F = \frac{D_S}{\delta} \ln\left(\frac{C_W - C_F}{C_R - C_F}\right) \quad [2.20]$$

Esta expresión es válida en cualquier posición axial, x , usando los valores locales del espesor de la capa límite y de las concentraciones de soluto.

Para usar parámetros que sean más fácilmente medibles, si se analiza la ecuación 2.20, para valores de fuerza impulsora muy pequeños se puede sustituir el logaritmo neperiano usando el primer término de su serie de Taylor. Con ello queda:

$$J_F = \frac{D_S}{\delta} \ln\left(\frac{(C_W - C_R) + (C_R - C_F)}{C_R - C_F}\right) \approx \frac{D_S}{\delta} \left(\frac{C_W - C_R}{C_W - C_F}\right) \quad [2.21]$$

La segunda igualdad de la ecuación 2.21 será válida cuando J_F tienda a cero y la fuerza impulsora sea muy pequeña, es decir $C_W \approx C_R$. En estas condiciones, y si comparamos la ecuación 2.21 con la 2.16, se obtiene que $K = D_S/\delta$ con lo que la ecuación 2.16 se puede escribir como:

$$J_F = K \cdot \ln \left(\frac{C_W - C_F}{C_R - C_F} \right) \quad [2.22]$$

En este modelo no aparece ningún término de presión, por lo que sólo será válido en la región donde el flujo es independiente de la misma.

Para la determinación de los coeficientes de transferencia de materia se han utilizado tres aproximaciones diferentes:

- Expresiones teóricas obtenidas por la resolución de las ecuaciones de transferencia de materia con las simplificaciones adecuadas según la geometría del sistema y la fluidodinámica.
- Correlaciones empíricas basadas en extrapolaciones de datos experimentales.
- Correlaciones empíricas basadas en el ajuste de la ecuación 2.22 a los datos experimentales de caudal de filtrado para un sistema determinado.

En lo referente a la transmisión, Tr_a , la ecuación 2.11 permite calcularla. Sin embargo, en la práctica no se tiene la concentración en la capa límite a la entrada del poro, C_W , lo que es fácilmente medible es la concentración en el retenido, C_R . Por ello, lo que se calcula es la transmisión observada, Tr , la cual se define como sigue:

$$Tr = \frac{C_F}{C_R} = \left(\frac{C_W}{C_R} \right) Tr_a \quad [2.23]$$

La acumulación que se produce en la superficie de la membrana puede hacer que existan grandes diferencias entre Tr y Tr_a . La concentración de soluto en la superficie de la membrana, C_W , puede evaluarse con el modelo de la capa límite (ecuación 2.22), lo que deja la siguiente expresión para el coeficiente de transmisión observada en términos del coeficiente de transferencia de materia:

$$Tr = \frac{Tr_a}{(1 - Tr_a) \exp \left(-\frac{J_F}{K} \right) + Tr_a} \quad [2.24]$$

Para bajos valores de flujo de filtrado, el coeficiente de transmisión observada es igual a la transmisión real, ya que $C_W \approx C_R$. A medida que J_F aumenta, Tr se hace mayor que Tr_a . Para valores muy altos del flujo de filtrado, Tr se aproxima a la unidad lo que significa que $C_F \rightarrow C_R$, esto se cumple si la membrana es al menos parcialmente permeable al soluto de interés.

2.4.3. Modelo de presión osmótica

Este modelo considera que el flujo de filtrado está determinado directamente por la diferencia entre la presión transmembrana aplicada y la diferencia de presión osmótica que se origina como consecuencia de la retención de solutos en las proximidades de la membrana. Tanto la colmatación de la membrana, como la resistencia hidráulica debida a la formación de torta o capas de gel se consideran despreciables. La presión osmótica para una disolución de macromoléculas se puede expresar mediante la ecuación de los coeficientes del virial:

$$\Pi = B_1 C_p + B_2 C_p^2 + B_3 C_p^3 \quad [2.25]$$

Donde B_1 , B_2 y B_3 son los coeficientes osmóticos del virial y C_p es la concentración de la disolución de la macromolécula. Desafortunadamente, no hay disponibles datos de presión osmótica para la mayoría de las especies macromoleculares en el rango de concentraciones requerido por el modelo de presión osmótica.

La presión osmótica es función de la carga del soluto y de la fuerza iónica (V.L. Vilker, 1981). La presión osmótica presenta un mínimo alrededor del punto isoeléctrico de la proteína, y experimenta incrementos tanto para pH superiores e inferiores debido tanto al equilibrio Donan como a las fuerzas electrostáticas de tipo repulsivo que aparecen entre las partículas cargadas. El primer efecto es debido a la partición de los iones pequeños. Ambos efectos tienden a aumentar los valores del segundo y tercer coeficientes del virial. Por otro lado, la presión osmótica normalmente disminuye al aumentar la concentración de sales debido al efecto de apantallamiento electrostático que tiene la sal.

El flujo de filtrado en este modelo se calcula por resolución simultánea de las siguientes ecuaciones:

$$J_F = K \cdot \ln \left(\frac{C_W - C_F}{C_R - C_F} \right) \quad [2.26]$$

$$J_F = L_p [\Delta P - \sigma_o (\Pi_W - \Pi_F)] \quad [2.27]$$

Donde Π_W y Π_F son función de C_W y C_F respectivamente, según la ecuación 2.25. Las propiedades de la membrana L_p y σ_o (coeficiente de reflexión) deben ser conocidas. σ_o se define como:

$$\sigma_o = \left(\frac{\Delta P}{\Delta \Pi} \right)_{J_F=0} \quad [2.28]$$

2.4.4. Modelo de resistencias en serie

En todo proceso de filtración se pueden distinguir dos zonas en función de la presión. Una zona controlada por la presión para valores bajos de la misma y una zona independiente de la presión para valores altos. Este modelo trata de describir este comportamiento y para ello realiza una analogía con la transferencia de calor (Cheryan, 1998). Para una membrana y disoluciones ideales la ecuación 2.1 se puede reescribir como:

$$J_F = \frac{M_p \cdot \Delta P}{\mu} \quad [2.29]$$

Donde M_p es el coeficiente de permeabilidad de la membrana e incluye los parámetros característicos de la misma. El coeficiente M_p/μ se puede expresar como $1/R_M$, siendo R_M la resistencia intrínseca de la membrana determinada con agua pura como alimentación. Por tanto podemos escribir:

$$J_{\text{agua}} = \frac{\Delta P}{R_M} \quad [2.30]$$

La resistencia intrínseca de la membrana es muy útil, no sólo para la formulación de modelos, sino también para evaluar la efectividad de los procesos de limpieza y la estabilidad de la membrana a largo plazo. En un proceso real, la resistencia de la membrana es sólo una pequeña parte de la resistencia total debido al fouling de la membrana y a la capa de polarización. Esto se tiene en cuenta añadiendo una serie de resistencias

adicionales. La colmatación de la membrana, producida como consecuencia de las interacciones específicas de la membrana y el soluto o por deposición en la superficie, da lugar a un aumento en la resistencia, lo que se representa mediante la adición de otro término al modelo, la llamada resistencia de fouling (R_F). Esta colmatación es debida a interacciones físico-químicas, por lo que se asume que no depende de los parámetros de operación. Por ello se une junto con R_M en una sola resistencia representada por R'_M . Considerando esto, la ecuación 2.30 se puede reescribir como:

$$J_F = \frac{\Delta P}{R'_M + R_p} \quad [2.31]$$

Donde R_p es la resistencia debida a la capa de polarización. Esta resistencia depende del grosor y de la permeabilidad de la capa de polarización que a su vez depende de la presión aplicada, por tanto es función de los parámetros de operación y de las propiedades físicas. Con ello la expresión final del flujo es:

$$J_F = \frac{\Delta P}{R'_M + \phi \cdot \Delta P} \quad [2.32]$$

Este modelo, conceptualmente, ajusta los datos de flujo-presión, distinguiendo entre las dos zonas en función de la presión. Así, a bajas presiones, R'_M es mayor que R_p y el caudal es función de la presión. Por el contrario, a altos valores de presión el caudal es independiente de ésta y se aproxima al valor límite de $1/\Phi$. Φ es función de las variables que afectan a las propiedades de transferencia de materia del sistema como la viscosidad, el esfuerzo cortante/velocidad y la temperatura. La presión óptima de trabajo es aquella en la que las resistencias R'_M y R_p son iguales (Cheryan, 1998).

2.4.5. Modelos de colmatación o fouling

Muchos de estos modelos relacionan el flujo con el tiempo o con el volumen de filtrado y generalmente toman la forma de curva exponencial, considerando la típica forma de las curvas de flujo debidas a la colmatación (Cheryan, 1998):

$$J_F = J_{F0} t^{-m} \quad [2.33]$$

$$J_F = J_{F0} e^{-m \cdot t} \quad [2.34]$$

$$J_F = J_{F0} V_F^{-m} \quad [2.35]$$

$$J_F = J_{SS} + J' \cdot e^{-m \cdot t} \quad [2.36]$$

Donde J_{F0} es el flujo inicial, J_F es el flujo a un tiempo determinado, J_{SS} el flujo límite o flujo en el estado estacionario, y V_F el volumen filtrado. Las constantes J' y m caracterizan el proceso de colmatación. Dado que estos modelos son empíricos no proporcionan información útil para poder explicar el mecanismo en sí mismo. De hecho, algunos de estos modelos predicen que el flujo a tiempo infinito es cero, lo cual no ocurre en la práctica.

Por otra parte, se han desarrollado modelos basándose en el mecanismo de bloqueo de poros desarrollado para la filtración tradicional (Hermia 1982, Scott y Hughes 1996, Jaffrin et al., 1997). Según formuló Hermia existen cuatro mecanismos (Figura 2.9):

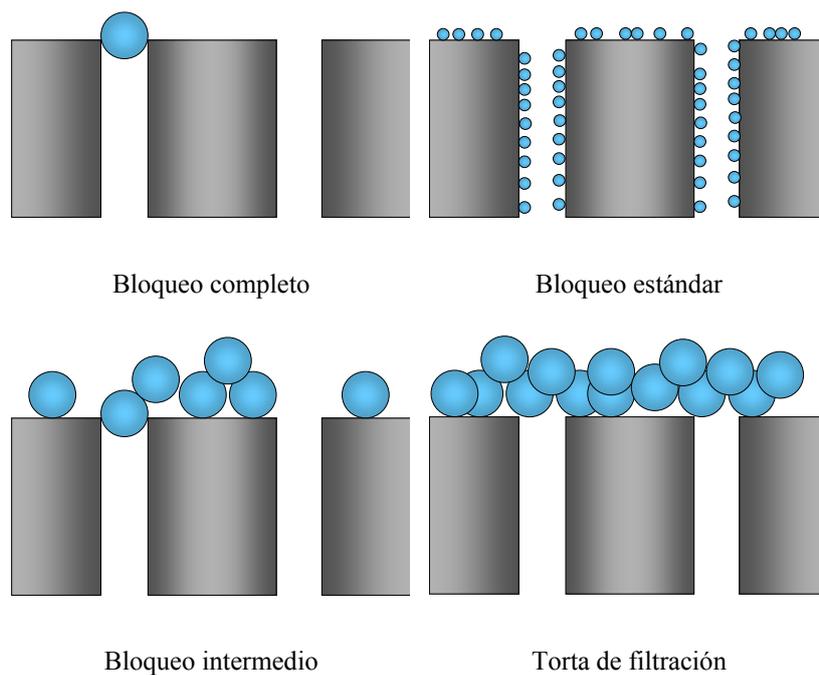


Figura 2.9 Mecanismos de bloqueo de poros.

- Bloqueo completo o bloqueo de poro: Las partículas individuales bloquean los poros sin superponerse unas sobre otras.
- Bloque estándar o adsorción directa: Las partículas se depositan en el interior de los poros.

- Bloqueo intermedio o adsorción a largo plazo: Las partículas o bloquean poros o se depositan sobre la superficie de la membrana (la superposición es posible).
- Torta de filtración o resistencia de la capa límite: Las partículas forman una capa sobre la superficie de la membrana.

Normalmente, sólo uno de estos mecanismos se considera a la hora de analizar los resultados experimentales. Sin embargo, lo más razonable es pensar que durante un experimento de filtración la reducción de flujo de filtrado se deba a todos o a varios de estos mecanismos.

A continuación se realiza un resumen de las hipótesis y de las conclusiones a las que se llegaron en los modelos desarrollados basados en los cuatro mecanismos correspondientes (Bowen et al., 1995):

Bloqueo completo de los poros:

Este modelo asume que cada partícula que llega a la membrana participa en el bloqueo de uno o varios poros sin superposición de partículas. Además, el área de la membrana disminuye con el tiempo de manera proporcional al caudal de filtrado. Esto lleva a la siguiente expresión para el caudal de filtrado:

$$Q_F = Q_{F0} e^{-A \cdot t} \quad [2.37]$$

Donde A es:

$$A = K_A \cdot U_{F0} \quad [2.38]$$

K_A es la superficie de membrana bloqueada por unidad de volumen filtrado a través de la membrana y U_{F0} es la velocidad inicial media de filtrado:

$$U_{F0} = \frac{Q_{F0}}{A_{P0}} \quad [2.39]$$

Donde A_{P0} representa el área de la membrana ocupada por los poros.

La evolución del volumen filtrado a lo largo del tiempo es:

$$V_F = \frac{Q_{F0}}{A} (1 - e^{-A \cdot t}) \quad [2.40]$$

Existe una relación entre la primera y la segunda derivada del volumen con el tiempo:

$$\frac{d^2t}{dV_F^2} = A \left(\frac{dt}{dV_F} \right)^2 \quad [2.41]$$

Esta relación es llamada la ecuación característica del proceso de bloqueo para el caso de bloqueo completo.

Bloqueo estándar:

En este caso, se considera que es posible que cada partícula que llega a la membrana se deposite en las paredes internas de los poros, lo que da lugar a una reducción del volumen del poro. Es más, si se considera que la membrana está formada por un conjunto de poros cilíndricos iguales, se produce el llamado bloqueo estándar. En este caso, la ecuación que expresa la dependencia del caudal de filtrado con el tiempo es la siguiente:

$$Q_F = \frac{Q_{F0}}{(1 + B \cdot t)^2} \quad [2.42]$$

En la que B es:

$$B = K_B \cdot U_{F0} \quad [2.43]$$

Donde K_B es la reducción en el área transversal de los poros (debida a la adsorción en las paredes de los poros) por unidad de volumen total de filtrado.

La evolución del volumen filtrado a lo largo del tiempo viene dada por:

$$V_F = \frac{Q_{F0} \cdot t}{1 + B \cdot t} \quad [2.44]$$

Mientras que la ecuación característica de este proceso es:

$$\frac{d^2t}{dV_F^2} = \frac{2B}{\sqrt{Q_{F0}}} \left(\frac{dt}{dV_F} \right)^{3/2} \quad [2.45]$$

Bloqueo intermedio:

Este proceso se basa en la idea de que cada partícula que llega a la membrana puede depositarse sobre otra partícula que ya estaba sobre la superficie de la membrana y bloquear poros o también puede directamente bloquear parte de la superficie de la membrana. El modelo resultante presenta la siguiente expresión para el caudal de filtrado en función del tiempo:

$$Q_F = \frac{Q_{F0}}{(1 + A \cdot t)} \quad [2.46]$$

Mientras que la evolución con el tiempo del volumen de filtrado total viene dada por:

$$V_F = \frac{Q_{F0}}{A} \ln(1 + A \cdot t) \quad [2.47]$$

La ecuación característica para este caso es:

$$\frac{d^2t}{dV_F^2} = \frac{A}{Q_{F0}} \left(\frac{dt}{dV_F} \right) \quad [2.48]$$

Torta de filtración:

Finalmente, se puede admitir que cada partícula se deposita sobre otras partículas que ya han llegado a la membrana y han bloqueado algunos poros. En este caso no hay espacio para obstrucción directa de la superficie de la membrana y se produce la llamada filtración por torta. La ecuación que representa el caudal de filtrado en función del tiempo para este caso viene dada por:

$$Q_F = \frac{Q_{F0}}{\sqrt{1 + C \cdot t}} \quad [2.49]$$

Donde C es

$$C = (2R_R) K_T U_{F0} \quad [2.50]$$

Siendo $1/K_T$ el volumen total de filtrado por unidad de área de membrana (que coincide con el área de la torta depositada) y R_R es la resistencia hidráulica de la torta dividida entre la resistencia inicial de la membrana, ($R_R=R_T/R_M$).

La evolución del volumen total de filtrado con el tiempo se calcula como:

$$V_F = \frac{2Q_{F0}}{C} (\sqrt{1+C \cdot t} - 1) \quad [2.51]$$

Y la ecuación característica de este fenómeno es:

$$\frac{d^2t}{dV_F^2} = \frac{C}{2Q_{F0}^2} \left(\frac{dt}{dV_F} \right)^0 \quad [2.52]$$

Forma general de las ecuaciones características:

En función de las cuatro ecuaciones características vistas anteriormente, se puede deducir una forma común para la ecuación característica en los modelos de bloqueo (Bowen et al., 1995):

$$\frac{d^2t}{dV_F^2} = \gamma \left(\frac{dt}{dV_F} \right)^\beta \quad [2.53]$$

En esta ecuación los valores de γ y β tienen los valores indicados en la Tabla 2.1. Cabe destacar que β decrece desde 2 a 0 mientras que γ es proporcional a la potencias de U_{F0} decreciendo éstas desde 1 a -1 y a las potencias de A_{P0} que también decrecen desde 0 a -2.

Tabla 2.1 Parámetros de las leyes de bloqueo a presión constante.

| Mecanismo | γ | β |
|------------|-----------------------------------|---------|
| Completo | $K_A U_{F0}$ | 2 |
| Estándar | $(2K_B/A_{P0}^{1/2})U_{F0}^{1/2}$ | 3/2 |
| Intermedio | K_A/A_{P0} | 1 |
| Torta | $(R_R K_C/A_{P0}^2)U_{F0}^{-1}$ | 0 |

Si tenemos en cuenta la definición de caudal de filtrado, $Q_F = dV/dt$, la ecuación 2.53 se puede reescribir como (Velasco et al. 2003):

$$-\frac{dQ_F}{dt} = \gamma \cdot Q_F^{(3-\beta)} \quad [2.54]$$

Lo que simplifica el proceso de ajuste de datos para la obtención de los parámetros de bloqueo.

Puesto que la ecuación anterior se desarrolló para los procesos de filtración convencional, Field et al. (1995) la modificó para tener en cuenta las características de la filtración tangencial. Para ello consideró un transporte constante de eliminación de soluto desde la membrana hacia la corriente de alimentación. De esta forma, la ecuación característica de bloqueo 2.54 se expresaría como:

$$-\frac{dJ_F}{dt} J_F^{(\beta-2)} = \gamma (J_F - J_F^*) \quad [2.55]$$

En el caso de bloqueo estándar, como las partículas se depositan en el interior de los poros, la colmatación no se ve afectada por el arrastre tangencial que se produce en la superficie de la membrana, por ello en este caso se puede usar la ecuación 2.54. En cada caso el término J_F^* puede considerarse un valor crítico de flujo, por debajo del cual no se colmataría la membrana.

2.5. REDES NEURONALES ARTIFICIALES

2.5.1. Fundamentos

Introducción.

La dificultad que encuentran los sistemas de computación tradicionales a la hora de resolver ciertas casuísticas ha dado lugar al nacimiento de las redes neuronales que tratan de solucionar problemas de manera similar al cerebro humano. Los sistemas de computación tradicionales procesan la información de manera secuencial, es decir, ejecutan las instrucciones almacenadas en la memoria una a una. Sin embargo, las redes neuronales no ejecutan instrucciones sino que responden en paralelo a las entradas que reciben. El conocimiento de una red neuronal no se almacena en instrucciones, el poder de la red está en su topología y en los valores de las conexiones entre las neuronas. En este sentido, las redes neuronales son un modelo artificial simplificado del cerebro humano e intentan emular ciertas de sus características como la capacidad de memorizar, asociar hechos y adquirir conocimientos a través de la experiencia. Una primera clasificación de los modelos basados en redes neuronales se puede realizar atendiendo a su similitud con la realidad biológica. Así se tiene el modelo tipo biológico, son redes que tratan de simular los sistemas neuronales biológicos. En contraposición al anterior existe el modelo tipo aplicación constituido por redes que no tienen porque guardar similitud con los sistemas biológicos, su arquitectura es función de las necesidades de la aplicación para la que se ha diseñado.

Son múltiples las definiciones existentes de red neuronal, algunos ejemplos de ellas son: “Nueva forma de computación, inspirada en modelos biológicos”. “Modelo matemático compuesto por un gran número de elementos de procesamiento organizados en niveles”. “Sistema de computación compuesto por un gran número de elementos simples, elementos de procesos interconectados, los cuales procesan información por medio de su estado dinámico como respuesta a entradas externas”. “Redes de elementos simples interconectadas masivamente en paralelo y con organización jerárquica, las cuales intentan interactuar con los objetos del mundo real del mismo modo que lo hace el sistema nervioso biológico”.

Ventajas de las redes neuronales.

Gracias a su constitución y a sus fundamentos, las redes neuronales son capaces de aprender de la experiencia, de generalizar de casos anteriores a nuevos casos, de abstraer características esenciales a partir de entradas que representan información irrelevante, etc. Esto hace que presenten numerosas ventajas (El-Hawary, 1993):

- Pueden operar en tiempo real, lo que evita la explosión combinatoria en tiempo de computación que ocurre frecuentemente en problemas de gran tamaño.
- El algoritmo no tienen que ser explícitamente conocido y programado por un experto. Una red neuronal puede aprender a programar su propia solución para un problema determinado basándose en un entrenamiento o en una experiencia inicial.
- Tolerancia a los fallos: en los algoritmos tradicionales el cambio de una sola dirección de memoria tiene efectos desastrosos. Esto no ocurre en las redes neuronales ya que la información está distribuida entre sus elementos.
- Memoria asociativa: una entrada incompleta o ruidosa puede aún ser válida para generar la información completa.
- Degradación gradual: al aumentar el daño sufrido por una red se produce una degradación gradual en su rendimiento.
- Gran capacidad de interpolación a partir de los datos de entrenamiento.
- Plasticidad: si algunas de las neuronas que la componen se eliminan o se dañan, la red puede reeducarse hasta alcanzar su rendimiento original.

Elementos de una red neuronal.

Como muestra la Figura 2.10, una red neuronal está constituida por elementos interconectados llamados neuronas. Estas neuronas se agrupan en capas, las cuales se clasifican en:

- Capa de entrada: es la capa que recibe directamente las señales de la entrada a la red.

- Capas ocultas: puede ser una o varias, no tienen contacto directo con el medio exterior. Sus elementos pueden tener diferentes conexiones. Estas capas son las que determinan la topología de la red.
- Capa de salida: recibe la información de las capas ocultas y transmite la respuesta al medio exterior.

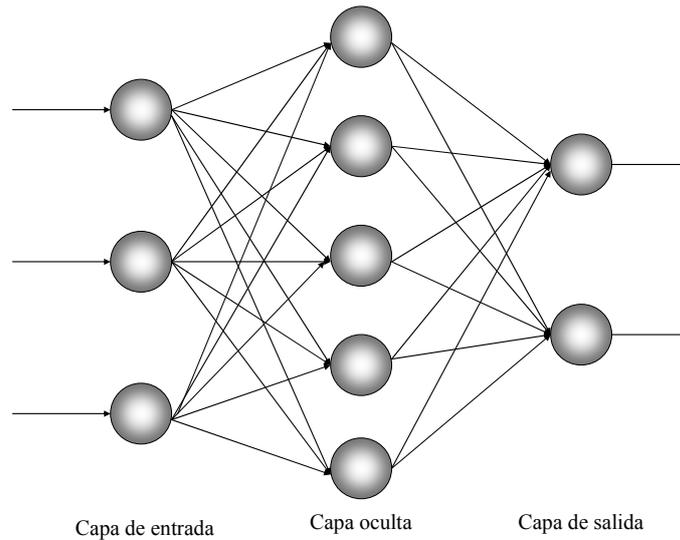


Figura 2.10 Elementos de una red feedforward con una capa oculta

Función de entrada:

A una neurona le llegan muchos valores de entrada, sin embargo, la neurona los agrupa y los trata como si fueran un único valor conocido como entrada global. Este proceso de transformar todas las entradas en una sola se realiza mediante la llamada función de entrada. Existen numerosas funciones de entrada, siendo una de las más frecuentemente empleadas la función sumatorio de entradas, la cual puede escribirse como:

$$n_i = \sum_{j=1}^{R_N} (p_{i,j} \cdot w_{i,j}) + b_i \quad [2.56]$$

Donde n_i es el valor de la función de entrada a la neurona i , R_N es el número de entradas de la neurona i , $w_{i,j}$ es el peso asignado a la entrada j de la neurona i y b_i es el bias de la neurona i . Los bias emiten un valor de salida constante a través de la conexión a las neuronas de la siguiente capa. El multiplicar las entradas por los pesos permite cambiar la

influencia de dichas entradas. El conjunto de las R_N entradas a la neurona es lo que comúnmente se llama vector de entrada.

Función de transferencia:

Un modelo que facilita el estudio de las neuronas puede verse en la Figura 2.11 (Demon y Beale, 2002) donde se considera una entrada de un único escalar.

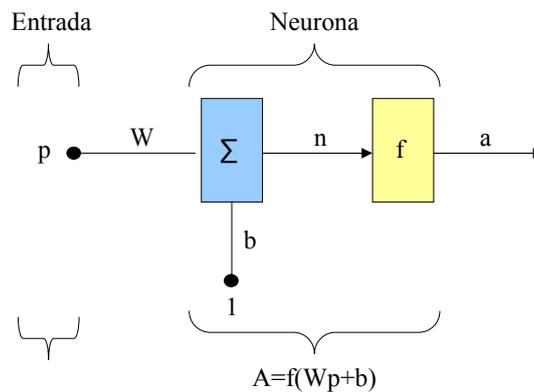


Figura 2.11 Modelo de neurona con una única entrada.

La entrada escalar “p” es transmitida a través de la conexión que multiplica su fuerza por el escalar peso “w” dado lugar al producto “wp”, de nuevo un escalar. A continuación se añade el bias “b” al producto “wp”, la misión del bias es reforzar la salida de la función de entrada. La entrada a la función de transferencia “n” está, por tanto, formada por la suma de la entrada pesada y el bias. “f” representa la función de transferencia, la cual toma el argumento “n” y genera la salida “a”. La función de transferencia puede ser lineal o no lineal y determina el nivel de activación de la neurona. Existen diferentes funciones de transferencia entre las cuales destacan las recogidas en la Tabla 2.2. Por último, señalar que tanto el peso como el bias son parámetros ajustables de la neurona. La idea central de las redes neuronales es modelar el comportamiento de la red mediante el ajuste de estos parámetros.

Tabla 2.2 Funciones de transferencia

| Función de transferencia | Relación entrada/salida | |
|-------------------------------|---|--------------------|
| Limitador fuerte. | $a = 0$ | $n < 0$ |
| | $a = 1$ | $n \geq 0$ |
| Limitador fuerte y simétrico. | $a = -1$ | $n < 0$ |
| | $a = +1$ | $n \geq 0$ |
| Lineal positiva. | $a = 0$ | $n < 0$ |
| | $a = n$ | $n \geq 0$ |
| Lineal. | $a = n$ | |
| Lineal saturada. | $a = 0$ | $n < 0$ |
| | $a = n$ | $0 \leq n \leq 1$ |
| | $a = 1$ | $n > 1$ |
| Lineal saturada y simétrica. | $a = -1$ | $n < -1$ |
| | $a = n$ | $-1 \leq n \leq 1$ |
| | $a = +1$ | $n > 1$ |
| Sigmoidal. | $a = \frac{1}{1 + e^{-n}}$ | |
| Tangente hiperbólica. | $a = \frac{e^n - e^{-n}}{e^n + e^{-n}}$ | |

Mecanismos de aprendizaje.

Las redes neuronales deben aprender a calcular la salida correcta para cada vector de entrada. Este proceso se denomina entrenamiento y el conjunto de datos usados para el aprendizaje se denomina datos de entrenamiento. El aprendizaje de una red neuronal consiste en la adaptación de los pesos y los bias, puesto que el resto de la red, es decir, su topología y las funciones de las neuronas permanecen constantes. Esta adaptación de los

pesos y los bias se pueden interpretar como la destrucción, modificación y creación de conexiones entre las neuronas que conforman la red. Se pueden distinguir dos métodos de aprendizaje importantes: aprendizaje supervisado y aprendizaje no supervisado.

Aprendizaje supervisado:

En el aprendizaje supervisado, el entrenamiento está controlado por un agente externo que determina la respuesta que debería proporcionar la red a partir de una entrada determinada. El agente externo controla la salida de la red y en caso de que ésta no sea la esperada, se procederá a modificar los pesos de las conexiones con el objetivo de mejorar la salida. Este tipo de aprendizaje puede llevarse a cabo de varias formas distintas:

- Aprendizaje por corrección de error: consiste en ajustar los pesos de las conexiones de la red en función del error cometido en la salida.
- Aprendizaje por refuerzo: se basa en no indicar durante el entrenamiento exactamente la salida que se desea que proporcione la red. En este caso la función del agente externo se reduce a indicar una señal de refuerzo si la salida obtenida en la red se ajusta a la deseada y en función de ello se ajustan los pesos basándose en un mecanismo de probabilidades.
- Aprendizaje estocástico: se realizan cambios aleatorios en los pesos de las conexiones de la red y se evalúa su efecto a partir del objetivo deseado y de distribuciones de probabilidad. El aprendizaje consistiría en realizar un cambio aleatorio de los valores de los pesos y evaluar los resultados de la red. Si son mejores, se acepta el cambio y si no lo son, se aceptará el cambio en función de una distribución de probabilidades previamente establecida.

Aprendizaje no supervisado:

En el otro extremo está el aprendizaje no supervisado, que no requiere de una influencia externa para ajustar los pesos de las conexiones de las neuronas. En este caso, la red no recibe ninguna información externa que le indique si la salida que está proporcionando es adecuada. El aprendizaje no supervisado suele realizarse de dos maneras:

- Aprendizaje hebbiano: se pretende medir la familiaridad o extraer características de los datos de entrada. Se fundamenta en que si dos neuronas toman el mismo estado de manera simultánea se potencia la conexión entre ambas.
- Aprendizaje competitivo y comparativo: se basa en la clasificación de los datos de entrada. Se fundamenta en comparar los nuevos patrones que recibe, así si el patrón pertenece a una clase conocida se procede a incluirla en ella lo que matizará la representación de la misma. Pero si no pertenece a ninguna clase conocida, se procede a un reajuste de la red para reconocer la nueva clase.

Otro criterio para diferenciar las reglas de aprendizaje se basa en considerar si la red puede aprender durante su funcionamiento habitual o si para ello tiene que haber una desconexión de la misma. Así en el primer caso se habla de un aprendizaje “on line” y en el segundo de un aprendizaje “off line”.

Elección del conjunto inicial de pesos.

Previo al proceso de entrenamiento hay que definir un estado inicial de la red, para ello se escoge un conjunto inicial de pesos para las conexiones existentes. Para la definición de este estado inicial se pueden seguir distintos criterios como, por ejemplo, asignarlos de manera aleatoria.

Finalización del proceso de aprendizaje.

Para dar por finalizado el proceso de aprendizaje hay que definir la condición de finalización. Una de las condiciones más usadas es detener el entrenamiento cuando el error cuadrático medio de todos los datos de entrenamiento ha alcanzado un valor mínimo. También se puede fijar como criterio de finalización que la red realice un determinado número de ciclos.

Validación de la red neuronal.

Una vez finalizado el proceso de aprendizaje, los pesos de las conexiones entre las neuronas quedan fijos. El siguiente paso es comprobar el funcionamiento de la red con esos valores para nuevos problemas con los que no ha sido entrenada. Al conjunto de datos necesario para realizar este proceso se le llama conjunto de validación. Este conjunto tiene los valores

de las variables de entrada y de salida pero ahora a la red no se le proporcionan los valores de salida. El proceso de validación consiste en comparar la solución calculada por la red con los valores de salida disponibles del conjunto de validación.

Topología de las redes neuronales.

Por topología de una red se entiende la organización y la disposición de las neuronas de ésta formado capas más o menos alejadas de la entrada y la salida de dicha red. Para definir la topología de la red los parámetros más importantes son el número de capas, el número de neuronas por capa y la conectividad entre las neuronas.

Atendiendo al número de capas podemos distinguir dos tipos. El primer tipo lo constituyen las redes monocapa, en este tipo de redes se establecen conexiones con las neuronas que pertenecen a la única capa que forma la red. Se utilizan para regenerar información de entrada que se presenta a la red de forma incompleta o distorsionada. El segundo tipo está formado por las redes multicapa, en este caso las neuronas se agrupan en varias capas. Para distinguir la capa a la que pertenece cada neurona hay que evaluar el origen de las señales que recibe y el destino de la señal de salida.

La conectividad entre las neuronas está relacionada con la manera en que las salidas de unas neuronas se transforman en las entradas de otras. De esta forma, la salida de una neurona puede ser una entrada de otra o ser entrada para ella misma (caso conocido como conexión autorecurrente). Cuando ninguna de las salidas de las neuronas de una capa es entrada de neuronas de esa misma capa o capas anteriores estamos ante una conexión hacia delante o feedforward. Cuando las salidas pueden ser entradas de neuronas de capas anteriores o de la misma capa se conoce como conexión hacia atrás o feedback.

Red basada en el algoritmo de retropropagación.

Es uno de los algoritmos más utilizados para aprendizaje supervisado con redes alimentadas hacia delante (Abdulbary et al. 1993, Riedmiller y Braun 1993). El algoritmo de retropropagación, surgido en los años 80, es un algoritmo de gradiente descendente (Demon y Beale, 2002). El término de retropropagación se refiere a la forma en que se propaga el error, que es de forma contraria al funcionamiento normal de la red. El funcionamiento de este algoritmo es el siguiente: cuando se introduce los datos de entrenamiento la red genera una salida, esta salida se compara con los reales proporcionados por el usuario y se procede

a calcular el error cuadrático medio de la misma. A continuación el error se propaga en sentido inverso desde la capa de salida hacia la capa de entrada. La señal de error se utiliza para realizar la actualización de los pesos y los bias de la entrada de cada neurona con objeto de minimizar el citado error cuadrático medio. El error que genera la red neuronal es un espacio de dimensión igual al número de pesos de conexión de la red, para realizar la minimización se evalúa el gradiente de error en un punto de esta superficie y se obtiene la dirección en la cual la función de error tiene una mayor reducción. Esto permite cumplir con la condición requerida para la actualización de los pesos del algoritmo de retropropagación. Al ser una técnica que se basa en el empleo del gradiente descendente es conveniente avanzar por la superficie de error con incrementos pequeños de los pesos, ya que se dispone de información local y se desconoce la distancia hasta el punto mínimo, por ello la selección de la velocidad de aprendizaje es muy importante. Si se escogen incrementos grandes podemos pasar por encima del punto mínimo, si se usan incrementos pequeños se evita esto pero se aumenta el tiempo de convergencia del algoritmo. El algoritmo de retropropagación no asegura que el mínimo encontrado por la red sea global, una vez se encuentre un mínimo sea global o local cesa el aprendizaje. No obstante, si la solución es adecuada, considerando para ello el error de la misma, no tiene demasiada relevancia si el mínimo es o no global.

La idea básica de este algoritmo es la aplicación repetida de la regla de la cadena para tener en cuenta la influencia de cada peso en la red con respecto a una función de error arbitraria E (Riedmiller y Braun, 1993):

$$\frac{\partial E}{\partial w_{ij}} = \frac{\partial E}{\partial s_i} \frac{\partial s_i}{\partial net_i} \frac{\partial net_i}{\partial w_{ij}} \quad [2.57]$$

Donde w_{ij} es el peso que va desde la neurona j hasta la neurona i , s_i es la salida y net_i es la suma pesada de las entradas a la neurona i . Una vez que la derivada parcial de cada peso es conocida, se puede minimizar la función de error mediante la aplicación del gradiente descendente.

$$w_{ij}(t+1) = w_{ij}(t) - \eta \frac{\partial E}{\partial w_{ij}}(t) \quad [2.58]$$

La elección de la tasa de aprendizaje, η , que barema la derivada, tiene una gran importancia en el tiempo que se necesita para lograr la convergencia. Si es demasiado pequeña se necesitan muchos pasos para lograr una solución aceptable y si es demasiado grande se puede producir oscilación impidiendo que el error disminuya por debajo de un cierto valor.

Una forma de evitar esto es introducir un término de momento:

$$\Delta w_{ij}(t) = -\eta \frac{\partial E}{\partial w_{ij}}(t) + \mu \cdot \Delta w_{ij}(t-1) \quad [2.59]$$

Donde el parámetro de momento, μ , regula la influencia de la etapa previa en la actual. Se considera que el término de momento proporciona mayor estabilidad al proceso y la convergencia en regiones planas de la función de error. Sin embargo, en la práctica, esto no se cumple en todas las ocasiones, ya que el valor óptimo de este parámetro también es función de la tasa de aprendizaje y no consigue mejorar los resultados.

Algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Aunque el algoritmo de retropropagación es fácil de implementar, flexible a la hora de aproximar cualquier función y es potente, se han desarrollado otros algoritmos que tratan de superar las limitaciones que presentaba. Entre ellos destaca el algoritmo de Levenberg-Marquardt (LM). A continuación se va a describir de manera resumida (una descripción matemática más detallada de este algoritmo se puede encontrar en Hagan y Menhaj (1994)). El algoritmo LM se diseñó como un algoritmo de optimización intermedio entre el método de Gauss-Newton y el algoritmo de gradiente descendiente, intentando superar las limitaciones de cada uno de ellos (Kermani et al., 2005).

El algoritmo de Gauss-Newton tiene excelentes propiedades de convergencia cuadrática, sin embargo estas propiedades dependen fuertemente de los valores iniciales de los pesos que se tomen. Si los valores iniciales no se escogen adecuadamente, este algoritmo diverge con facilidad, lo que supone una gran desventaja pues no es fácil escoger un conjunto apropiado de valores iniciales. Además, la precisión del algoritmo disminuye muchísimo una vez que se encuentra en las proximidades de un mínimo. Por otra parte, aunque el algoritmo de gradiente descendiente está limitado por una velocidad de convergencia

pequeña, muestra un excelente comportamiento en las proximidades del mínimo y su rendimiento no se ve afectado por el conjunto de valores iniciales de los pesos.

El algoritmo de Levenberg-Marquardt presenta las ventajas de los dos métodos mencionados anteriormente. Así este método usa el gradiente descendiente para eliminar el problema de la selección de los valores iniciales de los parámetros y se transforma en el método de Gauss-Newton cuando se aproxima al mínimo. Finalmente, cuando está muy próximo al mínimo, se vuelve a transformar en el algoritmo de gradiente descendiente para mejorar la exactitud (Kermani et al., 2005). Desde su creación los investigadores han usado el LM para ajustar curvas y otros muchos problemas de optimización. Este algoritmo se ha convertido en la primera elección a la hora de llevar a cabo optimizaciones gracias a sus excelentes propiedades.

La regla para optimizar los pesos de la red neuronal de acuerdo con el algoritmo de Gauss-Newton es:

$$\Delta w = -[\nabla^2 E(w)]^{-1} \cdot \nabla E(w) \quad [2.60]$$

Donde $\nabla^2 E(w)$ represente el Laplaciano de la función de energía y también se refiere a la matriz Hessiana. La matriz Hessiana se puede escribir como:

$$\nabla^2 E(w) = J^T(w) \cdot J(w) + S(w) \quad [2.61]$$

$$S(w) = \sum_{i=1}^N e_i(w) \cdot \nabla^2 e_i(w) \quad [2.62]$$

Donde el término $e_i(w)$ representa el vector de error de la red neuronal para patrón i y $J(w)$ representa la matriz Jacobina.

De manera similar a la expansión de series de Taylor, en el caso del algoritmo de Gauss-Newton, normalmente se asume que $S(w)$ es aproximadamente 0.

El término $S(w)$ recoge las segundas derivadas del error de la red con respecto a los pesos de la misma. Este término requiere mucha potencia de cálculo ya que el número de cálculos que hay que hacer se incrementa exponencialmente con el tamaño de la red. Combinando

las ecuaciones anteriores, la regla de actualización de los pesos para el método de Gauss-Newton es la siguiente:

$$\Delta w = -[J^T(w) \cdot J(w)]^{-1} \cdot J^T(w)e(w) \quad [2.63]$$

A partir de aquí la modificación de Levenberg-Marquardt queda como sigue:

$$\Delta w = -[J^T(w) \cdot J(w) + \lambda I]^{-1} \cdot J^T(w)e(w) \quad [2.64]$$

Señalar que cuando el parámetro λ es grande la ecuación anterior se aproxima a un gradiente descendente, mientras que cuando es pequeño se aproxima al método de Gauss-Newton. Adaptando este parámetro, el método LM puede operar entre ambos extremos y de esa manera combinar las ventajas y evitar las limitaciones de los dos algoritmos. La adaptación del parámetro λ se realiza de manera que cuando en un paso se produce un incremento de la función de energía, λ se multiplica por una constante mayor que la unidad para conducir el algoritmo hacia el algoritmo de gradiente descendente y obtener mayor estabilidad. En el caso contrario, es decir, si la función de energía disminuye, λ se multiplica por otra constante (la inversa de la anterior) para dirigirlo hacia el algoritmo de Gauss-Newton y ganar velocidad de convergencia. El criterio de parada de este algoritmo es similar al del algoritmo de retropropagación (Kermani et al. 2005).

2.5.2. Aplicación a procesos de membrana.

En términos de modelado, una de los principales inconvenientes que existe en el estudio de procesos de filtración tangencial es la dificultad de obtener modelos fenomenológicos que tengan en cuenta todos los factores que intervienen en el proceso. Uno de los motivos es que la transferencia de materia y los mecanismos de fouling todavía no se conocen bien. En la actualidad, los modelos existentes se basan o en hipótesis restrictivas que limitan su aplicabilidad a unos pocos casos simples, o en la utilización de parámetros ajustables que son difíciles de determinar experimentalmente o están expresados en términos de ecuaciones matemáticas complejas para las que una solución analítica no puede encontrarse (Agashichev 2001, Paris 2002 y Curcio 2005 a). Por ello, el uso de diferentes técnicas de modelado que, por medio de los algoritmos adecuados, analicen directamente las respuestas del sistema ante distintas entradas representan una alternativa a la hora de plantear modelos predictivos (Bowen et al, 1998 a). Las redes neuronales artificiales han demostrado ser un

instrumento predictivo para el modelado de sistemas dinámicos no lineales como los típicos de las aplicaciones de ingeniería. Además gracias a su capacidad para la generalización son capaces de resolver problemas que los métodos tradicionales no pueden afrontar (Hamachi et al. 1999). Las redes neuronales se han empleado con éxito en el modelado de la evolución dinámica de los procesos de membrana, permitiendo predecir el comportamiento del sistema en función de los parámetros de proceso. A continuación se resumen algunos de los trabajos realizados en este campo:

Dornier et al. (1995) trataron de establecer y validar el uso de redes neuronales para el modelado dinámico del fouling de membranas. Para ello, utilizaron datos de la filtración de jarabe de caña de azúcar en diferentes condiciones de operación. La membrana utilizada fue cerámica de tipo tubular, con un tamaño de poro medio de $1.4 \mu\text{m}$. Durante el diseño de la red neuronal se utilizaron como entradas la presión transmembrana y la velocidad tangencial y como salida se pretendió predecir la resistencia hidráulica. Los resultados obtenidos modelaban satisfactoriamente los efectos de las dos entradas.

Niemi et al. (1995) aplicaron la estrategia de redes neuronales para el modelado de la separación de alcohol etílico a partir de agua y ácido acético por ósmosis inversa y la purificación de efluentes de una planta de blanqueo de pulpa por ultrafiltración. La red neuronal se utilizó para estimar el flujo de filtrado y el rechazo, en función de una serie de variables de proceso (presión, concentración de soluto, temperatura y velocidad superficial de flujo). La red utilizada consistía en una única capa oculta, como métodos de entrenamiento usaron el método de Palosari y Bulsari (1993), y el método de Levenberg-Marquardt. Los resultados indicaron que la utilización de redes neuronales es adecuada incluso para ser utilizada con fines de diseño. También se vio que la predictibilidad de las redes era similar a la de los modelos teóricos pero reducía el tiempo de computación.

Piron et al. (1997) utilizaron redes neuronales en el estudio de microfiltración tangencial de levadura de panadería a través de una membrana tubular mineral con un tamaño de poro de $0.14 \mu\text{m}$. Se ensayaron dos concentraciones de levaduras a diferentes presiones transmembrana y velocidades tangenciales. Se recurrió a dos procedimientos, en el primero se consideró la aproximación de caja negra, que no necesita una descripción precisa del sistema y en el segundo se utilizó una aproximación semi-física para tener en cuenta el conocimiento previo existente. Como entradas a la red se consideraron la presión

transmembrana, la concentración de levadura, la velocidad tangencial y la resistencia hidráulica actual, como salida se obtenía la resistencia hidráulica para el siguiente tiempo de muestra. Para entrenar la red se recurrió a un algoritmo cuasi-newtoniano. Se apreció que la aproximación semi-física era más precisa, lo que indicó que la técnica de redes neuronales era adecuada como complemento a la utilización de modelos físicos.

Bowen et al. (1998 a) usaron redes neuronales para estudiar la dependencia con el tiempo del flujo en la ultrafiltración de suspensiones de partículas de sílice en diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y presión. Las membranas utilizadas fueron orgánicas de polietersulfona con un tamaño de corte de 30 kDa y se utilizaron 5 combinaciones diferentes de pH y fuerza iónica. La estrategia para abordar el tema fue usar redes neuronales con una capa oculta y pocos puntos de entrenamiento. Las redes utilizadas en este trabajo tenían cuatro entradas: presión, fuerza iónica, potencial zeta y tiempo, y una salida, el flujo. Se obtuvo un excelente resultado, obteniendo predicciones mejores que con los modelos físicos existentes para la ultrafiltración tangencial de coloides cargados.

Bowen et al. (1998 b) aplicaron la tecnología de redes neuronales para predecir la tasa de ultrafiltración de BSA en función del pH y la fuerza iónica. La red usada en este trabajo tenía una única capa oculta, y el número de neuronas de la misma se determinó por ensayo y error (probando con un número de neuronas que oscilaba entre 2-10). Se consiguieron excelentes predicciones con un número de datos de entrenamiento reducido. Se apreció que la calidad de datos de entrenamiento era de mayor importancia que el uso de una gran cantidad de datos. Finalmente, destacó que la red ofrecía unos resultados con errores medios inferiores al 2.7 %.

Delgrange et al. (1998) diseñaron una red neuronal para predecir la presión transmembrana al final de un ciclo de operación y el comienzo del siguiente con datos de las condiciones de operación y calidad del agua en una planta piloto de producción de agua potable por ultrafiltración con un módulo de fibras huecas de acetato de celulosa. Como entradas se consideraron el flujo de filtrado, la turbidez durante el ciclo y las medidas de presión al comienzo del ciclo y al final del ciclo previo. Se probaron distintas estructuras y arquitecturas de red, obteniéndose excelentes resultados. Las redes fueron capaces de modelar el efecto tanto del fouling reversible como del irreversible sobre las presiones, incluso sin considerar parámetros relacionados con materia inorgánica.

Hamachi et al. (1999) propusieron la utilización de redes neuronales para modelar la microfiltración tangencial de suspensiones de bentonita en función de distintas condiciones de operación. Se utilizaron redes con una única capa oculta y con un mecanismo de aprendizaje basado en un método cuasi-newtoniano. Como entradas a la red se escogieron la presión transmembrana, la velocidad tangencial y la concentración de la suspensión, mientras como salidas, la red proporcionaba el flujo de filtrado y el grosor del depósito. La red elaborada fue capaz de predecir la evolución de las salidas en función de las variables de entrada.

Bowen et al. (2000) utilizaron la estrategia de redes neuronales para la predicción del rechazo de sales tanto de manera individual como en mezcla en una membrana de nanofiltración. La red utilizada era híbrida ya que se usaron conocimientos de otros modelos más detallados a la hora de seleccionar las entradas a la red. Los datos experimentales se obtuvieron con una membrana con un tamaño de corte de 150-300 Da para moléculas orgánicas no cargadas. La red escogida tenía una única capa oculta, las entradas fueron la presión aplicada, el pH y para cada sal implicada la difusividad, la concentración y la valencia del ión, y como salidas se obtenían los rechazos de los diferentes iones. Los resultados fueron muy buenos. Las predicciones para las sales filtradas de manera individual y en mezclas eran comparables con las obtenidas usando modelos físicos e incluso en ocasiones mejores.

Razavi et al. (2003 a) desarrollaron un modelo basado en redes neuronales para la predicción dinámica del flujo de filtrado, la resistencia hidráulica total y el rechazo de solutos en la ultrafiltración tangencial de leche desnatada en función de la presión transmembrana y la temperatura. Los datos experimentales se obtuvieron usando una membrana de polisulfona amida de 20 kDa. Los resultados experimentales mostraron que tanto la resistencia hidráulica como el rechazo (excepto para la proteína) aumentaban con el tiempo para cada valor de presión y temperatura, mientras el flujo disminuía para las mismas condiciones. Al aumentar la presión a temperatura constante se producía un aumento del flujo, la resistencia y el rechazo, sin embargo el aumento de la temperatura a presión constante no tenía ningún efecto significativo sobre el flujo de filtrado, la resistencia y el rechazo. Se usó una red con una única capa oculta que tenía como entradas la presión transmembrana, la temperatura y el tiempo y como salidas el flujo de filtrado y la resistencia hidráulica. Los resultados mostraron que las redes neuronales se pueden usar

para predecir el rendimiento en la ultrafiltración de leche con arquitecturas sencillas y usando un pequeño número de datos de entrenamiento ya que los errores medios eran menores del 1%.

Razavi et al. (2003 b) estudiaron el empleo de la estrategia de redes neuronales para el modelado dinámico de la ultrafiltración tangencial de leche desnatada. Con la red se pretendía predecir el flujo de filtrado, la resistencia hidráulica y el rechazo de los componentes de la leche en función de la presión transmembrana y el tiempo del proceso. Como en el trabajo anterior, para obtener los datos experimentales se usó una membrana de polisulfona amida con un tamaño de corte de 20 kDa. Se observó que el flujo de filtrado para cada presión probada disminuía con el tiempo de manera significativa mientras que la resistencia aumentaba. Al aumentar la presión, tanto el flujo como la resistencia aumentaban significativamente. En cuanto al rechazo de los componentes, éste aumentaba de manera importante con el tiempo para cada presión ensayada, con la excepción de la proteína que permanecía prácticamente constante. El aumento de la presión sólo condujo a un pequeño aumento del rechazo de cada componente. A la hora de diseñar la red neuronal se plantearon como puntos de partida el uso de pequeñas cantidades de datos para el entrenamiento, una selección racional de los datos de entrenamiento y el uso de redes simples. Como entradas se consideraron la presión transmembrana y el tiempo y como salidas se distinguieron dos casos, en el primero fueron el flujo de filtrado y la resistencia hidráulica y en el segundo 5 rechazos. Se probaron distintas estructuras con varias capas ocultas y distinto número de neuronas. Los resultados mostraron que la evolución con el tiempo del proceso estudiado se podía predecir con la utilización de una red con una única capa oculta, un pequeño número de datos de entrenamiento y una adecuada selección de los mismos. También se observó su capacidad de interpolación obteniendo excelentes resultados.

Shetty et al. (2003) aplicaron las redes neuronales a la eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos mediante nanofiltración de aguas de distinta naturaleza. La red utilizada estaba formada por dos capas ocultas y como técnica de aprendizaje se utilizó el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Como entradas a la red se utilizaron el flujo de filtrado, la recuperación de agua de alimentación, la velocidad tangencial, la fuerza iónica, el pH, la concentración del contaminante objetivo y el coeficiente de difusividad de fase acuosa. La salida proporcionada por la red era la razón entre la concentración en el filtrado y en la

alimentación de cada contaminante. La proximidad entre los resultados experimentales y los proporcionados por la red demostraron que las redes neuronales se podían usar para predecir la calidad del agua filtrada mediante nanofiltración de aguas municipales.

Shetty y Cellam (2003) desarrollaron una red neuronal para predecir el fouling a largo plazo en membranas de nanofiltración empleadas para tratar suministros de agua contaminados. Los parámetros de la red fueron escogidos para considerar todos los parámetros físicamente significativos. La red constaba de una única capa oculta y se entrenó mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Las entradas elegidas fueron: el caudal de entrada, el flujo de filtrado para experimentos a flujo constante, la presión transmembrana para experimentos a presión constante, la temperatura (si se cambiaba), el caudal de agua de alimentación, el tiempo de operación, el pH, la fuerza iónica y la absorbancia ultravioleta a 254 nm. Con todas esas entradas, la red predecía la resistencia total de filtración. Los resultados mostraron errores absolutos relativos menores al 5% para el 93% de los datos predichos, usando solo el 10% de los datos experimentales para el entrenamiento. Esto demostró que las redes neuronales se podían aplicar con éxito a sistemas de gran complejidad química.

Abbas y Al-Bastaki (2005) se plantearon como objetivo el desarrollo de una red neuronal que predijese el comportamiento de una unidad de ósmosis inversa. Para ello se consideraron tres factores claves de operación: la temperatura de la alimentación, la presión y la concentración de sal, los cuales se usaban para alimentar a la red con objeto de predecir la tasa de producción de agua. Los rangos de operación se escogieron de manera que fuesen similares a los que se pueden encontrar en unidades similares funcionando en la realidad. Como algoritmo de optimización se utilizó el de Levenberg-Marquardt. En este trabajo se comprobó la habilidad de la red tanto para interpolar como para extrapolar, observándose que a la hora de interpolar la red era muy precisa pero no ocurría lo mismo cuando extrapolaba.

Aydimer et al. (2005) modelaron los flujos obtenidos durante la eliminación de fosfatos en disoluciones acuosas por microfiltración tangencial mediante membranas de acetato de celulosa y nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 45 μm . Para ello utilizaron tanto la técnica de redes neuronales como el modelo de la renovación superficial de Koltuniewicz. Los resultados mostraron que todas las condiciones experimentales se podían modelar de

manera adecuada mediante el empleo de las redes neuronales, sin embargo no ocurría lo mismo con la técnica de Koltuniewicz. Las entradas utilizadas para las redes neuronales fueron: dosis de cenizas volátiles, concentración de fosfatos, presión transmembrana y tipo de membrana. Se probaron dos arquitecturas distintas obteniendo para ambos casos correlaciones entorno a 0.99.

Curcio et al. (2005 b) utilizaron un modelo basado en redes neuronales con objeto de predecir el comportamiento de la ultrafiltración en condiciones de operación pulsantes. Los experimentos de ultrafiltración se llevaron a cabo con BSA y membranas de polietersulfona con un tamaño de corte de 20 kDa en un módulo plano. Se empleó la técnica de prueba y error con objeto de identificar la mejor red, finalmente se obtuvo que la utilización de una red formada por una capa de entrada, dos capas ocultas (de seis y tres neuronas respectivamente) y una de salida era la más adecuada. Se observó que la red era capaz de predecir el comportamiento del sistema con gran precisión dentro del rango estudiado. El error relativo nunca excedió el 4.6 %. La red propuesta permitía incluso la determinación de una secuencia de pulsos que maximizaba el flujo de filtrado de la instalación.

Chellam (2005) estudiaron la aplicación de redes neuronales para el modelado del fouling producido en las membranas por suspensiones polidispersas durante microfiltración. Las membranas utilizadas eran de PVDF y policarbonato con un tamaño de corte de 0.1 μm . Se probaron distintos tipos de redes pero todas con una capa de entrada, una capa oculta y una de salida. Como algoritmo de aprendizaje se utilizó el de Levenberg-Marquardt. Como variables de entrada se consideraron todas las que podían influir en el fouling. La red predijo con gran precisión la evolución del flujo con el tiempo para distintas suspensiones y un amplio rango de parámetros hidrodinámicos.

Chen y Kim (2006) investigaron la utilización de redes neuronales de base radial para interpretar la disminución del flujo de filtrado durante microfiltración tangencial de sólidos en suspensión. Como entradas de la red se utilizaron el tamaño de partícula, la fuerza iónica, el pH, la presión transmembrana y el tiempo de filtración. Los resultados mostraron que el flujo de filtrado era correctamente modelado por este tipo de red con gran precisión y utilizando pocos puntos de entrenamiento.

Mhurchú y Foley (2006) midieron la resistencia específica y el flujo estacionario a través de tortas de filtración formadas durante la filtración en modo dead-end por levadura de

panadero en distintas condiciones de presión, pH, fuerza iónica, concentración de células y resistencia de membranas. Las membranas utilizadas fueron de polisulfona con tamaños de poro de 0.2 y 0.45 μm . La resistencia específica mostró una dependencia lineal con la presión y una relación más complicada con el pH y la fuerza iónica. La red utilizada tenía una única capa oculta con nueve neuronas y se utilizó el algoritmo de Levenberg-Marquardt para el entrenamiento. La red proporcionó un excelente resultado con un error medio inferior al 10 %. Se realizó una interpretación de los pesos de las conexiones de la red con objeto de conocer el efecto relativo de cada parámetro de entrada sobre las salidas, los resultados mostraron las tendencias que se esperaban según los conocimientos disponibles.

2.6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Con los antecedentes descritos anteriormente, se hace patente el interés científico e industrial que tiene el desarrollo de procesos efectivos para la purificación y el fraccionamiento de proteínas. Como se ha descrito, hasta el momento, las técnicas utilizadas a nivel de laboratorio (intercambio iónico, cromatografía por afinidad o precipitación selectiva) no han resultado viables para su implantación a nivel industrial ya que presentan difícil escalado, alto coste y bajo rendimiento.

Por otra parte, en 1997 surge la filtración tangencial de alta resolución (HPTFF). Esta técnica de separación con membranas se basa en una adecuada selección del pH y de la fuerza iónica de la disolución con el objeto de maximizar las diferencias en el volumen hidrodinámico de especies cargadas. La alteración del volumen hidrodinámico posibilita el fraccionamiento de solutos de similar peso molecular mediante el empleo de membranas con un tamaño de poro adecuado. Los estudios realizados en este campo están poniendo de manifiesto la capacidad de esta técnica y su potencial aplicabilidad para la purificación de proteínas a gran escala.

En este contexto, el objetivo global de la línea de investigación es el estudio de la filtración tangencial de alta resolución como técnica para el fraccionamiento de proteínas. Enmarcados en este objetivo global, los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1. Estudio experimental de la técnica de filtración tangencial de alta resolución con proteínas modelo:** Para ello se han seleccionado tres proteínas con diferente tamaño y punto isoeléctrico: BSA (peso molecular 69 kDa y punto isoeléctrico 4.9), β -lactoglobulina (peso molecular 18.3 kDa y punto isoeléctrico 5.2) y lisozima (peso molecular 14.3 kDa y punto isoeléctrico 10.7). Se estudiarán los sistemas unitarios, binarios y ternario, analizándose la influencia del tamaño de poro, pH, fuerza iónica, velocidad de circulación y presión transmembrana en la evolución del caudal de filtrado y transferencia de proteína.
- 2. Análisis de las interacciones electrostáticas y estéricas:** Los resultados experimentales obtenidos se discutirán en función del punto de carga cero de la

membrana y del punto isoeléctrico de la/s proteína/s poniendo de manifiesto las interacciones electrostáticas y estéricas que tienen lugar.

- 3. Modelización:** Se ensayarán modelos matemáticos mecanísticos y empíricos que permitan la predicción del caudal de filtrado y de la transmisión de proteína durante el proceso de filtración.

Este estudio ha sido realizado gracias al proyecto de investigación: “Fraccionamiento de proteínas mediante filtración tangencial de alta resolución” (PPQ2002-2235) del Plan Nacional I+D+i (2000-2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROTEÍNAS MODELO

Las proteínas utilizadas en el presente trabajo son: β -lactoglobulina, BSA y lisozima. Todas ellas han sido proporcionadas por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) con una pureza superior al 90%, 96% y 95% respectivamente.

3.1.1. β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina (Figura 3.1) es la proteína mayoritaria en el lactosuero, aproximadamente 3 g/L, lo que representa más del 50% de la fracción proteica del mismo (Verheul et al., 1999). En la leche bovina, se encuentran presentes sus isoformas A y B en proporciones similares. Estas isoformas sólo se diferencian en dos aminoácidos (Mulvihill y Donovan, 1987). El monómero de esta proteína está formado por 162 aminoácidos, su secuencia se describe en la Tabla 3.1. Tiene una masa molecular de 18.3 kDa y su punto isoelectrico es de 5.2 (Zydney, 1998). La β -lactoglobulina se asocia de forma reversible y esta asociación está muy influenciada por la condiciones del medio (Verheul et al., 1999). A temperatura ambiente y en condiciones similares a las de la leche, la proteína se encuentra mayoritariamente en forma dímera. Por debajo de pH 3.5, el dímero se disocia en unidades monoméricas; la disociación se ve favorecida por bajas concentraciones de proteína, baja fuerza iónica, pH bajo y un aumento de la temperatura. Para valores de pH superiores a 7.5 el dímero también se disocia en monómeros, aunque por encima de pH 8 se induce una agregación irreversible de la proteína que es dependiente del tiempo.

Tabla 3.1 Secuencia de aminoácidos de la β -lactoglobulina.

| |
|---|
| LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDL EILLQKWENGECQAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKYLLFCME NSAEPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI |
|---|



Figura 3.1 β -lactoglobulina.

La β -lactoglobulina se usa en la industria confitera ya que es mejor estabilizador de espumas que otras proteínas (Cayot y Lorient, 1997). Aunque su función exacta no se conoce bien, ha mostrado capacidad para unirse a muchos tipos de ligandos orgánicos, incluyendo dodecilsulfato, retinol y ácidos grasos (Remard et al., 1998). Esto ha suscitado mucho interés y ha dado lugar a trabajos con el objeto de conocer sus propiedades funcionales para su aplicación en la industria agroalimentaria.

3.1.2. BSA

La seroalbúmina bovina (BSA) (Figura 3.2) está presente en el lactosuero en una concentración de 0.4 g/L, tiene un peso molecular de 69 kDa y un punto isoeléctrico entre 4.7-4.9 (Zydney, 1998). Es una de las proteínas más estudiadas, en la Tabla 3.2. se describe su secuencia de aminoácidos. La BSA puede agregarse en función del pH, así se ha visto que para valores de pH entre 4 y 6, la molécula forma agregados, de los cuales un 20 % aparecen en forma de dímeros (Kanal et al., 1994). Esta asociación de la BSA ha sido estudiada mediante la técnica de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), habiendo determinado su constante de disociación (Levi y González Flecha, 2002).

Tabla 3.2 Secuencia de aminoácidos de la BSA

```
DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVA  
DESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDS  
PDLPKLKPDPNTLCDEFKADEKKFWGKLYEIIARRHPYFYAPELLYYANKYNG  
VFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVA  
RLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTI  
SSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAF  
LGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKHLHL  
VDEPQNLIKQNCQDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVG  
TRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTCCTESLVNRRPCFS  
ALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQL  
KTMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA
```



Figura 3.2 BSA

La BSA tiene interés en un gran número de aplicaciones tanto terapéuticas como de la industria agroalimentaria por su capacidad espumante, de gelación y su capacidad para unirse a un gran número de ligandos.

3.1.3. Lisozima

Esta proteína (Figura 3.3) representa el 4 % del contenido proteico presente en la albúmina del huevo. Su peso molecular es de 14.3 kDa y su punto isoelectrico es 10.7 (Lucas et al.,

1998). En la Tabla 3.3 se recoge su secuencia de aminoácidos. Se ha observado que la lisozima sufre autoasociación en función del pH de la disolución, así a pH inferiores a 4 sólo existe la forma monomérica, en el rango de pH comprendido entre 4 y 6.5 hay una aparición de especies asociadas que coexisten con los monómeros y a partir de pH 6.5 la proporción entre monómeros y especies asociadas no varía. A concentraciones muy bajas de lisozima (< 0.0001 M) las especies asociadas son dímeros (Nesmelova y Fedetov, 1998).

Tabla 3.3 Secuencia de aminoácidos de la lisozima

| |
|---|
| KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTD |
| YGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMNA |
| WVAWRNRCKGTDVQAWIRGRL |



Figura 3.3 Lisozima

Se trata de una enzima (EC 3.2.1.17) de gran importancia a nivel comercial. En tecnología alimentaria se usa como un potente agente antibacteriano en productos derivados de la leche y en la producción de vino. También tiene un importante campo de aplicación en la industria farmacéutica como medicamento para el tratamiento de úlceras e infecciones. Su uso potencial como agente anticancerígeno ha sido recientemente demostrado y se ha estudiado su empleo en el tratamiento de las infecciones HIV (Yakup et al., 2005).

3.2. MEMBRANAS

Para el desarrollo de esta investigación se han utilizado membranas cerámicas tubulares, modelo Inside Céram[®] 25 (Figura 3.4), suministradas por la casa TAMI (Nyons, Francia). Las membranas están formadas por un soporte tubular de 10 mm de diámetro, con tres canales de 3.6 mm de diámetro hidráulico, una longitud de 250 mm y un área superficial de 0.0094 m². El soporte está formado por óxidos de aluminio, titanio y circonio, mientras que para la capa activa se usa óxido de titanio. Estas membranas están preparadas para operar en condiciones extremas: 10 bar de presión, 350 °C y pH en el intervalo 0-14. Los tamaños de corte de las membranas empleadas están comprendidos entre 50 KDa y 300 KDa. El módulo utilizado para alojar la membrana está fabricado en acero inoxidable 316L, con juntas de silicona y conexiones clamp (DN 38 para el retenido y 4/6 mm para el filtrado).

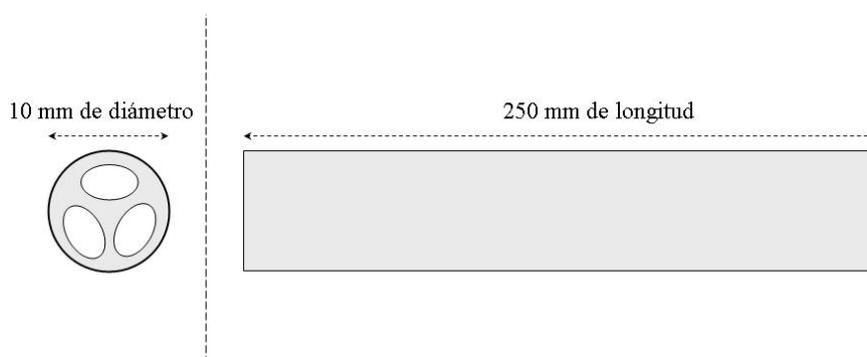
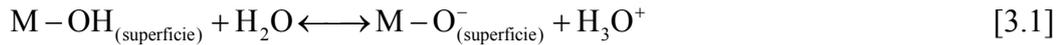


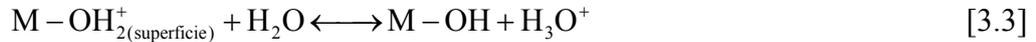
Figura 3.4 Membrana cerámica

Se ha trabajado con membranas cerámicas debido a las ventajas que presentan sobre las membranas orgánicas: son más resistentes a productos químicos, se pueden utilizar en un rango amplio de temperaturas y pH, soportan altos límites de presión y tienen una larga vida de operación. Por otra parte, se han empleado módulos tubulares porque son muy adecuados debido a su fácil limpieza, posibilidad de aceptar fluidos cargados en partículas (ya que el diámetro del tubo es grande en términos relativos) y la simplicidad en su instalación y reemplazo (Martínez, 1999). Estos módulos tubulares permiten escalar el proceso con fiabilidad (Cui et al., 1997) y para el caso concreto de las membranas cerámicas, requieren menos superficie que las configuraciones planas en idénticas condiciones, gracias a la diferencia en las velocidades de circulación que se dan entre ambas (Grangeon y Lescoche, 2000).

Las membranas inorgánicas presentan un comportamiento anfótero debido a que poseen puntos en su superficie que pueden ionizarse en disolución acuosa. Las reacciones involucradas en la creación de cargas superficiales en función del pH son (Ricq et al., 1996; Abrabri et al., 1998):



$$K_{A1} = \frac{[M-O^-]_{(superficie)} [H_3O^+]}{[M-OH]_{(superficie)}} \quad [3.2]$$



$$K_{A2} = \frac{[M-OH]_{(superficie)} [H_3O^+]}{[M-OH_2^+]_{(superficie)}} \quad [3.4]$$

Debido a estas reacciones, puede aparecer en la superficie de la membrana un exceso de cargas positivas o negativas. A causa de ello, la membrana tendrá una carga neta que puede ser de distinto signo en función del pH. Este fenómeno es de gran importancia en la filtración de proteínas, pues la existencia de una membrana con carga neta da lugar a que se produzcan interacciones electrostáticas entre la membrana y las proteínas que, al igual que la membrana, presentan una carga neta variable en función del pH. Estas interacciones, que pueden ser de naturaleza atractiva o repulsiva, afectan a la colmatación de la membrana y a la forma en la que se aproximan las proteínas a la misma. Existe un valor de pH para el cual la membrana presenta una densidad de carga superficial igual a cero. Este valor es conocido como punto de carga cero (pzc). Para valores de pH superiores al punto de carga cero, los grupos hidroxilo de la superficie de la membrana se encuentran desprotonados por lo que la membrana presenta una carga neta negativa, mientras que para valores inferiores, los grupos hidroxilo están protonados y la membrana presenta una carga neta positiva.

Para la determinación del punto de carga cero de las membranas utilizadas en la investigación se ha seguido el método propuesto por Mullet et al. (1999). Este método

consiste en recircular agua Milli-Q a un pH determinado a través de la membrana, registrándose la evolución de pH con el tiempo desde el valor inicial hasta que éste alcance un valor constante. El experimento se repite para distintos valores de pH inicial, representándose el incremento de pH en función del valor de pH inicial. El punto de carga cero viene dado por aquel valor de pH inicial que permanece constante con el tiempo.

Para la aplicación del método se fijaron las siguientes condiciones de operación: 30 °C, 400 L/h de caudal de retenido y presión transmembrana de 1 bar. El seguimiento de la variación del valor de pH se realizó con un Titrino (Metrohm 718 STAT Titrino, Suiza). Los resultados mostraron que el punto de carga cero se encontraba a un valor de pH de 7 (de la Casa et al., 2007)

3.3. DISPOSITIVO DE FILTRACIÓN

En las Figura 3.5 y 3.6 se esquematiza y muestra el dispositivo utilizado para el desarrollo de la fase experimental:

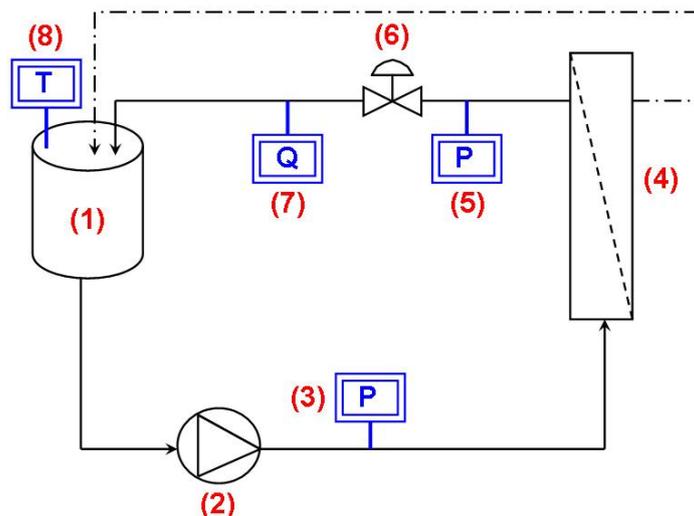


Figura 3.5 Dispositivo de filtración.

El montaje se compone de un tanque termostatzado de acero inoxidable con agitación (1), que incorpora un control de temperatura (8). Para termostatzar el tanque se utiliza un baño (Clifton NE4, Reino Unido). La temperatura de trabajo se visualiza con un termómetro digital (Hanna Instrument HI 98509, USA). Para hacer circular la disolución a través de todo el circuito, se usa una bomba de desplazamiento positivo (2) (motor de 0.56 kw y cabezal Procon, USA) cuya velocidad puede ajustarse mediante un variador de frecuencia (Omron Sysdrive 3G3JV Inverter, USA). De esta manera, se envía la alimentación hasta el módulo de membrana (4). Del módulo se obtienen dos corrientes: la corriente de retenido (línea sólida) y la corriente de filtrado (línea punteada). Ambas son recirculadas de nuevo al tanque de alimentación. En la corriente de alimentación se coloca un manómetro analógico (3) (Wika, 1-60 psi, USA) que permite medir la presión en la entrada del módulo de membrana. En la corriente de retenido se coloca un caudalímetro magnético (7) (Badger-Meter Type Food Primo V11, Alemania), un manómetro (5) (Wika, 1-60 psi, USA) para medir la presión en la salida del módulo de membrana y una válvula de membrana (6) que

permite regular la presión. La corriente de filtrado está abierta y su caudal se determina midiendo la masa recogida a lo largo de un tiempo determinado mediante una balanza electrónica (Mettler Toledo PB 1502-S, Suiza).



Figura 3.6 Fotografía del dispositivo de filtración

3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1. Disoluciones unitarias

Forma de operación.

La forma de operación constaba de 3 etapas:

1. Acondicionamiento de la membrana: se recirculaba agua Milli-Q en las condiciones de pH y temperatura de trabajo durante 10 minutos.
2. Filtración: Se procedía a la filtración de la disolución trabajando a recirculación total. Se establecieron las siguientes condiciones de operación: temperatura de 30 °C para evitar fenómenos de desnaturalización, presión transmembrana de 1 bar que permite trabajar dentro de la zona de operación controlada por la presión, una velocidad de circulación de 3.3 m/s que se corresponde con un caudal de retenido de 400 L/h y que proporciona un régimen turbulento para minimizar la capa de polarización. Se monitorizó la evolución del caudal de filtrado con el tiempo. A intervalos de tiempo seleccionados se tomaron muestras de 1.5 mL de retenido y filtrado para la cuantificación de la concentración de proteína y el cálculo de la transmisión.
3. Limpieza: Teniendo en cuenta la naturaleza de la suciedad depositada en la membrana, el material cerámico y las limitaciones impuestas por el mismo, para la limpieza de la membrana se pueden utilizar: una disolución de NaOH (hasta 15-20 g/L, 85 °C) a la que se le añade un agente surfactante, sodio dodecil sulfato (hasta 2 g/L) con objeto de eliminar la suciedad de origen orgánico y biológico; una disolución de ácido nítrico (hasta 5 mL/L, 50 °C) para eliminar la suciedad producida por las sales inorgánicas; una disolución de NaOH (hasta 15 g/L, 25 °C) con cloro activo (hasta 300 ppm.) para eliminar microorganismos y desinfectar.

De acuerdo con lo anterior, el protocolo de limpieza establecido en esta investigación fue:

1. Prelavado con agua destilada para eliminar restos de la disolución de trabajo.

2. Lavado con una disolución de NaOH (Panreac, España) a una concentración de 20 g/L y SDS (Panreac, España) a una concentración de 2 g/L, a 350 L/h, 50°C y 1 bar de presión, durante un tiempo máximo de 150 minutos.
3. Enjuague con agua destilada hasta la neutralidad tanto del retenido como del filtrado.
4. En caso de no alcanzar el valor de referencia se realizaba un lavado con ácido nítrico del 60% (2.5 mL/L) a 350 L/h, 50 °C y 1 bar durante un tiempo de 10 minutos.
5. Enjuague con agua destilada hasta neutralidad tanto del retenido como del filtrado.
6. Repetición de las etapas 2 a 5 si procedía, hasta recuperar las condiciones filtrantes iniciales de la membrana.

Los experimentos se llevaron a cabo con disoluciones de β -lactoglobulina, BSA y lisozima en agua Milli-Q a una concentración de 0.25 g/L de proteína teniendo en cuenta la riqueza.

Influencia del pH.

Para estudiar el efecto del pH en la filtración de cada proteína se realizaron experimentos en el intervalo de pH comprendido entre 3-12. El ajuste del pH se realizó con HCl o NaOH (Panreac, España) y un pH-metro (Crison micropH 2001, sonda 52-02, Italia).

Influencia de la fuerza iónica.

En el estudio de la influencia de la fuerza iónica, se analizó el efecto de la concentración de NaCl en el rango de concentraciones 0-20 mM. Como pH de trabajo se escogió el punto isoeléctrico de cada proteína. La elección del cloruro sódico se justifica por no alterar el punto de carga cero de la membrana cerámica (Mullet et al., 1999).

3.4.2. Mezcla de proteínas

Forma de operación.

La forma de operación coincide con la descrita para las disoluciones unitarias salvo que en las condiciones de filtración se varió el caudal de alimentación y la presión transmembrana

con el objeto de estudiar su efecto sobre la filtración. Los experimentos se llevaron a cabo con disoluciones de proteína en agua Milli-Q, a una concentración total de proteína de 0.25 g/L teniendo en cuenta la riqueza de cada una de las proteínas. La membrana utilizada fue la de 300 kDa de tamaño de corte.

Influencia del pH.

Para estudiar la influencia del pH se llevaron a cabo experimentos para el rango de pH comprendido entre 4 y 7. El ajuste del pH se realizó de la misma manera que en el caso de las disoluciones unitarias.

Influencia de la fuerza iónica.

En el estudio de la influencia de la fuerza iónica se analizó el efecto de la concentración de NaCl realizando los siguientes experimentos: 0 mM y 5 mM. Como pH de trabajo se escogió pH 5.

Influencia del caudal de alimentación.

Se realizaron los siguientes experimentos a pH 5: 300 L/h, 400 L/h y 500 L/h.

Influencia de la presión transmembrana.

En este caso el pH de trabajo seleccionado, al igual que en los dos casos anteriores, fue 5 y se probaron los siguientes valores de presión transmembrana (expresada en bar): 0.5, 1, 1.5.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.

Disoluciones unitarias.

La cuantificación de la proteína se realizó por espectrofotometría ultravioleta-visible mediante un espectrofotómetro Heλios α (Thermo Electronic, USA). Para cada proteína se determinó la longitud de onda a la que tenía lugar la máxima absorbancia. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se eligió 280 nm como la longitud de onda a emplear, valor que está abalado por varias referencias bibliográficas (Marshall et al., 1997; Nyström et al., 1998). En el caso de la β-lactoglobulina y la BSA, se observó que el pH de la muestra influía en la absorbancia. Para eliminar este efecto, las medidas se realizaron con un buffer a pH 7 en una proporción de 1 parte de disolución por 3 de buffer. Se realizaron rectas de calibrado para las proteínas a la longitud de onda seleccionada y para un rango de concentración comprendido entre 0 y 0.4 g/L.

Mezclas de proteínas.

Para la determinación de la concentración de proteína en las muestras de filtrado y retenido de las mezclas se usó cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. El método empleado fue el descrito por Elgar et al. (2000) y posteriormente extendido por Palmano y Elgar (2002). El sistema de cromatografía líquida de alta resolución (Waters, Milford MA, USA) estaba formado por un módulo de separación Alliance 2690 interconectado con un detector de absorbancia M-474 y un sistema de adquisición y manipulación de datos Millenium. La columna utilizada fue una Resource RPC de 1 mL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) que trabajaba a temperatura ambiente y a un caudal de 1 mL/min.

Antes de pasar al cromatógrafo, las muestras se filtraban a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.22 μm. Los solventes eran filtrados con filtros de membrana Durapore de 0.45 μm y desgasificados .

El procedimiento requería la utilización de dos solventes, el solvente A estaba compuesto por ácido trifluoroacético (ATF) al 0.1 % v/v en agua Milli-Q y el solvente B estaba compuesto por ATF al 0.09 % v/v, 90 % v/v acetonitrilo y el resto agua Milli-Q. Tanto el ATF como el acetonitrilo eran de grado HPLC (Scharlau Chemie, Barcelona, España). La

columna se equilibraba con un 80% de solvente A. Después se usaba el gradiente descrito en la Tabla 3.4. Se realizaron rectas de calibrado a la longitud de onda de 214 nm y para un rango de concentración comprendido entre 0 y 0.4 g/L de cada proteína.

Tabla 3.4 Gradiente utilizado en los análisis.

| Tiempo (minutos) | Solvente B (%) |
|-------------------------|-----------------------|
| 0-1 | 20 |
| 1-6 | 20-40 |
| 6-16 | 40-45 |
| 16-19 | 45-50 |
| 19-20 | 50 |
| 20-23 | 50-70 |
| 23-24 | 70-100 |
| 24-25 | 100 |
| 25-27 | 100-20 |
| 27-30 | 20 |

3.6. REDES NEURONALES ARTIFICIALES

La implementación de las redes neuronales se llevó a cabo mediante el empleo módulo para redes neuronales de MATLAB 6.5.

3.6.1. Arquitectura de la red

Se empleó una red alimentada hacia delante con una única capa oculta. La razón de no usar varias capas ocultas es que, de acuerdo con la teoría de la aproximación universal, únicamente se necesita una capa oculta con un adecuado número de neuronas (Bowen et al., 2000). Puesto que, a priori, es muy difícil conocer cual es ese número de neuronas adecuado para la capa oculta se decidió variarlo entre 5 y 60 en intervalos de 5.

A la hora de elegir las funciones de transferencia, se observó que la única combinación que era adecuada para todas las redes propuestas era la formada por la función sigmoideal (ecuación 3.5) en la capa oculta y la lineal saturada simétrica (ecuación 3.6) en la capa de salida.

$$a = \frac{1}{1 + e^{-n}} \quad [3.5]$$

$$\begin{aligned} a &= -1 & n &< -1 \\ a &= n & -1 &\leq n \leq 1 \\ a &= +1 & n &> 1 \end{aligned} \quad [3.6]$$

3.6.2. Variables de entrada y salida

Se plantearon cinco redes con distinto número de entradas y salidas:

- Red para el caudal de filtrado de lisozima considerando los dos tamaños de corte utilizados. Esta red consta de 4 entradas (tamaño de corte, pH, fuerza iónica, tiempo) y una salida (caudal de filtrado).
- Red para la transmisión observada de lisozima, tiene las mismas entradas que la anterior y como salida la transmisión observada.

- Red para el sistema β -lactoglobulina-300 kDa. La red consta de 3 entradas (pH, fuerza iónica y tiempo) obteniéndose 2 salidas (transmisión observada y caudal de filtrado).
- Red para el caudal de filtrado del sistema binario β -lactoglobulina-BSA, que consta de 5 entradas (presión transmembrana, caudal de retenido, pH, fuerza iónica y tiempo) para obtener una salida (caudal de filtrado).
- Red para la transmisión del sistema binario con 7 entradas (presión transmembrana, caudal de retenido, peso molecular y punto isoeléctrico de la proteína, pH, fuerza iónica y tiempo) y una salida (transmisión observada).

3.6.3. Algoritmo de aprendizaje

El algoritmo de aprendizaje utilizado en todas las redes fue el de Levenberg-Marquardt, cuya regla de actualización viene dada por:

$$\Delta w = -[J^T(w) \cdot J(w) + \lambda I]^{-1} \cdot J^T(w) e(w) \quad [3.7]$$

Cuando el parámetro λ es grande el algoritmo Levenberg-Marquardt se aproxima al método de gradiente descendente, mientras que cuando es pequeño se aproxima al método de Gauss-Newton.

Los valores de los parámetros del algoritmo se indican a continuación:

- $\lambda=1$.
- $\lambda_{DEC}=0.8$, indica el valor por el que se multiplica λ cuando el error cuadrático medio se reduce en la etapa.
- $\lambda_{INC}=1.5$, indica el valor por el que se multiplica λ cuando el error cuadrático medio aumenta en la etapa.
- $\lambda_{MAX}=1 \cdot 10^{10}$, indica el valor máximo que puede alcanzar λ , cuando este valor es alcanzado el algoritmo se detiene.
- Número máximo de interacciones 10000.

- Valor objetivo a conseguir por el el error cuadrático medio: 0.
- Tiempo máximo del aprendizaje: infinito.
- Número máximo de fallos: 10, indica el número máximo de iteraciones en las que el error de validación puede aumentar de forma consecutiva antes de que se detenga el proceso de aprendizaje para evitar sobre ajuste.

Como método de mejora de la generalización se ha usado early stopping. En esta técnica los datos se dividen en tres conjuntos: entrenamiento, validación y prueba. El conjunto de entrenamiento se usa para computar el gradiente y actualizar los pesos y los bias de la red. El conjunto de validación se utiliza para calcular el error de validación, que es monitorizado durante todo el proceso de entrenamiento. Este error descenderá en la fase inicial al igual que lo hace el error de entrenamiento, sin embargo, cuando la red comienza a sobre ajustar los datos, el error de validación aumenta. Cuando el error de validación se incrementa en un determinado número de iteraciones consecutivas, el entrenamiento se detiene y los pesos y los bias adquieren el valor que tenían cuando se alcanzó el mínimo del error de validación. El error del conjunto de prueba no se usa durante el entrenamiento pero se suele usar para comparar diferentes modelos. Es conveniente representar el error de prueba durante el entrenamiento pues si éste alcanza un mínimo en una iteración muy distinta a la de error de validación indica una pobre división de los datos. Al usar early stopping y un algoritmo de convergencia rápida, el manual de MATLAB 6.5 recomienda definir los parámetros del algoritmo de manera que se ralentice la convergencia ($\lambda=1$, $\lambda_{DEC}=0.8$ y $\lambda_{INC}=1.5$).

3.6.4. Funcionamiento de la red

A continuación se describe brevemente el funcionamiento del programa:

- Se cargan los datos experimentales.
- Se procede a la normalización de los mismos de manera que queden comprendidos en el rango [-1,1]. La normalización se lleva a cabo con el siguiente algoritmo:

$$v_N = \frac{2(v - \min)}{(\max - \min)} - 1 \quad [3.8]$$

Donde v_N es el valor normalizado, v el valor sin normalizar, \min y \max los valores mínimo y máximo respectivamente del conjunto a normalizar.

- Se realizan 30 entrenamientos para cada red. De manera previa a cada entrenamiento se procede a la agrupación de los datos en tres conjuntos de forma aleatoria: El conjunto de entrenamiento que contiene el 70 % de los datos, el conjunto de validación con el 15% y el de prueba con los datos restantes. De esta manera los datos usados cada vez para el entrenamiento de la red son diferentes, lo que garantiza que no existe sesgo en la elección de los datos usados en cada conjunto.
- Para cada entrenamiento de la red, se simulan las salidas y se desnormalizan. El algoritmo de desnormalización es el siguiente:

$$v = 0.5(v_N + 1)(\max - \min) + \min \quad [3.9]$$

4. RESULTADOS

4.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

Con objeto de cumplir con los objetivos planteados, el primer paso fue la selección de la membrana con el tamaño de corte adecuado, es decir, que permitiese el paso de proteína en el punto isoeléctrico de la misma. Para llevar a cabo esta fase, se realizaron experimentos con disoluciones unitarias de proteína y los tamaños de corte que se indican a continuación:

- BSA: 300 kDa y 0.14 μm .
- β -lactoglobulina: 50 kDa, 150 kDa y 300 kDa.
- Lisozima: 50 kDa, 150 kDa y 300 kDa.

En la selección de los tamaños de corte se tuvo en cuenta el peso molecular de las proteínas implicadas (BSA 69 kDa, β -lactoglobulina 18.3 kDa, lisozima 14.3 kDa).

Los experimentos revelaron que la BSA sólo pasaba a través de la membrana de 0.14 μm , sistema que ya ha sido estudiado por De la casa (2006). En el caso de la β -lactoglobulina, se encontró que únicamente transmitía por la membrana de 300 kDa a pesar de que su peso molecular es de 36.6 kDa (en forma dímera). Finalmente, la lisozima pasó por todos los tamaños de corte, aunque fue para la membrana de 300 kDa cuando se produjo el paso de una cantidad importante de proteína.

A la vista de los resultados anteriores se seleccionó la membrana de 300 kDa como la más adecuada para realizar el estudio tanto de los sistemas unitarios, binarios como del ternario. Adicionalmente se decidió realizar el estudio de la lisozima con la membrana de 50 kDa con la finalidad de observar el comportamiento de este sistema caracterizado por presentar efectos estéricos mucho más importantes.

4.1.1. Tratamiento de los resultados

Durante el desarrollo de la investigación, los experimentos se monitorizaron mediante el seguimiento de la evolución temporal del caudal de filtrado (Q_F) y las concentraciones en retenido (C_R) y filtrado (C_{Fa}) de las proteínas objeto de estudio. No obstante, es necesario trabajar estos datos para obtener otros datos secundarios necesarios para el entendimiento del proceso. Seguidamente se detallan los datos secundarios que se van a calcular:

Transmisión observada.

La transmisión observada se calcula como el cociente entre la concentración a la salida de la cámara de filtrado y la concentración de retenido:

$$Tr(\%) = \frac{C_{Fa}}{C_R} \cdot 100 \quad [4.1]$$

Caudales o flujos de filtrado relativos.

Para poder calcular el caudal o flujo de filtrado relativo, es necesario conocer el caudal de filtrado a tiempo cero (Q_{F0}). Ante esta situación, surgen dos posibilidades, o bien se puede usar el caudal de filtrado del agua pura a través de la membrana completamente limpia o bien se obtiene mediante extrapolación de los datos experimentales para $t=0$. Los resultados obtenidos de ambas formas son muy diferentes, lo indica que durante los dos primeros minutos de experimento se produce una fuerte colmatación de la membrana que condiciona la evolución de la filtración. Puesto que se quiere estudiar el proceso con detalle y es importante interpretar lo que ocurre en los momentos iniciales, se utilizará como caudal de filtrado a tiempo cero el caudal del agua pura obtenido en las condiciones de operación (Jones et al., 2001). Los caudales o flujos relativos en cada instante se calculan por tanto de la siguiente forma:

$$\frac{Q_F}{Q_{F0}} = \frac{J_F}{J_{F0}} \quad [4.2]$$

Volumen de filtrado.

Se calcula a partir de la integración numérica de los datos de caudal:

$$V_F = \int_0^t Q_F dt \quad [4.3]$$

Concentración de filtrado.

Las concentraciones de filtrado medidas experimentalmente no se corresponden con las que se producen en la salida de la membrana, se corresponden con las de salida de la cámara de filtrado, y éstas se ven afectadas por el proceso de mezcla que tiene lugar en dicha cámara.

Para eliminar este efecto, y si se admite que en la cámara de filtrado se produce mezcla perfecta y se utiliza la función E de distribución de edades de salida:

$$E = \exp(-\theta) = \exp\left(-\frac{V_F}{V_{CF}}\right) \quad [4.4]$$

donde V_{CF} es el volumen de la cámara de filtrado (28.3 mL).

Por tanto, la fracción de la corriente de salida de la cámara más joven que θ es la que aporta la proteína a la corriente de salida:

$$\int_0^{\theta} E d\theta = \int_0^{\theta} \exp(-\theta) d\theta = 1 - \exp(-\theta) = 1 - \exp\left(-\frac{V_F}{V_{CF}}\right) \quad [4.5]$$

Se puede considerar que la concentración de salida de proteína es el resultado de la mezcla de esta fracción, cuya concentración es la que existe a la salida de la membrana, con el resto presente en la cámara:

$$C_F = \frac{C_{Fa}}{1 - \exp\left(-\frac{V_F}{V_{CF}}\right)} \quad [4.6]$$

Donde C_F es la concentración a la salida de la membrana y C_{Fa} es la concentración medida experimentalmente. Esta corrección se hace despreciable para tiempos grandes.

Masa de proteína depositada en la membrana.

Es interesante conocer la evolución temporal de la masa total de proteína que se deposita en la membrana. Esta masa se calcula restándole a la masa de proteína inicial, las masas correspondientes a las muestras recogidas y la contenida en los volúmenes de retenido y filtrado (ecuación 4.7):

$$M_d = M - V_R C_R - V_{Fil} C_{Fa} \quad [4.7]$$

Donde M_d es la masa depositada, M es la masa de proteína en cada instante, V_{Fil} es el volumen del circuito de filtrado y V_R es el volumen de retenido.

La masa de proteína en cada instante se calcula considerando la masa retirada por la toma de muestras. Para ello, se tiene en cuenta que el volumen de cada muestra recogida es de 1.5 mL:

$$M = M_0 - 0.0015 C_0 - 0.0015 \sum C_R - 0.0015 \sum C_{Fa} \quad [4.8]$$

El volumen del circuito de filtrado está constituido por el volumen de la cámara de filtrado (28.3 mL) y el capilar de salida que recircula el filtrado al depósito de alimentación (11 mL), por tanto el volumen del circuito de filtrado es de 39.3 mL.

El volumen de retenido se calcula como el volumen inicial menos el volumen del circuito de filtrado y el volumen de las muestras retiradas. El volumen inicial (V_i) es la suma del volumen de la cámara de filtrado y de la disolución que se filtra: 1.0283 L.

$$V_R = V_i - V_{Fil} - 0.0015 \cdot n \quad [4.9]$$

donde n es el número de muestras tomadas. En el caso del cálculo de V_R a tiempo cero, V_{Fil} tendrá un valor de 28.3 mL pues en ese instante el capilar de salida está vacío.

Masa de proteína transportada a través de la membrana.

Finalmente se calculará la masa de proteína que ha pasado por la membrana en función del tiempo mediante la siguiente ecuación:

$$M_{PM} = \int_0^t Q_F C_F dt \quad [4.10]$$

4.2. SISTEMAS EXPERIMENTALES

Una vez explicada la forma de tratar los datos experimentales se procede a detallar los resultados obtenidos para cada sistema estudiado.

4.2.1. Sistema Lisozima-membrana de 50 kDa

En este sistema se estudiaron los efectos del pH y la fuerza iónica sobre la filtración de lisozima a través de una membrana de 50 kDa. Las condiciones de operación elegidas fueron las siguientes:

- Temperatura: 30 °C.
- Masa de proteína: 0.25 g.
- Volumen inicial: 1 L.
- Caudal de retenido: 400 L/h.
- Presión transmembrana de 1 bar.

Los experimentos realizados se listan en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1 Experimentos Lisozima-50 kDa.

| Experimento | pH | Fuerza iónica, mM |
|--------------------|-----------|--------------------------|
| L50-5-0 | 5 | 0 |
| L50-6-0 | 6 | 0 |
| L50-7-0 | 7 | 0 |
| L50-8-0 | 8 | 0 |
| L50-9-0 | 9 | 0 |
| L50-10-0 | 10 | 0 |
| L50-10.7-0 | 10.7 | 0 |
| L50-10.7-1 | 10.7 | 1 |
| L50-10.7-2 | 10.7 | 2 |
| L50-10.7-5 | 10.7 | 5 |
| L50-10.7-10 | 10.7 | 10 |
| L50-10.7-15 | 10.7 | 15 |
| L50-12-0 | 12 | 0 |

Los resultados obtenidos para estos experimentos se detallan a continuación:

Resultados

Flujos relativos y volumen de filtrado.

Tabla 4.2 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-5-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.56 | 1.000 | 0 |
| 2 | 37.50 | 0.757 | 87.1 |
| 4 | 37.50 | 0.757 | 162.1 |
| 6 | 37.50 | 0.757 | 237.1 |
| 8 | 37.50 | 0.757 | 312.1 |
| 10 | 37.50 | 0.757 | 387.1 |
| 12 | 35.29 | 0.712 | 459.9 |
| 14 | 35.29 | 0.712 | 530.4 |
| 16 | 35.29 | 0.712 | 601.0 |
| 18 | 35.29 | 0.712 | 671.6 |
| 20 | 34.62 | 0.698 | 741.5 |
| 25 | 33.33 | 0.673 | 911.4 |
| 30 | 31.58 | 0.637 | 1073.7 |
| 35 | 30.00 | 0.605 | 1227.6 |
| 40 | 30.00 | 0.605 | 1377.6 |
| 45 | 28.57 | 0.576 | 1524.1 |
| 50 | 28.57 | 0.576 | 1666.9 |
| 55 | 27.27 | 0.550 | 1806.5 |
| 60 | 27.27 | 0.550 | 1942.9 |

Tabla 4.3 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-6-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 37.5 | 0.757 | 87.1 |
| 4 | 37.5 | 0.757 | 162.1 |
| 6 | 35.3 | 0.712 | 234.9 |
| 8 | 33.3 | 0.673 | 303.5 |
| 10 | 33.3 | 0.673 | 370.2 |
| 12 | 31.6 | 0.637 | 435.1 |
| 14 | 31.6 | 0.637 | 498.2 |
| 16 | 30.0 | 0.605 | 559.8 |
| 18 | 30.0 | 0.605 | 619.8 |
| 20 | 28.6 | 0.576 | 678.4 |
| 25 | 27.3 | 0.550 | 818.0 |
| 30 | 26.1 | 0.526 | 951.4 |
| 35 | 24.0 | 0.484 | 1076.6 |
| 40 | 23.1 | 0.466 | 1194.3 |
| 45 | 23.1 | 0.466 | 1309.7 |
| 50 | 22.2 | 0.448 | 1422.9 |
| 55 | 21.4 | 0.432 | 1532.1 |
| 60 | 20.7 | 0.417 | 1637.3 |

Resultados

Tabla 4.4 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-7-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 37.5 | 0.757 | 87.1 |
| 4 | 33.3 | 0.673 | 157.9 |
| 6 | 33.3 | 0.673 | 224.6 |
| 8 | 31.6 | 0.637 | 289.5 |
| 10 | 31.6 | 0.637 | 352.6 |
| 12 | 30.0 | 0.605 | 414.2 |
| 14 | 30.0 | 0.605 | 474.2 |
| 16 | 30.0 | 0.605 | 534.2 |
| 18 | 28.6 | 0.576 | 592.8 |
| 20 | 27.3 | 0.550 | 648.6 |
| 25 | 27.3 | 0.550 | 785.0 |
| 30 | 26.1 | 0.526 | 918.4 |
| 35 | 26.1 | 0.526 | 1048.8 |
| 40 | 25.0 | 0.504 | 1176.5 |
| 45 | 25.0 | 0.504 | 1301.5 |
| 50 | 24.0 | 0.484 | 1424.0 |
| 55 | 23.1 | 0.466 | 1541.7 |
| 60 | 23.1 | 0.466 | 1657.1 |

Tabla 4.5 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-8-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 37.5 | 0.757 | 87.1 |
| 4 | 31.6 | 0.637 | 156.1 |
| 6 | 29.0 | 0.586 | 216.8 |
| 8 | 26.1 | 0.526 | 271.9 |
| 10 | 26.1 | 0.526 | 324.0 |
| 12 | 25.0 | 0.504 | 375.1 |
| 14 | 24.0 | 0.484 | 424.1 |
| 16 | 24.0 | 0.484 | 472.1 |
| 18 | 23.1 | 0.466 | 519.2 |
| 20 | 22.2 | 0.448 | 564.5 |
| 25 | 21.4 | 0.432 | 673.6 |
| 30 | 20.0 | 0.404 | 777.2 |
| 35 | 19.4 | 0.391 | 875.6 |
| 40 | 18.8 | 0.378 | 970.9 |
| 45 | 18.2 | 0.367 | 1063.2 |
| 50 | 17.6 | 0.356 | 1152.8 |
| 55 | 17.1 | 0.346 | 1239.7 |
| 60 | 17.1 | 0.346 | 1325.4 |

Resultados

Tabla 4.6 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-9-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 26.1 | 0.526 | 75.6 |
| 4 | 24.0 | 0.484 | 125.7 |
| 6 | 23.1 | 0.466 | 172.8 |
| 8 | 21.4 | 0.432 | 217.3 |
| 10 | 21.4 | 0.432 | 260.2 |
| 12 | 21.4 | 0.432 | 303.0 |
| 14 | 20.7 | 0.417 | 345.2 |
| 16 | 20.7 | 0.417 | 386.5 |
| 18 | 20.7 | 0.417 | 427.9 |
| 20 | 20.7 | 0.417 | 469.3 |
| 25 | 20.0 | 0.404 | 571.0 |
| 30 | 19.4 | 0.391 | 669.4 |
| 35 | 19.4 | 0.391 | 766.2 |
| 40 | 18.8 | 0.378 | 861.4 |
| 45 | 18.8 | 0.378 | 955.2 |
| 50 | 18.2 | 0.367 | 1047.5 |
| 55 | 18.2 | 0.367 | 1138.4 |
| 60 | 17.6 | 0.356 | 1228.0 |

Tabla 4.7 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-10-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 9.0 | 0.182 | 58.6 |
| 4 | 7.8 | 0.158 | 75.4 |
| 6 | 6.9 | 0.140 | 90.1 |
| 8 | 6.7 | 0.135 | 103.7 |
| 10 | 6.4 | 0.130 | 116.8 |
| 12 | 6.2 | 0.125 | 129.5 |
| 14 | 6.0 | 0.121 | 141.7 |
| 16 | 5.8 | 0.117 | 153.5 |
| 18 | 5.8 | 0.117 | 165.1 |
| 20 | 5.8 | 0.117 | 176.7 |
| 25 | 5.6 | 0.113 | 205.3 |
| 30 | 5.5 | 0.110 | 233.0 |
| 35 | 5.3 | 0.107 | 259.8 |
| 40 | 5.3 | 0.107 | 286.3 |
| 45 | 5.1 | 0.104 | 312.4 |
| 50 | 5.1 | 0.104 | 338.1 |
| 55 | 5.1 | 0.104 | 363.8 |
| 60 | 5.1 | 0.104 | 389.6 |

Resultados

Tabla 4.8 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-10.7-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 4.6 | 0.093 | 54.2 |
| 4 | 4.4 | 0.090 | 63.2 |
| 6 | 4.1 | 0.083 | 71.8 |
| 8 | 3.9 | 0.078 | 79.8 |
| 10 | 3.8 | 0.076 | 87.5 |
| 12 | 3.8 | 0.076 | 95.0 |
| 14 | 3.8 | 0.076 | 102.5 |
| 16 | 3.6 | 0.073 | 109.8 |
| 18 | 3.6 | 0.073 | 117.1 |
| 20 | 3.6 | 0.073 | 124.4 |
| 25 | 3.3 | 0.067 | 141.8 |
| 30 | 3.3 | 0.067 | 158.5 |
| 35 | 3.2 | 0.065 | 174.9 |
| 40 | 3.2 | 0.064 | 190.9 |
| 45 | 3.1 | 0.062 | 206.5 |
| 50 | 3.0 | 0.061 | 221.7 |
| 55 | 2.9 | 0.059 | 236.5 |
| 60 | 2.9 | 0.058 | 251.0 |

Tabla 4.9 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-10.7-1.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 4.8 | 0.097 | 54.4 |
| 4 | 4.3 | 0.086 | 63.4 |
| 6 | 4.1 | 0.083 | 71.9 |
| 8 | 3.9 | 0.078 | 79.9 |
| 10 | 3.8 | 0.076 | 87.5 |
| 12 | 3.8 | 0.076 | 95.0 |
| 14 | 3.8 | 0.076 | 102.5 |
| 16 | 3.6 | 0.073 | 109.9 |
| 18 | 3.5 | 0.071 | 117.1 |
| 20 | 3.5 | 0.071 | 124.1 |
| 25 | 3.4 | 0.069 | 141.5 |
| 30 | 3.3 | 0.067 | 158.4 |
| 35 | 3.2 | 0.065 | 174.9 |
| 40 | 3.2 | 0.064 | 190.9 |
| 45 | 3.1 | 0.062 | 206.4 |
| 50 | 3.0 | 0.061 | 221.6 |
| 55 | 2.9 | 0.059 | 236.5 |
| 60 | 2.9 | 0.058 | 250.9 |

Resultados

Tabla 4.10 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-10.7-2.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 5.0 | 0.101 | 54.6 |
| 4 | 4.6 | 0.093 | 64.2 |
| 6 | 4.3 | 0.086 | 73.1 |
| 8 | 4.4 | 0.090 | 81.8 |
| 10 | 4.3 | 0.086 | 90.5 |
| 12 | 4.1 | 0.083 | 99.0 |
| 14 | 4.1 | 0.083 | 107.2 |
| 16 | 4.0 | 0.081 | 115.4 |
| 18 | 4.0 | 0.081 | 123.4 |
| 20 | 4.0 | 0.081 | 131.4 |
| 25 | 4.0 | 0.081 | 151.4 |
| 30 | 3.9 | 0.078 | 171.1 |
| 35 | 3.6 | 0.073 | 189.8 |
| 40 | 3.5 | 0.071 | 207.7 |
| 45 | 3.5 | 0.071 | 225.4 |
| 50 | 3.4 | 0.069 | 242.8 |
| 55 | 3.3 | 0.067 | 259.7 |
| 60 | 3.2 | 0.065 | 276.1 |

Tabla 4.11 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-10.7-5.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 5.5 | 0.110 | 55.0 |
| 4 | 5.0 | 0.101 | 65.5 |
| 6 | 4.8 | 0.097 | 75.3 |
| 8 | 4.8 | 0.097 | 84.9 |
| 10 | 4.6 | 0.093 | 94.3 |
| 12 | 4.6 | 0.093 | 103.5 |
| 14 | 4.4 | 0.090 | 112.6 |
| 16 | 4.3 | 0.086 | 121.3 |
| 18 | 4.3 | 0.086 | 129.9 |
| 20 | 4.3 | 0.086 | 138.5 |
| 25 | 4.1 | 0.083 | 159.5 |
| 30 | 4.0 | 0.081 | 179.9 |
| 35 | 3.9 | 0.078 | 199.5 |
| 40 | 3.8 | 0.076 | 218.6 |
| 45 | 3.6 | 0.073 | 237.1 |
| 50 | 3.5 | 0.071 | 255.0 |
| 55 | 3.5 | 0.071 | 272.6 |
| 60 | 3.4 | 0.069 | 290.0 |

Resultados

Tabla 4.12 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-10.7-10.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 9.5 | 0.191 | 59.0 |
| 4 | 9.5 | 0.191 | 78.0 |
| 6 | 9.0 | 0.182 | 96.5 |
| 8 | 9.0 | 0.182 | 114.5 |
| 10 | 9.0 | 0.182 | 132.5 |
| 12 | 8.6 | 0.173 | 150.0 |
| 14 | 8.6 | 0.173 | 167.2 |
| 16 | 8.2 | 0.165 | 183.9 |
| 18 | 8.2 | 0.165 | 200.3 |
| 20 | 7.8 | 0.158 | 216.3 |
| 25 | 7.5 | 0.151 | 254.6 |
| 30 | 7.2 | 0.145 | 291.4 |
| 35 | 6.9 | 0.140 | 326.7 |
| 40 | 6.7 | 0.135 | 360.6 |
| 45 | 6.4 | 0.130 | 393.4 |
| 50 | 6.2 | 0.125 | 425.0 |
| 55 | 6.0 | 0.121 | 455.5 |
| 60 | 6.0 | 0.121 | 485.5 |

Tabla 4.13 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-10.7-15.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 8.2 | 0.165 | 57.7 |
| 4 | 8.2 | 0.165 | 74.1 |
| 6 | 8.1 | 0.163 | 90.4 |
| 8 | 8.2 | 0.165 | 106.6 |
| 10 | 7.8 | 0.158 | 122.6 |
| 12 | 7.8 | 0.158 | 138.3 |
| 14 | 7.5 | 0.151 | 153.6 |
| 16 | 7.5 | 0.151 | 168.6 |
| 18 | 7.2 | 0.145 | 183.3 |
| 20 | 7.2 | 0.145 | 197.7 |
| 25 | 6.9 | 0.140 | 233.0 |
| 30 | 6.4 | 0.130 | 266.4 |
| 35 | 6.4 | 0.130 | 298.5 |
| 40 | 6.2 | 0.125 | 330.1 |
| 45 | 6.0 | 0.121 | 360.6 |
| 50 | 6.0 | 0.121 | 390.6 |
| 55 | 5.8 | 0.117 | 420.2 |
| 60 | 5.6 | 0.113 | 448.7 |

Resultados

Tabla 4.14 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L50-12-0.

| t, minutos | Q_F , mL/min | J_F/J_{F0} | V_F , mL |
|---------------|-------------------|--------------|------------|
| 0 | 49.6 | 1.000 | 0 |
| 2 | 28.6 | 0.576 | 78.1 |
| 4 | 28.6 | 0.576 | 135.3 |
| 6 | 27.3 | 0.550 | 191.1 |
| 8 | 27.3 | 0.550 | 245.7 |
| 10 | 27.3 | 0.550 | 300.2 |
| 12 | 27.3 | 0.550 | 354.8 |
| 14 | 27.3 | 0.550 | 409.3 |
| 16 | 26.1 | 0.526 | 462.7 |
| 18 | 26.1 | 0.526 | 514.8 |
| 20 | 26.1 | 0.526 | 567.0 |
| 25 | 26.1 | 0.526 | 697.4 |
| 30 | 26.1 | 0.526 | 827.9 |
| 35 | 25.0 | 0.504 | 955.6 |
| 40 | 25.0 | 0.504 | 1080.6 |
| 45 | 25.0 | 0.504 | 1205.6 |
| 50 | 25.0 | 0.504 | 1330.6 |
| 55 | 25.0 | 0.504 | 1455.6 |
| 60 | 25.0 | 0.504 | 1580.6 |

Concentración de filtrado, transmisión observada, masa depositada y masa transportada.

A continuación, se muestran los datos de concentración de proteína en retenido y filtrado, además de las correcciones, la transmisión observada, la masa depositada y la masa transportada a través de la membrana calculadas como se indicó en el apartado de tratamiento de los datos experimentales. Debido a que los tiempos de toma de muestras y los de medida del caudal de filtrado no coinciden siempre, los datos de volumen de filtrado necesarios se han obtenido por interpolación lineal en los datos experimentales.

Resultados

Tabla 4.15 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L50-5-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.232 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2321 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.226 | 0.000 | 43.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2317 | 0.0097 | 0.0000 |
| 3 | 0.225 | 0.000 | 124.6 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2314 | 0.0104 | 0.0000 |
| 5 | 0.226 | 0.000 | 199.6 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2310 | 0.0104 | 0.0000 |
| 7 | 0.227 | 0.000 | 274.6 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2307 | 0.0095 | 0.0000 |
| 9 | 0.226 | 0.000 | 349.6 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2304 | 0.0110 | 0.0000 |
| 11 | 0.226 | 0.000 | 423.5 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2300 | 0.0110 | 0.0000 |
| 13 | 0.226 | 0.000 | 495.2 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.2297 | 0.0113 | 0.0000 |
| 15 | 0.226 | 0.000 | 565.7 | 0.000 | 0.00 | 0.964 | 0.2293 | 0.0121 | 0.0000 |
| 20 | 0.228 | 0.000 | 741.5 | 0.000 | 0.00 | 0.961 | 0.2290 | 0.0104 | 0.0000 |
| 25 | 0.228 | 0.000 | 911.4 | 0.000 | 0.00 | 0.958 | 0.2287 | 0.0108 | 0.0000 |
| 30 | 0.228 | 0.000 | 1073.7 | 0.000 | 0.00 | 0.955 | 0.2283 | 0.0107 | 0.0000 |
| 45 | 0.228 | 0.000 | 1524.1 | 0.000 | 0.00 | 0.952 | 0.2280 | 0.0115 | 0.0000 |
| 60 | 0.228 | 0.000 | 1942.9 | 0.000 | 0.00 | 0.949 | 0.2276 | 0.0118 | 0.0000 |

Tabla 4.16 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L50-6-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.232 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2321 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.226 | 0.000 | 43.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2317 | 0.0097 | 0.0000 |
| 3 | 0.225 | 0.000 | 124.6 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2314 | 0.0104 | 0.0000 |
| 5 | 0.227 | 0.000 | 198.5 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2310 | 0.0088 | 0.0000 |
| 7 | 0.226 | 0.000 | 269.2 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2307 | 0.0103 | 0.0000 |
| 9 | 0.224 | 0.000 | 336.8 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2304 | 0.0122 | 0.0000 |
| 11 | 0.225 | 0.000 | 402.6 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2300 | 0.0118 | 0.0000 |
| 13 | 0.225 | 0.000 | 466.6 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.2297 | 0.0121 | 0.0000 |
| 15 | 0.232 | 0.000 | 529.0 | 0.000 | 0.00 | 0.964 | 0.2293 | 0.0062 | 0.0000 |
| 20 | 0.226 | 0.000 | 678.4 | 0.000 | 0.00 | 0.961 | 0.2290 | 0.0124 | 0.0000 |
| 25 | 0.226 | 0.000 | 818.0 | 0.000 | 0.00 | 0.958 | 0.2287 | 0.0123 | 0.0000 |
| 30 | 0.226 | 0.000 | 951.4 | 0.000 | 0.00 | 0.955 | 0.2283 | 0.0123 | 0.0000 |
| 45 | 0.226 | 0.000 | 1309.7 | 0.000 | 0.00 | 0.952 | 0.2280 | 0.0126 | 0.0000 |
| 60 | 0.226 | 0.000 | 1637.3 | 0.000 | 0.00 | 0.949 | 0.2276 | 0.0130 | 0.0000 |

Tabla 4.17 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L50-7-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.232 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2321 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.226 | 0.000 | 43.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2317 | 0.0089 | 0.0000 |
| 3 | 0.228 | 0.000 | 122.5 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2314 | 0.0072 | 0.0000 |
| 5 | 0.228 | 0.000 | 191.2 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2310 | 0.0080 | 0.0000 |
| 7 | 0.229 | 0.000 | 257.0 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2307 | 0.0075 | 0.0000 |
| 9 | 0.228 | 0.000 | 321.1 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2303 | 0.0087 | 0.0000 |
| 11 | 0.229 | 0.000 | 383.4 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2300 | 0.0082 | 0.0000 |
| 13 | 0.229 | 0.000 | 444.2 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.2297 | 0.0086 | 0.0000 |
| 15 | 0.228 | 0.000 | 504.2 | 0.000 | 0.00 | 0.964 | 0.2293 | 0.0101 | 0.0000 |
| 20 | 0.233 | 0.000 | 648.6 | 0.000 | 0.00 | 0.961 | 0.2290 | 0.0054 | 0.0000 |
| 25 | 0.230 | 0.000 | 785.0 | 0.000 | 0.00 | 0.958 | 0.2286 | 0.0084 | 0.0000 |
| 30 | 0.230 | 0.000 | 918.4 | 0.000 | 0.00 | 0.955 | 0.2283 | 0.0084 | 0.0000 |
| 45 | 0.233 | 0.000 | 1301.5 | 0.000 | 0.00 | 0.952 | 0.2279 | 0.0060 | 0.0000 |
| 60 | 0.234 | 0.000 | 1657.1 | 0.000 | 0.00 | 0.949 | 0.2276 | 0.0052 | 0.0000 |

Resultados

Tabla 4.18 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L50-8-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.230 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2296 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.224 | 0.000 | 43.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2293 | 0.0089 | 0.0000 |
| 3 | 0.226 | 0.000 | 121.6 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2290 | 0.0076 | 0.0000 |
| 5 | 0.226 | 0.000 | 186.4 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2286 | 0.0075 | 0.0000 |
| 7 | 0.226 | 0.000 | 244.3 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2283 | 0.0075 | 0.0000 |
| 9 | 0.227 | 0.000 | 298.0 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2279 | 0.0074 | 0.0000 |
| 11 | 0.226 | 0.000 | 349.6 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2276 | 0.0090 | 0.0000 |
| 13 | 0.227 | 0.000 | 399.6 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.2273 | 0.0081 | 0.0000 |
| 15 | 0.229 | 0.000 | 448.1 | 0.000 | 0.00 | 0.964 | 0.2269 | 0.0061 | 0.0000 |
| 20 | 0.229 | 0.000 | 564.5 | 0.000 | 0.00 | 0.961 | 0.2266 | 0.0068 | 0.0000 |
| 25 | 0.227 | 0.000 | 673.6 | 0.000 | 0.00 | 0.958 | 0.2262 | 0.0091 | 0.0000 |
| 30 | 0.229 | 0.000 | 777.2 | 0.000 | 0.00 | 0.955 | 0.2259 | 0.0075 | 0.0000 |
| 45 | 0.228 | 0.000 | 1063.2 | 0.000 | 0.00 | 0.952 | 0.2255 | 0.0087 | 0.0000 |
| 60 | 0.229 | 0.000 | 1325.4 | 0.000 | 0.00 | 0.949 | 0.2252 | 0.0082 | 0.0000 |

Tabla 4.19 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L50-9-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.234 | 0.00000 | 0.0 | 0.00000 | 0.00 | 0.999 | 0.2341 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.225 | 0.00000 | 37.8 | 0.00000 | 0.00 | 0.985 | 0.2337 | 0.0121 | 0.0000 |
| 3 | 0.225 | 0.00000 | 100.7 | 0.00000 | 0.00 | 0.982 | 0.2334 | 0.0128 | 0.0000 |
| 5 | 0.225 | 0.00000 | 149.3 | 0.00000 | 0.00 | 0.979 | 0.2331 | 0.0132 | 0.0000 |
| 7 | 0.225 | 0.00000 | 195.1 | 0.00000 | 0.00 | 0.976 | 0.2327 | 0.0135 | 0.0000 |
| 9 | 0.225 | 0.00000 | 238.7 | 0.00000 | 0.00 | 0.973 | 0.2324 | 0.0135 | 0.0000 |
| 11 | 0.226 | 0.00000 | 281.6 | 0.00000 | 0.00 | 0.970 | 0.2320 | 0.0130 | 0.0000 |
| 13 | 0.226 | 0.00000 | 324.1 | 0.00000 | 0.00 | 0.967 | 0.2317 | 0.0137 | 0.0000 |
| 15 | 0.226 | 0.00028 | 365.8 | 0.00028 | 0.13 | 0.964 | 0.2314 | 0.0133 | 0.0000 |
| 20 | 0.226 | 0.00024 | 469.3 | 0.00024 | 0.11 | 0.961 | 0.2310 | 0.0136 | 0.0000 |
| 25 | 0.226 | 0.00032 | 571.0 | 0.00032 | 0.14 | 0.958 | 0.2307 | 0.0144 | 0.0001 |
| 30 | 0.226 | 0.00040 | 669.4 | 0.00040 | 0.18 | 0.955 | 0.2304 | 0.0147 | 0.0001 |
| 45 | 0.227 | 0.00049 | 955.2 | 0.00049 | 0.21 | 0.952 | 0.2300 | 0.0139 | 0.0002 |
| 60 | 0.225 | 0.00036 | 1228.0 | 0.00036 | 0.16 | 0.949 | 0.2297 | 0.0161 | 0.0003 |

Tabla 4.20 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L50-10-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.232 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2316 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.223 | 0.000 | 29.3 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2313 | 0.0117 | 0.0000 |
| 3 | 0.228 | 0.000 | 67.0 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2310 | 0.0076 | 0.0000 |
| 5 | 0.221 | 0.000 | 82.8 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2306 | 0.0139 | 0.0000 |
| 7 | 0.224 | 0.000 | 96.9 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2303 | 0.0115 | 0.0000 |
| 9 | 0.221 | 0.000 | 110.3 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2300 | 0.0146 | 0.0000 |
| 11 | 0.223 | 0.000 | 123.1 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2296 | 0.0130 | 0.0000 |
| 13 | 0.222 | 0.001 | 135.6 | 0.001 | 0.55 | 0.967 | 0.2293 | 0.0144 | 0.0000 |
| 15 | 0.223 | 0.004 | 147.6 | 0.004 | 1.81 | 0.964 | 0.2290 | 0.0139 | 0.0000 |
| 20 | 0.221 | 0.003 | 176.7 | 0.003 | 1.47 | 0.961 | 0.2286 | 0.0166 | 0.0001 |
| 25 | 0.220 | 0.004 | 205.3 | 0.004 | 2.03 | 0.958 | 0.2283 | 0.0176 | 0.0003 |
| 30 | 0.219 | 0.013 | 233.0 | 0.013 | 5.74 | 0.955 | 0.2279 | 0.0188 | 0.0005 |
| 45 | 0.217 | 0.031 | 312.4 | 0.031 | 14.37 | 0.952 | 0.2276 | 0.0199 | 0.0022 |
| 60 | 0.215 | 0.043 | 389.6 | 0.043 | 19.74 | 0.949 | 0.2272 | 0.0212 | 0.0050 |

Resultados

Tabla 4.21 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L50-10.7-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.231 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2304 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.222 | 0.000 | 27.1 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2301 | 0.0113 | 0.0000 |
| 3 | 0.220 | 0.000 | 58.7 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2298 | 0.0136 | 0.0000 |
| 5 | 0.220 | 0.000 | 67.5 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2294 | 0.0143 | 0.0000 |
| 7 | 0.217 | 0.000 | 75.8 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2291 | 0.0174 | 0.0000 |
| 9 | 0.217 | 0.000 | 83.6 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2288 | 0.0181 | 0.0000 |
| 11 | 0.217 | 0.000 | 91.2 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2285 | 0.0185 | 0.0000 |
| 13 | 0.216 | 0.001 | 98.7 | 0.001 | 0.56 | 0.967 | 0.2281 | 0.0195 | 0.0000 |
| 15 | 0.215 | 0.003 | 106.1 | 0.003 | 1.32 | 0.964 | 0.2278 | 0.0202 | 0.0000 |
| 20 | 0.208 | 0.063 | 124.4 | 0.064 | 30.21 | 0.961 | 0.2274 | 0.0254 | 0.0006 |
| 25 | 0.203 | 0.150 | 141.8 | 0.151 | 73.90 | 0.958 | 0.2269 | 0.0264 | 0.0025 |
| 30 | 0.201 | 0.232 | 158.5 | 0.233 | 115.49 | 0.955 | 0.2262 | 0.0250 | 0.0057 |
| 45 | 0.198 | 0.302 | 206.5 | 0.303 | 152.76 | 0.952 | 0.2255 | 0.0252 | 0.0185 |
| 60 | 0.197 | 0.315 | 251.0 | 0.315 | 159.96 | 0.949 | 0.2247 | 0.0253 | 0.0322 |

Tabla 4.22 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L50-10.7-1.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.236 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2353 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.226 | 0.000 | 27.2 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2349 | 0.0125 | 0.0000 |
| 3 | 0.224 | 0.000 | 58.9 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2346 | 0.0149 | 0.0000 |
| 5 | 0.223 | 0.000 | 67.7 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2343 | 0.0164 | 0.0000 |
| 7 | 0.223 | 0.000 | 75.9 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2339 | 0.0163 | 0.0000 |
| 9 | 0.221 | 0.000 | 83.7 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2336 | 0.0190 | 0.0000 |
| 11 | 0.221 | 0.000 | 91.3 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2333 | 0.0190 | 0.0000 |
| 13 | 0.220 | 0.000 | 98.8 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.2329 | 0.0201 | 0.0000 |
| 15 | 0.217 | 0.003 | 106.2 | 0.003 | 1.31 | 0.964 | 0.2326 | 0.0238 | 0.0000 |
| 20 | 0.213 | 0.045 | 124.1 | 0.046 | 21.29 | 0.961 | 0.2322 | 0.0259 | 0.0004 |
| 25 | 0.210 | 0.136 | 141.5 | 0.137 | 64.86 | 0.958 | 0.2317 | 0.0256 | 0.0020 |
| 30 | 0.208 | 0.219 | 158.4 | 0.220 | 105.45 | 0.955 | 0.2311 | 0.0238 | 0.0050 |
| 45 | 0.203 | 0.300 | 206.4 | 0.301 | 148.10 | 0.952 | 0.2303 | 0.0255 | 0.0175 |
| 60 | 0.200 | 0.321 | 250.9 | 0.321 | 160.85 | 0.949 | 0.2295 | 0.0276 | 0.0313 |

Tabla 4.23 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L50-10.7-2.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.235 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2345 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.224 | 0.000 | 27.3 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2341 | 0.0137 | 0.0000 |
| 3 | 0.222 | 0.000 | 59.4 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2338 | 0.0160 | 0.0000 |
| 5 | 0.222 | 0.000 | 68.6 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2335 | 0.0164 | 0.0000 |
| 7 | 0.219 | 0.000 | 77.4 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2331 | 0.0191 | 0.0000 |
| 9 | 0.218 | 0.000 | 86.2 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2328 | 0.0210 | 0.0000 |
| 11 | 0.216 | 0.000 | 94.8 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2325 | 0.0233 | 0.0000 |
| 13 | 0.215 | 0.001 | 103.1 | 0.001 | 0.56 | 0.967 | 0.2322 | 0.0243 | 0.0000 |
| 15 | 0.213 | 0.014 | 111.3 | 0.014 | 6.45 | 0.964 | 0.2318 | 0.0257 | 0.0001 |
| 20 | 0.210 | 0.107 | 131.4 | 0.108 | 50.97 | 0.961 | 0.2314 | 0.0257 | 0.0013 |
| 25 | 0.206 | 0.211 | 151.4 | 0.212 | 102.16 | 0.958 | 0.2307 | 0.0247 | 0.0045 |
| 30 | 0.205 | 0.267 | 171.1 | 0.268 | 130.18 | 0.955 | 0.2300 | 0.0236 | 0.0092 |
| 45 | 0.202 | 0.302 | 225.4 | 0.303 | 149.70 | 0.952 | 0.2293 | 0.0251 | 0.0250 |
| 60 | 0.201 | 0.315 | 276.1 | 0.315 | 157.06 | 0.949 | 0.2285 | 0.0256 | 0.0407 |

Resultados

Tabla 4.24 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L50-10.7-5.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.231 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2308 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.224 | 0.000 | 27.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2305 | 0.0097 | 0.0000 |
| 3 | 0.224 | 0.000 | 60.2 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2302 | 0.0104 | 0.0000 |
| 5 | 0.223 | 0.000 | 70.4 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2298 | 0.0119 | 0.0000 |
| 7 | 0.221 | 0.000 | 80.1 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2295 | 0.0135 | 0.0000 |
| 9 | 0.219 | 0.000 | 89.6 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2292 | 0.0158 | 0.0000 |
| 11 | 0.217 | 0.000 | 98.9 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2288 | 0.0181 | 0.0000 |
| 13 | 0.217 | 0.005 | 108.0 | 0.005 | 2.43 | 0.967 | 0.2285 | 0.0190 | 0.0000 |
| 15 | 0.215 | 0.031 | 116.9 | 0.031 | 14.34 | 0.964 | 0.2281 | 0.0202 | 0.0002 |
| 20 | 0.211 | 0.130 | 138.5 | 0.131 | 61.61 | 0.961 | 0.2276 | 0.0199 | 0.0019 |
| 25 | 0.210 | 0.212 | 159.5 | 0.213 | 100.96 | 0.958 | 0.2270 | 0.0175 | 0.0055 |
| 30 | 0.209 | 0.243 | 179.9 | 0.244 | 116.47 | 0.955 | 0.2263 | 0.0173 | 0.0102 |
| 45 | 0.206 | 0.279 | 237.1 | 0.279 | 135.17 | 0.952 | 0.2256 | 0.0186 | 0.0251 |
| 60 | 0.204 | 0.290 | 290.0 | 0.290 | 142.06 | 0.949 | 0.2249 | 0.0199 | 0.0401 |

Tabla 4.25 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L50-10.7-10.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.231 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2304 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.223 | 0.000 | 29.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2301 | 0.0101 | 0.0000 |
| 3 | 0.221 | 0.000 | 68.5 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2298 | 0.0128 | 0.0000 |
| 5 | 0.217 | 0.000 | 87.2 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2294 | 0.0175 | 0.0000 |
| 7 | 0.219 | 0.052 | 105.5 | 0.053 | 23.66 | 0.976 | 0.2290 | 0.0133 | 0.0005 |
| 9 | 0.215 | 0.175 | 123.5 | 0.177 | 81.32 | 0.973 | 0.2285 | 0.0129 | 0.0025 |
| 11 | 0.215 | 0.234 | 141.2 | 0.236 | 109.25 | 0.970 | 0.2278 | 0.0105 | 0.0062 |
| 13 | 0.214 | 0.248 | 158.6 | 0.249 | 116.10 | 0.967 | 0.2271 | 0.0107 | 0.0104 |
| 15 | 0.215 | 0.255 | 175.5 | 0.255 | 118.68 | 0.964 | 0.2264 | 0.0096 | 0.0147 |
| 20 | 0.215 | 0.262 | 216.3 | 0.262 | 122.03 | 0.961 | 0.2257 | 0.0089 | 0.0252 |
| 25 | 0.214 | 0.266 | 254.6 | 0.266 | 124.01 | 0.958 | 0.2249 | 0.0094 | 0.0353 |
| 30 | 0.214 | 0.270 | 291.4 | 0.270 | 126.14 | 0.955 | 0.2242 | 0.0096 | 0.0451 |
| 45 | 0.212 | 0.273 | 393.4 | 0.273 | 128.82 | 0.952 | 0.2235 | 0.0109 | 0.0729 |
| 60 | 0.210 | 0.277 | 485.5 | 0.277 | 131.85 | 0.949 | 0.2228 | 0.0130 | 0.0985 |

Tabla 4.26 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L50-10.7-15.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.226 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2256 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.221 | 0.000 | 28.9 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2253 | 0.0080 | 0.0000 |
| 3 | 0.216 | 0.000 | 65.9 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2249 | 0.0127 | 0.0000 |
| 5 | 0.214 | 0.000 | 82.2 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2246 | 0.0154 | 0.0000 |
| 7 | 0.210 | 0.001 | 98.5 | 0.001 | 0.58 | 0.976 | 0.2243 | 0.0193 | 0.0000 |
| 9 | 0.209 | 0.040 | 114.6 | 0.041 | 19.19 | 0.973 | 0.2239 | 0.0192 | 0.0003 |
| 11 | 0.209 | 0.124 | 130.5 | 0.126 | 59.38 | 0.970 | 0.2234 | 0.0156 | 0.0017 |
| 13 | 0.206 | 0.188 | 145.9 | 0.189 | 91.34 | 0.967 | 0.2228 | 0.0167 | 0.0041 |
| 15 | 0.206 | 0.216 | 161.1 | 0.217 | 104.72 | 0.964 | 0.2222 | 0.0152 | 0.0072 |
| 20 | 0.206 | 0.233 | 197.7 | 0.233 | 112.97 | 0.961 | 0.2215 | 0.0144 | 0.0154 |
| 25 | 0.205 | 0.240 | 233.0 | 0.240 | 117.00 | 0.958 | 0.2209 | 0.0153 | 0.0238 |
| 30 | 0.204 | 0.243 | 266.4 | 0.243 | 118.85 | 0.955 | 0.2202 | 0.0159 | 0.0318 |
| 45 | 0.203 | 0.247 | 360.6 | 0.247 | 121.71 | 0.952 | 0.2195 | 0.0164 | 0.0546 |
| 60 | 0.204 | 0.252 | 448.7 | 0.252 | 123.66 | 0.949 | 0.2188 | 0.0158 | 0.0764 |

Resultados

Tabla 4.27 C_R , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L50-12-0.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|-------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 0 | 0.235 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2345 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.225 | 0.096 | 39.1 | 0.128 | 42.63 | 0.985 | 0.2340 | 0.0086 | 0.0025 |
| 3 | 0.225 | 0.160 | 106.7 | 0.163 | 70.86 | 0.982 | 0.2334 | 0.0062 | 0.0122 |
| 5 | 0.224 | 0.162 | 163.2 | 0.162 | 72.20 | 0.979 | 0.2328 | 0.0070 | 0.0214 |
| 7 | 0.223 | 0.157 | 218.4 | 0.157 | 70.11 | 0.976 | 0.2323 | 0.0081 | 0.0302 |
| 9 | 0.225 | 0.155 | 272.9 | 0.155 | 69.06 | 0.973 | 0.2317 | 0.0067 | 0.0387 |
| 11 | 0.226 | 0.153 | 327.5 | 0.153 | 67.68 | 0.970 | 0.2311 | 0.0065 | 0.0471 |
| 13 | 0.224 | 0.151 | 382.0 | 0.151 | 67.27 | 0.967 | 0.2306 | 0.0083 | 0.0554 |
| 15 | 0.224 | 0.149 | 436.0 | 0.149 | 66.43 | 0.964 | 0.2300 | 0.0080 | 0.0635 |
| 20 | 0.225 | 0.147 | 567.0 | 0.147 | 65.41 | 0.961 | 0.2295 | 0.0078 | 0.0830 |
| 25 | 0.225 | 0.144 | 697.4 | 0.144 | 64.14 | 0.958 | 0.2289 | 0.0081 | 0.1020 |
| 30 | 0.224 | 0.143 | 827.9 | 0.143 | 64.01 | 0.955 | 0.2283 | 0.0090 | 0.1207 |
| 45 | 0.224 | 0.137 | 1205.6 | 0.137 | 61.12 | 0.952 | 0.2278 | 0.0094 | 0.1744 |
| 60 | 0.222 | 0.133 | 1580.6 | 0.133 | 59.74 | 0.949 | 0.2273 | 0.0112 | 0.2250 |

4.2.2. Sistema Lisozima-membrana de 300 kDa

A continuación se detallan los resultados del estudio del efecto del pH y la fuerza iónica sobre la filtración de lisozima a través de una membrana de 300 kDa. Las condiciones de operación elegidas fueron las mismas que las recogidas en el apartado 4.2.1.

Los experimentos realizados se listan en la Tabla 4.28:

Tabla 4.28 Experimentos Lisozima-300 kDa.

| Experimento | pH | Fuerza iónica, mM |
|--------------------|-----------|--------------------------|
| L300-5-0 | 5 | 0 |
| L300-6-0 | 6 | 0 |
| L300-7-0 | 7 | 0 |
| L300-8-0 | 8 | 0 |
| L300-9-0 | 9 | 0 |
| L300-10-0 | 10 | 0 |
| L300-10.7-0 | 10.7 | 0 |
| L300-10.7-2 | 10.7 | 2 |
| L300-10.7-5 | 10.7 | 5 |
| L300-10.7-10 | 10.7 | 10 |
| L300-10.7-15 | 10.7 | 15 |
| L300-12-0 | 12 | 0 |

Los resultados obtenidos en cada experimento se detallan a continuación.

Flujos relativos y volumen de filtrado

Tabla 4.29 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-5-0.

| t, minutos | Q_F , mL/min | J_F/J_{F0} | V_F , mL |
|---------------|-------------------|--------------|------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 52.2 | 0.701 | 126.6 |
| 4 | 46.2 | 0.620 | 224.9 |
| 6 | 44.4 | 0.597 | 315.5 |
| 8 | 42.9 | 0.576 | 402.8 |
| 10 | 41.4 | 0.556 | 487.1 |
| 12 | 41.4 | 0.556 | 569.8 |
| 14 | 40.0 | 0.537 | 651.2 |
| 16 | 40.0 | 0.537 | 731.2 |
| 18 | 38.7 | 0.520 | 809.9 |
| 20 | 38.7 | 0.520 | 887.3 |
| 25 | 37.5 | 0.504 | 1077.9 |
| 30 | 37.5 | 0.504 | 1265.4 |
| 35 | 37.5 | 0.504 | 1452.9 |
| 40 | 37.5 | 0.504 | 1640.4 |
| 45 | 37.5 | 0.504 | 1827.9 |
| 50 | 37.5 | 0.504 | 2015.4 |
| 55 | 36.4 | 0.489 | 2200.0 |
| 60 | 36.4 | 0.489 | 2381.8 |

Tabla 4.30 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-6-0.

| t, minutos | Q_F , mL/min | J_F/J_{F0} | V_F , mL |
|---------------|-------------------|--------------|------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 48.0 | 0.645 | 122.4 |
| 4 | 42.9 | 0.576 | 213.3 |
| 6 | 40.0 | 0.537 | 296.1 |
| 8 | 38.7 | 0.520 | 374.8 |
| 10 | 37.5 | 0.504 | 451.1 |
| 12 | 37.5 | 0.504 | 526.1 |
| 14 | 36.4 | 0.489 | 599.9 |
| 16 | 36.4 | 0.489 | 672.6 |
| 18 | 36.4 | 0.489 | 745.4 |
| 20 | 36.4 | 0.489 | 818.1 |
| 25 | 36.4 | 0.489 | 999.9 |
| 30 | 36.4 | 0.489 | 1181.7 |
| 35 | 35.3 | 0.474 | 1360.9 |
| 40 | 35.3 | 0.474 | 1537.4 |
| 45 | 34.3 | 0.461 | 1711.3 |
| 50 | 34.3 | 0.461 | 1882.7 |
| 55 | 34.3 | 0.461 | 2054.2 |
| 60 | 34.3 | 0.461 | 2225.6 |

Resultados

Tabla 4.31 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-7-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 44.4 | 0.597 | 118.9 |
| 4 | 40.0 | 0.537 | 203.3 |
| 6 | 38.7 | 0.520 | 282.0 |
| 8 | 37.5 | 0.504 | 358.2 |
| 10 | 36.4 | 0.489 | 432.1 |
| 12 | 36.4 | 0.489 | 504.8 |
| 14 | 35.3 | 0.474 | 576.5 |
| 16 | 35.3 | 0.474 | 647.1 |
| 18 | 35.3 | 0.474 | 717.7 |
| 20 | 35.3 | 0.474 | 788.2 |
| 25 | 35.3 | 0.474 | 964.7 |
| 30 | 35.3 | 0.474 | 1141.2 |
| 35 | 34.3 | 0.461 | 1315.1 |
| 40 | 34.3 | 0.461 | 1486.6 |
| 45 | 34.3 | 0.461 | 1658.0 |
| 50 | 34.3 | 0.461 | 1829.4 |
| 55 | 33.3 | 0.448 | 1998.5 |
| 60 | 33.3 | 0.448 | 2165.1 |

Tabla 4.32 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-8-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 46.2 | 0.620 | 120.6 |
| 4 | 41.4 | 0.556 | 208.1 |
| 6 | 40.0 | 0.537 | 289.5 |
| 8 | 38.7 | 0.520 | 368.2 |
| 10 | 38.7 | 0.520 | 445.6 |
| 12 | 38.7 | 0.520 | 523.0 |
| 14 | 38.7 | 0.520 | 600.5 |
| 16 | 37.5 | 0.504 | 676.7 |
| 18 | 37.5 | 0.504 | 751.7 |
| 20 | 37.5 | 0.504 | 826.7 |
| 25 | 37.5 | 0.504 | 1014.2 |
| 30 | 37.5 | 0.504 | 1201.7 |
| 35 | 37.5 | 0.504 | 1389.2 |
| 40 | 37.5 | 0.504 | 1576.7 |
| 45 | 37.5 | 0.504 | 1764.2 |
| 50 | 36.4 | 0.489 | 1948.8 |
| 55 | 36.4 | 0.489 | 2130.6 |
| 60 | 36.4 | 0.489 | 2312.5 |

Resultados

Tabla 4.33 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-9-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 35.3 | 0.474 | 109.7 |
| 4 | 33.3 | 0.448 | 178.3 |
| 6 | 33.3 | 0.448 | 245.0 |
| 8 | 31.6 | 0.424 | 309.9 |
| 10 | 31.6 | 0.424 | 373.1 |
| 12 | 31.6 | 0.424 | 436.2 |
| 14 | 31.6 | 0.424 | 499.4 |
| 16 | 31.6 | 0.424 | 562.6 |
| 18 | 31.6 | 0.424 | 625.7 |
| 20 | 31.6 | 0.424 | 688.9 |
| 25 | 31.6 | 0.424 | 846.8 |
| 30 | 33.3 | 0.448 | 1009.0 |
| 35 | 33.3 | 0.448 | 1175.7 |
| 40 | 33.3 | 0.448 | 1342.4 |
| 45 | 33.3 | 0.448 | 1509.0 |
| 50 | 33.3 | 0.448 | 1675.7 |
| 55 | 33.3 | 0.448 | 1842.4 |
| 60 | 33.3 | 0.448 | 2009.0 |

Tabla 4.34 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-10-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 30.0 | 0.403 | 104.4 |
| 4 | 28.6 | 0.384 | 163.0 |
| 6 | 27.3 | 0.366 | 218.8 |
| 8 | 27.3 | 0.366 | 273.4 |
| 10 | 26.1 | 0.351 | 326.7 |
| 12 | 26.1 | 0.351 | 378.9 |
| 14 | 25.0 | 0.336 | 430.0 |
| 16 | 25.0 | 0.336 | 480.0 |
| 18 | 24.0 | 0.322 | 529.0 |
| 20 | 24.0 | 0.322 | 577.0 |
| 25 | 23.1 | 0.310 | 694.7 |
| 30 | 22.2 | 0.299 | 807.9 |
| 35 | 22.2 | 0.299 | 919.1 |
| 40 | 22.2 | 0.299 | 1030.2 |
| 45 | 22.2 | 0.299 | 1141.3 |
| 50 | 22.2 | 0.299 | 1252.4 |
| 55 | 22.2 | 0.299 | 1363.5 |
| 60 | 22.2 | 0.299 | 1474.6 |

Resultados

Tabla 4.35 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-10.7-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 28.6 | 0.384 | 103.0 |
| 4 | 26.1 | 0.351 | 157.7 |
| 6 | 26.1 | 0.351 | 209.8 |
| 8 | 25.0 | 0.336 | 260.9 |
| 10 | 23.1 | 0.310 | 309.0 |
| 12 | 23.1 | 0.310 | 355.1 |
| 14 | 23.1 | 0.310 | 401.3 |
| 16 | 23.1 | 0.310 | 447.5 |
| 18 | 22.2 | 0.299 | 492.7 |
| 20 | 22.2 | 0.299 | 537.2 |
| 25 | 22.2 | 0.299 | 648.3 |
| 30 | 21.4 | 0.288 | 757.4 |
| 35 | 21.4 | 0.288 | 864.6 |
| 40 | 20.7 | 0.278 | 969.9 |
| 45 | 20.7 | 0.278 | 1073.3 |
| 50 | 20.7 | 0.278 | 1176.8 |
| 55 | 20.7 | 0.278 | 1280.2 |
| 60 | 20.7 | 0.278 | 1383.7 |

Tabla 4.36 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-10.7-2.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 33.3 | 0.448 | 107.8 |
| 4 | 31.6 | 0.424 | 172.7 |
| 6 | 31.6 | 0.424 | 235.8 |
| 8 | 30.0 | 0.403 | 297.4 |
| 10 | 28.6 | 0.384 | 356.0 |
| 12 | 28.6 | 0.384 | 413.1 |
| 14 | 28.6 | 0.384 | 470.3 |
| 16 | 28.6 | 0.384 | 527.4 |
| 18 | 28.6 | 0.384 | 584.5 |
| 20 | 27.3 | 0.366 | 640.4 |
| 25 | 27.3 | 0.366 | 776.8 |
| 30 | 27.3 | 0.366 | 913.1 |
| 35 | 27.3 | 0.366 | 1049.5 |
| 40 | 27.3 | 0.366 | 1185.8 |
| 45 | 26.1 | 0.351 | 1319.2 |
| 50 | 25.0 | 0.336 | 1447.0 |
| 55 | 25.0 | 0.336 | 1572.0 |
| 60 | 25.0 | 0.336 | 1697.0 |

Resultados

Tabla 4.37 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-10.7-5.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 37.5 | 0.504 | 111.9 |
| 4 | 37.5 | 0.504 | 186.9 |
| 6 | 35.3 | 0.474 | 259.7 |
| 8 | 35.3 | 0.474 | 330.3 |
| 10 | 35.3 | 0.474 | 400.9 |
| 12 | 35.3 | 0.474 | 471.5 |
| 14 | 35.3 | 0.474 | 542.1 |
| 16 | 33.3 | 0.448 | 610.7 |
| 18 | 33.3 | 0.448 | 677.4 |
| 20 | 33.3 | 0.448 | 744.0 |
| 25 | 31.6 | 0.424 | 906.3 |
| 30 | 31.6 | 0.424 | 1064.2 |
| 35 | 31.6 | 0.424 | 1222.1 |
| 40 | 30.0 | 0.403 | 1376.0 |
| 45 | 30.0 | 0.403 | 1526.0 |
| 50 | 30.0 | 0.403 | 1676.0 |
| 55 | 30.0 | 0.403 | 1826.0 |
| 60 | 30.0 | 0.403 | 1976.0 |

Tabla 4.38 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-10.7-10.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 40.0 | 0.537 | 114.4 |
| 4 | 40.0 | 0.537 | 194.4 |
| 6 | 40.0 | 0.537 | 274.4 |
| 8 | 37.5 | 0.504 | 351.9 |
| 10 | 37.5 | 0.504 | 426.9 |
| 12 | 37.5 | 0.504 | 501.9 |
| 14 | 35.3 | 0.474 | 574.7 |
| 16 | 35.3 | 0.474 | 645.3 |
| 18 | 35.3 | 0.474 | 715.9 |
| 20 | 35.3 | 0.474 | 786.5 |
| 25 | 33.3 | 0.448 | 958.0 |
| 30 | 33.3 | 0.448 | 1124.7 |
| 35 | 33.3 | 0.448 | 1291.4 |
| 40 | 31.6 | 0.424 | 1453.7 |
| 45 | 31.6 | 0.424 | 1611.6 |
| 50 | 31.6 | 0.424 | 1769.5 |
| 55 | 31.6 | 0.424 | 1927.3 |
| 60 | 31.6 | 0.424 | 2085.2 |

Resultados

Tabla 4.39 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-10.7-15.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 46.2 | 0.620 | 120.6 |
| 4 | 46.2 | 0.620 | 212.9 |
| 6 | 42.9 | 0.576 | 301.9 |
| 8 | 42.9 | 0.576 | 387.6 |
| 10 | 42.9 | 0.576 | 473.3 |
| 12 | 42.9 | 0.576 | 559.0 |
| 14 | 42.9 | 0.576 | 644.8 |
| 16 | 42.9 | 0.576 | 730.5 |
| 18 | 42.9 | 0.576 | 816.2 |
| 20 | 40.0 | 0.537 | 899.0 |
| 25 | 40.0 | 0.537 | 1099.0 |
| 30 | 40.0 | 0.537 | 1299.0 |
| 35 | 40.0 | 0.537 | 1499.0 |
| 40 | 37.5 | 0.504 | 1692.8 |
| 45 | 37.5 | 0.504 | 1880.3 |
| 50 | 37.5 | 0.504 | 2067.8 |
| 55 | 37.5 | 0.504 | 2255.3 |
| 60 | 37.5 | 0.504 | 2442.8 |

Tabla 4.40 J_F/J_{F0} y V_F , experimento L300-12-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 74.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 54.5 | 0.733 | 129.0 |
| 4 | 50.0 | 0.672 | 233.5 |
| 6 | 48.0 | 0.645 | 331.5 |
| 8 | 48.0 | 0.645 | 427.5 |
| 10 | 48.0 | 0.645 | 523.5 |
| 12 | 48.0 | 0.645 | 619.5 |
| 14 | 46.2 | 0.620 | 713.7 |
| 16 | 46.2 | 0.620 | 806.0 |
| 18 | 46.2 | 0.620 | 898.3 |
| 20 | 46.2 | 0.620 | 990.6 |
| 25 | 46.2 | 0.620 | 1221.4 |
| 30 | 46.2 | 0.620 | 1452.1 |
| 35 | 46.2 | 0.620 | 1682.9 |
| 40 | 46.2 | 0.620 | 1913.7 |
| 45 | 46.2 | 0.620 | 2144.4 |
| 50 | 46.2 | 0.620 | 2375.2 |
| 55 | 44.4 | 0.597 | 2601.7 |
| 60 | 44.4 | 0.597 | 2823.9 |

Resultados

Concentración de filtrado, transmisión observada, masa depositada y masa transportada.

En las siguientes tablas se recogen los datos de concentración de proteína en retenido y filtrado, además de las correcciones, la transmisión observada, la masa depositada y la masa transportada a través de la membrana calculadas siguiendo el método descrito.

Tabla 4.41 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L300-5-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.244 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2435 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.237 | 0.000 | 63.3 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2432 | 0.0097 | 0.0000 |
| 3 | 0.238 | 0.000 | 175.8 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2428 | 0.0097 | 0.0000 |
| 5 | 0.238 | 0.002 | 270.2 | 0.002 | 0.79 | 0.979 | 0.2425 | 0.0100 | 0.0001 |
| 7 | 0.235 | 0.006 | 359.2 | 0.006 | 2.55 | 0.976 | 0.2421 | 0.0127 | 0.0004 |
| 9 | 0.235 | 0.007 | 444.9 | 0.007 | 2.86 | 0.973 | 0.2417 | 0.0126 | 0.0010 |
| 11 | 0.235 | 0.008 | 528.4 | 0.008 | 3.34 | 0.970 | 0.2414 | 0.0133 | 0.0016 |
| 13 | 0.236 | 0.009 | 610.5 | 0.009 | 3.80 | 0.967 | 0.2410 | 0.0122 | 0.0023 |
| 15 | 0.236 | 0.010 | 691.2 | 0.010 | 4.13 | 0.964 | 0.2406 | 0.0132 | 0.0030 |
| 20 | 0.236 | 0.011 | 887.3 | 0.011 | 4.76 | 0.961 | 0.2403 | 0.0135 | 0.0051 |
| 25 | 0.236 | 0.013 | 1077.9 | 0.013 | 5.56 | 0.958 | 0.2399 | 0.0137 | 0.0074 |
| 30 | 0.236 | 0.013 | 1265.4 | 0.013 | 5.70 | 0.955 | 0.2395 | 0.0133 | 0.0099 |
| 45 | 0.236 | 0.015 | 1827.9 | 0.015 | 6.17 | 0.952 | 0.2391 | 0.0136 | 0.0178 |
| 60 | 0.239 | 0.015 | 2381.8 | 0.015 | 6.25 | 0.949 | 0.2388 | 0.0111 | 0.0260 |

Tabla 4.42 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L300-6-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.240 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2394 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.232 | 0.000 | 61.2 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2391 | 0.0104 | 0.0000 |
| 3 | 0.233 | 0.000 | 167.8 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2387 | 0.0104 | 0.0000 |
| 5 | 0.235 | 0.001 | 254.7 | 0.001 | 0.48 | 0.979 | 0.2384 | 0.0088 | 0.0000 |
| 7 | 0.233 | 0.005 | 335.5 | 0.005 | 2.08 | 0.976 | 0.2380 | 0.0101 | 0.0003 |
| 9 | 0.232 | 0.009 | 412.9 | 0.009 | 3.72 | 0.973 | 0.2376 | 0.0121 | 0.0008 |
| 11 | 0.231 | 0.009 | 488.6 | 0.009 | 3.88 | 0.970 | 0.2373 | 0.0128 | 0.0015 |
| 13 | 0.232 | 0.010 | 563.0 | 0.010 | 4.19 | 0.967 | 0.2369 | 0.0124 | 0.0022 |
| 15 | 0.232 | 0.010 | 636.3 | 0.010 | 4.52 | 0.964 | 0.2366 | 0.0127 | 0.0029 |
| 20 | 0.232 | 0.011 | 818.1 | 0.011 | 4.85 | 0.961 | 0.2362 | 0.0134 | 0.0049 |
| 25 | 0.232 | 0.012 | 999.9 | 0.012 | 5.15 | 0.958 | 0.2358 | 0.0129 | 0.0070 |
| 30 | 0.233 | 0.012 | 1181.7 | 0.012 | 5.29 | 0.955 | 0.2355 | 0.0122 | 0.0092 |
| 45 | 0.233 | 0.013 | 1711.3 | 0.013 | 5.77 | 0.952 | 0.2351 | 0.0125 | 0.0160 |
| 60 | 0.234 | 0.013 | 2225.6 | 0.013 | 5.76 | 0.949 | 0.2347 | 0.0124 | 0.0229 |

Resultados

Tabla 4.43 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L300-7-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.239 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2387 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.231 | 0.000 | 59.4 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2383 | 0.0111 | 0.0000 |
| 3 | 0.230 | 0.000 | 161.1 | 0.000 | 0.16 | 0.982 | 0.2380 | 0.0122 | 0.0000 |
| 5 | 0.230 | 0.001 | 242.7 | 0.001 | 0.49 | 0.979 | 0.2376 | 0.0128 | 0.0001 |
| 7 | 0.230 | 0.005 | 320.1 | 0.005 | 2.28 | 0.976 | 0.2373 | 0.0130 | 0.0003 |
| 9 | 0.229 | 0.009 | 395.2 | 0.009 | 3.92 | 0.973 | 0.2369 | 0.0136 | 0.0009 |
| 11 | 0.229 | 0.011 | 468.5 | 0.011 | 4.90 | 0.970 | 0.2366 | 0.0142 | 0.0016 |
| 13 | 0.230 | 0.013 | 540.6 | 0.013 | 5.70 | 0.967 | 0.2362 | 0.0137 | 0.0025 |
| 15 | 0.229 | 0.014 | 611.8 | 0.014 | 6.05 | 0.964 | 0.2358 | 0.0147 | 0.0034 |
| 20 | 0.227 | 0.015 | 788.2 | 0.015 | 6.75 | 0.961 | 0.2355 | 0.0168 | 0.0060 |
| 25 | 0.229 | 0.016 | 964.7 | 0.016 | 7.03 | 0.958 | 0.2351 | 0.0153 | 0.0088 |
| 30 | 0.229 | 0.016 | 1141.2 | 0.016 | 6.86 | 0.955 | 0.2347 | 0.0156 | 0.0116 |
| 45 | 0.232 | 0.016 | 1658.0 | 0.016 | 6.77 | 0.952 | 0.2344 | 0.0131 | 0.0198 |
| 60 | 0.234 | 0.015 | 2165.1 | 0.015 | 6.40 | 0.949 | 0.2340 | 0.0117 | 0.0276 |

Tabla 4.44 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L300-8-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.236 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2353 | 0.0000 | 0 |
| 1 | 0.230 | 0.000 | 60.3 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2350 | 0.0085 | 0.0000 |
| 3 | 0.230 | 0.000 | 164.3 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2346 | 0.0088 | 0.0000 |
| 5 | 0.228 | 0.000 | 248.8 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2343 | 0.0114 | 0.0000 |
| 7 | 0.228 | 0.001 | 328.8 | 0.001 | 0.49 | 0.976 | 0.2339 | 0.0117 | 0.0000 |
| 9 | 0.229 | 0.004 | 406.9 | 0.004 | 1.96 | 0.973 | 0.2336 | 0.0111 | 0.0003 |
| 11 | 0.227 | 0.007 | 484.3 | 0.007 | 2.96 | 0.970 | 0.2332 | 0.0125 | 0.0007 |
| 13 | 0.228 | 0.008 | 561.7 | 0.008 | 3.61 | 0.967 | 0.2329 | 0.0124 | 0.0013 |
| 15 | 0.227 | 0.009 | 638.6 | 0.009 | 3.95 | 0.964 | 0.2325 | 0.0130 | 0.0019 |
| 20 | 0.228 | 0.011 | 826.7 | 0.011 | 4.76 | 0.961 | 0.2322 | 0.0129 | 0.0038 |
| 25 | 0.228 | 0.010 | 1014.2 | 0.010 | 4.26 | 0.958 | 0.2318 | 0.0129 | 0.0057 |
| 30 | 0.229 | 0.010 | 1201.7 | 0.010 | 4.26 | 0.955 | 0.2315 | 0.0129 | 0.0076 |
| 45 | 0.233 | 0.010 | 1764.2 | 0.010 | 4.34 | 0.952 | 0.2311 | 0.0093 | 0.0131 |
| 60 | 0.230 | 0.009 | 2312.5 | 0.009 | 4.06 | 0.949 | 0.2307 | 0.0118 | 0.0185 |

Tabla 4.45 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento L300-9-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.238 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2375 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.233 | 0.001 | 54.9 | 0.001 | 0.48 | 0.985 | 0.2372 | 0.0077 | 0.0000 |
| 3 | 0.233 | 0.000 | 144.0 | 0.000 | 0.16 | 0.982 | 0.2368 | 0.0081 | 0.0001 |
| 5 | 0.232 | 0.024 | 211.7 | 0.024 | 10.18 | 0.979 | 0.2365 | 0.0090 | 0.0009 |
| 7 | 0.230 | 0.044 | 277.5 | 0.044 | 19.22 | 0.976 | 0.2361 | 0.0103 | 0.0031 |
| 9 | 0.230 | 0.048 | 341.5 | 0.048 | 20.68 | 0.973 | 0.2356 | 0.0104 | 0.0061 |
| 11 | 0.229 | 0.048 | 404.7 | 0.048 | 20.88 | 0.970 | 0.2352 | 0.0110 | 0.0091 |
| 13 | 0.229 | 0.045 | 467.8 | 0.045 | 19.61 | 0.967 | 0.2348 | 0.0118 | 0.0120 |
| 15 | 0.229 | 0.043 | 531.0 | 0.043 | 18.79 | 0.964 | 0.2344 | 0.0121 | 0.0148 |
| 20 | 0.230 | 0.034 | 688.9 | 0.034 | 14.61 | 0.961 | 0.2340 | 0.0114 | 0.0208 |
| 25 | 0.231 | 0.022 | 846.8 | 0.022 | 9.71 | 0.958 | 0.2336 | 0.0114 | 0.0253 |
| 30 | 0.231 | 0.014 | 1009.0 | 0.014 | 5.99 | 0.955 | 0.2333 | 0.0121 | 0.0282 |
| 45 | 0.233 | 0.008 | 1509.0 | 0.008 | 3.38 | 0.952 | 0.2329 | 0.0112 | 0.0336 |
| 60 | 0.236 | 0.004 | 2009.0 | 0.004 | 1.90 | 0.949 | 0.2325 | 0.0088 | 0.0367 |

Resultados

Tabla 4.46 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L300-10-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.241 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2405 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.227 | 0.000 | 52.2 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2402 | 0.0167 | 0.0000 |
| 3 | 0.214 | 0.077 | 133.7 | 0.077 | 35.78 | 0.982 | 0.2398 | 0.0264 | 0.0023 |
| 5 | 0.213 | 0.200 | 190.9 | 0.200 | 94.02 | 0.979 | 0.2391 | 0.0230 | 0.0101 |
| 7 | 0.212 | 0.214 | 246.1 | 0.214 | 100.88 | 0.976 | 0.2385 | 0.0232 | 0.0216 |
| 9 | 0.211 | 0.223 | 300.1 | 0.223 | 105.31 | 0.973 | 0.2378 | 0.0236 | 0.0333 |
| 11 | 0.212 | 0.223 | 352.8 | 0.223 | 104.94 | 0.970 | 0.2372 | 0.0228 | 0.0451 |
| 13 | 0.212 | 0.225 | 404.5 | 0.225 | 105.81 | 0.967 | 0.2365 | 0.0224 | 0.0566 |
| 15 | 0.212 | 0.226 | 455.0 | 0.226 | 106.16 | 0.964 | 0.2359 | 0.0223 | 0.0680 |
| 20 | 0.211 | 0.223 | 577.0 | 0.223 | 105.31 | 0.961 | 0.2352 | 0.0235 | 0.0955 |
| 25 | 0.213 | 0.218 | 694.7 | 0.218 | 102.11 | 0.958 | 0.2346 | 0.0219 | 0.1214 |
| 30 | 0.212 | 0.211 | 807.9 | 0.211 | 99.47 | 0.955 | 0.2340 | 0.0228 | 0.1457 |
| 45 | 0.214 | 0.183 | 1141.3 | 0.183 | 85.64 | 0.952 | 0.2334 | 0.0229 | 0.2114 |
| 60 | 0.217 | 0.154 | 1474.6 | 0.154 | 71.16 | 0.949 | 0.2328 | 0.0213 | 0.2676 |

Tabla 4.47 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L300-10.7-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.244 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2432 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.234 | 0.008 | 51.5 | 0.009 | 3.35 | 0.985 | 0.2428 | 0.0119 | 0.0002 |
| 3 | 0.222 | 0.098 | 130.3 | 0.099 | 44.18 | 0.982 | 0.2423 | 0.0207 | 0.0034 |
| 5 | 0.220 | 0.235 | 183.7 | 0.235 | 106.63 | 0.979 | 0.2416 | 0.0172 | 0.0123 |
| 7 | 0.219 | 0.248 | 235.4 | 0.248 | 113.14 | 0.976 | 0.2409 | 0.0173 | 0.0247 |
| 9 | 0.217 | 0.255 | 285.0 | 0.255 | 117.21 | 0.973 | 0.2402 | 0.0189 | 0.0372 |
| 11 | 0.218 | 0.258 | 332.1 | 0.258 | 118.38 | 0.970 | 0.2395 | 0.0183 | 0.0493 |
| 13 | 0.216 | 0.262 | 378.2 | 0.262 | 121.11 | 0.967 | 0.2388 | 0.0195 | 0.0612 |
| 15 | 0.218 | 0.264 | 424.4 | 0.264 | 121.13 | 0.964 | 0.2381 | 0.0179 | 0.0734 |
| 20 | 0.217 | 0.265 | 537.2 | 0.265 | 122.07 | 0.961 | 0.2373 | 0.0185 | 0.1033 |
| 25 | 0.217 | 0.266 | 648.3 | 0.266 | 122.20 | 0.958 | 0.2366 | 0.0181 | 0.1328 |
| 30 | 0.218 | 0.265 | 757.4 | 0.265 | 121.65 | 0.955 | 0.2359 | 0.0177 | 0.1617 |
| 45 | 0.218 | 0.265 | 1073.3 | 0.265 | 121.23 | 0.952 | 0.2352 | 0.0169 | 0.2454 |
| 60 | 0.218 | 0.262 | 1383.7 | 0.262 | 120.07 | 0.949 | 0.2344 | 0.0173 | 0.3271 |

Tabla 4.48 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L300-10.7-2.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.237 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2368 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.232 | 0.007 | 53.9 | 0.008 | 3.06 | 0.985 | 0.2364 | 0.0075 | 0.0002 |
| 3 | 0.223 | 0.181 | 140.2 | 0.182 | 81.04 | 0.982 | 0.2358 | 0.0099 | 0.0066 |
| 5 | 0.222 | 0.232 | 204.2 | 0.232 | 104.55 | 0.979 | 0.2352 | 0.0090 | 0.0198 |
| 7 | 0.219 | 0.238 | 266.6 | 0.238 | 108.53 | 0.976 | 0.2345 | 0.0113 | 0.0345 |
| 9 | 0.219 | 0.239 | 326.7 | 0.239 | 109.22 | 0.973 | 0.2338 | 0.0112 | 0.0488 |
| 11 | 0.219 | 0.245 | 384.5 | 0.245 | 111.95 | 0.970 | 0.2331 | 0.0109 | 0.0628 |
| 13 | 0.220 | 0.244 | 441.7 | 0.244 | 111.05 | 0.967 | 0.2324 | 0.0102 | 0.0768 |
| 15 | 0.221 | 0.246 | 498.8 | 0.246 | 111.34 | 0.964 | 0.2317 | 0.0090 | 0.0908 |
| 20 | 0.221 | 0.246 | 640.4 | 0.246 | 110.98 | 0.961 | 0.2310 | 0.0086 | 0.1252 |
| 25 | 0.222 | 0.245 | 776.8 | 0.245 | 110.44 | 0.958 | 0.2303 | 0.0079 | 0.1587 |
| 30 | 0.222 | 0.245 | 913.1 | 0.245 | 110.29 | 0.955 | 0.2296 | 0.0082 | 0.1921 |
| 45 | 0.224 | 0.241 | 1319.2 | 0.241 | 107.50 | 0.952 | 0.2289 | 0.0059 | 0.2893 |
| 60 | 0.226 | 0.241 | 1697.0 | 0.241 | 106.74 | 0.949 | 0.2282 | 0.0043 | 0.3818 |

Resultados

Tabla 4.49 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L300-10.7-5.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.238 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2375 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.227 | 0.006 | 56.0 | 0.007 | 2.48 | 0.985 | 0.2372 | 0.0138 | 0.0002 |
| 3 | 0.217 | 0.204 | 149.4 | 0.205 | 93.80 | 0.982 | 0.2366 | 0.0152 | 0.0082 |
| 5 | 0.218 | 0.223 | 223.3 | 0.223 | 102.06 | 0.979 | 0.2359 | 0.0138 | 0.0240 |
| 7 | 0.218 | 0.227 | 295.0 | 0.227 | 104.12 | 0.976 | 0.2352 | 0.0136 | 0.0401 |
| 9 | 0.218 | 0.230 | 365.6 | 0.230 | 105.84 | 0.973 | 0.2346 | 0.0138 | 0.0563 |
| 11 | 0.218 | 0.233 | 436.2 | 0.233 | 107.04 | 0.970 | 0.2339 | 0.0137 | 0.0726 |
| 13 | 0.217 | 0.233 | 506.8 | 0.233 | 107.59 | 0.967 | 0.2332 | 0.0144 | 0.0891 |
| 15 | 0.218 | 0.234 | 576.4 | 0.234 | 107.20 | 0.964 | 0.2325 | 0.0132 | 0.1054 |
| 20 | 0.217 | 0.235 | 744.0 | 0.235 | 108.45 | 0.961 | 0.2319 | 0.0142 | 0.1450 |
| 25 | 0.218 | 0.235 | 906.3 | 0.235 | 107.55 | 0.958 | 0.2312 | 0.0132 | 0.1832 |
| 30 | 0.218 | 0.235 | 1064.2 | 0.235 | 107.71 | 0.955 | 0.2305 | 0.0127 | 0.2202 |
| 45 | 0.218 | 0.235 | 1526.0 | 0.235 | 107.36 | 0.952 | 0.2298 | 0.0127 | 0.3287 |
| 60 | 0.217 | 0.233 | 1976.0 | 0.233 | 107.40 | 0.949 | 0.2291 | 0.0138 | 0.4340 |

Tabla 4.50 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L300-10.7-10.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.240 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2398 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.227 | 0.001 | 57.2 | 0.001 | 0.50 | 0.985 | 0.2394 | 0.0162 | 0.0000 |
| 3 | 0.218 | 0.196 | 154.4 | 0.197 | 89.90 | 0.982 | 0.2388 | 0.0167 | 0.0080 |
| 5 | 0.216 | 0.212 | 234.4 | 0.213 | 98.44 | 0.979 | 0.2382 | 0.0186 | 0.0244 |
| 7 | 0.217 | 0.218 | 313.2 | 0.218 | 100.17 | 0.976 | 0.2375 | 0.0170 | 0.0413 |
| 9 | 0.217 | 0.221 | 389.4 | 0.221 | 101.55 | 0.973 | 0.2369 | 0.0168 | 0.0580 |
| 11 | 0.216 | 0.223 | 464.4 | 0.223 | 103.29 | 0.970 | 0.2362 | 0.0178 | 0.0747 |
| 13 | 0.217 | 0.224 | 538.3 | 0.224 | 103.28 | 0.967 | 0.2356 | 0.0174 | 0.0912 |
| 15 | 0.218 | 0.225 | 610.0 | 0.225 | 103.44 | 0.964 | 0.2349 | 0.0163 | 0.1073 |
| 20 | 0.217 | 0.225 | 786.5 | 0.225 | 103.79 | 0.961 | 0.2342 | 0.0170 | 0.1470 |
| 25 | 0.217 | 0.225 | 958.0 | 0.225 | 103.44 | 0.958 | 0.2336 | 0.0166 | 0.1856 |
| 30 | 0.218 | 0.226 | 1124.7 | 0.226 | 103.60 | 0.955 | 0.2329 | 0.0159 | 0.2232 |
| 45 | 0.220 | 0.224 | 1611.6 | 0.224 | 101.53 | 0.952 | 0.2322 | 0.0138 | 0.3327 |
| 60 | 0.220 | 0.224 | 2085.2 | 0.224 | 102.04 | 0.949 | 0.2316 | 0.0145 | 0.4387 |

Tabla 4.51 C_F , Tr , M_d , M_{PM} , experimento L300-10.7-15.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.236 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2353 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.228 | 0.007 | 60.3 | 0.008 | 3.28 | 0.985 | 0.2350 | 0.0100 | 0.0003 |
| 3 | 0.220 | 0.196 | 166.7 | 0.197 | 89.12 | 0.982 | 0.2343 | 0.0107 | 0.0098 |
| 5 | 0.218 | 0.210 | 257.4 | 0.210 | 96.06 | 0.979 | 0.2337 | 0.0117 | 0.0283 |
| 7 | 0.220 | 0.212 | 344.8 | 0.212 | 96.10 | 0.976 | 0.2330 | 0.0098 | 0.0467 |
| 9 | 0.221 | 0.214 | 430.5 | 0.214 | 97.12 | 0.973 | 0.2324 | 0.0093 | 0.0649 |
| 11 | 0.219 | 0.213 | 516.2 | 0.213 | 97.27 | 0.970 | 0.2317 | 0.0108 | 0.0832 |
| 13 | 0.219 | 0.213 | 601.9 | 0.213 | 97.44 | 0.967 | 0.2311 | 0.0112 | 0.1015 |
| 15 | 0.219 | 0.212 | 687.6 | 0.212 | 96.76 | 0.964 | 0.2304 | 0.0109 | 0.1198 |
| 20 | 0.220 | 0.213 | 899.0 | 0.213 | 96.94 | 0.961 | 0.2298 | 0.0102 | 0.1638 |
| 25 | 0.218 | 0.212 | 1099.0 | 0.212 | 97.08 | 0.958 | 0.2291 | 0.0120 | 0.2063 |
| 30 | 0.219 | 0.208 | 1299.0 | 0.208 | 94.88 | 0.955 | 0.2285 | 0.0111 | 0.2483 |
| 45 | 0.221 | 0.205 | 1880.3 | 0.205 | 92.71 | 0.952 | 0.2279 | 0.0098 | 0.3682 |
| 60 | 0.222 | 0.203 | 2442.8 | 0.203 | 91.74 | 0.949 | 0.2272 | 0.0088 | 0.4830 |

Resultados

Tabla 4.52 C_F, Tr, M_d, M_{PM}, experimento L300-12-0.

| t, minutos | C _R , g/L | C _{Fa} , g/L | V _F , mL | C _F , g/L | Tr, % | V _R , L | M, g | M _d , g | M _{PM} , g |
|------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-------|--------------------|--------|--------------------|---------------------|
| 0 | 0.247 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2465 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.228 | 0.152 | 64.5 | 0.170 | 66.72 | 0.985 | 0.2459 | 0.0153 | 0.0055 |
| 3 | 0.229 | 0.205 | 181.2 | 0.205 | 89.23 | 0.982 | 0.2453 | 0.0122 | 0.0271 |
| 5 | 0.230 | 0.198 | 282.5 | 0.198 | 86.18 | 0.979 | 0.2446 | 0.0118 | 0.0475 |
| 7 | 0.232 | 0.193 | 379.5 | 0.193 | 83.52 | 0.976 | 0.2440 | 0.0105 | 0.0665 |
| 9 | 0.235 | 0.189 | 475.5 | 0.189 | 80.70 | 0.973 | 0.2434 | 0.0078 | 0.0849 |
| 11 | 0.235 | 0.184 | 571.5 | 0.184 | 78.47 | 0.970 | 0.2427 | 0.0081 | 0.1028 |
| 13 | 0.236 | 0.183 | 666.6 | 0.183 | 77.62 | 0.967 | 0.2421 | 0.0072 | 0.1203 |
| 15 | 0.236 | 0.179 | 759.8 | 0.179 | 75.75 | 0.964 | 0.2415 | 0.0071 | 0.1371 |
| 20 | 0.237 | 0.172 | 990.6 | 0.172 | 72.67 | 0.961 | 0.2409 | 0.0067 | 0.1776 |
| 25 | 0.239 | 0.167 | 1221.4 | 0.167 | 70.06 | 0.958 | 0.2403 | 0.0052 | 0.2168 |
| 30 | 0.241 | 0.163 | 1452.1 | 0.163 | 67.60 | 0.955 | 0.2397 | 0.0030 | 0.2549 |
| 45 | 0.243 | 0.156 | 2144.4 | 0.156 | 64.31 | 0.952 | 0.2391 | 0.0016 | 0.3655 |
| 60 | 0.243 | 0.147 | 2823.9 | 0.147 | 60.31 | 0.949 | 0.2385 | 0.0021 | 0.4685 |

4.2.3. Sistema β-lactoglobulina-membrana de 300 kDa

Los resultados obtenidos durante el estudio de la influencia del pH y la fuerza iónica durante la filtración de β-lactoglobulina mediante una membrana de 300 kDa se muestran a continuación. Las condiciones de operación elegidas fueron las mismas que las señaladas en el apartado 4.2.1. Los experimentos realizados se listan en la Tabla 4.53 :

Tabla 4.53 Experimentos β-lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | Fuerza iónica, mM |
|-------------|-----|-------------------|
| BLg-3-0 | 3 | 0 |
| BLg-4-0 | 4 | 0 |
| BLg-5.2-0 | 5.2 | 0 |
| BLg-5.2-5 | 5.2 | 5 |
| BLg-5.2-7 | 5.2 | 7 |
| BLg-5.2-10 | 5.2 | 10 |
| BLg-5.2-15 | 5.2 | 15 |
| BLg-5.2-20 | 5.2 | 20 |
| BLg-6-0 | 6 | 0 |
| BLg-7-0 | 7 | 0 |
| BLg-8-0 | 8 | 0 |
| BLg-9-0 | 9 | 0 |

Flujos relativos y volumen de filtrado

Tabla 4.54 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-3-0.

| t, minutos | Q_F , mL/min | J_F/J_{F0} | V_F , mL |
|---------------|-------------------|--------------|------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 57.1 | 0.416 | 194.5 |
| 4 | 52.2 | 0.380 | 303.8 |
| 6 | 48.0 | 0.350 | 404.0 |
| 8 | 46.2 | 0.336 | 498.1 |
| 10 | 44.4 | 0.324 | 588.7 |
| 12 | 44.4 | 0.324 | 677.6 |
| 14 | 42.9 | 0.312 | 764.9 |
| 16 | 42.9 | 0.312 | 850.6 |
| 18 | 42.9 | 0.312 | 936.3 |
| 20 | 41.4 | 0.301 | 1020.6 |
| 25 | 40.0 | 0.291 | 1224.0 |
| 30 | 40.0 | 0.291 | 1424.0 |
| 35 | 40.0 | 0.291 | 1624.0 |
| 40 | 40.0 | 0.291 | 1824.0 |
| 45 | 40.0 | 0.291 | 2024.0 |
| 50 | 38.7 | 0.282 | 2220.8 |
| 55 | 38.7 | 0.282 | 2414.3 |
| 60 | 38.7 | 0.282 | 2607.9 |

Tabla 4.55 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-4-0.

| t, minutos | Q_F , mL/min | J_F/J_{F0} | V_F , mL |
|---------------|-------------------|--------------|------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 37.5 | 0.273 | 174.8 |
| 4 | 33.3 | 0.243 | 245.7 |
| 6 | 30.8 | 0.224 | 309.8 |
| 8 | 30.0 | 0.218 | 370.5 |
| 10 | 28.6 | 0.208 | 429.1 |
| 12 | 27.3 | 0.199 | 485.0 |
| 14 | 26.7 | 0.194 | 538.9 |
| 16 | 26.1 | 0.190 | 591.7 |
| 18 | 25.5 | 0.186 | 643.3 |
| 20 | 25.0 | 0.182 | 693.8 |
| 25 | 24.0 | 0.175 | 816.3 |
| 30 | 23.1 | 0.168 | 934.0 |
| 35 | 22.6 | 0.165 | 1048.3 |
| 40 | 22.2 | 0.162 | 1160.4 |
| 45 | 21.4 | 0.156 | 1269.6 |
| 50 | 21.4 | 0.156 | 1376.7 |
| 55 | 21.1 | 0.153 | 1482.9 |
| 60 | 20.7 | 0.151 | 1587.3 |

Resultados

Tabla 4.56 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-5.2-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 31.6 | 0.230 | 168.9 |
| 4 | 28.6 | 0.208 | 229.1 |
| 6 | 27.3 | 0.199 | 284.9 |
| 8 | 27.3 | 0.199 | 339.5 |
| 10 | 26.1 | 0.190 | 392.8 |
| 12 | 26.1 | 0.190 | 445.0 |
| 14 | 26.1 | 0.190 | 497.2 |
| 16 | 26.1 | 0.190 | 549.3 |
| 18 | 26.1 | 0.190 | 601.5 |
| 20 | 26.1 | 0.190 | 653.7 |
| 25 | 26.1 | 0.190 | 784.1 |
| 30 | 26.1 | 0.190 | 914.6 |
| 35 | 26.1 | 0.190 | 1045.0 |
| 40 | 26.1 | 0.190 | 1175.4 |
| 45 | 26.1 | 0.190 | 1305.9 |
| 50 | 26.1 | 0.190 | 1436.3 |
| 55 | 26.1 | 0.190 | 1566.7 |
| 60 | 26.1 | 0.190 | 1697.2 |

Tabla 4.57 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-5.2-5.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 31.6 | 0.230 | 168.9 |
| 4 | 28.6 | 0.208 | 229.1 |
| 6 | 27.3 | 0.199 | 284.9 |
| 8 | 26.1 | 0.190 | 338.3 |
| 10 | 26.1 | 0.190 | 390.4 |
| 12 | 25.0 | 0.182 | 441.5 |
| 14 | 25.0 | 0.182 | 491.5 |
| 16 | 25.0 | 0.182 | 541.5 |
| 18 | 25.0 | 0.182 | 591.5 |
| 20 | 25.0 | 0.182 | 641.5 |
| 25 | 25.0 | 0.182 | 766.5 |
| 30 | 25.0 | 0.182 | 891.5 |
| 35 | 25.0 | 0.182 | 1016.5 |
| 40 | 25.0 | 0.182 | 1141.5 |
| 45 | 25.0 | 0.182 | 1266.5 |
| 50 | 25.0 | 0.182 | 1391.5 |
| 55 | 25.0 | 0.182 | 1516.5 |
| 60 | 25.0 | 0.182 | 1641.5 |

Resultados

Tabla 4.58 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-5.2-7.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 31.6 | 0.230 | 168.9 |
| 4 | 28.6 | 0.208 | 229.1 |
| 6 | 27.3 | 0.199 | 284.9 |
| 8 | 27.3 | 0.199 | 339.5 |
| 10 | 26.1 | 0.190 | 392.8 |
| 12 | 26.1 | 0.190 | 445.0 |
| 14 | 26.1 | 0.190 | 497.2 |
| 16 | 26.1 | 0.190 | 549.3 |
| 18 | 26.1 | 0.190 | 601.5 |
| 20 | 26.1 | 0.190 | 653.7 |
| 25 | 25.0 | 0.182 | 781.4 |
| 30 | 25.0 | 0.182 | 906.4 |
| 35 | 25.0 | 0.182 | 1031.4 |
| 40 | 25.0 | 0.182 | 1156.4 |
| 45 | 25.0 | 0.182 | 1281.4 |
| 50 | 25.0 | 0.182 | 1406.4 |
| 55 | 24.0 | 0.175 | 1528.9 |
| 60 | 24.0 | 0.175 | 1648.9 |

Tabla 4.59 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-5.2-10.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 31.6 | 0.230 | 168.9 |
| 4 | 28.6 | 0.208 | 229.1 |
| 6 | 27.3 | 0.199 | 284.9 |
| 8 | 27.3 | 0.199 | 339.5 |
| 10 | 26.1 | 0.190 | 392.8 |
| 12 | 26.1 | 0.190 | 445.0 |
| 14 | 26.1 | 0.190 | 497.2 |
| 16 | 26.1 | 0.190 | 549.3 |
| 18 | 26.1 | 0.190 | 601.5 |
| 20 | 25.0 | 0.182 | 652.6 |
| 25 | 25.0 | 0.182 | 777.6 |
| 30 | 25.0 | 0.182 | 902.6 |
| 35 | 25.0 | 0.182 | 1027.6 |
| 40 | 25.0 | 0.182 | 1152.6 |
| 45 | 25.0 | 0.182 | 1277.6 |
| 50 | 25.0 | 0.182 | 1402.6 |
| 55 | 25.0 | 0.182 | 1527.6 |
| 60 | 24.0 | 0.175 | 1650.1 |

Resultados

Tabla 4.60 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-5.2-15.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 33.3 | 0.243 | 170.7 |
| 4 | 30.0 | 0.218 | 234.0 |
| 6 | 28.6 | 0.208 | 292.6 |
| 8 | 28.6 | 0.208 | 349.7 |
| 10 | 28.6 | 0.208 | 406.9 |
| 12 | 27.3 | 0.199 | 462.7 |
| 14 | 27.3 | 0.199 | 517.3 |
| 16 | 26.1 | 0.190 | 570.6 |
| 18 | 26.1 | 0.190 | 622.8 |
| 20 | 26.1 | 0.190 | 675.0 |
| 25 | 26.1 | 0.190 | 805.4 |
| 30 | 25.0 | 0.182 | 933.1 |
| 35 | 25.0 | 0.182 | 1058.1 |
| 40 | 25.0 | 0.182 | 1183.1 |
| 45 | 25.0 | 0.182 | 1308.1 |
| 50 | 25.0 | 0.182 | 1433.1 |
| 55 | 24.0 | 0.175 | 1555.6 |
| 60 | 24.0 | 0.175 | 1675.6 |

Tabla 4.61 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-5.2-20.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 35.3 | 0.257 | 172.6 |
| 4 | 31.6 | 0.230 | 239.5 |
| 6 | 30.0 | 0.218 | 301.1 |
| 8 | 28.6 | 0.208 | 359.7 |
| 10 | 27.3 | 0.199 | 415.5 |
| 12 | 27.3 | 0.199 | 470.0 |
| 14 | 27.3 | 0.199 | 524.6 |
| 16 | 26.1 | 0.190 | 577.9 |
| 18 | 26.1 | 0.190 | 630.1 |
| 20 | 26.1 | 0.190 | 682.3 |
| 25 | 25.0 | 0.182 | 810.0 |
| 30 | 25.0 | 0.182 | 935.0 |
| 35 | 25.0 | 0.182 | 1060.0 |
| 40 | 25.0 | 0.182 | 1185.0 |
| 45 | 24.0 | 0.175 | 1307.5 |
| 50 | 24.0 | 0.175 | 1427.5 |
| 55 | 23.1 | 0.168 | 1545.2 |
| 60 | 23.1 | 0.168 | 1660.6 |

Resultados

Tabla 4.62 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-6-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 41.4 | 0.301 | 178.7 |
| 4 | 38.7 | 0.282 | 258.8 |
| 6 | 38.7 | 0.282 | 336.2 |
| 8 | 38.7 | 0.282 | 413.6 |
| 10 | 38.7 | 0.282 | 491.1 |
| 12 | 38.7 | 0.282 | 568.5 |
| 14 | 38.7 | 0.282 | 645.9 |
| 16 | 38.7 | 0.282 | 723.3 |
| 18 | 38.7 | 0.282 | 800.7 |
| 20 | 38.7 | 0.282 | 878.2 |
| 25 | 38.7 | 0.282 | 1071.7 |
| 30 | 38.7 | 0.282 | 1265.3 |
| 35 | 38.7 | 0.282 | 1458.8 |
| 40 | 38.7 | 0.282 | 1652.4 |
| 45 | 38.7 | 0.282 | 1845.9 |
| 50 | 38.7 | 0.282 | 2039.5 |
| 55 | 38.7 | 0.282 | 2233.0 |
| 60 | 38.7 | 0.282 | 2426.5 |

Tabla 4.63 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-7-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 60.0 | 0.437 | 197.3 |
| 4 | 60.0 | 0.437 | 317.3 |
| 6 | 57.1 | 0.416 | 434.5 |
| 8 | 54.5 | 0.397 | 546.2 |
| 10 | 54.5 | 0.397 | 655.3 |
| 12 | 54.5 | 0.397 | 764.4 |
| 14 | 54.5 | 0.397 | 873.4 |
| 16 | 52.2 | 0.380 | 980.2 |
| 18 | 52.2 | 0.380 | 1084.5 |
| 20 | 52.2 | 0.380 | 1188.9 |
| 25 | 50.0 | 0.364 | 1444.3 |
| 30 | 50.0 | 0.364 | 1694.3 |
| 35 | 50.0 | 0.364 | 1944.3 |
| 40 | 50.0 | 0.364 | 2194.3 |
| 45 | 50.0 | 0.364 | 2444.3 |
| 50 | 50.0 | 0.364 | 2694.3 |
| 55 | 50.0 | 0.364 | 2944.3 |
| 60 | 50.0 | 0.364 | 3194.3 |

Resultados

Tabla 4.64 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-8-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 70.6 | 0.514 | 207.9 |
| 4 | 68.2 | 0.496 | 346.7 |
| 6 | 66.7 | 0.485 | 481.5 |
| 8 | 63.2 | 0.460 | 611.4 |
| 10 | 63.2 | 0.460 | 737.7 |
| 12 | 63.2 | 0.460 | 864.0 |
| 14 | 63.2 | 0.460 | 990.3 |
| 16 | 60.0 | 0.437 | 1113.5 |
| 18 | 60.0 | 0.437 | 1233.5 |
| 20 | 60.0 | 0.437 | 1353.5 |
| 25 | 60.0 | 0.437 | 1653.5 |
| 30 | 60.0 | 0.437 | 1953.5 |
| 35 | 60.0 | 0.437 | 2253.5 |
| 40 | 60.0 | 0.437 | 2553.5 |
| 45 | 57.1 | 0.416 | 2846.3 |
| 50 | 57.1 | 0.416 | 3132.0 |
| 55 | 57.1 | 0.416 | 3417.8 |
| 60 | 54.5 | 0.397 | 3697.0 |

Tabla 4.65 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BLg-9-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 137.3 | 1.000 | 0 |
| 2 | 80.0 | 0.583 | 217.3 |
| 4 | 75.0 | 0.546 | 372.3 |
| 6 | 75.0 | 0.546 | 522.3 |
| 8 | 75.0 | 0.546 | 672.3 |
| 10 | 75.0 | 0.546 | 822.3 |
| 12 | 70.6 | 0.514 | 967.9 |
| 14 | 70.6 | 0.514 | 1109.1 |
| 16 | 70.6 | 0.514 | 1250.3 |
| 18 | 66.7 | 0.485 | 1387.5 |
| 20 | 66.7 | 0.485 | 1520.9 |
| 25 | 66.7 | 0.485 | 1854.2 |
| 30 | 66.7 | 0.485 | 2187.5 |
| 35 | 63.2 | 0.460 | 2512.1 |
| 40 | 63.2 | 0.460 | 2827.9 |
| 45 | 63.2 | 0.460 | 3143.7 |
| 50 | 60.0 | 0.437 | 3451.6 |
| 55 | 60.0 | 0.437 | 3751.6 |
| 60 | 60.0 | 0.437 | 4051.6 |

Resultados

Concentración de filtrado, transmisión observada, masa depositada y masa transportada.

Tabla 4.66 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-3-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.245 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2449 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.241 | 0.054 | 97.2 | 0.055 | 22.22 | 0.985 | 0.2444 | 0.0053 | 0.0027 |
| 3 | 0.245 | 0.054 | 249.1 | 0.054 | 21.82 | 0.982 | 0.2440 | 0.0012 | 0.0110 |
| 5 | 0.245 | 0.054 | 353.9 | 0.054 | 21.82 | 0.979 | 0.2435 | 0.0015 | 0.0166 |
| 7 | 0.241 | 0.049 | 451.0 | 0.049 | 20.37 | 0.976 | 0.2431 | 0.0063 | 0.0216 |
| 9 | 0.241 | 0.045 | 543.4 | 0.045 | 18.52 | 0.973 | 0.2427 | 0.0068 | 0.0259 |
| 11 | 0.241 | 0.049 | 633.2 | 0.049 | 20.37 | 0.970 | 0.2422 | 0.0069 | 0.0301 |
| 13 | 0.245 | 0.049 | 721.3 | 0.049 | 20.00 | 0.967 | 0.2418 | 0.0028 | 0.0344 |
| 15 | 0.245 | 0.045 | 807.8 | 0.045 | 18.18 | 0.964 | 0.2414 | 0.0033 | 0.0385 |
| 20 | 0.241 | 0.045 | 1020.6 | 0.045 | 18.52 | 0.961 | 0.2409 | 0.0079 | 0.0479 |
| 25 | 0.245 | 0.045 | 1224.0 | 0.045 | 18.18 | 0.958 | 0.2405 | 0.0039 | 0.0569 |
| 30 | 0.245 | 0.045 | 1424.0 | 0.045 | 18.18 | 0.955 | 0.2401 | 0.0042 | 0.0659 |
| 45 | 0.245 | 0.045 | 2024.0 | 0.045 | 18.18 | 0.952 | 0.2396 | 0.0045 | 0.0926 |
| 60 | 0.245 | 0.045 | 2607.9 | 0.045 | 18.18 | 0.949 | 0.2392 | 0.0048 | 0.1189 |

Tabla 4.67 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-4-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.232 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2315 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.232 | 0.000 | 87.4 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2312 | 0.0029 | 0.0000 |
| 3 | 0.223 | 0.027 | 210.3 | 0.027 | 12.00 | 0.982 | 0.2308 | 0.0109 | 0.0009 |
| 5 | 0.223 | 0.049 | 277.7 | 0.049 | 22.00 | 0.979 | 0.2304 | 0.0103 | 0.0035 |
| 7 | 0.223 | 0.049 | 340.2 | 0.049 | 22.00 | 0.976 | 0.2300 | 0.0106 | 0.0065 |
| 9 | 0.218 | 0.049 | 399.8 | 0.049 | 22.45 | 0.973 | 0.2296 | 0.0152 | 0.0095 |
| 11 | 0.218 | 0.054 | 457.0 | 0.054 | 24.49 | 0.970 | 0.2292 | 0.0152 | 0.0124 |
| 13 | 0.223 | 0.054 | 511.9 | 0.054 | 24.00 | 0.967 | 0.2288 | 0.0112 | 0.0153 |
| 15 | 0.223 | 0.054 | 565.3 | 0.054 | 24.00 | 0.964 | 0.2283 | 0.0114 | 0.0182 |
| 20 | 0.218 | 0.058 | 693.8 | 0.058 | 26.53 | 0.961 | 0.2279 | 0.0158 | 0.0253 |
| 25 | 0.223 | 0.062 | 816.3 | 0.062 | 28.00 | 0.958 | 0.2275 | 0.0116 | 0.0327 |
| 30 | 0.223 | 0.049 | 934.0 | 0.049 | 22.00 | 0.955 | 0.2271 | 0.0124 | 0.0393 |
| 45 | 0.223 | 0.058 | 1269.6 | 0.058 | 26.00 | 0.952 | 0.2267 | 0.0123 | 0.0571 |
| 60 | 0.218 | 0.058 | 1587.3 | 0.058 | 26.53 | 0.949 | 0.2263 | 0.0167 | 0.0754 |

Resultados

Tabla 4.68 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-5.2-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.245 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2449 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.223 | 0.000 | 84.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2445 | 0.0250 | 0.0000 |
| 3 | 0.214 | 0.094 | 199.0 | 0.094 | 43.75 | 0.982 | 0.2441 | 0.0303 | 0.0028 |
| 5 | 0.218 | 0.178 | 257.0 | 0.178 | 81.63 | 0.979 | 0.2435 | 0.0227 | 0.0106 |
| 7 | 0.218 | 0.174 | 312.2 | 0.174 | 79.59 | 0.976 | 0.2429 | 0.0229 | 0.0203 |
| 9 | 0.210 | 0.174 | 366.1 | 0.174 | 82.98 | 0.973 | 0.2423 | 0.0317 | 0.0297 |
| 11 | 0.223 | 0.152 | 418.9 | 0.152 | 68.00 | 0.970 | 0.2418 | 0.0197 | 0.0383 |
| 13 | 0.223 | 0.143 | 471.1 | 0.143 | 64.00 | 0.967 | 0.2412 | 0.0201 | 0.0460 |
| 15 | 0.218 | 0.143 | 523.3 | 0.143 | 65.31 | 0.964 | 0.2407 | 0.0245 | 0.0534 |
| 20 | 0.227 | 0.143 | 653.7 | 0.143 | 62.75 | 0.961 | 0.2401 | 0.0161 | 0.0721 |
| 25 | 0.218 | 0.125 | 784.1 | 0.125 | 57.14 | 0.958 | 0.2396 | 0.0255 | 0.0895 |
| 30 | 0.223 | 0.120 | 914.6 | 0.120 | 54.00 | 0.955 | 0.2391 | 0.0215 | 0.1055 |
| 45 | 0.232 | 0.094 | 1305.9 | 0.094 | 40.38 | 0.952 | 0.2386 | 0.0143 | 0.1474 |
| 60 | 0.227 | 0.067 | 1697.2 | 0.067 | 29.41 | 0.949 | 0.2382 | 0.0198 | 0.1788 |

Tabla 4.69 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-5.2-5.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.227 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2271 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.214 | 0.000 | 84.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2267 | 0.0160 | 0.0000 |
| 3 | 0.214 | 0.107 | 199.0 | 0.107 | 50.00 | 0.982 | 0.2263 | 0.0120 | 0.0032 |
| 5 | 0.214 | 0.169 | 257.0 | 0.169 | 79.17 | 0.979 | 0.2257 | 0.0096 | 0.0112 |
| 7 | 0.218 | 0.192 | 311.6 | 0.192 | 87.76 | 0.976 | 0.2251 | 0.0044 | 0.0210 |
| 9 | 0.218 | 0.169 | 364.4 | 0.169 | 77.55 | 0.973 | 0.2245 | 0.0054 | 0.0306 |
| 11 | 0.218 | 0.174 | 416.0 | 0.174 | 79.59 | 0.970 | 0.2239 | 0.0052 | 0.0394 |
| 13 | 0.218 | 0.169 | 466.5 | 0.169 | 77.55 | 0.967 | 0.2233 | 0.0055 | 0.0481 |
| 15 | 0.214 | 0.165 | 516.5 | 0.165 | 77.08 | 0.964 | 0.2228 | 0.0101 | 0.0565 |
| 20 | 0.214 | 0.161 | 641.5 | 0.161 | 75.00 | 0.961 | 0.2222 | 0.0103 | 0.0768 |
| 25 | 0.223 | 0.143 | 766.5 | 0.143 | 64.00 | 0.958 | 0.2216 | 0.0026 | 0.0958 |
| 30 | 0.223 | 0.143 | 891.5 | 0.143 | 64.00 | 0.955 | 0.2211 | 0.0027 | 0.1136 |
| 45 | 0.223 | 0.129 | 1266.5 | 0.129 | 58.00 | 0.952 | 0.2206 | 0.0033 | 0.1646 |
| 60 | 0.223 | 0.111 | 1641.5 | 0.111 | 50.00 | 0.949 | 0.2201 | 0.0042 | 0.2097 |

Tabla 4.70 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-5.2-7.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.254 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2538 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.245 | 0.000 | 84.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2534 | 0.0120 | 0.0000 |
| 3 | 0.236 | 0.169 | 199.0 | 0.170 | 71.70 | 0.982 | 0.2528 | 0.0142 | 0.0051 |
| 5 | 0.236 | 0.187 | 257.0 | 0.187 | 79.25 | 0.979 | 0.2522 | 0.0136 | 0.0154 |
| 7 | 0.227 | 0.183 | 312.2 | 0.183 | 80.39 | 0.976 | 0.2516 | 0.0225 | 0.0256 |
| 9 | 0.232 | 0.183 | 366.1 | 0.183 | 78.85 | 0.973 | 0.2509 | 0.0183 | 0.0355 |
| 11 | 0.227 | 0.183 | 418.9 | 0.183 | 80.39 | 0.970 | 0.2503 | 0.0227 | 0.0452 |
| 13 | 0.232 | 0.178 | 471.1 | 0.178 | 76.92 | 0.967 | 0.2497 | 0.0186 | 0.0546 |
| 15 | 0.227 | 0.174 | 523.3 | 0.174 | 76.47 | 0.964 | 0.2491 | 0.0232 | 0.0638 |
| 20 | 0.236 | 0.174 | 653.7 | 0.174 | 73.58 | 0.961 | 0.2485 | 0.0147 | 0.0865 |
| 25 | 0.241 | 0.174 | 781.4 | 0.174 | 72.22 | 0.958 | 0.2479 | 0.0105 | 0.1087 |
| 30 | 0.241 | 0.174 | 906.4 | 0.174 | 72.22 | 0.955 | 0.2472 | 0.0106 | 0.1304 |
| 45 | 0.236 | 0.156 | 1281.4 | 0.156 | 66.04 | 0.952 | 0.2467 | 0.0157 | 0.1923 |
| 60 | 0.250 | 0.156 | 1648.9 | 0.156 | 62.50 | 0.949 | 0.2460 | 0.0031 | 0.2496 |

Resultados

Tabla 4.71 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-5.2-10.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.245 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2449 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.227 | 0.000 | 84.5 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2445 | 0.0207 | 0.0000 |
| 3 | 0.227 | 0.156 | 199.0 | 0.156 | 68.63 | 0.982 | 0.2440 | 0.0146 | 0.0047 |
| 5 | 0.227 | 0.183 | 257.0 | 0.183 | 80.39 | 0.979 | 0.2433 | 0.0136 | 0.0145 |
| 7 | 0.223 | 0.183 | 312.2 | 0.183 | 82.00 | 0.976 | 0.2427 | 0.0181 | 0.0246 |
| 9 | 0.218 | 0.183 | 366.1 | 0.183 | 83.67 | 0.973 | 0.2421 | 0.0225 | 0.0345 |
| 11 | 0.223 | 0.183 | 418.9 | 0.183 | 82.00 | 0.970 | 0.2415 | 0.0182 | 0.0441 |
| 13 | 0.218 | 0.183 | 471.1 | 0.183 | 83.67 | 0.967 | 0.2409 | 0.0226 | 0.0536 |
| 15 | 0.232 | 0.183 | 523.3 | 0.183 | 78.85 | 0.964 | 0.2403 | 0.0097 | 0.0632 |
| 20 | 0.232 | 0.178 | 652.6 | 0.178 | 76.92 | 0.961 | 0.2397 | 0.0100 | 0.0862 |
| 25 | 0.232 | 0.174 | 777.6 | 0.174 | 75.00 | 0.958 | 0.2391 | 0.0102 | 0.1083 |
| 30 | 0.227 | 0.165 | 902.6 | 0.165 | 72.55 | 0.955 | 0.2385 | 0.0149 | 0.1294 |
| 45 | 0.223 | 0.152 | 1277.6 | 0.152 | 68.00 | 0.952 | 0.2379 | 0.0198 | 0.1888 |
| 60 | 0.232 | 0.143 | 1650.1 | 0.143 | 61.54 | 0.949 | 0.2374 | 0.0118 | 0.2429 |

Tabla 4.72 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-5.2-15.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.232 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2315 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.218 | 0.004 | 85.3 | 0.005 | 2.04 | 0.985 | 0.2312 | 0.0159 | 0.0002 |
| 3 | 0.201 | 0.125 | 202.3 | 0.125 | 62.22 | 0.982 | 0.2307 | 0.0288 | 0.0046 |
| 5 | 0.214 | 0.156 | 263.3 | 0.156 | 72.92 | 0.979 | 0.2301 | 0.0146 | 0.0131 |
| 7 | 0.218 | 0.178 | 321.1 | 0.178 | 81.63 | 0.976 | 0.2295 | 0.0094 | 0.0228 |
| 9 | 0.223 | 0.178 | 378.3 | 0.178 | 80.00 | 0.973 | 0.2289 | 0.0051 | 0.0329 |
| 11 | 0.214 | 0.201 | 434.8 | 0.201 | 93.75 | 0.970 | 0.2283 | 0.0129 | 0.0436 |
| 13 | 0.214 | 0.196 | 490.0 | 0.196 | 91.67 | 0.967 | 0.2277 | 0.0131 | 0.0546 |
| 15 | 0.205 | 0.196 | 543.9 | 0.196 | 95.65 | 0.964 | 0.2271 | 0.0218 | 0.0652 |
| 20 | 0.210 | 0.178 | 675.0 | 0.178 | 85.11 | 0.961 | 0.2265 | 0.0182 | 0.0899 |
| 25 | 0.223 | 0.169 | 805.4 | 0.169 | 76.00 | 0.958 | 0.2259 | 0.0058 | 0.1126 |
| 30 | 0.218 | 0.165 | 933.1 | 0.165 | 75.51 | 0.955 | 0.2254 | 0.0103 | 0.1339 |
| 45 | 0.227 | 0.161 | 1308.1 | 0.161 | 70.59 | 0.952 | 0.2248 | 0.0021 | 0.1950 |
| 60 | 0.227 | 0.143 | 1675.6 | 0.143 | 62.75 | 0.949 | 0.2242 | 0.0029 | 0.2508 |

Tabla 4.73 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-5.2-20.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.236 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2360 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.232 | 0.000 | 86.3 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2356 | 0.0074 | 0.0000 |
| 3 | 0.232 | 0.107 | 206.1 | 0.107 | 46.15 | 0.982 | 0.2351 | 0.0033 | 0.0036 |
| 5 | 0.196 | 0.174 | 270.3 | 0.174 | 88.64 | 0.979 | 0.2346 | 0.0357 | 0.0125 |
| 7 | 0.210 | 0.174 | 330.4 | 0.174 | 82.98 | 0.976 | 0.2340 | 0.0227 | 0.0230 |
| 9 | 0.201 | 0.174 | 387.6 | 0.174 | 86.67 | 0.973 | 0.2334 | 0.0315 | 0.0329 |
| 11 | 0.205 | 0.187 | 442.8 | 0.187 | 91.30 | 0.970 | 0.2328 | 0.0266 | 0.0429 |
| 13 | 0.196 | 0.183 | 497.3 | 0.183 | 93.18 | 0.967 | 0.2323 | 0.0355 | 0.0530 |
| 15 | 0.196 | 0.183 | 551.3 | 0.183 | 93.18 | 0.964 | 0.2317 | 0.0355 | 0.0628 |
| 20 | 0.205 | 0.183 | 682.3 | 0.183 | 89.13 | 0.961 | 0.2311 | 0.0269 | 0.0869 |
| 25 | 0.210 | 0.161 | 810.0 | 0.161 | 76.60 | 0.958 | 0.2306 | 0.0236 | 0.1089 |
| 30 | 0.214 | 0.165 | 935.0 | 0.165 | 77.08 | 0.955 | 0.2300 | 0.0192 | 0.1292 |
| 45 | 0.210 | 0.161 | 1307.5 | 0.161 | 76.60 | 0.952 | 0.2294 | 0.0237 | 0.1891 |
| 60 | 0.223 | 0.147 | 1660.6 | 0.147 | 66.00 | 0.949 | 0.2289 | 0.0116 | 0.2434 |

Resultados

Tabla 4.74 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BLg-6-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.245 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2449 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.245 | 0.000 | 89.4 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2445 | 0.0031 | 0.0000 |
| 3 | 0.223 | 0.040 | 218.8 | 0.040 | 18.00 | 0.982 | 0.2441 | 0.0237 | 0.0016 |
| 5 | 0.227 | 0.058 | 297.5 | 0.058 | 25.49 | 0.979 | 0.2437 | 0.0189 | 0.0055 |
| 7 | 0.223 | 0.054 | 374.9 | 0.054 | 24.00 | 0.976 | 0.2433 | 0.0237 | 0.0098 |
| 9 | 0.223 | 0.058 | 452.4 | 0.058 | 26.00 | 0.973 | 0.2429 | 0.0238 | 0.0141 |
| 11 | 0.223 | 0.054 | 529.8 | 0.054 | 24.00 | 0.970 | 0.2424 | 0.0242 | 0.0184 |
| 13 | 0.227 | 0.054 | 607.2 | 0.054 | 23.53 | 0.967 | 0.2420 | 0.0201 | 0.0225 |
| 15 | 0.223 | 0.054 | 684.6 | 0.054 | 24.00 | 0.964 | 0.2416 | 0.0247 | 0.0267 |
| 20 | 0.232 | 0.045 | 878.2 | 0.045 | 19.23 | 0.961 | 0.2412 | 0.0167 | 0.0362 |
| 25 | 0.227 | 0.045 | 1071.7 | 0.045 | 19.61 | 0.958 | 0.2408 | 0.0213 | 0.0448 |
| 30 | 0.232 | 0.058 | 1265.3 | 0.058 | 25.00 | 0.955 | 0.2403 | 0.0167 | 0.0547 |
| 45 | 0.254 | 0.031 | 1845.9 | 0.031 | 12.28 | 0.952 | 0.2399 | -0.0031 | 0.0806 |
| 60 | 0.245 | 0.018 | 2426.5 | 0.018 | 7.27 | 0.949 | 0.2395 | 0.0062 | 0.0949 |

Tabla 4.75 Concentración de filtrado y Tr, experimento BLg-7-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.245 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2449 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.245 | 0.000 | 98.7 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2445 | 0.0031 | 0.0000 |
| 3 | 0.254 | 0.022 | 257.3 | 0.022 | 8.77 | 0.982 | 0.2441 | -0.0062 | 0.0013 |
| 5 | 0.245 | 0.009 | 375.9 | 0.009 | 3.64 | 0.979 | 0.2437 | 0.0034 | 0.0032 |
| 7 | 0.245 | 0.013 | 490.3 | 0.013 | 5.45 | 0.976 | 0.2433 | 0.0036 | 0.0045 |
| 9 | 0.245 | 0.013 | 600.7 | 0.013 | 5.45 | 0.973 | 0.2429 | 0.0039 | 0.0059 |
| 11 | 0.254 | 0.022 | 709.8 | 0.022 | 8.77 | 0.970 | 0.2425 | -0.0048 | 0.0079 |
| 13 | 0.241 | 0.013 | 818.9 | 0.013 | 5.56 | 0.967 | 0.2421 | 0.0089 | 0.0098 |
| 15 | 0.245 | 0.013 | 926.8 | 0.013 | 5.45 | 0.964 | 0.2418 | 0.0049 | 0.0113 |
| 20 | 0.241 | 0.018 | 1188.9 | 0.018 | 7.41 | 0.961 | 0.2414 | 0.0094 | 0.0154 |
| 25 | 0.245 | 0.018 | 1444.3 | 0.018 | 7.27 | 0.958 | 0.2410 | 0.0054 | 0.0199 |
| 30 | 0.245 | 0.018 | 1694.3 | 0.018 | 7.27 | 0.955 | 0.2406 | 0.0058 | 0.0244 |
| 45 | 0.250 | 0.013 | 2444.3 | 0.013 | 5.36 | 0.952 | 0.2402 | 0.0021 | 0.0361 |
| 60 | 0.250 | 0.018 | 3194.3 | 0.018 | 7.14 | 0.949 | 0.2398 | 0.0022 | 0.0478 |

Tabla 4.76 Concentración de filtrado y Tr, experimento BLg-8-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|------------|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| 0 | 0.245 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2449 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.241 | 0.000 | 104.0 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2445 | 0.0075 | 0.0000 |
| 3 | 0.241 | 0.000 | 277.3 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2442 | 0.0078 | 0.0000 |
| 5 | 0.241 | 0.000 | 414.1 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2438 | 0.0082 | 0.0000 |
| 7 | 0.245 | 0.000 | 546.5 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2434 | 0.0042 | 0.0000 |
| 9 | 0.236 | 0.000 | 674.5 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2431 | 0.0132 | 0.0000 |
| 11 | 0.236 | 0.000 | 800.8 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2427 | 0.0136 | 0.0000 |
| 13 | 0.236 | 0.000 | 927.2 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.2424 | 0.0140 | 0.0000 |
| 15 | 0.232 | 0.000 | 1051.9 | 0.000 | 0.00 | 0.964 | 0.2420 | 0.0186 | 0.0000 |
| 20 | 0.236 | 0.000 | 1353.5 | 0.000 | 0.00 | 0.961 | 0.2417 | 0.0147 | 0.0000 |
| 25 | 0.241 | 0.000 | 1653.5 | 0.000 | 0.00 | 0.958 | 0.2413 | 0.0107 | 0.0000 |
| 30 | 0.241 | 0.000 | 1953.5 | 0.000 | 0.00 | 0.955 | 0.2409 | 0.0111 | 0.0000 |
| 45 | 0.245 | 0.000 | 2846.3 | 0.000 | 0.00 | 0.952 | 0.2406 | 0.0072 | 0.0000 |
| 60 | 0.245 | 0.000 | 3697.0 | 0.000 | 0.00 | 0.949 | 0.2402 | 0.0076 | 0.0000 |

Resultados

Tabla 4.77 Concentración de filtrado y Tr, experimento BLg-9-0.

| t, minutos | C _R , g/L | C _{Fa} , g/L | V _F , mL | C _F , g/L | Tr, % | V _R , L | M, g | M _d , g | M _{PM} , g |
|------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-------|--------------------|--------|--------------------|---------------------|
| 0 | 0.254 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.2538 | 0.0000 | 0.0000 |
| 1 | 0.254 | 0.000 | 108.7 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.2534 | 0.0032 | 0.0000 |
| 3 | 0.250 | 0.000 | 294.8 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.2530 | 0.0079 | 0.0000 |
| 5 | 0.245 | 0.000 | 447.3 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.2527 | 0.0127 | 0.0000 |
| 7 | 0.245 | 0.000 | 597.3 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.2523 | 0.0131 | 0.0000 |
| 9 | 0.245 | 0.000 | 747.3 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.2519 | 0.0134 | 0.0000 |
| 11 | 0.241 | 0.000 | 895.1 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.2516 | 0.0181 | 0.0000 |
| 13 | 0.236 | 0.000 | 1038.5 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.2512 | 0.0228 | 0.0000 |
| 15 | 0.241 | 0.000 | 1179.7 | 0.000 | 0.00 | 0.964 | 0.2508 | 0.0188 | 0.0000 |
| 20 | 0.241 | 0.000 | 1520.9 | 0.000 | 0.00 | 0.961 | 0.2505 | 0.0192 | 0.0000 |
| 25 | 0.236 | 0.000 | 1854.2 | 0.000 | 0.00 | 0.958 | 0.2501 | 0.0238 | 0.0000 |
| 30 | 0.241 | 0.004 | 2187.5 | 0.004 | 1.85 | 0.955 | 0.2498 | 0.0198 | 0.0007 |
| 45 | 0.245 | 0.004 | 3143.7 | 0.004 | 1.82 | 0.952 | 0.2494 | 0.0159 | 0.0051 |
| 60 | 0.241 | 0.004 | 4051.6 | 0.004 | 1.85 | 0.949 | 0.2490 | 0.0205 | 0.0092 |

4.2.4. Sistema BSA-membrana de 300 kDa

Únicamente se realizó un experimento para un valor de pH igual al del punto isoeléctrico y con las mismas condiciones de operación que las usadas en los sistemas anteriores. Sólo se detallan los resultados para los flujos relativos y para el volumen de filtrado, ya que no se apreció transmisión durante el citado experimento.

Tabla 4.78 J_F/J_{F0} y V_F, experimento BSA-4.9-0.

| t, minutos | Q _F , mL/min | J _F /J _{F0} | V _F , mL |
|------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 0 | 83.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 12.0 | 0.144 | 95.4 |
| 4 | 9.7 | 0.116 | 117.1 |
| 6 | 8.8 | 0.106 | 135.6 |
| 8 | 8.1 | 0.097 | 152.5 |
| 10 | 7.5 | 0.090 | 168.1 |
| 12 | 7.3 | 0.088 | 182.9 |
| 14 | 7.1 | 0.086 | 197.4 |
| 16 | 6.8 | 0.082 | 211.3 |
| 18 | 6.7 | 0.080 | 224.8 |
| 20 | 6.5 | 0.078 | 238.0 |
| 25 | 6.3 | 0.075 | 269.9 |
| 30 | 6.0 | 0.072 | 300.6 |
| 35 | 5.8 | 0.069 | 330.0 |
| 40 | 5.7 | 0.068 | 358.6 |
| 45 | 5.6 | 0.067 | 386.6 |
| 50 | 5.5 | 0.065 | 414.1 |
| 55 | 5.4 | 0.064 | 441.2 |
| 60 | 5.3 | 0.063 | 467.7 |

4.2.5. Sistemas Binarios y Ternario.

De los sistemas binarios y del sistema ternario únicamente se pudo estudiar el sistema binario formado por BSA- β -lactoglobulina debido a las fuertes interacciones de la lisozima con las otras dos proteínas que daba lugar a fenómenos de agregación y precipitación muy importantes (Ricq et al., 1999).

En este caso, se estudió la influencia del pH, la fuerza iónica, el caudal de retenido (velocidad tangencial) y la presión transmembrana en la filtración de la mezcla BSA- β -lactoglobulina a través de una membrana de 300 kDa. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- Temperatura: 30 °C.
- Masa de proteína: 0.125 g de cada una de las proteínas.
- Volumen inicial: 1 L.

Los experimentos realizados se listan en la Tabla 4.79:

Tabla 4.79 Experimentos BSA- β -lactoglobulina.

| Experimento | pH | Fuerza iónica, mM | Presión transmembrana, bar | Caudal de retenido, L/h |
|---------------|----|-------------------|----------------------------|-------------------------|
| BSA-BLg-4-0 | 4 | 0 | 1 | 400 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 1 | 400 |
| BSA-BLg-5-5 | 5 | 5 | 1 | 400 |
| BSA-BLg-6-0 | 6 | 0 | 1 | 400 |
| BSA-BLg-7-0 | 7 | 0 | 1 | 400 |
| BSA-BLg-5-300 | 5 | 0 | 1 | 300 |
| BSA-BLg-5-500 | 5 | 0 | 1 | 500 |
| BSA-BLg-5-0.5 | 5 | 0 | 0.5 | 400 |
| BSA-BLg-5-1.5 | 5 | 0 | 1.5 | 400 |

Flujos relativos y volumen de filtrado.

Tabla 4.80 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-4-0.

| t, minutos | Q_F , mL/min | J_F/J_{F0} | V_F , mL |
|---------------|-------------------|--------------|------------|
| 0 | 121.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 46.2 | 0.380 | 167.6 |
| 4 | 37.5 | 0.309 | 251.2 |
| 6 | 35.3 | 0.291 | 324.0 |
| 8 | 35.3 | 0.291 | 394.6 |
| 10 | 33.3 | 0.275 | 463.2 |
| 12 | 33.3 | 0.275 | 529.9 |
| 14 | 33.3 | 0.275 | 596.6 |
| 16 | 33.3 | 0.275 | 663.2 |
| 18 | 33.3 | 0.275 | 729.9 |
| 20 | 31.6 | 0.260 | 794.8 |
| 25 | 31.6 | 0.260 | 952.7 |
| 30 | 30.0 | 0.247 | 1106.7 |
| 35 | 30.0 | 0.247 | 1256.7 |
| 40 | 30.0 | 0.247 | 1406.7 |
| 45 | 28.6 | 0.235 | 1553.1 |
| 50 | 28.6 | 0.235 | 1695.9 |
| 55 | 28.6 | 0.235 | 1838.8 |
| 60 | 28.6 | 0.235 | 1981.7 |

Tabla 4.81 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-5-0.

| t, minutos | Q_F , mL/min | J_F/J_{F0} | V_F , mL |
|---------------|-------------------|--------------|------------|
| 0 | 121.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 19.4 | 0.159 | 140.8 |
| 4 | 15.8 | 0.130 | 175.9 |
| 6 | 14.6 | 0.121 | 206.3 |
| 8 | 14.0 | 0.115 | 234.9 |
| 10 | 13.6 | 0.112 | 262.5 |
| 12 | 13.3 | 0.110 | 289.5 |
| 14 | 13.0 | 0.107 | 315.9 |
| 16 | 12.8 | 0.105 | 341.7 |
| 18 | 12.8 | 0.105 | 367.2 |
| 20 | 12.5 | 0.103 | 392.5 |
| 25 | 12.2 | 0.101 | 454.3 |
| 30 | 12.2 | 0.101 | 515.6 |
| 35 | 12.0 | 0.099 | 576.2 |
| 40 | 12.0 | 0.099 | 636.2 |
| 45 | 12.0 | 0.099 | 696.2 |
| 50 | 12.0 | 0.099 | 756.2 |
| 55 | 12.0 | 0.099 | 816.2 |
| 60 | 12.0 | 0.099 | 876.2 |

Resultados

Tabla 4.82 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-5-5.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 121.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 19.4 | 0.159 | 140.8 |
| 4 | 15.4 | 0.127 | 175.5 |
| 6 | 14.0 | 0.115 | 204.8 |
| 8 | 13.0 | 0.107 | 231.8 |
| 10 | 12.2 | 0.101 | 257.1 |
| 12 | 11.5 | 0.095 | 280.9 |
| 14 | 10.7 | 0.088 | 303.2 |
| 16 | 10.2 | 0.084 | 324.1 |
| 18 | 9.8 | 0.081 | 344.1 |
| 20 | 9.5 | 0.078 | 363.4 |
| 25 | 9.0 | 0.074 | 409.6 |
| 30 | 8.5 | 0.070 | 453.1 |
| 35 | 8.2 | 0.068 | 494.8 |
| 40 | 8.0 | 0.066 | 535.4 |
| 45 | 8.0 | 0.066 | 575.4 |
| 50 | 8.0 | 0.066 | 615.4 |
| 55 | 8.0 | 0.066 | 655.4 |
| 60 | 8.0 | 0.066 | 695.4 |

Tabla 4.83 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-6-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 121.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 34.6 | 0.285 | 156.0 |
| 4 | 31.0 | 0.256 | 221.7 |
| 6 | 30.0 | 0.247 | 282.7 |
| 8 | 29.0 | 0.239 | 341.7 |
| 10 | 29.0 | 0.239 | 399.8 |
| 12 | 29.0 | 0.239 | 457.9 |
| 14 | 29.0 | 0.239 | 515.9 |
| 16 | 29.0 | 0.239 | 574.0 |
| 18 | 29.0 | 0.239 | 632.1 |
| 20 | 29.0 | 0.239 | 690.1 |
| 25 | 29.0 | 0.239 | 835.3 |
| 30 | 29.0 | 0.239 | 980.5 |
| 35 | 29.0 | 0.239 | 1125.6 |
| 40 | 29.0 | 0.239 | 1270.8 |
| 45 | 29.0 | 0.239 | 1415.9 |
| 50 | 29.0 | 0.239 | 1561.1 |
| 55 | 29.0 | 0.239 | 1706.3 |
| 60 | 29.0 | 0.239 | 1851.4 |

Resultados

Tabla 4.84 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-7-0.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 121.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 60.0 | 0.494 | 181.4 |
| 4 | 54.5 | 0.449 | 296.0 |
| 6 | 52.2 | 0.430 | 402.7 |
| 8 | 52.2 | 0.430 | 507.0 |
| 10 | 50.0 | 0.412 | 609.2 |
| 12 | 50.0 | 0.412 | 709.2 |
| 14 | 50.0 | 0.412 | 809.2 |
| 16 | 48.0 | 0.395 | 907.2 |
| 18 | 48.0 | 0.395 | 1003.2 |
| 20 | 48.0 | 0.395 | 1099.2 |
| 25 | 46.2 | 0.380 | 1334.6 |
| 30 | 46.2 | 0.380 | 1565.4 |
| 35 | 44.4 | 0.366 | 1791.9 |
| 40 | 44.4 | 0.366 | 2014.1 |
| 45 | 44.4 | 0.366 | 2236.3 |
| 50 | 44.4 | 0.366 | 2458.5 |
| 55 | 44.4 | 0.366 | 2680.7 |
| 60 | 44.4 | 0.366 | 2903.0 |

Tabla 4.85 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-5-300.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 121.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 13.0 | 0.107 | 134.5 |
| 4 | 10.0 | 0.082 | 157.5 |
| 6 | 8.8 | 0.073 | 176.3 |
| 8 | 7.9 | 0.065 | 193.0 |
| 10 | 7.3 | 0.060 | 208.3 |
| 12 | 6.8 | 0.056 | 222.4 |
| 14 | 6.5 | 0.054 | 235.7 |
| 16 | 6.3 | 0.051 | 248.5 |
| 18 | 6.0 | 0.049 | 260.8 |
| 20 | 5.8 | 0.048 | 272.5 |
| 25 | 5.6 | 0.046 | 300.8 |
| 30 | 5.4 | 0.044 | 328.1 |
| 35 | 5.2 | 0.043 | 354.4 |
| 40 | 5.0 | 0.041 | 379.9 |
| 45 | 5.0 | 0.041 | 404.9 |
| 50 | 4.9 | 0.041 | 429.7 |
| 55 | 4.9 | 0.041 | 454.3 |
| 60 | 4.9 | 0.041 | 478.8 |

Resultados

Tabla 4.86 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-5-500.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 121.4 | 1.000 | 0 |
| 2 | 15.4 | 0.127 | 136.8 |
| 4 | 13.0 | 0.107 | 165.2 |
| 6 | 12.2 | 0.101 | 190.5 |
| 8 | 11.5 | 0.095 | 214.3 |
| 10 | 11.1 | 0.092 | 237.0 |
| 12 | 10.9 | 0.090 | 259.0 |
| 14 | 10.7 | 0.088 | 280.6 |
| 16 | 10.5 | 0.087 | 301.8 |
| 18 | 10.3 | 0.085 | 322.7 |
| 20 | 10.2 | 0.084 | 343.2 |
| 25 | 9.8 | 0.081 | 393.2 |
| 30 | 9.7 | 0.080 | 442.0 |
| 35 | 9.7 | 0.080 | 490.4 |
| 40 | 9.5 | 0.078 | 538.4 |
| 45 | 9.5 | 0.078 | 586.0 |
| 50 | 9.5 | 0.078 | 633.6 |
| 55 | 9.5 | 0.078 | 681.3 |
| 60 | 9.5 | 0.078 | 728.9 |

Tabla 4.87 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-5-0.5.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 60.7 | 1.000 | 0 |
| 2 | 9.4 | 0.154 | 70.1 |
| 4 | 7.7 | 0.127 | 87.2 |
| 6 | 6.8 | 0.112 | 101.7 |
| 8 | 6.3 | 0.103 | 114.7 |
| 10 | 6.0 | 0.099 | 127.0 |
| 12 | 5.7 | 0.093 | 138.6 |
| 14 | 5.5 | 0.090 | 149.8 |
| 16 | 5.2 | 0.085 | 160.4 |
| 18 | 5.1 | 0.084 | 170.6 |
| 20 | 4.8 | 0.080 | 180.6 |
| 25 | 4.6 | 0.076 | 204.2 |
| 30 | 4.4 | 0.073 | 226.8 |
| 35 | 4.3 | 0.071 | 248.5 |
| 40 | 4.2 | 0.069 | 269.6 |
| 45 | 4.1 | 0.068 | 290.3 |
| 50 | 4.1 | 0.067 | 310.7 |
| 55 | 4.1 | 0.067 | 331.0 |
| 60 | 4.1 | 0.067 | 351.3 |

Resultados

Tabla 4.88 J_F/J_{F0} y V_F , experimento BSA-BLg-5-1.5.

| t, minutos | Q_F, mL/min | J_F/J_{F0} | V_F, mL |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 0 | 182.1 | 1.000 | 0 |
| 2 | 25.0 | 0.137 | 207.1 |
| 4 | 20.7 | 0.114 | 252.8 |
| 6 | 19.4 | 0.106 | 292.9 |
| 8 | 18.2 | 0.100 | 330.4 |
| 10 | 17.1 | 0.094 | 365.7 |
| 12 | 16.7 | 0.092 | 399.5 |
| 14 | 16.2 | 0.089 | 432.4 |
| 16 | 15.8 | 0.087 | 464.4 |
| 18 | 15.4 | 0.084 | 495.6 |
| 20 | 15.0 | 0.082 | 526.0 |
| 25 | 14.6 | 0.080 | 600.1 |
| 30 | 14.3 | 0.078 | 672.4 |
| 35 | 14.0 | 0.077 | 743.0 |
| 40 | 14.0 | 0.077 | 812.7 |
| 45 | 13.6 | 0.075 | 881.7 |
| 50 | 13.6 | 0.075 | 949.9 |
| 55 | 13.6 | 0.075 | 1018.1 |
| 60 | 13.6 | 0.075 | 1086.2 |

Concentración de filtrado, transmisión observada, masa depositada y masa transportada.

Tabla 4.89 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BSA-BLg-4-0.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|--|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------------------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.129 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1287 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.112 | 0.000 | 209.4 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1285 | 0.0185 | 0.0000 |
| 7 | 0.108 | 0.000 | 359.3 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1283 | 0.0227 | 0.0000 |
| 13 | 0.116 | 0.003 | 563.2 | 0.003 | 2.82 | 0.979 | 0.1282 | 0.0149 | 0.0003 |
| 20 | 0.122 | 0.005 | 794.8 | 0.005 | 4.07 | 0.976 | 0.1280 | 0.0090 | 0.0013 |
| 30 | 0.115 | 0.006 | 1106.7 | 0.006 | 5.31 | 0.973 | 0.1278 | 0.0161 | 0.0029 |
| 45 | 0.108 | 0.009 | 1553.1 | 0.009 | 8.40 | 0.970 | 0.1276 | 0.0221 | 0.0063 |
| 60 | 0.117 | 0.013 | 1981.7 | 0.013 | 11.11 | 0.967 | 0.1274 | 0.0142 | 0.0110 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.130 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1302 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.110 | 0.000 | 209.4 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1300 | 0.0212 | 0.0000 |
| 7 | 0.110 | 0.000 | 359.3 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1298 | 0.0218 | 0.0000 |
| 13 | 0.115 | 0.002 | 563.2 | 0.002 | 1.80 | 0.979 | 0.1297 | 0.0174 | 0.0002 |
| 20 | 0.122 | 0.007 | 794.8 | 0.007 | 5.65 | 0.976 | 0.1295 | 0.0097 | 0.0012 |
| 30 | 0.113 | 0.009 | 1106.7 | 0.009 | 8.38 | 0.973 | 0.1293 | 0.0189 | 0.0037 |
| 45 | 0.105 | 0.016 | 1553.1 | 0.016 | 15.09 | 0.970 | 0.1291 | 0.0264 | 0.0093 |
| 60 | 0.111 | 0.019 | 1981.7 | 0.019 | 16.88 | 0.967 | 0.1289 | 0.0212 | 0.0167 |

Resultados

Tabla 4.90 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BSA-BLg-5-0.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|--|-------------|----------------|------------|-------------|--------|-----------|--------|-----------|--------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.124 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1237 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.113 | 0.000 | 158.3 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1235 | 0.0121 | 0.0000 |
| 7 | 0.101 | 0.030 | 220.6 | 0.030 | 29.75 | 0.982 | 0.1233 | 0.0226 | 0.0009 |
| 13 | 0.100 | 0.052 | 302.7 | 0.052 | 51.85 | 0.979 | 0.1231 | 0.0234 | 0.0042 |
| 20 | 0.098 | 0.048 | 392.5 | 0.048 | 49.00 | 0.976 | 0.1229 | 0.0257 | 0.0086 |
| 30 | 0.094 | 0.040 | 515.6 | 0.040 | 42.83 | 0.973 | 0.1227 | 0.0292 | 0.0140 |
| 45 | 0.093 | 0.033 | 696.2 | 0.033 | 36.13 | 0.970 | 0.1225 | 0.0315 | 0.0208 |
| 60 | 0.081 | 0.027 | 876.2 | 0.027 | 33.42 | 0.967 | 0.1223 | 0.0434 | 0.0262 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.145 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1445 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.128 | 0.000 | 158.3 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1443 | 0.0188 | 0.0000 |
| 7 | 0.116 | 0.065 | 220.6 | 0.065 | 55.46 | 0.982 | 0.1441 | 0.0272 | 0.0018 |
| 13 | 0.112 | 0.124 | 302.7 | 0.124 | 111.15 | 0.979 | 0.1437 | 0.0292 | 0.0095 |
| 20 | 0.110 | 0.125 | 392.5 | 0.125 | 113.16 | 0.976 | 0.1433 | 0.0309 | 0.0206 |
| 30 | 0.105 | 0.116 | 515.6 | 0.116 | 111.44 | 0.973 | 0.1430 | 0.0368 | 0.0354 |
| 45 | 0.099 | 0.105 | 696.2 | 0.105 | 105.93 | 0.970 | 0.1427 | 0.0427 | 0.0555 |
| 60 | 0.090 | 0.093 | 876.2 | 0.093 | 103.32 | 0.967 | 0.1424 | 0.0514 | 0.0734 |

Tabla 4.91 C_F , Tr, M_d , M_{PM} , experimento BSA-BLg-5-5.

| t, minutos | C_R , g/L | C_{Fa} , g/L | V_F , mL | C_F , g/L | Tr, % | V_R , L | M, g | M_d , g | M_{PM} , g |
|--|-------------|----------------|------------|-------------|-------|-----------|--------|-----------|--------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.125 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1248 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.113 | 0.000 | 158.1 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1247 | 0.0130 | 0.0000 |
| 7 | 0.114 | 0.000 | 218.3 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1245 | 0.0130 | 0.0000 |
| 13 | 0.094 | 0.004 | 292.0 | 0.004 | 4.35 | 0.979 | 0.1244 | 0.0323 | 0.0001 |
| 20 | 0.085 | 0.003 | 363.4 | 0.003 | 3.46 | 0.976 | 0.1242 | 0.0408 | 0.0004 |
| 30 | 0.068 | 0.001 | 453.1 | 0.001 | 1.59 | 0.973 | 0.1241 | 0.0579 | 0.0006 |
| 45 | 0.069 | 0.000 | 575.4 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.1240 | 0.0573 | 0.0006 |
| 60 | 0.064 | 0.000 | 695.4 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.1239 | 0.0623 | 0.0006 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.145 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1445 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.128 | 0.000 | 158.1 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1443 | 0.0187 | 0.0000 |
| 7 | 0.115 | 0.000 | 218.3 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1441 | 0.0317 | 0.0000 |
| 13 | 0.107 | 0.039 | 292.0 | 0.039 | 36.32 | 0.979 | 0.1439 | 0.0379 | 0.0013 |
| 20 | 0.096 | 0.044 | 363.4 | 0.044 | 45.61 | 0.976 | 0.1437 | 0.0485 | 0.0042 |
| 30 | 0.091 | 0.025 | 453.1 | 0.025 | 27.17 | 0.973 | 0.1435 | 0.0540 | 0.0072 |
| 45 | 0.085 | 0.016 | 575.4 | 0.016 | 18.25 | 0.970 | 0.1434 | 0.0604 | 0.0097 |
| 60 | 0.080 | 0.008 | 695.4 | 0.008 | 10.19 | 0.967 | 0.1433 | 0.0653 | 0.0111 |

Resultados

Tabla 4.92 C_F, Tr, M_d, M_{PM}, experimento BSA-BLg-6-0.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.140 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1400 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.130 | 0.000 | 188.9 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1398 | 0.0119 | 0.0000 |
| 7 | 0.129 | 0.000 | 312.2 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1396 | 0.0130 | 0.0000 |
| 13 | 0.132 | 0.000 | 486.9 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.1394 | 0.0101 | 0.0000 |
| 20 | 0.136 | 0.000 | 690.1 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.1392 | 0.0065 | 0.0000 |
| 30 | 0.129 | 0.000 | 980.5 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.1390 | 0.0137 | 0.0000 |
| 45 | 0.131 | 0.000 | 1415.9 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.1388 | 0.0121 | 0.0000 |
| 60 | 0.128 | 0.000 | 1851.4 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.1386 | 0.0149 | 0.0000 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.142 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1419 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.127 | 0.000 | 188.9 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1417 | 0.0167 | 0.0000 |
| 7 | 0.123 | 0.000 | 312.2 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1415 | 0.0212 | 0.0000 |
| 13 | 0.118 | 0.010 | 486.9 | 0.010 | 8.14 | 0.979 | 0.1414 | 0.0260 | 0.0008 |
| 20 | 0.117 | 0.011 | 690.1 | 0.011 | 9.72 | 0.976 | 0.1412 | 0.0267 | 0.0030 |
| 30 | 0.113 | 0.009 | 980.5 | 0.009 | 8.32 | 0.973 | 0.1410 | 0.0312 | 0.0060 |
| 45 | 0.110 | 0.008 | 1415.9 | 0.008 | 7.02 | 0.970 | 0.1408 | 0.0334 | 0.0097 |
| 60 | 0.107 | 0.007 | 1851.4 | 0.007 | 6.41 | 0.967 | 0.1406 | 0.0368 | 0.0129 |

Tabla 4.93 C_F, Tr, M_d, M_{PM}, experimento BSA-BLg-7-0.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.144 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1434 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.140 | 0.000 | 238.7 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1432 | 0.0054 | 0.0000 |
| 7 | 0.138 | 0.000 | 454.9 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1430 | 0.0077 | 0.0000 |
| 13 | 0.141 | 0.000 | 759.2 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.1428 | 0.0051 | 0.0000 |
| 20 | 0.142 | 0.000 | 1099.2 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.1426 | 0.0042 | 0.0000 |
| 30 | 0.139 | 0.000 | 1565.4 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.1424 | 0.0074 | 0.0000 |
| 45 | 0.134 | 0.000 | 2236.3 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.1421 | 0.0121 | 0.0000 |
| 60 | 0.138 | 0.000 | 2903.0 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.1419 | 0.0082 | 0.0000 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.139 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1391 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.133 | 0.000 | 238.7 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1389 | 0.0075 | 0.0000 |
| 7 | 0.131 | 0.000 | 454.9 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1387 | 0.0099 | 0.0000 |
| 13 | 0.132 | 0.000 | 759.2 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.1385 | 0.0097 | 0.0000 |
| 20 | 0.131 | 0.000 | 1099.2 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.1383 | 0.0110 | 0.0000 |
| 30 | 0.127 | 0.000 | 1565.4 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.1382 | 0.0143 | 0.0000 |
| 45 | 0.120 | 0.000 | 2236.3 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.1380 | 0.0212 | 0.0000 |
| 60 | 0.123 | 0.000 | 2903.0 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.1378 | 0.0189 | 0.0000 |

Resultados

Tabla 4.94 C_F, Tr, M_d, M_{PM}, experimento BSA-BLg-5-300.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.120 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1196 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.102 | 0.000 | 146.0 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1194 | 0.0191 | 0.0000 |
| 7 | 0.101 | 0.000 | 184.7 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1193 | 0.0201 | 0.0000 |
| 13 | 0.091 | 0.000 | 229.1 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.1191 | 0.0296 | 0.0000 |
| 20 | 0.094 | 0.000 | 272.5 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.1190 | 0.0270 | 0.0000 |
| 30 | 0.080 | 0.000 | 328.1 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.1189 | 0.0415 | 0.0000 |
| 45 | 0.078 | 0.000 | 404.9 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.1187 | 0.0435 | 0.0000 |
| 60 | 0.068 | 0.000 | 478.8 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.1186 | 0.0532 | 0.0000 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.143 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1428 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.126 | 0.000 | 146.0 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1426 | 0.0183 | 0.0000 |
| 7 | 0.122 | 0.000 | 184.7 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1424 | 0.0229 | 0.0000 |
| 13 | 0.114 | 0.000 | 229.1 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.1422 | 0.0309 | 0.0000 |
| 20 | 0.107 | 0.017 | 272.5 | 0.017 | 16.31 | 0.976 | 0.1420 | 0.0368 | 0.0003 |
| 30 | 0.104 | 0.020 | 328.1 | 0.020 | 18.84 | 0.973 | 0.1419 | 0.0401 | 0.0013 |
| 45 | 0.098 | 0.010 | 404.9 | 0.010 | 10.63 | 0.970 | 0.1417 | 0.0466 | 0.0025 |
| 60 | 0.095 | 0.009 | 478.8 | 0.009 | 9.46 | 0.967 | 0.1415 | 0.0494 | 0.0032 |

Tabla 4.95 C_F, Tr, M_d, M_{PM}, experimento BSA-BLg-5-500.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.118 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1183 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.105 | 0.000 | 151.0 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1181 | 0.0150 | 0.0000 |
| 7 | 0.093 | 0.000 | 202.4 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1180 | 0.0262 | 0.0000 |
| 13 | 0.089 | 0.011 | 269.8 | 0.011 | 12.68 | 0.979 | 0.1179 | 0.0307 | 0.0004 |
| 20 | 0.088 | 0.009 | 343.2 | 0.009 | 9.99 | 0.976 | 0.1177 | 0.0319 | 0.0011 |
| 30 | 0.082 | 0.004 | 442.0 | 0.004 | 5.17 | 0.973 | 0.1176 | 0.0373 | 0.0017 |
| 45 | 0.081 | 0.002 | 586.0 | 0.002 | 2.71 | 0.970 | 0.1175 | 0.0388 | 0.0022 |
| 60 | 0.076 | 0.000 | 728.9 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.1173 | 0.0441 | 0.0024 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.141 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1405 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.123 | 0.000 | 151.0 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1403 | 0.0191 | 0.0000 |
| 7 | 0.110 | 0.002 | 202.4 | 0.002 | 1.79 | 0.982 | 0.1402 | 0.0324 | 0.0000 |
| 13 | 0.102 | 0.064 | 269.8 | 0.064 | 62.67 | 0.979 | 0.1399 | 0.0374 | 0.0022 |
| 20 | 0.098 | 0.074 | 343.2 | 0.074 | 75.68 | 0.976 | 0.1397 | 0.0413 | 0.0072 |
| 30 | 0.093 | 0.058 | 442.0 | 0.058 | 62.19 | 0.973 | 0.1394 | 0.0468 | 0.0136 |
| 45 | 0.089 | 0.029 | 586.0 | 0.029 | 32.14 | 0.970 | 0.1393 | 0.0518 | 0.0198 |
| 60 | 0.082 | 0.016 | 728.9 | 0.016 | 19.18 | 0.967 | 0.1391 | 0.0596 | 0.0230 |

Resultados

Tabla 4.96 C_F, Tr, M_d, M_{PM}, experimento BSA-BLg-5-0.5.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.119 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1188 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.109 | 0.000 | 78.6 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1187 | 0.0111 | 0.0000 |
| 7 | 0.100 | 0.000 | 108.2 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1185 | 0.0204 | 0.0000 |
| 13 | 0.100 | 0.000 | 144.2 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.1184 | 0.0205 | 0.0000 |
| 20 | 0.094 | 0.000 | 180.6 | 0.000 | 0.00 | 0.976 | 0.1182 | 0.0268 | 0.0000 |
| 30 | 0.090 | 0.000 | 226.8 | 0.000 | 0.00 | 0.973 | 0.1181 | 0.0305 | 0.0000 |
| 45 | 0.080 | 0.000 | 290.3 | 0.000 | 0.00 | 0.970 | 0.1180 | 0.0401 | 0.0000 |
| 60 | 0.080 | 0.000 | 351.3 | 0.000 | 0.00 | 0.967 | 0.1179 | 0.0405 | 0.0000 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.143 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1427 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.129 | 0.000 | 78.6 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1425 | 0.0160 | 0.0000 |
| 7 | 0.123 | 0.000 | 108.2 | 0.000 | 0.00 | 0.982 | 0.1423 | 0.0218 | 0.0000 |
| 13 | 0.117 | 0.000 | 144.2 | 0.000 | 0.00 | 0.979 | 0.1421 | 0.0272 | 0.0000 |
| 20 | 0.111 | 0.002 | 180.6 | 0.002 | 2.17 | 0.976 | 0.1420 | 0.0335 | 0.0000 |
| 30 | 0.105 | 0.014 | 226.8 | 0.014 | 13.16 | 0.973 | 0.1418 | 0.0396 | 0.0004 |
| 45 | 0.100 | 0.018 | 290.3 | 0.018 | 18.38 | 0.970 | 0.1416 | 0.0444 | 0.0014 |
| 60 | 0.095 | 0.013 | 351.3 | 0.013 | 13.18 | 0.967 | 0.1415 | 0.0490 | 0.0024 |

Tabla 4.97 C_F, Tr, M_d, M_{PM}, experimento BSA-BLg-5-1.5.

| t, minutos | C_R, g/L | C_{Fa}, g/L | V_F, mL | C_F, g/L | Tr, % | V_R, L | M, g | M_d, g | M_{PM}, g |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| BSA | | | | | | | | | |
| 0 | 0.123 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1232 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.106 | 0.000 | 230.0 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1231 | 0.0188 | 0.0000 |
| 7 | 0.093 | 0.059 | 311.6 | 0.059 | 63.17 | 0.982 | 0.1228 | 0.0289 | 0.0022 |
| 13 | 0.094 | 0.072 | 416.0 | 0.072 | 77.18 | 0.979 | 0.1226 | 0.0282 | 0.0091 |
| 20 | 0.092 | 0.071 | 526.0 | 0.071 | 77.29 | 0.976 | 0.1223 | 0.0302 | 0.0169 |
| 30 | 0.085 | 0.052 | 672.4 | 0.052 | 61.01 | 0.973 | 0.1221 | 0.0370 | 0.0258 |
| 45 | 0.083 | 0.051 | 881.7 | 0.051 | 61.40 | 0.970 | 0.1219 | 0.0392 | 0.0366 |
| 60 | 0.082 | 0.044 | 1086.2 | 0.044 | 54.17 | 0.967 | 0.1218 | 0.0406 | 0.0464 |
| β-lactoglobulina | | | | | | | | | |
| 0 | 0.144 | 0.000 | 0.0 | 0.000 | 0.00 | 0.999 | 0.1441 | 0.0000 | 0.0000 |
| 3 | 0.124 | 0.000 | 230.0 | 0.000 | 0.00 | 0.985 | 0.1439 | 0.0220 | 0.0000 |
| 7 | 0.112 | 0.096 | 311.6 | 0.096 | 85.46 | 0.982 | 0.1436 | 0.0295 | 0.0036 |
| 13 | 0.109 | 0.124 | 416.0 | 0.124 | 113.31 | 0.979 | 0.1432 | 0.0313 | 0.0151 |
| 20 | 0.106 | 0.122 | 526.0 | 0.122 | 114.72 | 0.976 | 0.1429 | 0.0342 | 0.0285 |
| 30 | 0.101 | 0.114 | 672.4 | 0.114 | 113.74 | 0.973 | 0.1426 | 0.0403 | 0.0456 |
| 45 | 0.096 | 0.105 | 881.7 | 0.105 | 109.59 | 0.970 | 0.1423 | 0.0451 | 0.0686 |
| 60 | 0.090 | 0.096 | 1086.2 | 0.096 | 106.68 | 0.967 | 0.1420 | 0.0512 | 0.0892 |

5. DISCUSIÓN

5.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

Para la interpretación de la evolución del caudal de filtrado y del transporte de soluto en los distintos sistemas que han sido objeto de estudio, se va a seguir el procedimiento que se describe a continuación:

- Cálculo del radio efectivo de la proteína.
- Aplicación del modelo de fouling propuesto.
- Análisis del transporte de soluto a través de la membrana.

5.1.1. Cálculo del radio efectivo de la proteína

Una proteína cargada se rodea de una nube iónica difusa conocida como doble capa. El grosor de esta doble capa viene dado por la longitud de Debye, κ^{-1} :

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0 RT}{F^2 \sum C_i z_i^2} \right)^{1/2} \quad [5.1]$$

donde F es la constante de Faraday, R la constante universal de los gases, ϵ_0 es la permeabilidad del vacío, ϵ_r es la constante dieléctrica de la disolución, z_i es la valencia y C_i la concentración de cada especie iónica.

En disoluciones acuosas la longitud de Debye viene dada por la ecuación 5.2 (Zydney, 1998):

$$\kappa^{-1} = \frac{0.304}{I^{-1/2}} \quad [5.2]$$

Donde I, es la fuerza iónica expresada mol/L y κ^{-1} se obtiene en nanómetros. La fuerza iónica se calcula mediante la ecuación 5.3:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2 \quad [5.3]$$

Pujar y Zydney (1998) desarrollaron un modelo aproximado para explicar los efectos de las interacciones electrostáticas en la partición de proteínas tanto para la cromatografía de exclusión por tamaño como para la ultrafiltración con membranas. Para ello definieron un radio de proteína efectivo que tiene en cuenta la presencia y la distorsión de la doble capa eléctrica que rodea a la proteína. El radio efectivo de la proteína cargada se define como el radio de una esfera sin carga que tendría el mismo coeficiente de partición que la citada proteína:

$$r_{\text{eff}} = r_s + \frac{4 r_s^3 \sigma_s^2}{\epsilon_r \epsilon_0 k T} \lambda (1 - \lambda) \kappa^{-1} \quad [5.4]$$

donde:

- r_s : radio de Stokes de la proteína (nm).
- k : constante de Boltzmann ($1.381 \cdot 10^{-5} \frac{\text{nm}^2 \text{Kg}}{\text{s}^2 \text{K}}$).
- ϵ_0 : $8.854 \cdot 10^{-39} \frac{\text{C}^2 \text{s}^2}{\text{nm}^3 \text{kg}}$.
- ϵ_r : 76.60.
- λ : cociente entre el radio de Stokes y el radio de poro.
- σ_s : carga superficial de la proteína ($\frac{\text{C}}{\text{nm}^2}$).

La carga superficial de la proteína se calcula asumiendo que la carga se distribuye uniformemente sobre la superficie de una esfera con radio igual al radio de Stokes (Menon y Zydney, 1999):

$$\sigma_s = \frac{z \cdot e}{4\pi r_s^2} \quad [5.5]$$

donde z es la carga de la proteína y $e = 1.60218 \cdot 10^{-19} \frac{\text{C}}{\text{carga}}$.

5.1.2. Evolución temporal del flujo de filtrado

Para el estudio de la evolución temporal del flujo de filtrado se consideraron los modelos de colmatación descritos en la introducción:

- Bloqueo completo o bloqueo de poro.
- Bloque estándar o adsorción directa.
- Bloqueo intermedio o adsorción a largo plazo.
- Torta de filtración o resistencia de la capa límite.

A continuación se resumen las expresiones de los modelos citados:

Bloqueo completo de los poros.

$$Q_F = Q_{F0} e^{-A \cdot t} \quad [5.6]$$

Bloqueo intermedio.

$$Q_F = \frac{Q_{F0}}{(1 + A \cdot t)} \quad [5.7]$$

donde A es la constante de bloqueo completo o bloqueo intermedio y está relacionada con la superficie de membrana bloqueada por unidad de volumen filtrado a través de la membrana.

Bloqueo estándar.

$$Q_F = \frac{Q_{F0}}{(1 + B \cdot t)^2} \quad [5.8]$$

en la que B es la constante de bloqueo estándar y está relacionada con la reducción en el área transversal de los poros (debida a la adsorción en las paredes de los poros) por unidad de volumen total de filtrado.

Torta de filtración.

$$Q_F = \frac{Q_{F0}}{\sqrt{1 + C \cdot t}} \quad [5.9]$$

donde C es la constante de la torta de filtración y es igual a:

$$C = 2 \frac{A_{P0} R_C}{V_F R_M} \cdot U_{F0} \quad [5.10]$$

Esta constante relaciona la evolución del volumen de filtrado (V_F) con la evolución de la resistencia de la torta (R_C).

Al aplicar estos modelos a los datos experimentales, ninguno de ellos fue capaz de predecir la evolución del flujo de filtrado con el tiempo. Por tanto no existía un sólo mecanismo que determinase el proceso. Ante esta situación se decidió usar modelos que combinaran varios mecanismos de colmatación.

Modelos combinados.

Los resultados experimentales muestran una caída brusca de caudal de filtrado en los primeros instantes de la filtración, seguida por un proceso más lento de disminución de caudal con el tiempo. Para explicar este comportamiento se han utilizado dos posibles combinaciones de los mecanismos anteriormente descritos. En ambas combinaciones se explica el descenso brusco de caudal en los primeros instantes mediante el fenómeno de bloqueo completo (Ho y Zydney, 2000). Este mecanismo se combina con el de bloqueo estándar o con el de formación de torta en función de la existencia o no de transmisión. En resumen, los modelos combinados considerados son:

- Bloqueo completo + bloqueo estándar, cuando existe transmisión.
- Bloqueo completo + torta de filtración, en el caso contrario.

Para combinar los mecanismos se tiene en cuenta que el tamaño de los poros de una membrana no es uniforme. Según esto, se considera que existe una fracción α de los mismos que son susceptibles de ser bloqueados por la proteína, esta fracción será la que experimente el mecanismo de bloqueo completo. El resto de los poros ($1-\alpha$)

experimentarán el otro mecanismo de colmatación considerado. Así, cuando existe transmisión, se considera que la proteína en su paso a través de los poros se une a sus paredes dando lugar a una reducción del área transversal de los mismos, es decir, dando lugar al bloqueo estándar. En el caso contrario, es decir, cuando no existe transmisión, se considera que la proteína forma una torta sobre la superficie de los poros que no son susceptibles de sufrir bloqueo completo, dando lugar al mecanismo de torta de filtración.

Según las consideraciones anteriores, se obtienen los siguientes modelos combinados:

- Bloqueo completo + bloqueo estándar:

$$Q_F = \alpha \cdot Q_{F0} e^{-A \cdot t} + (1 - \alpha) \cdot \frac{Q_{F0}}{(1 + B \cdot t)^2} \quad [5.11]$$

Ecuación que se puede expresar en términos de flujos o caudales relativos:

$$\frac{Q_F}{Q_{F0}} = \frac{J_F}{J_{F0}} = \alpha \cdot e^{-A \cdot t} + \frac{(1 - \alpha)}{(1 + B \cdot t)^2} \quad [5.12]$$

- Bloqueo completo + torta de filtración:

$$Q_F = \alpha \cdot Q_{F0} e^{-A \cdot t} + (1 - \alpha) \cdot \frac{Q_{F0}}{\sqrt{1 + C \cdot t}} \quad [5.13]$$

Expresada en términos de flujos o caudales relativos:

$$\frac{Q_F}{Q_{F0}} = \frac{J_F}{J_{F0}} = \alpha \cdot e^{-A \cdot t} + \frac{(1 - \alpha)}{\sqrt{1 + C \cdot t}} \quad [5.14]$$

Las ecuaciones 5.12 y 5.14 se han usado para el ajuste de los resultados experimentales de flujos relativos para cada sistema mediante regresión no lineal. Los parámetros ajustables en cada caso son α , A , B y α , A , C , respectivamente.

5.1.3. Transporte de proteína a través de la membrana.

En la sección de resultados se ha calculado la masa de proteína que pasa a través de la membrana, M_{PM} , para cada uno de los sistemas estudiados. Observando su evolución con el tiempo, se ha procedido a su ajuste mediante el empleo de dos tipos de ecuaciones:

- Ecuación hiperbólica: para los casos en los que hay un rápido aumento de M_{PM} en los primeros instantes de la filtración.

$$M_{PM} = \frac{d_1 \cdot t}{f_1 + t} \quad [5.15]$$

- Ecuación sigmoïdal: para los casos en los que en los primeros instantes se produce sólo un leve aumento de M_{PM} , mientras que a tiempos intermedios aumenta considerablemente

$$M_{PM} = \frac{d_2 \cdot t^2}{f_2 + t^2} \quad [5.16]$$

Este ajuste ha permitido calcular el tiempo donde la velocidad de transporte de proteína a través de la membrana alcanza su máximo. La velocidad de transporte viene dada por la primera derivada con respecto al tiempo de las ecuaciones 5.15 y 5.16:

- dM_{PM}/dt para la ecuación hiperbólica:

$$\frac{dM_{PM}}{dt} = \frac{d_1 f_1}{(f_1 + t)^2} \quad [5.17]$$

- dM_{PM}/dt para la ecuación sigmoïdal:

$$\frac{dM_{PM}}{dt} = \frac{2d_2 f_2 t}{(f_2 + t^2)^2} \quad [5.18]$$

El tiempo correspondiente a la velocidad máxima viene dado por:

- t_{max} y $(dM_{PM}/dt)_{max}$ para la ecuación hiperbólica: en este caso la velocidad máxima se produce a tiempo cero:

$$t_{\max} = 0 \quad [5.19]$$

$$\left(\frac{dM_{\text{PM}}}{dt} \right)_{\max} = \frac{d_1}{f_1} \quad [5.20]$$

➤ t_{\max} y $(dM_{\text{PM}}/dt)_{\max}$ para la ecuación sigmoïdal:

$$\frac{d^2M_{\text{PM}}}{dt^2} = \frac{2(f_2 - 3t^2)}{(f_2 + t^2)^3} = 0 \rightarrow f_2 - 3t_{\max}^2 = 0$$

$$t_{\max} = \sqrt{\frac{f_2}{3}} \quad [5.21]$$

$$\left(\frac{dM_{\text{PM}}}{dt} \right)_{\max} = 0.650 \frac{d_2}{\sqrt{f_2}} \quad [5.22]$$

5.2. SISTEMAS EXPERIMENTALES

5.2.1. Sistema lisozima-membrana de 50 kDa

Cálculo del radio efectivo de la proteína.

Para el cálculo del radio efectivo de la lisozima a través de la membrana de 50 kDa se han utilizado los siguientes datos:

- Radio de Stokes: 1.83 nm (Lucas et al., 1998).
- Radio de poro medio: 7 nm (Palacio, 1999).
- Carga de la lisozima en función del pH (Roxby y Tanford, 1971):

| | | | | | | | | |
|--------------|----|------|------|------|------|------|------|-------|
| pH: | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 10.7 | 12 |
| Carga | 10 | 8.91 | 8.05 | 7.25 | 6.45 | 3.45 | 0 | -4.49 |

Teniendo en cuenta la fuerza iónica aportada por el ajuste del pH y la proteína se obtienen los siguientes resultados:

| | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
| pH: | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 10.7 | 12 |
| r_{eff}, nm | 26.49 | 23.33 | 20.88 | 18.11 | 14.69 | 5.80 | 1.83 | 3.27 |

Estos resultados están de acuerdo con las observaciones experimentales pues, en este sistema, únicamente se han obtenido transmisión para valores de pH 10, 10.7 y 12. En estos casos el radio efectivo de la lisozima está por debajo del radio efectivo de la membrana de 50 kDa (7 nm).

Evolución temporal del flujo de filtrado.

Influencia del pH sobre el flujo de filtrado.

En este caso y según los resultados obtenidos, se ha utilizado el modelo combinado que considera el mecanismo de torta de filtración para los experimentos a valores de pH entre 5 y 9 pues se cumple con la premisa de no obtener transmisión de proteína. Para el resto de los experimentos, es decir, para valores de pH de 10, 10.7 (punto isoelectrico) y 12 se ha empleado el modelo combinado que tiene en cuenta el mecanismo del bloqueo estándar. Los resultados de la aplicación de ambos modelos para los experimentos señalados se muestran en las siguientes Figuras 5.1 a 5.8:

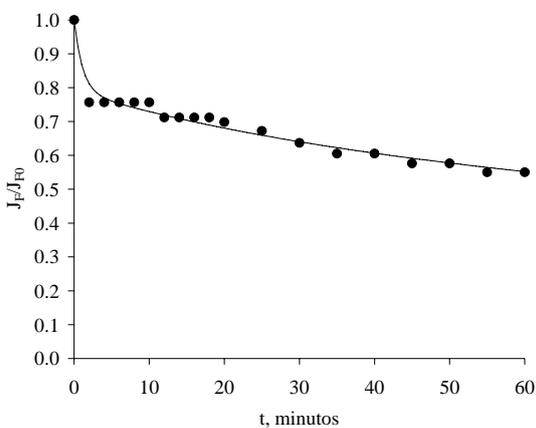


Figura 5.1 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-5-0.

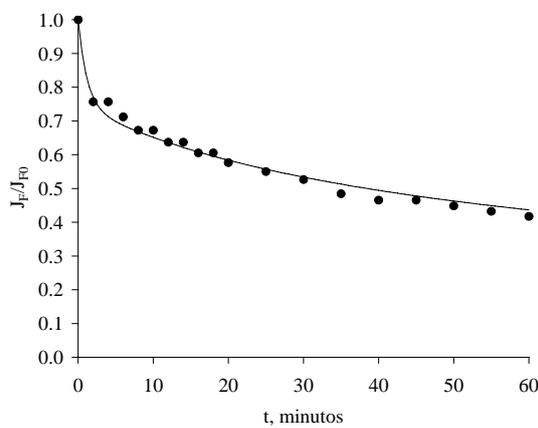


Figura 5.2 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-6-0.

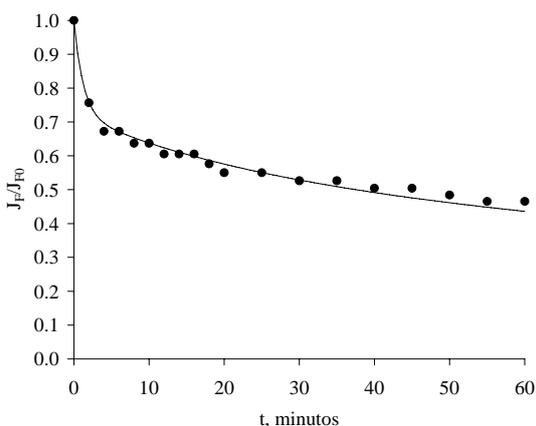


Figura 5.3 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-7-0.

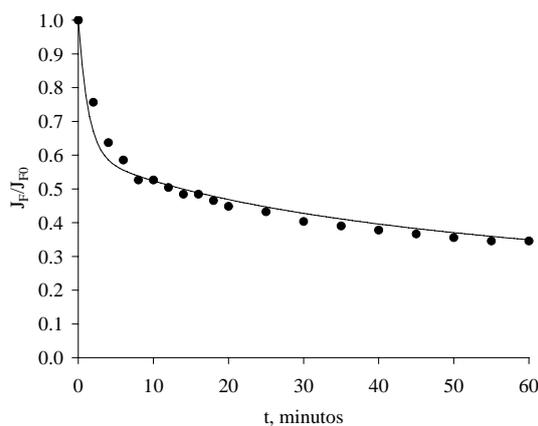


Figura 5.4 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-8-0.

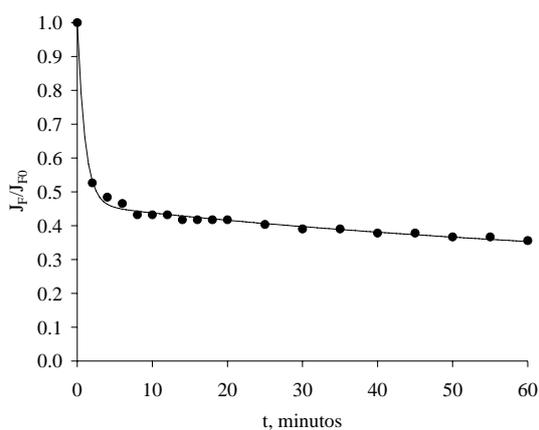


Figura 5.5 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-9-0.

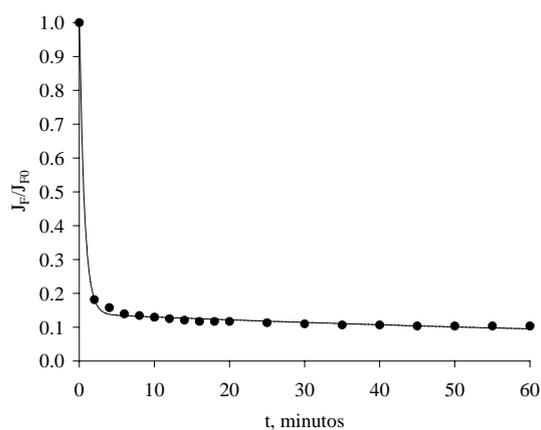


Figura 5.6 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10-0.

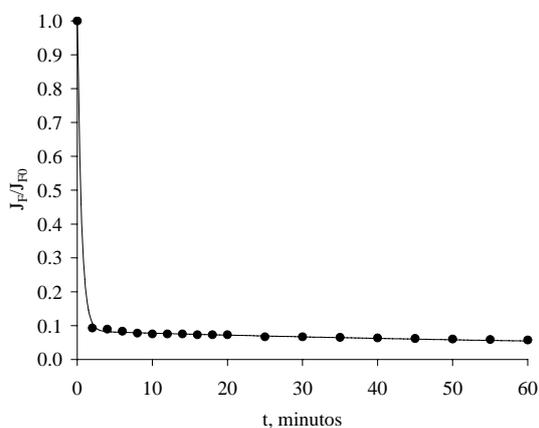


Figura 5.7 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10.7-0.

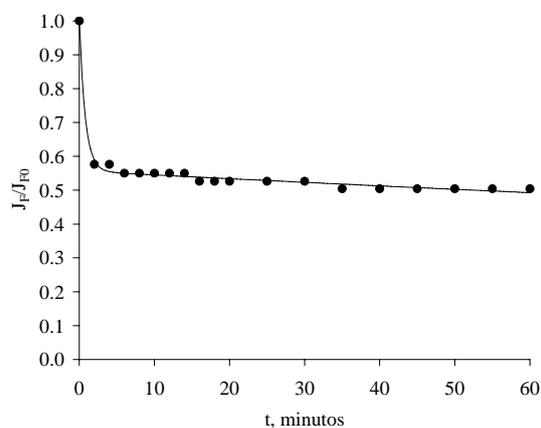


Figura 5.8 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-12-0.

El valor obtenido de los parámetros tras el ajuste de los resultados experimentales a los modelos propuestos se recoge en la Tabla 5.1:

Tabla 5.1 Parámetros de los modelos combinados en función del pH, lisozima-50 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} | C, min^{-1} |
|-------------|------|-------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| L50-5-0 | 5 | 0 | 0.209 | 0.898 | | 0.017487 |
| L50-6-0 | 6 | 0 | 0.250 | 0.869 | | 0.032454 |
| L50-7-0 | 7 | 0 | 0.274 | 0.817 | | 0.029516 |
| L50-8-0 | 8 | 0 | 0.395 | 0.772 | | 0.033239 |
| L50-9-0 | 9 | 0 | 0.537 | 0.982 | | 0.012005 |
| L50-10-0 | 10 | 0 | 0.860 | 1.465 | 0.003531 | |
| L50-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.916 | 1.785 | 0.004040 | |
| L50-12-0 | 12 | 0 | 0.443 | 1.262 | 0.001049 | |

El análisis preliminar del valor de los parámetros pone de manifiesto la rapidez con la que se produce el fenómeno de bloqueo de poros ya que durante los dos primeros minutos de operación se bloquean la mayoría de los poros que son susceptibles de experimentar este mecanismo de colmatación, concretamente entre el 79 % para pH 8 y el 97 % en el punto isoelectrico.

En la Figura 5.9 se muestra la influencia del pH sobre el parámetro α que indica la fracción del caudal que circula por los poros que experimentan bloqueo completo.

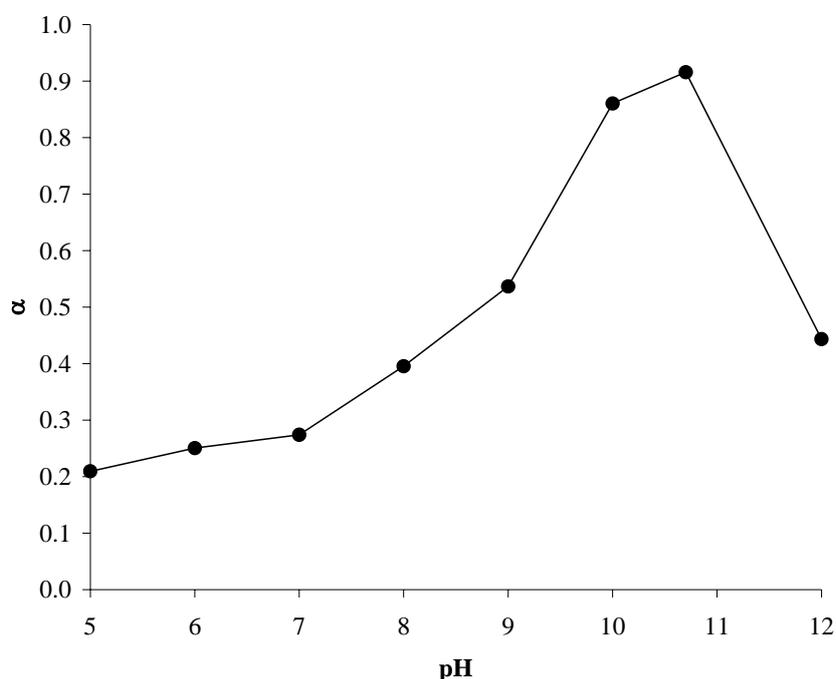


Figura 5.9 Influencia del pH sobre α , lisozima-50 kDa.

Como se observa en la figura, la máxima fracción de poros bloqueables se encuentra en el punto isoelectrico de la proteína (91.6 %). A ambos lados del punto isoelectrico se aprecia un claro descenso de α al alejarnos del mismo, alcanzado su valor mínimo a pH 5 (20.9 %).

Los resultados indican que la fracción de poros bloqueables aumenta al reducirse el radio efectivo de la proteína, que varía desde 26.49 nm a pH 5 hasta 1.83 nm en el punto isoelectrico. Esta relación podría deberse a que al reducirse el radio efectivo de la proteína, ésta puede bloquear poros más pequeños aumentando la fracción de poros que pueden experimentar el mecanismo de bloqueo completo. Otro fenómeno que puede contribuir al aumento de α al acercarse al punto isoelectrico es la reducción de la carga de las moléculas

de proteína. La reducción de carga debe favorecer la formación de agregados, esto unido con la tortuosidad y la irregularidad de los poros favorecería su obstrucción (Persson et al., 2003).

La influencia del pH sobre el parámetro de bloqueo completo de poros, A, se muestra en la Figura 5.10:

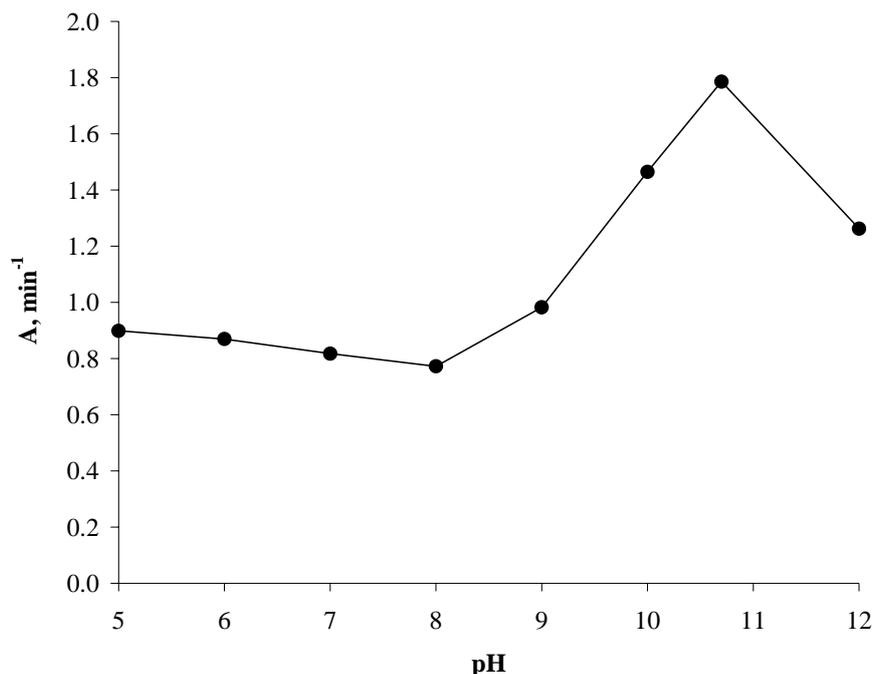


Figura 5.10 Influencia del pH sobre A, lisozima-50 kDa.

Este parámetro muestra variaciones entorno al 10 % con respecto a un valor medio de 0.868 min⁻¹ en los experimentos en los que no se aprecia transmisión (pH entre 5 y 9) a pesar de que en ese rango la relación de carga entre la proteína y la membrana varía en función del pH. Así, para los experimentos a pH 5 y 6 ambas tienen carga positiva, para el experimento a pH 7 la membrana tiene carga neta nula y para los experimentos de pH 8 y 9 presentan carga de distinto signo. Esto parece señalar que en ese rango de pH, donde el radio efectivo es mayor que el radio de poro de la membrana, los efectos estéricos predominan sobre los electrostáticos en la velocidad con la que se produce el bloqueo de poros. En los casos en los que se aprecia transmisión se observa un aumento de A. El valor máximo de A se encuentra en el punto isoeléctrico, justo cuando la proteína tiene carga neta nula lo que reduce las fuerzas de repulsión entre ellas, facilitando la deposición y el bloqueo de los

poros. A ambos lados se produce una disminución de A debido a la repulsión electrostática entre las moléculas de proteína, siendo esta reducción mayor a pH 12 ya que adicionalmente también existen fuerzas de repulsión con la membrana, al contrario de lo que sucede a pH 10.

La variación de los parámetros B y C con el pH queda recogida en la Figura 5.11:

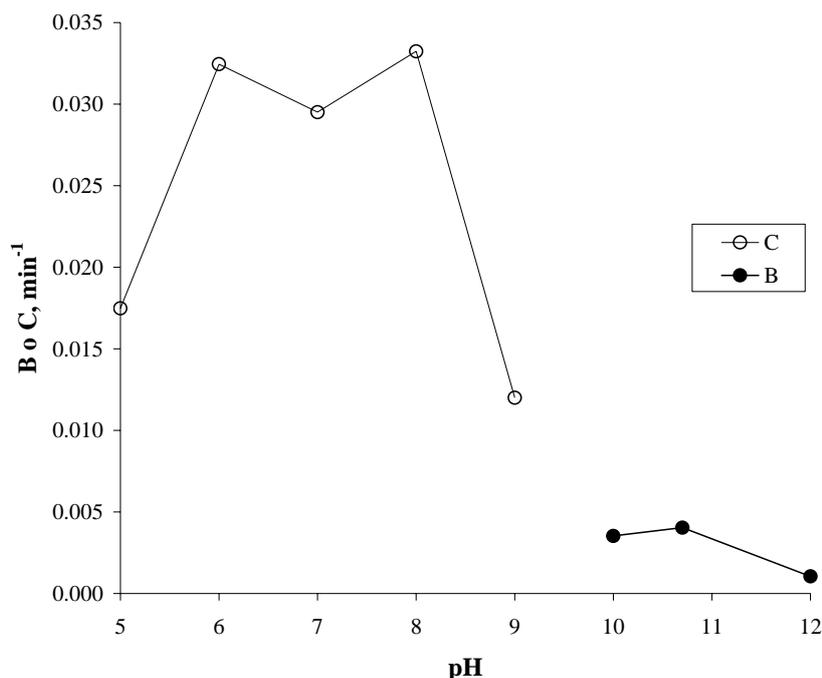


Figura 5.11 Influencia del pH sobre B y C, lisozima-50 kDa.

El parámetro de bloqueo estándar, B, presenta un máximo en el punto isoeléctrico debido a que la ausencia de carga neta permite que la proteína se adsorba fácilmente sobre los poros y sobre capas de proteína previamente depositadas (Ricq et al., 1996; Palacio et al., 1999). Para pH 10, se obtienen un valor muy similar ya que la membrana y la proteína presentan cargas de diferente signo, lo que debe facilitar la deposición inicial. Adicionalmente, puesto que la proteína presenta una carga reducida a ese pH, la deposición sobre ella misma no se ve impedida. En pH 12 se aprecia una reducción importante de B debido a las fuerzas repulsivas entre la membrana y la proteína (ambas cargadas negativamente) lo que dificulta la adsorción.

El parámetro de formación de torta, C, presenta los valores máximos en las proximidades del punto de carga cero de la membrana (pH 7) donde las interacciones electrostáticas entre

la proteína y la membrana son menores, permitiendo esto la formación de una torta más compacta. El valor obtenido a pH 9 es el mínimo a pesar de que proteína y membrana tienen carga de signo opuesto. Este fenómeno puede explicarse si se tiene en cuenta que el parámetro C representa la relación entre el aumento de la resistencia de la torta y el volumen filtrado (ecuación 5.10) por tanto, sólo será constante si tanto la resistencia de la torta como el volumen de filtrado evolucionan de la misma forma. Sin embargo, la compactación y el grosor de la torta deben alcanzar un valor máximo mientras que el volumen de filtrado aumenta con el tiempo, dando lugar a que C no sea realmente constante (Bowen et al., 1995). Por todo ello, los resultados parecen indicar que a pH 9 la formación de la torta en los primeros instantes ha sido muy importante (sobre este valor de pH deben darse las fuerzas de atracción proteína-membrana mayores), quedando enmascarada por el descenso inicial de flujo atribuido al bloqueo completo. Durante el resto del experimento, la formación de torta ha continuado con menor intensidad lo que da lugar al bajo valor de C

Influencia de la fuerza iónica sobre el flujo de filtrado.

Puesto que durante el análisis de la fuerza iónica sobre el flujo de filtrado siempre se ha obtenido transmisión, sólo se ha considerado el modelo combinado que tiene en cuenta el mecanismo del bloqueo estándar. Los resultados de la aplicación del citado modelo se recogen en las Figuras 5.12 a 5.17:

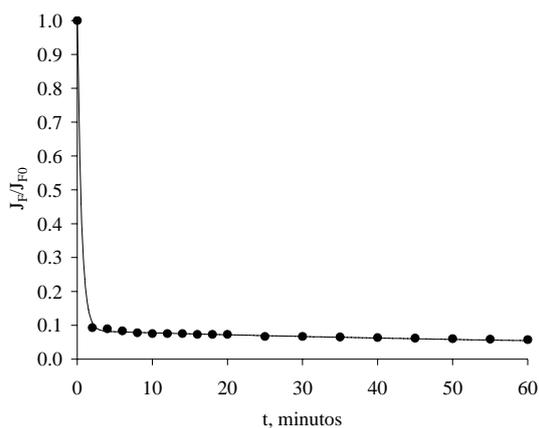


Figura 5.12 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10.7-0.

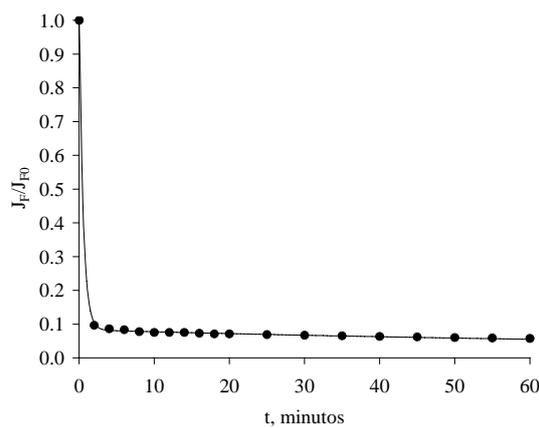


Figura 5.13 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10.7-1.

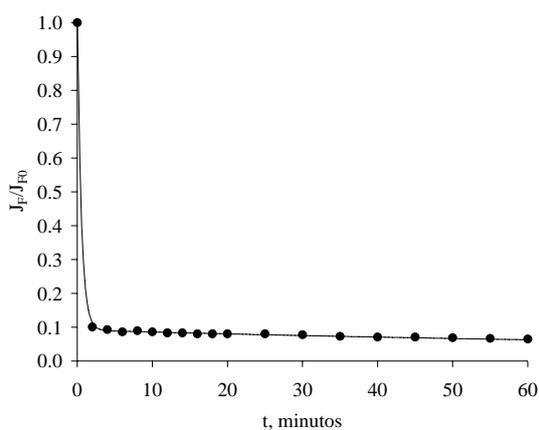


Figura 5.14 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10.7-2.

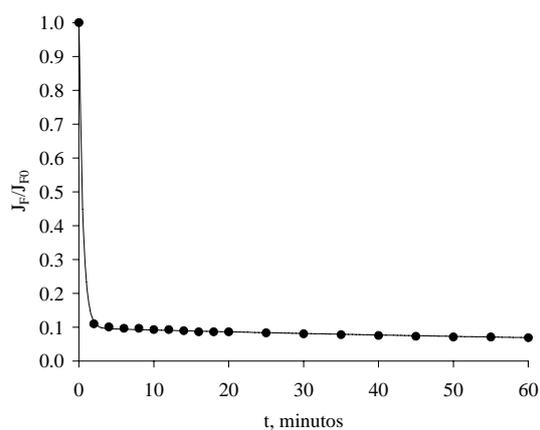


Figura 5.15 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10.7-5.

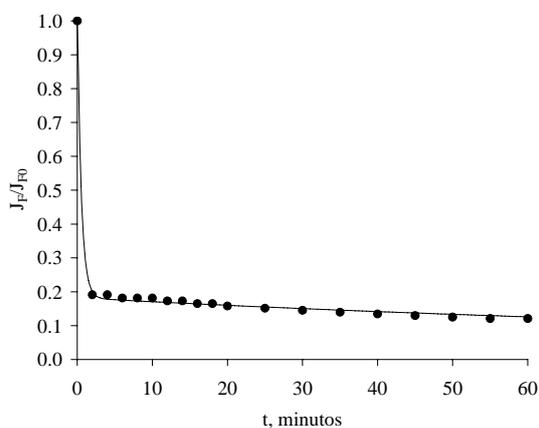


Figura 5.16 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10.7-10.

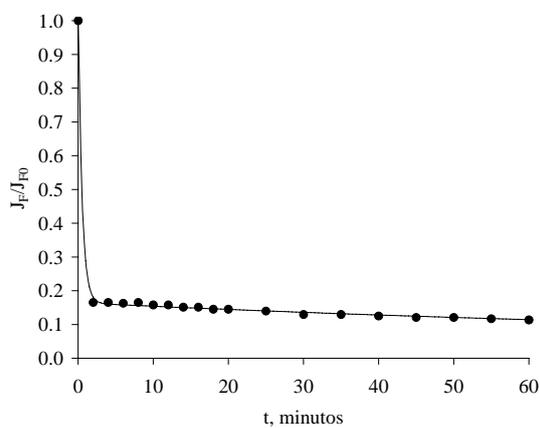


Figura 5.17 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L50-10.7-15.

El valor de los parámetros, obtenidos tras el ajuste de los resultados experimentales al modelo se recoge en la Tabla 5.2:

Tabla 5.2 Parámetros del modelo combinado en función de la fuerza iónica, lisozima-50 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} |
|-------------|------|-------|----------|----------------------|----------------------|
| L50-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.916 | 1.785 | 0.004040 |
| L50-10.7-1 | 10.7 | 1 | 0.916 | 1.851 | 0.003835 |
| L50-10.7-2 | 10.7 | 2 | 0.908 | 1.820 | 0.003467 |
| L50-10.7-5 | 10.7 | 5 | 0.902 | 1.885 | 0.003114 |
| L50-10.7-10 | 10.7 | 10 | 0.818 | 1.821 | 0.003391 |
| L50-10.7-15 | 10.7 | 15 | 0.835 | 1.899 | 0.003320 |

Un análisis preliminar indica que entre el 97-98 % de lo poros susceptibles de bloquearse ya se han bloqueado al alcanzar los dos minutos de experimento. Además este fenómeno no se ve afectado por el aumento de fuerza iónica como se aprecia por los valores obtenidos del parámetro A, que oscilan entorno a un valor medio de 1.844 min^{-1} con una desviación estándar de 0.043 min^{-1} .

En la Figura 5.18 se muestra la influencia de la fuerza iónica sobre el parámetro α .

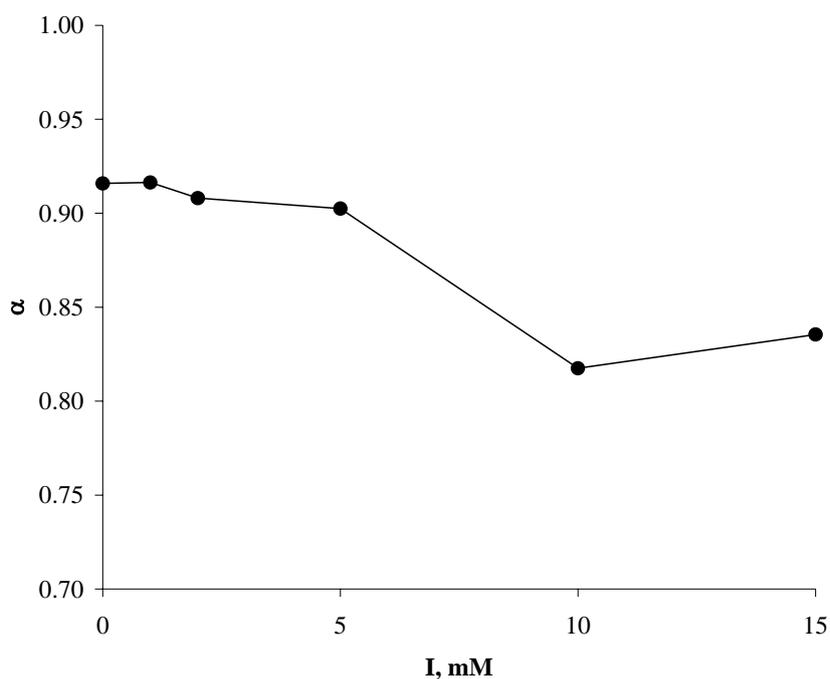


Figura 5.18 Influencia de la fuerza iónica sobre α , lisozima-50 kDa.

Un aumento de la fuerza iónica provoca una disminución en la fracción de poros bloqueables, disminuyendo desde 0.916 para el experimento realizado sin adición de fuerza iónica a valores entorno a 0.82 para los experimentos con 10 y 15 mM de fuerza iónica adicional. La disminución se puede deber a un aumento del tamaño de la proteína (que en estas condiciones presenta su menor radio efectivo) pues la adición de iones salinos da lugar a un apantallamiento de las fuerzas intermoleculares atractivas que se producen entre los grupos funcionales con carga opuesta de la molécula (Jones, et al., 2000). Otro fenómeno que contribuye al aumento de tamaño en el punto isoeléctrico al aumentar la fuerza iónica es un ligero aumento de su carga neta por la unión de iones salinos a la

molécula (Fane et al. 1983). La alteración de la carga neta por la unión de los iones debe dificultar la formación de agregados, lo que también contribuye a la reducción de α .

La influencia de la fuerza iónica sobre el parámetro de bloqueo estándar, B, se muestra en la Figura 5.19:

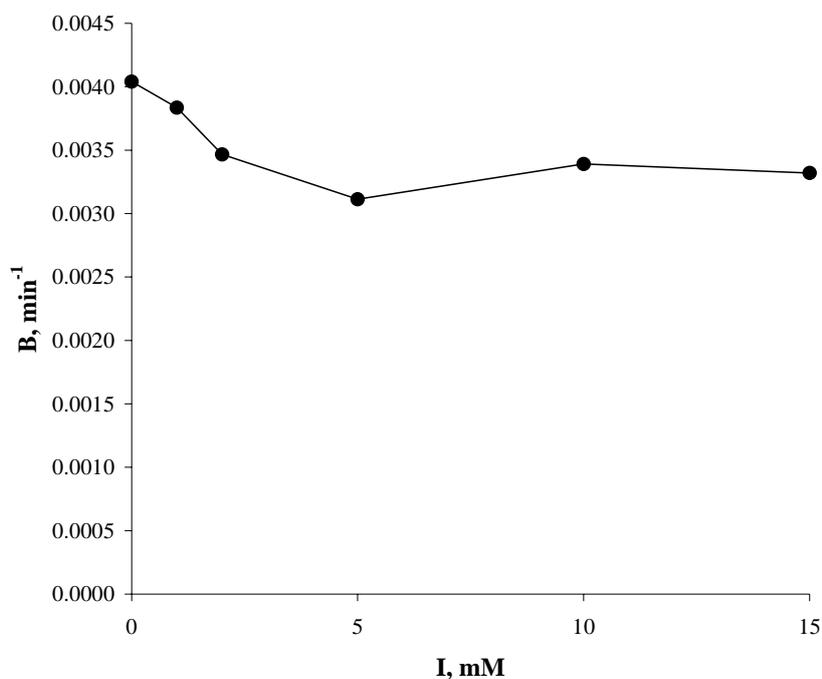


Figura 5.19 Influencia de la fuerza iónica sobre B, lisozima-50 kDa.

Se aprecia un descenso de un 20 % de B con el aumento de la fuerza iónica, lo que indica que la adición de sal reduce la adsorción de proteína en el interior de los poros. Este efecto de la fuerza iónica puede deberse a que los iones salinos añadidos interfieren en las interacciones electrostáticas entre la membrana y la proteína (Clark et al. 1991), posiblemente al competir por los puntos de adsorción existentes en la superficie de los poros y al unirse a las moléculas de proteína.

Transporte de proteína a través de la membrana.

Influencia del pH sobre el transporte de proteína.

Se ha aplicado el procedimiento descrito en el apartado 5.1.3 para los experimentos en los que se produce transmisión. Los experimentos correspondientes a pH 10 y 10.7 se han

ajustado mediante la ecuación sigmoïdal y el experimento a pH 12 mediante la ecuación hiperbólica. Los resultados se recogen a continuación:

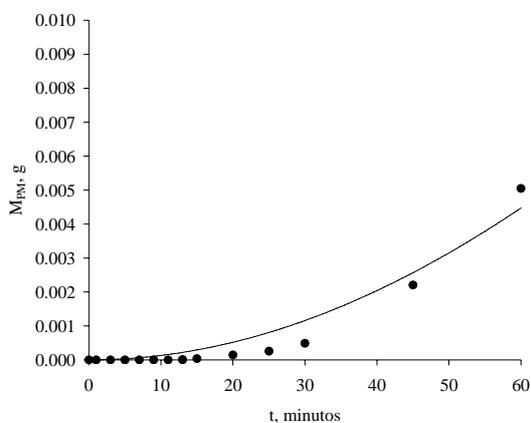


Figura 5.20 M_{PM} vs t. Exp L50-10-0.

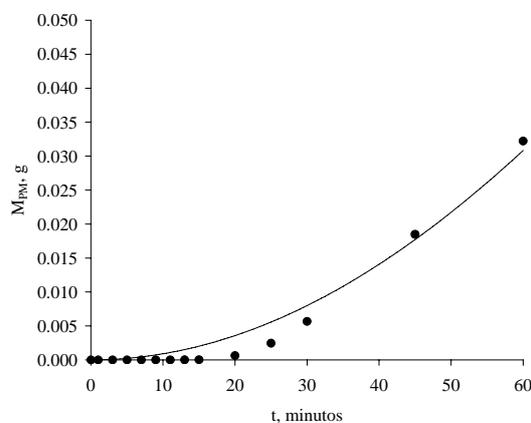


Figura 5.21 M_{PM} vs t. Exp L50-10.7-0.

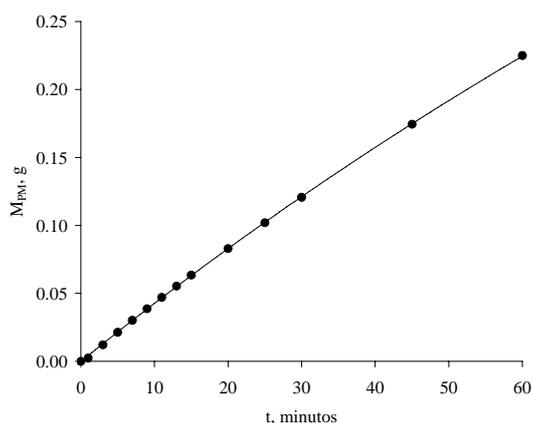


Figura 5.22 M_{PM} vs t. Exp L50-12-0.

En las siguientes tablas se muestran los valores de los parámetros de ajuste, así como el tiempo, la velocidad de transmisión máxima y el valor de M_{PM} al finalizar el experimento.

Tabla 5.3 Parámetros para el ajuste sigmoïdal de M_{PM} , lisozima-50 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|-------------|------|-------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| L50-10-0 | 10 | 0 | 0.0963 | 73959.75 | 157.01 | 0.00023 | 0.0050 |
| L50-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.6523 | 72569.80 | 155.53 | 0.00157 | 0.0322 |

Tabla 5.4 Parámetros para el ajuste hiperbólico de M_{PM} , lisozima-50 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_1 , g | f_1 , min | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|-------------|----|-------|-----------|-------------|-----------------|--|--------------|
| L50-12-0 | 12 | 0 | 1.5319 | 349.35 | 0.00 | 0.00439 | 0.2250 |

Se observa que, en los experimentos a pH 10 y 10.7, el máximo de velocidad de transporte se encuentra en un tiempo mayor que el de duración del experimento, indicando que el proceso de adsorción sobre las paredes de los poros se prolonga durante todo el experimento. Sin embargo, durante el experimento a pH 12 el máximo se encuentra en el instante inicial. Esto puede deberse a la reducción de la adsorción como consecuencia de que a ese valor de pH tanto la proteína como la membrana tiene carga opuesta, existiendo por tanto fuerzas electrostáticas repulsivas entre ellas. Como consecuencia de esta reducción y del flujo mayor, la cantidad de proteína transportada es mucho mayor para este caso alcanzando un valor final de 0.225 g.

Influencia de la fuerza iónica sobre el transporte de proteína.

La aplicación del procedimiento descrito en el apartado 5.1.3 da lugar a los siguientes resultados.

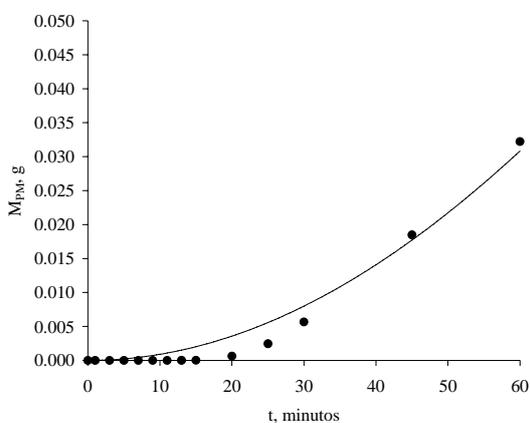


Figura 5.23 M_{PM} vs t. Exp L50-10.7-0.

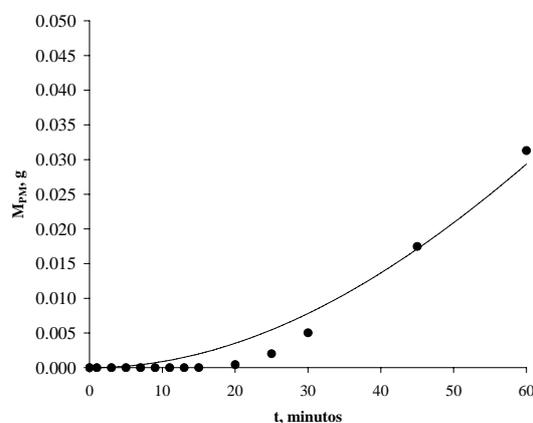


Figura 5.24 M_{PM} vs t. Exp L50-10.7-1.

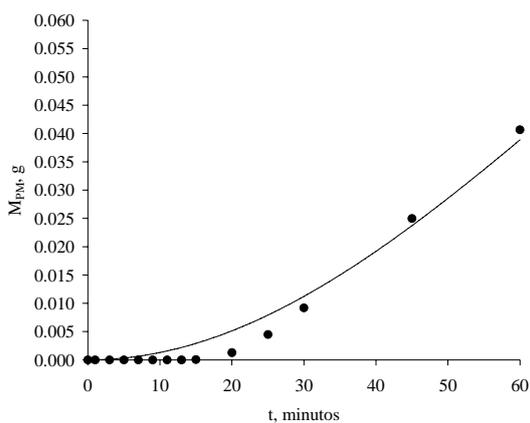


Figura 5.25 M_{PM} vs t. Exp L50-10.7-2.

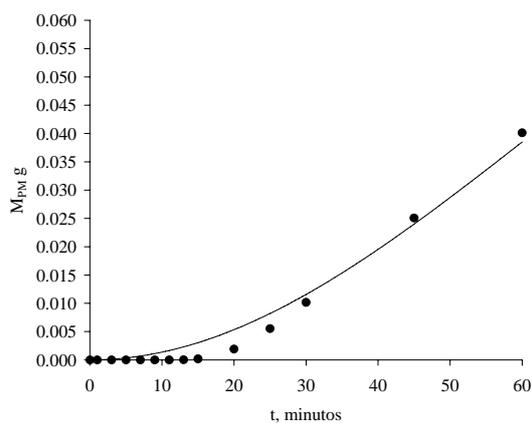


Figura 5.26 M_{PM} vs t. Exp L50-10.7-5.

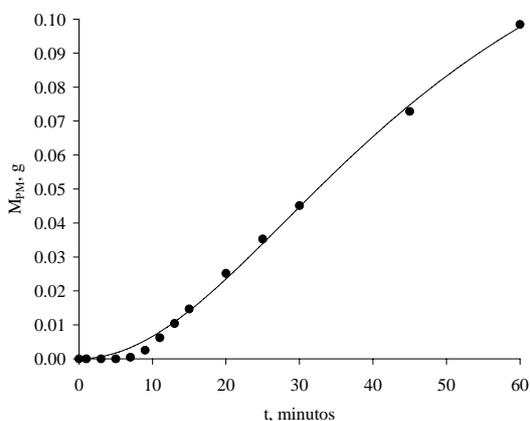


Figura 5.27 M_{PM} vs t. Exp L50-10.7-10.

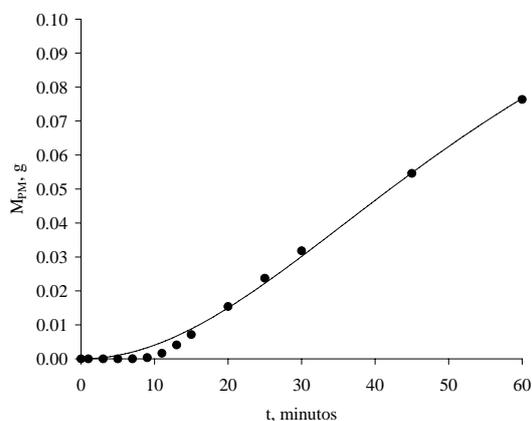


Figura 5.28 M_{PM} vs t. Exp L50-10.7-15.

En la Tabla 5.5 se muestran los valores obtenidos para los ajustes anteriores.

Tabla 5.5 Parámetros para el ajuste sigmoideal de M_{PM} , lisozima-50 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|-------------|------|-------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| L50-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.6523 | 72569.80 | 155.53 | 0.00157 | 0.0322 |
| L50-10.7-1 | 10.7 | 1 | 0.3599 | 40560.65 | 116.28 | 0.00116 | 0.0313 |
| L50-10.7-2 | 10.7 | 2 | 0.2176 | 16556.68 | 74.29 | 0.00110 | 0.0407 |
| L50-10.7-5 | 10.7 | 5 | 0.1726 | 12538.28 | 64.65 | 0.00100 | 0.0401 |
| L50-10.7-10 | 10.7 | 10 | 0.1614 | 2347.62 | 27.97 | 0.00216 | 0.0985 |
| L50-10.7-15 | 10.7 | 15 | 0.1579 | 3812.98 | 35.65 | 0.00166 | 0.0764 |

La adición de fuerza iónica provoca dos efectos fundamentales, uno es que la velocidad máxima de transporte se produce a tiempos menores y el otro es un aumento de la cantidad final de proteína transportada. La máxima velocidad de transporte pasa de 155.53 minutos cuando no se adiciona sal a 30 minutos para la adición de 10-15 mM. Esto parece indicar una disminución de la adsorción en el interior de los poros que puede justificarse, como ya se indicó, por la alteración de las interacciones electrostáticas proteína-membrana. Esta alteración se debe, posiblemente, a la competencia de los iones salinos con la proteína por los puntos de adsorción de las paredes de los poros. El aumento de la cantidad de proteína transportada es una consecuencia lógica de la reducción de la adsorción, que provoca que la proteína aparezca antes en el filtrado, y del aumento de caudal experimentado por la adición de sal, que provoca que el volumen filtrado sea mucho mayor (251.0 mL con 0 mM y 485.5 mL con 10 mM). Como consecuencia de lo anteriormente descrito, M_{PM} es unas 3 veces superior para el experimento de 10 mM en comparación con el experimento sin adición de fuerza iónica.

5.2.2. Sistema lisozima-membrana de 300 kDa

Cálculo del radio efectivo de la proteína

Los datos utilizados en este caso para el cálculo del radio efectivo son:

- Radio de Stokes: 1.83 nm.
- Radio de poro medio: 17.5 nm (Palacio, 1999).
- Carga de la lisozima en función del pH:

| | | | | | | | | |
|--------------|----|------|------|------|------|------|------|-------|
| pH: | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 10.7 | 12 |
| Carga | 10 | 8.91 | 8.05 | 7.25 | 6.45 | 3.45 | 0 | -4.49 |

Teniendo en cuenta la fuerza iónica aportada por el ajuste del pH y la proteína se obtienen los siguientes resultados:

| | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| pH: | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 10.7 | 12 |
| r_{eff}, nm | 13.79 | 12.25 | 11.07 | 9.72 | 8.07 | 3.76 | 1.83 | 2.53 |

Resultados que muestran un radio efectivo de la proteína menor que el radio de poro. El radio efectivo calculado está en consonancia con las observaciones experimentales ya que, en este sistema, se ha obtenido transmisión en todos los valores de pH ensayados.

Evolución temporal del flujo de filtrado.

Influencia del pH sobre el flujo de filtrado.

Puesto que en este sistema se ha obtenido transmisión en todos los casos, sólo se ha utilizado el modelo combinado que considera el mecanismo de bloqueo estándar. Los resultados se recogen a continuación.

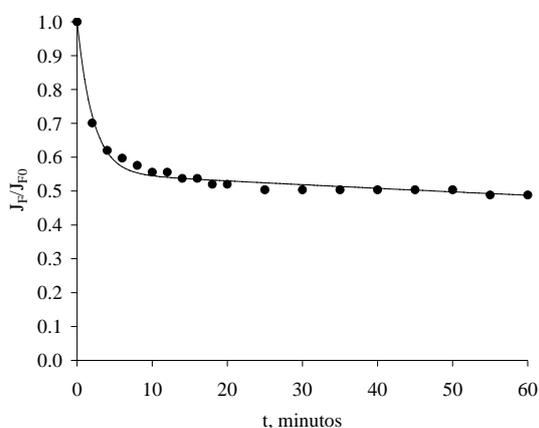


Figura 5.29 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-5-0.

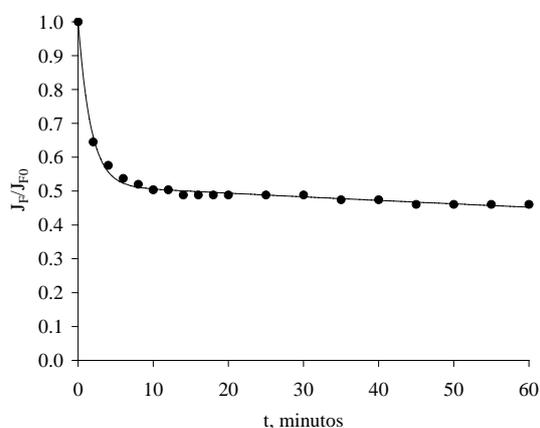


Figura 5.30 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-6-0.

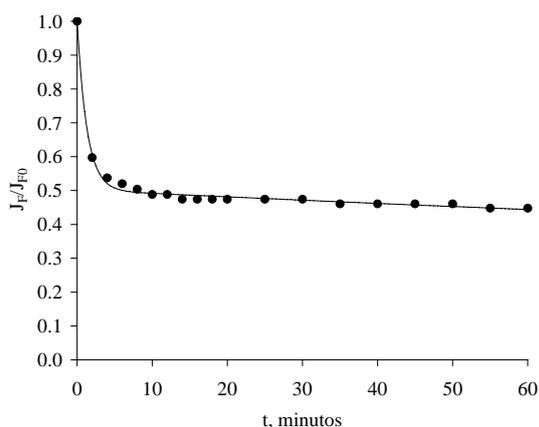


Figura 5.31 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-7-0.

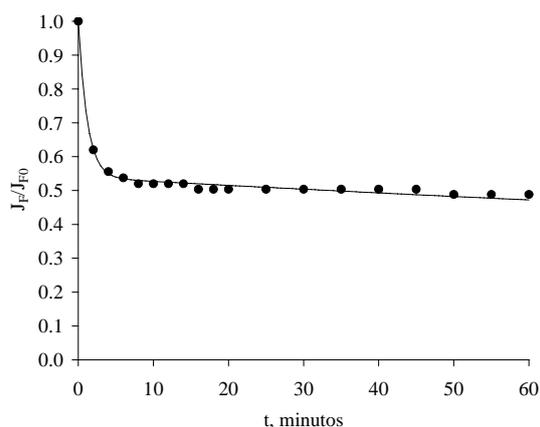


Figura 5.32 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-8-0.

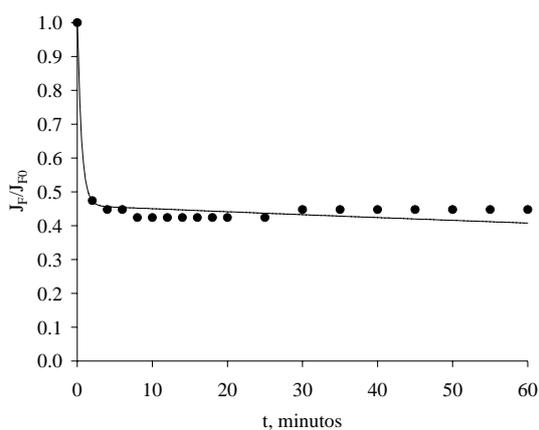


Figura 5.33 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-9-0.

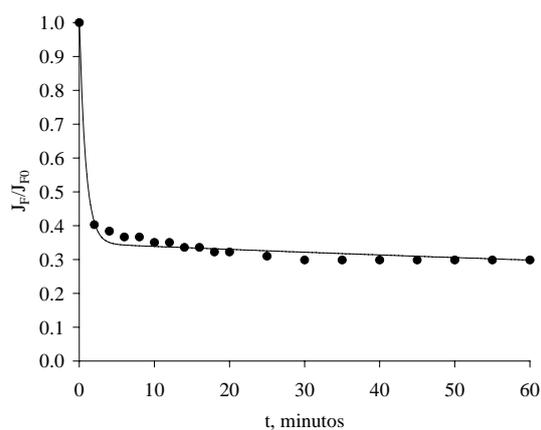


Figura 5.34 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-10-0.

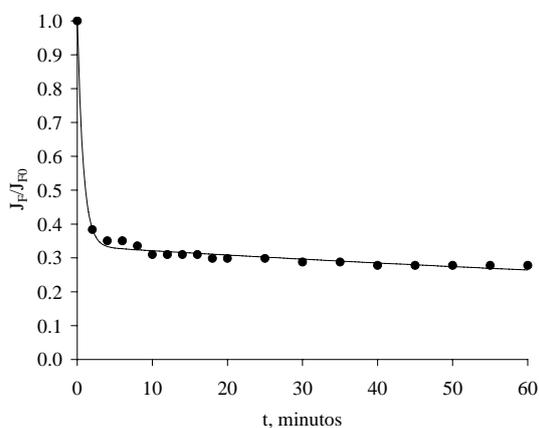


Figura 5.35 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-10.7-0.

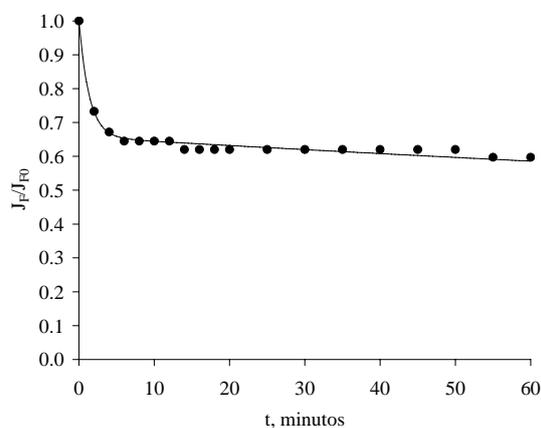


Figura 5.36 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-12-0.

Los parámetros obtenidos tras el ajuste de los resultados experimentales se resumen en la Tabla 5.6:

Tabla 5.6 Parámetros del modelo combinado en función del pH, lisozima-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} |
|-------------|------|-------|----------|----------------------|----------------------|
| L300-5-0 | 5 | 0 | 0.447 | 0.476 | 0.001087 |
| L300-6-0 | 6 | 0 | 0.483 | 0.595 | 0.001143 |
| L300-7-0 | 7 | 0 | 0.498 | 0.766 | 0.001057 |
| L300-8-0 | 8 | 0 | 0.461 | 0.840 | 0.001140 |
| L300-9-0 | 9 | 0 | 0.541 | 1.756 | 0.001025 |
| L300-10-0 | 10 | 0 | 0.652 | 1.156 | 0.001326 |
| L300-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.665 | 1.245 | 0.002093 |
| L300-12-0 | 12 | 0 | 0.343 | 0.741 | 0.000987 |

El análisis preliminar de los parámetros muestra que el fenómeno de bloqueo de poros es rápido, aunque más lento que en el caso de la membrana de 50 kDa. En este caso durante los dos primeros minutos de operación se bloquean entre el 61% para pH 5 y el 97% para pH 9 de los poros susceptibles de experimentar este mecanismo.

El efecto del pH sobre el parámetro α se muestra en la siguiente figura:

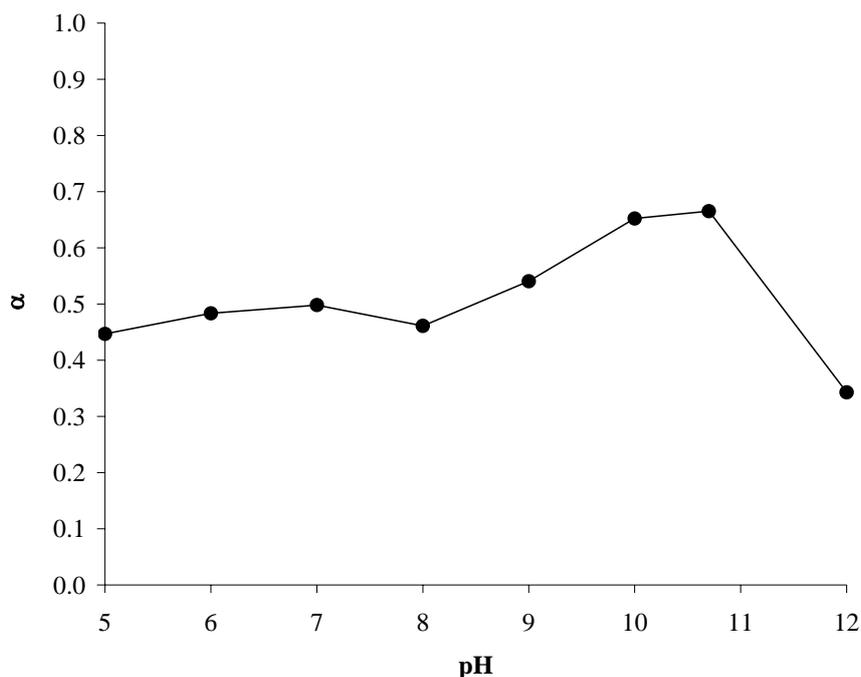


Figura 5.37 Influencia del pH sobre α , lisozima-300 kDa.

La máxima fracción de poros bloqueables se encuentra en el punto isoeléctrico de la proteína (66.5 %), descendiendo al alejarnos del mismo tanto para valores de pH superiores como inferiores, alcanzando el mínimo en pH 12 (33.4 %).

La fracción de poros bloqueables, como en el sistema anterior, aumenta al reducirse el radio efectivo (13.79 nm a pH 5 hasta 1.83 nm a pH 10.7). Este efecto se explica por los mismos factores mencionados en el sistema anterior, es decir, al reducirse el radio efectivo de la proteína, ésta puede bloquear poros de menor tamaño que antes no le eran accesibles. Además la reducción de carga que experimenta al acercarnos al punto isoeléctrico posibilita la formación de agregados, lo que aumenta la capacidad de obstrucción de poros.

La Figura 5.38 muestra el efecto del pH sobre el parámetro, A:

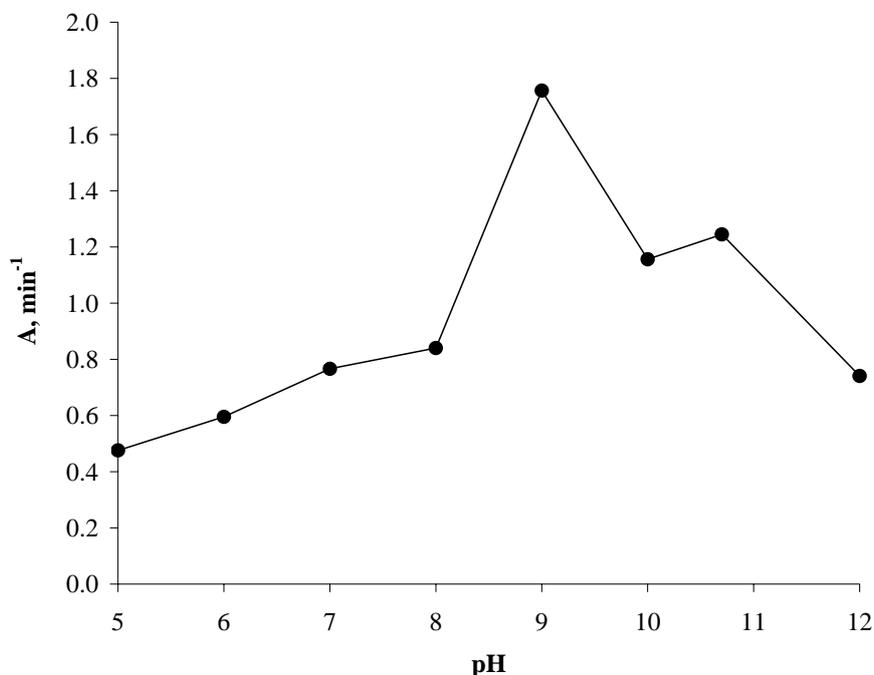


Figura 5.38 Influencia del pH sobre A, lisozima-300 kDa.

A es mayor cuando nos encontramos en los intervalos donde la proteína y la membrana tienen cargas opuestas (valores de pH 8, 9, 10) y cuando la proteína presenta carga neta nula. Este comportamiento indica que las fuerzas de atracción entre la proteína y la membrana aumentan la velocidad con la que se produce el bloqueo de los poros (Millesime et al., 1994). Hipótesis que se ve fortalecida por el hecho de que la máxima velocidad del proceso se produce a pH 9, valor intermedio entre el punto de carga cero de la membrana (pH 7) y el punto isoeléctrico de la proteína (pH 10.7) y, por tanto, en el que presumiblemente estas fuerzas de atracción pueden ser más intensas. En el punto isoeléctrico, A presenta su segundo valor más elevado lo que indica que cuando la proteína presenta carga neta nula también se favorece la deposición y el bloqueo de los poros.

La variación del parámetro B con el pH se muestra en la siguiente figura:

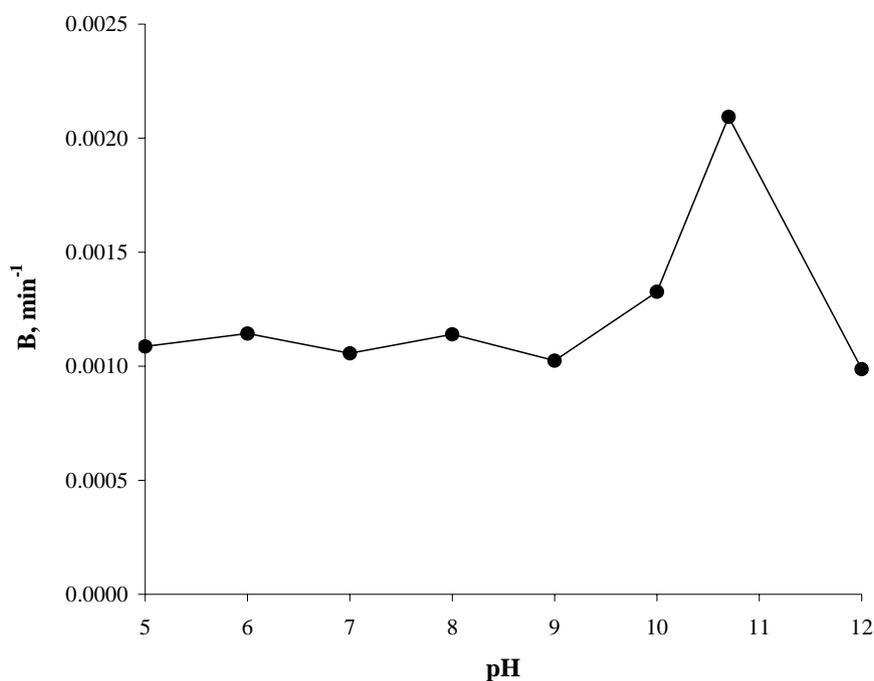


Figura 5.39 Influencia del pH sobre B, lisozima-300 kDa.

B, parámetro característico del bloqueo estándar, muestra un máximo en el punto isoeléctrico al igual que en el sistema anterior. Este máximo se puede explicar por un aumento de la adsorción en el interior de los poros como consecuencia de la carga neta nula que presenta la proteína, que facilita la deposición de capas sucesivas de proteína. Para el resto de valores por debajo del punto isoeléctrico el valor de B oscila entre 0.0011 min^{-1} y 0.0013 min^{-1} , valores muy similares que parecen indicar que una vez se ha depositado la primera capa de proteína, la repulsión entre la monocapa formada y las proteínas que tienden a depositarse sobre ella controlan el proceso. En el caso de pH 12, se obtiene un valor de B del mismo orden que los anteriores, hecho que se puede atribuir al mismo fenómeno.

Influencia de la fuerza iónica sobre el flujo de filtrado.

Los resultados de la aplicación del modelo que contempla como segundo mecanismo el bloqueo estándar se muestra en las Figuras 5.40 a 5.44:

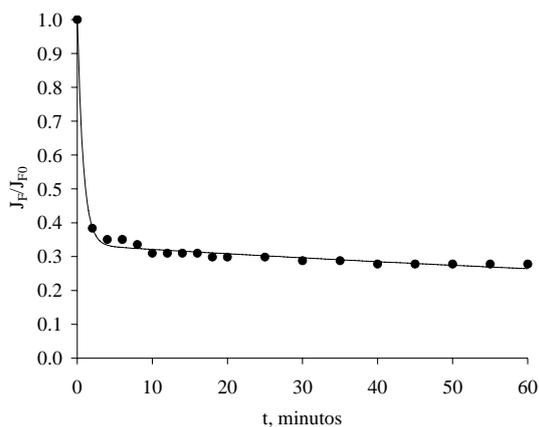


Figura 5.40 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-10.7-0.

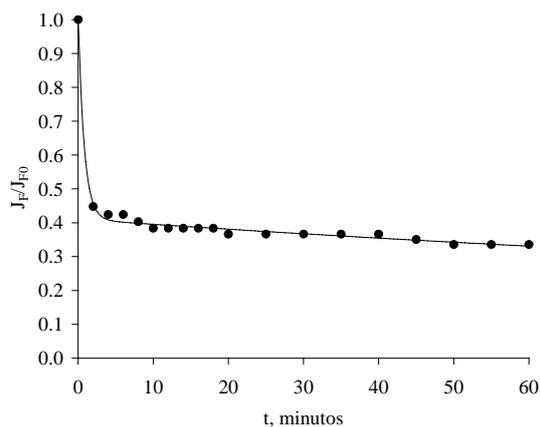


Figura 5.41 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-10.7-2.

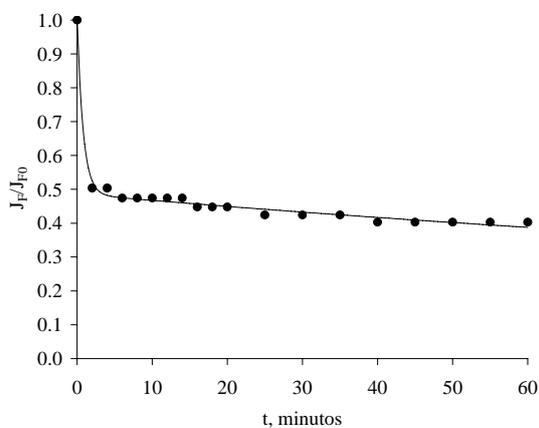


Figura 5.42 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-10.7-5.

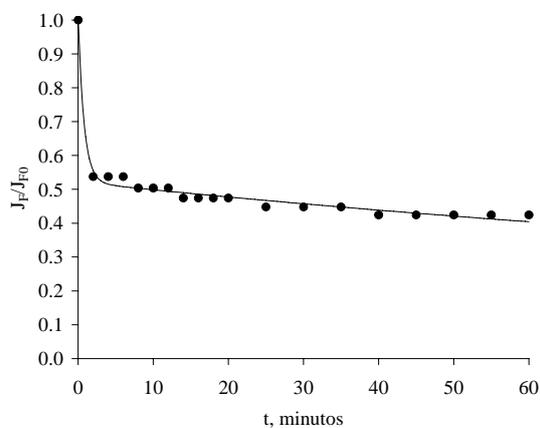


Figura 5.43 J_F/J_{F0} vs t. Exp. L300-10.7-10.

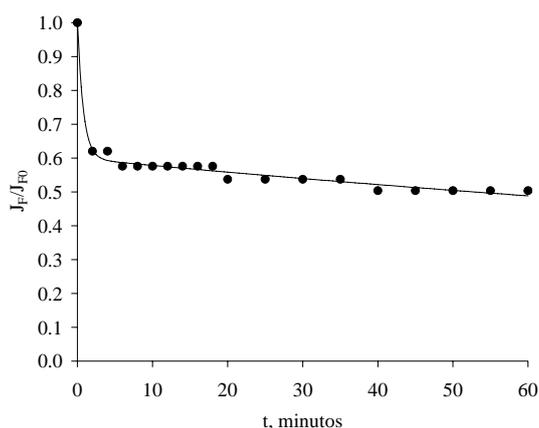


Figura 5.44 J_F/J_{FO} vs t. Exp. L300-10.7-15.

Los parámetros de ajuste se recogen en la Tabla 5.7:

Tabla 5.7 Parámetros del modelo combinado en función de la fuerza iónica, lisozima-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} |
|--------------|------|-------|----------|----------------------|----------------------|
| L300-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.665 | 1.245 | 0.002093 |
| L300-10.7-2 | 10.7 | 2 | 0.590 | 1.229 | 0.001895 |
| L300-10.7-5 | 10.7 | 5 | 0.514 | 1.240 | 0.001998 |
| L300-10.7-10 | 10.7 | 10 | 0.479 | 1.258 | 0.002262 |
| L300-10.7-15 | 10.7 | 15 | 0.401 | 1.277 | 0.001778 |

Se aprecia que tanto el parámetro A como el B no muestran una clara dependencia de la fuerza iónica. A toma un valor medio de 1.250 min^{-1} con una desviación estándar de 0.019 min^{-1} , lo que señala que en los dos primeros minutos de ensayo se han bloqueado el 92% de los poros de la fracción α . En cuanto al parámetro de bloqueo estándar, B, oscila entorno a un valor medio de 0.00201 min^{-1} y su desviación estándar es de 0.00019 min^{-1} . Esto indica que la ligera reducción de la adsorción de proteína como consecuencia de la adición de fuerza iónica que se apreciaba en el sistema lisozima-50 kDa (una reducción del 20% de B) no se observa en este caso, como consecuencia del aumento del tamaño de los poros y por tanto el aumento de los puntos de interacción.

Puesto que ni A ni B sufren alteraciones significativas por la adición de fuerza iónica, el responsable en los cambios de flujo experimentados es la fracción de poros bloqueables. En la siguiente figura se muestra su evolución en función de la fuerza iónica.

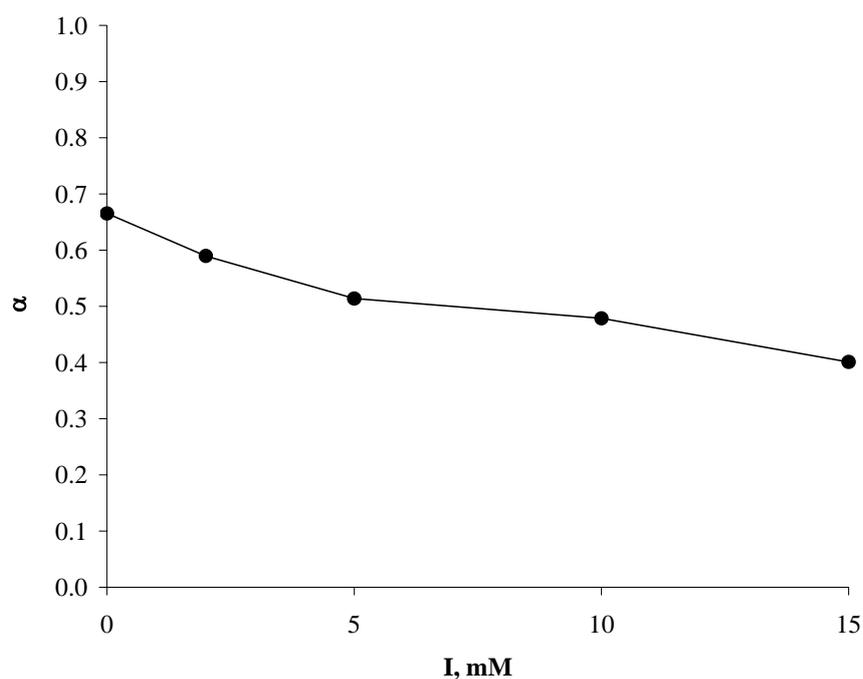


Figura 5.45 Influencia de la fuerza iónica sobre α , lisozima-300 kDa.

Al igual que en el sistema lisozima-50 kDa, el aumento de la fuerza iónica da lugar a la disminución de la fracción de poros bloqueables, que pasa de 0.665 a 0.401. Esto se puede volver a explicar por el hecho de que la adición de iones salinos puede dar lugar a un aumento del tamaño de la proteína tanto por la alteración de las fuerzas intramoleculares como por la unión de iones salinos a la proteína. Además, se dificultará la formación de agregados como consecuencia de la alteración de la carga neta que experimenta la proteína, lo que también contribuye a la reducción de α pues disminuye la probabilidad de obstruir poros.

Transporte de proteína a través de la membrana.

Influencia del pH sobre el transporte de proteína.

Tras aplicar los ajustes descritos en la sección 5.1.3, se obtienen los resultados recogidos en las Figuras 5.46 a 5.53:

Discusión

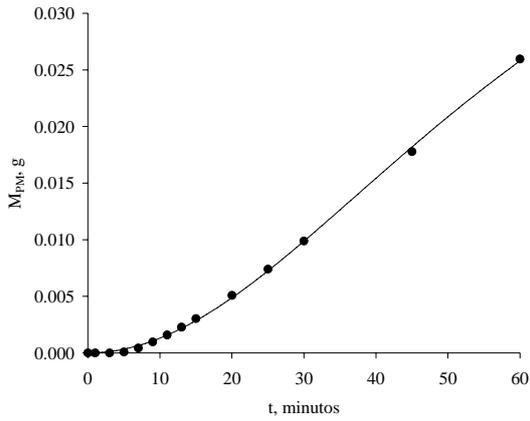


Figura 5.46 M_{PM} vs t. Exp L300-5-0.

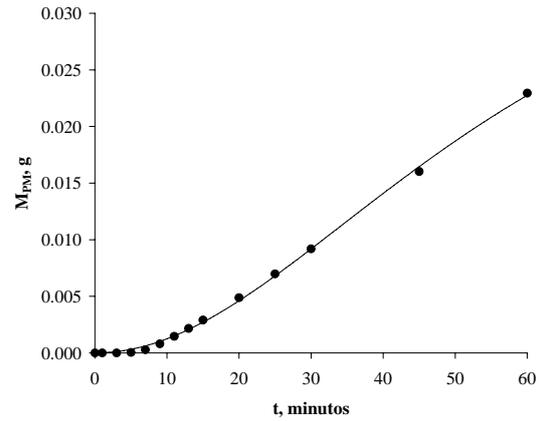


Figura 5.47 M_{PM} vs t. L300-Exp 6-0.

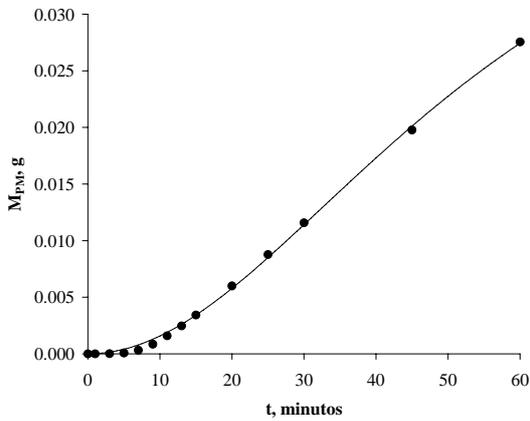


Figura 5.48 M_{PM} vs t. Exp L300-7-0.

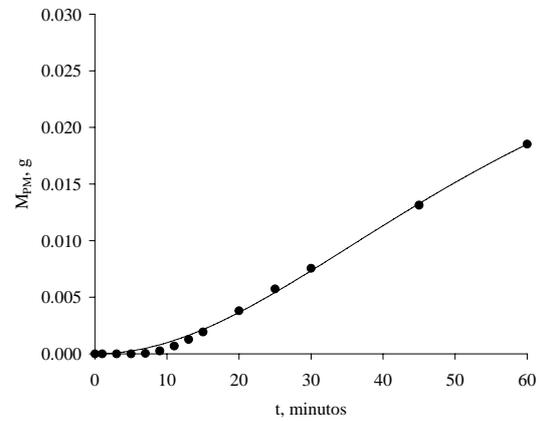


Figura 5.49 M_{PM} vs t. Exp L300-8-0.

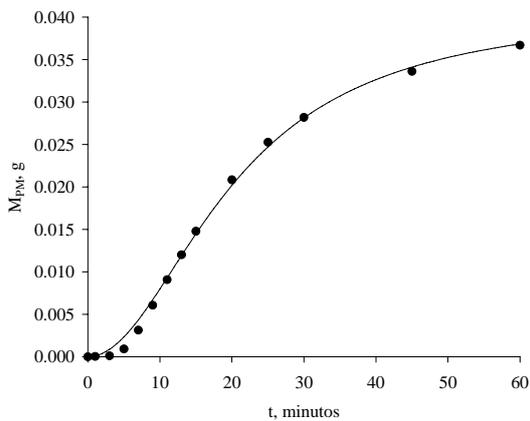


Figura 5.50 M_{PM} vs t. Exp L300-9-0.

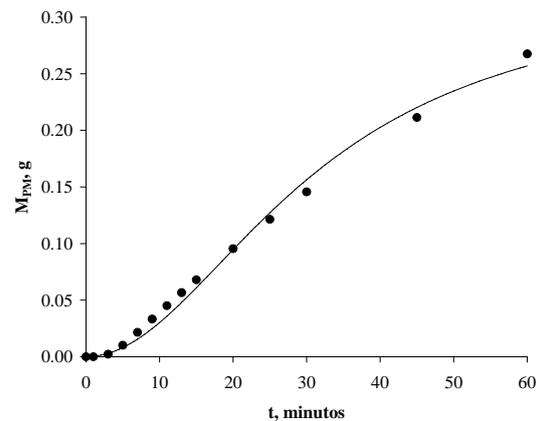


Figura 5.51 M_{PM} vs t. Exp L300-10-0.

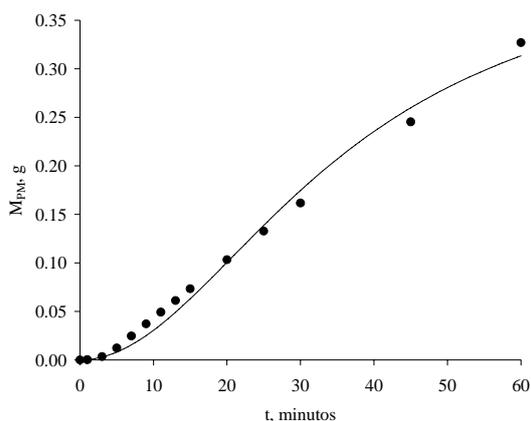


Figura 5.52 M_{PM} vs t. Exp L300-10.7-0.

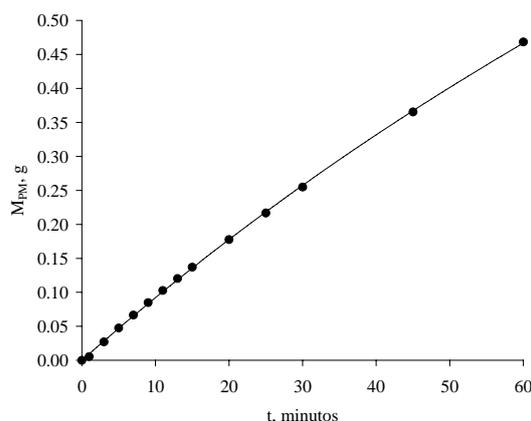


Figura 5.53 M_{PM} vs t. Exp L300-12-0.

A continuación se tabulan los valores de los parámetros de ajuste, la velocidad de transmisión máxima, el tiempo de esa velocidad máxima y el valor de M_{PM} al finalizar el experimento.

Tabla 5.8 Parámetros para el ajuste sigmoide de M_{PM} , lisozima-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min^2 | t_{\max} , min | $(\frac{dM_{PM}}{dt})_{\max}$, $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ | M_{PM} , g |
|-------------|------|-------|-----------|------------------------|------------------|--|--------------|
| L300-5-0 | 5 | 0 | 0.0557 | 4182.46 | 37.34 | 0.00056 | 0.0260 |
| L300-6-0 | 6 | 0 | 0.0448 | 3491.16 | 34.11 | 0.00049 | 0.0229 |
| L300-7-0 | 7 | 0 | 0.0516 | 3169.09 | 32.50 | 0.00060 | 0.0276 |
| L300-8-0 | 8 | 0 | 0.0377 | 3721.32 | 35.22 | 0.00040 | 0.0185 |
| L300-9-0 | 9 | 0 | 0.0411 | 414.03 | 11.75 | 0.00131 | 0.0367 |
| L300-10-0 | 10 | 0 | 0.3270 | 982.90 | 18.10 | 0.00677 | 0.2676 |
| L300-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.4263 | 1297.45 | 20.80 | 0.00769 | 0.3271 |

Tabla 5.9 Parámetros para el ajuste hiperbólico de M_{PM} , lisozima-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_1 , g | f_1 , min | t_{\max} , min | $(\frac{dM_{PM}}{dt})_{\max}$, $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ | M_{PM} , g |
|-------------|----|-------|-----------|-------------|------------------|--|--------------|
| L300-12-0 | 12 | 0 | 2.4998 | 261.37 | 0.00 | 0.00956 | 0.4685 |

Los experimentos realizados a pH comprendidos entre 5 y 8 muestran la velocidad máxima a tiempos muy similares, teniendo en cuenta las variaciones de carga que se producen en ese intervalo y la similitud de los valores obtenidos, todo parece indicar que en ese caso predominan efectos estéricos más que efectos electrostáticos (el radio efectivo oscila entre 13.79-9.72 nm). t_{\max} a pH 9 indica que la adsorción se produce rápidamente, resultado lógico pues es donde, como se explicó anteriormente, las fuerzas atractivas entre membrana y proteína pueden ser más elevadas. En los experimentos donde la cantidad de proteína que

pasa a través de la membrana es importante (pH 10, 10.7 y 12), se aprecia como t_{\max} se desplaza a tiempos mayores en el punto isoeléctrico. Este hecho potencia la idea, que se indicó al analizar el flujo, de que la ausencia de carga neta en las moléculas de proteína facilita la adsorción de sucesivas capas (Ricq et al., 1996; Palacio et al., 1999), y por tanto se produce una mayor adsorción. Durante el experimento a pH 12, el máximo se encuentra en el instante inicial, lo que indica una posible reducción de la adsorción como consecuencia de las fuerzas electrostáticas repulsivas existentes entre la proteína y la membrana en esas condiciones. Al igual que ocurría en el sistema lisozima-50 kDa, a consecuencia de menor adsorción y del flujo mayor la cantidad de proteína transportada es la máxima, alcanzando un valor final de 0.4685 g.

Influencia de la fuerza iónica sobre el transporte de proteína.

Los resultados del ajuste de la masa de proteína transportada a través de la membrana para las fuerzas iónicas estudiadas se recogen en las siguientes figuras.

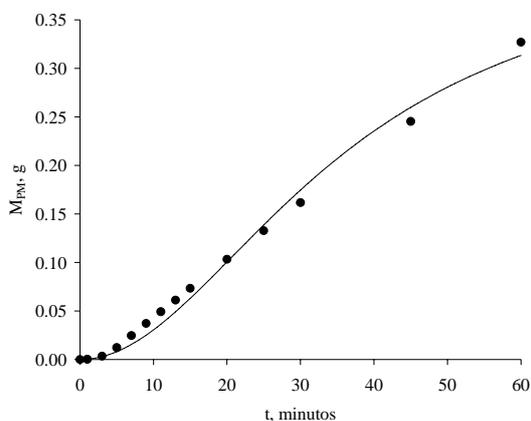


Figura 5.54 M_{PM} vs t. Exp L300-10.7-0.

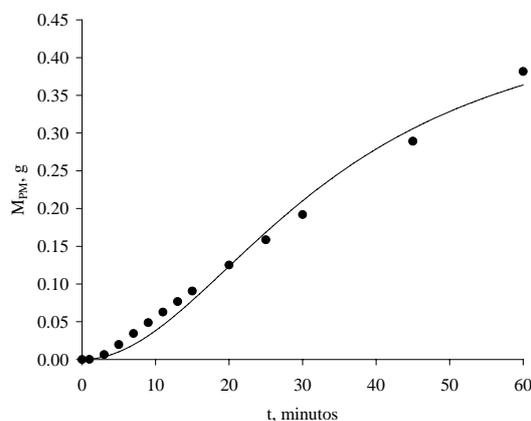


Figura 5.55 M_{PM} vs t. L300-Exp 10.7-2.

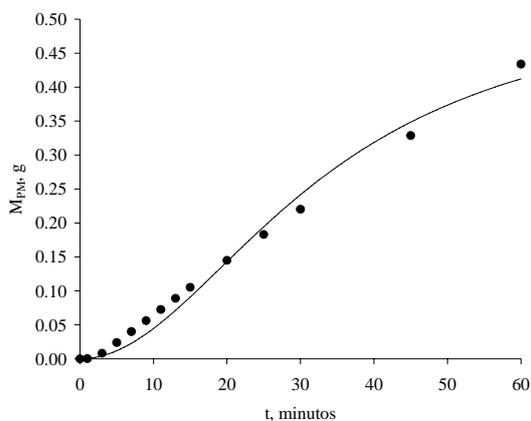


Figura 5.56 M_{PM} vs t. Exp L300-10.7-5.

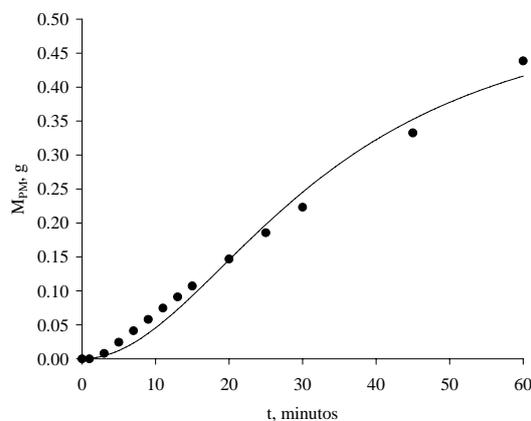


Figura 5.57 M_{PM} vs t. Exp L300-10.7-10.

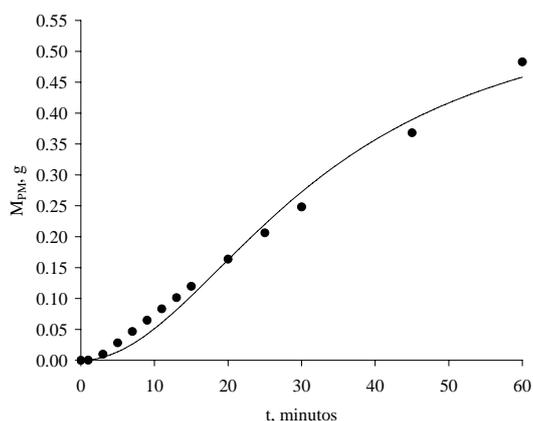


Figura 5.58 M_{PM} vs t. Exp L300-10.7-15.

Tabla 5.10 Parámetros para el ajuste sigmoial de M_{PM} , lisozima-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|--------------|------|-------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| L300-10.7-0 | 10.7 | 0 | 0.4263 | 1297.45 | 20.80 | 0.00769 | 0.3271 |
| L300-10.7-2 | 10.7 | 2 | 0.4807 | 1158.63 | 19.65 | 0.00917 | 0.3818 |
| L300-10.7-5 | 10.7 | 5 | 0.5390 | 1108.08 | 19.22 | 0.01052 | 0.4340 |
| L300-10.7-10 | 10.7 | 10 | 0.5423 | 1090.69 | 19.07 | 0.01067 | 0.4387 |
| L300-10.7-15 | 10.7 | 15 | 0.5928 | 1057.95 | 18.78 | 0.01184 | 0.4830 |

Los resultados muestran que la adición de fuerza iónica hace que la velocidad máxima de transporte se produzca a tiempos menores pasando de 20.80 min sin adición de sal a 18.78

min al añadir 15 mM. Además alcanza valores hasta un 53% mayores, por otra parte también contribuye al aumento de la cantidad final de proteína transportada en un 48%. La reducción de t_{\max} parece indicar una pequeña disminución de la adsorción en el interior de los poros por la alteración de las interacciones electrostáticas membrana-proteína. La reducción de la adsorción se traduce en que la proteína llega antes a la corriente de filtrado, esto junto con el aumento de caudal experimentado por la adición de sal explica el aumento tanto de la velocidad máxima de transporte como de la cantidad final de proteína transportada.

Trasmisiones superiores al 100 %.

Llama la atención las transmisiones superiores al 100% obtenidas tanto en este sistema como en el caso de la lisozima con la membrana de 50 kDa. Esto indica que la concentración de proteína en la corriente de entrada al poro debe ser muy alta. A modo de ejemplo se va a calcular la concentración de entrada al poro para el caso de pH 10.7 de este sistema, para ello se seguirá el siguiente procedimiento:

La evolución de la proteína depositada en la membrana se puede ajustar mediante una ecuación del tipo:

$$M_d = d_3 \cdot (1 - e^{-f_3 t}) \quad [5.23]$$

Donde d_3 y f_3 son parámetros de ajuste.

La masa de proteína depositada de forma mayoritaria debe entrar en los poros y adsorberse sobre la superficie interna de los mismos, por tanto:

$$Q_F C_E = \frac{dM_d}{dt} + Q_F C_F \quad [5.24]$$

$$\frac{dM_d}{dt} = d_3 f_3 e^{-f_3 t} \quad [5.25]$$

donde C_E es la concentración de entrada al poro.

La concentración de entrada en los poros vendría dada por:

$$C_E = \frac{d_3 f_3 e^{-f_3 t}}{Q_F} + C_F \quad [5.26]$$

Aplicando el proceso, el ajuste de M_d se muestra en la siguiente figura:

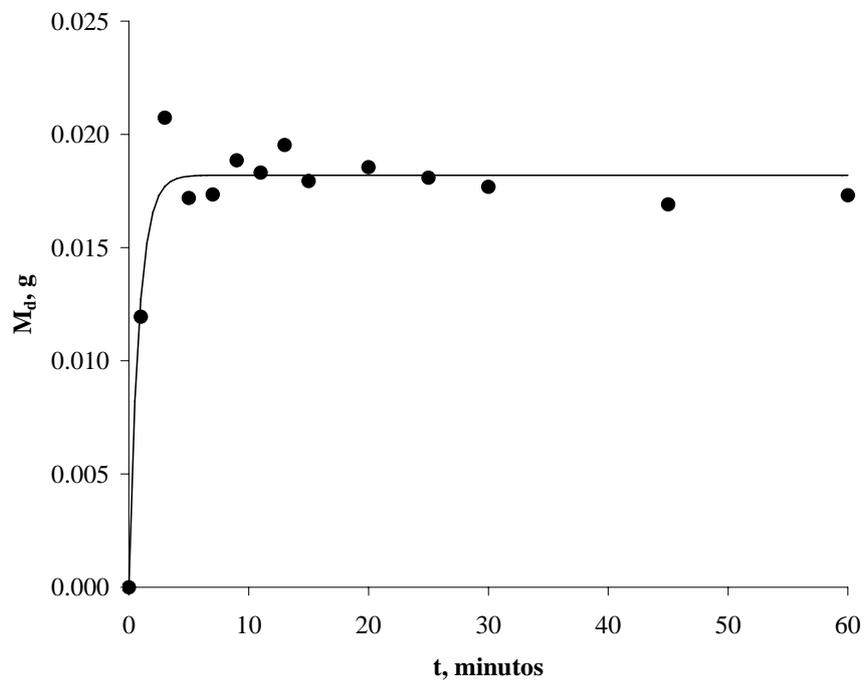


Figura 5.59 M_d en función del tiempo para pH 10.7

Con unos valores de ajuste de:

$$d_3=1.202 \text{ g y } f_3=0.0182 \text{ min}^{-1}.$$

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5.11 Cálculo de C_E a pH 10.7

| Tiempo, min ⁻¹ | C_E , g/L | C_F , g/L | C_R , g/L |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 0.137 | 0.009 | 0.234 |
| 3 | 0.121 | 0.099 | 0.222 |
| 5 | 0.237 | 0.235 | 0.220 |
| 7 | 0.248 | 0.248 | 0.219 |
| 9 | 0.255 | 0.255 | 0.217 |
| 11 | 0.258 | 0.258 | 0.218 |
| 13 | 0.262 | 0.262 | 0.216 |
| 15 | 0.264 | 0.264 | 0.218 |
| 20 | 0.265 | 0.265 | 0.217 |
| 25 | 0.266 | 0.266 | 0.217 |
| 30 | 0.265 | 0.265 | 0.218 |
| 45 | 0.265 | 0.265 | 0.218 |
| 60 | 0.262 | 0.262 | 0.218 |

Donde se observa que la concentración a la entrada de los poros en ocasiones es superior a C_R , lo que implica transmisiones superiores al 100 %.

Este fenómeno puede explicarse si consideramos que existe, a parte del transporte convectivo, un transporte adicional como consecuencia de las interacciones proteína-membrana. Estas interacciones empujan continuamente proteína hacia la membrana, incluso a costa de agotar la alimentación en proteína (Balakrishnan et al., 1993).

Otra explicación para este fenómeno está en considerar el mecanismo de flujo preferencial adsorción-capilaridad empleado por Sourirajan (1977). Si la superficie de la membrana porosa tiene preferencia por la adsorción de un componente, se producirá un salto en el gradiente de concentración y por tanto dará lugar a la aparición de una lámina de fluido preferencialmente adsorbido en la interfase membrana-alimentación. Consecuentemente, la lámina interfacial de fluido se enriquece en uno de los componentes. La continua eliminación de la capa interfacial enriquecida por el flujo bajo presión da lugar a una corriente de producto cuya composición es diferente a la de la alimentación. En el caso de lisozima pura, la proteína probablemente es adsorbida de manera preferencial por la membrana frente al agua. La aplicación de presión da lugar a que parte de la proteína preferentemente adsorbida sea arrastrada dando lugar a concentraciones muy altas en la corriente de filtrado. En este mecanismo, la relación del grosor de la capa preferencialmente adsorbida y el diámetro del capilar es muy importante, disminuyendo el efecto del aumento de la concentración de perneado al aumentar el diámetro de poro frente al grosor de la capa.

Esto queda demostrado por el hecho de que las transmisiones observadas son mayores en el caso de la membrana de 50 kDa al compararla con la membrana de 300 kDa.

5.2.3. Sistema β -lactoglobulina-membrana de 300 kDa

Cálculo del radio efectivo de la proteína.

Los datos utilizados en este caso para el cálculo del radio efectivo son:

- Radio de Stokes del monómero: 1.80 nm (Ko et al., 1993), por encima de pH 3.5 la forma mayoritaria es el dímero.
- Radio de poro medio: 17.5 nm.
- Carga de la β -lactoglobulina en función del pH (Fogolari et al., 2000):

| | | | | | | | |
|--------------|-------|-------|-----|-------|--------|--------|--------|
| pH: | 3 | 4 | 5.2 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Carga | 16.40 | 11.50 | 0 | -6.50 | -11.30 | -15.30 | -18.60 |

Teniendo en cuenta la fuerza iónica aportada por el ajuste del pH y la proteína se obtienen los siguientes resultados:

| | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| pH: | 3 | 4 | 5.2 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| r_{eff}, nm | 19.08 | 19.81 | 3.60 | 12.31 | 20.87 | 27.78 | 32.99 |

Según los radios efectivos calculados, únicamente se debería obtener transmisión en los experimentos a pH 4, 5.2 y 6, sin embargo se obtienen transmisiones bajas a pH 3 y 7. Estos resultados no son sorprendentes, pues la membrana tiene radio de poro medio de 17.5 nm, muy próximo a los radios efectivos obtenidos a esos valores de pH, por lo que la proteína podría pasar por la fracción de poros de radio mayor que el radio medio.

Evolución temporal del flujo de filtrado.

Influencia del pH sobre el flujo de filtrado.

En este sistema y teniendo en cuenta el criterio de la transmisión, se ha utilizado el modelo que contempla el bloqueo estándar para los experimentos con valores de pH entre 3 y 7, ambos incluidos. Para los experimentos realizados a pH 8 y 9 se ha utilizado el modelo combinado con formación de torta. Los resultados se muestran a continuación.

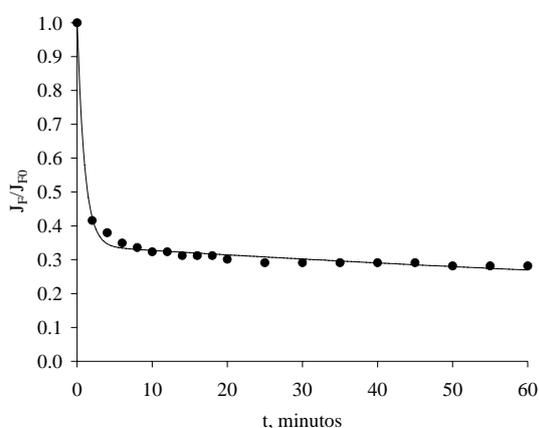


Figura 5.60 J_F/J_{FO} vs t. Exp. BLg-3-0.

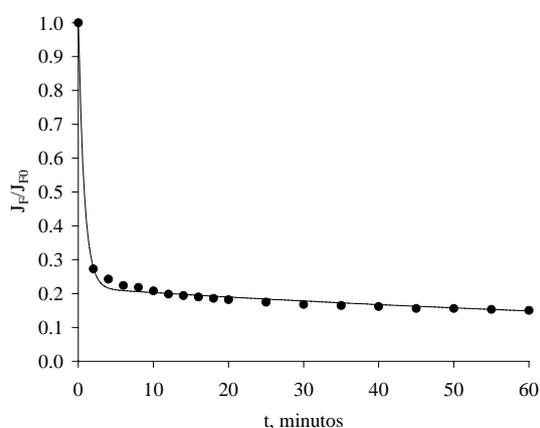


Figura 5.61 J_F/J_{FO} vs t. Exp. BLg-4-0.

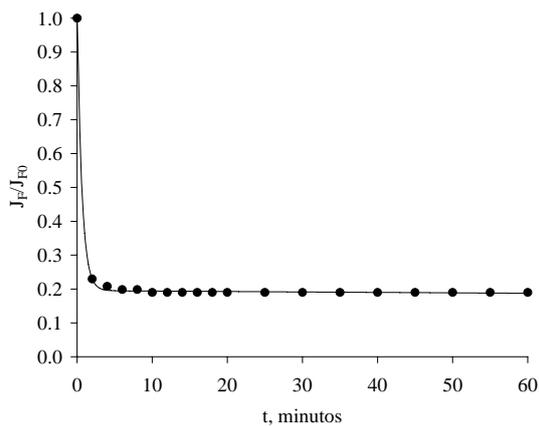


Figura 5.62 J_F/J_{FO} vs t. Exp. BLg-5.2-0.

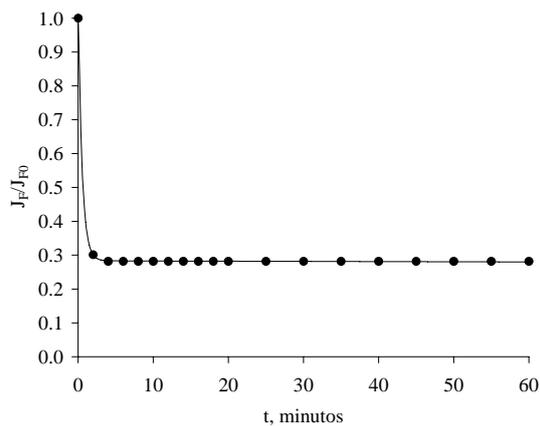


Figura 5.63 J_F/J_{FO} vs t. Exp. BLg-6-0.

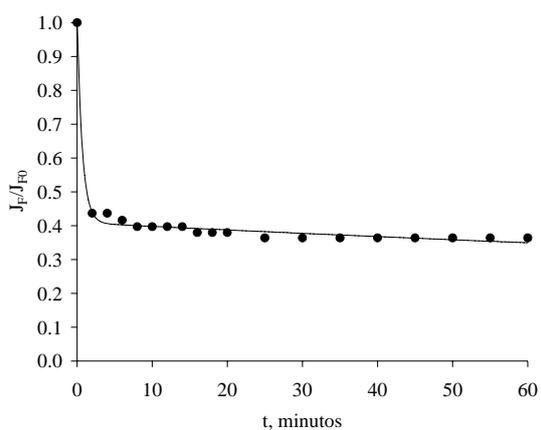


Figura 5.64 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-7-0.

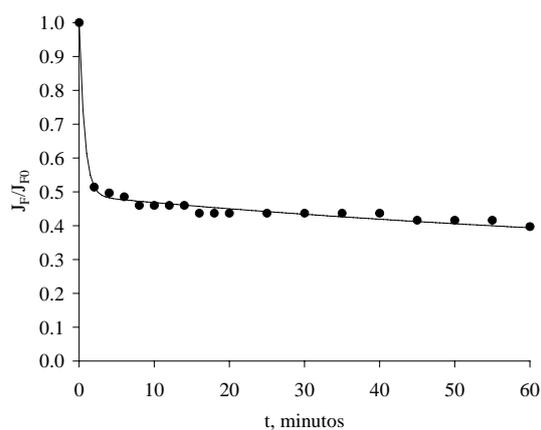


Figura 5.65 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-8-0.

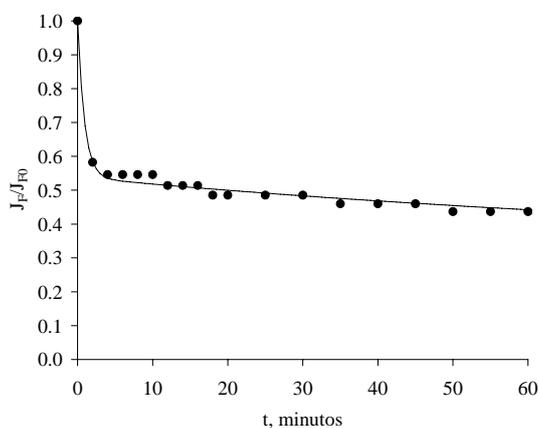


Figura 5.66 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-9-0.

Los parámetros obtenidos tras el ajuste de los resultados experimentales se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 5.12 Parámetros de los modelos combinados en función del pH, β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} | C, min^{-1} |
|-------------|-----|-------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| BLg-3-0 | 3 | 0 | 0.659 | 1.011 | 0.002092 | |
| BLg-4-0 | 4 | 0 | 0.783 | 1.256 | 0.003460 | |
| BLg-5.2-0 | 5.2 | 0 | 0.805 | 1.555 | 0.000347 | |
| BLg-6-0 | 6 | 0 | 0.717 | 1.842 | 0.000100 | |
| BLg-7-0 | 7 | 0 | 0.591 | 1.430 | 0.001360 | |
| BLg-8-0 | 8 | 0 | 0.511 | 1.398 | | 0.009024 |
| BLg-9-0 | 9 | 0 | 0.461 | 1.098 | | 0.008061 |

Al igual que en los dos sistemas anteriores, se puede apreciar que el bloqueo de poros se produce en los primeros instantes del proceso de filtración, así, durante los dos primeros minutos se bloquean entre el 87% para pH 3 y el 97% para pH 6 de los poros pertenecientes a la fracción bloqueable.

El efecto del pH sobre el parámetro α se muestra en la siguiente figura:

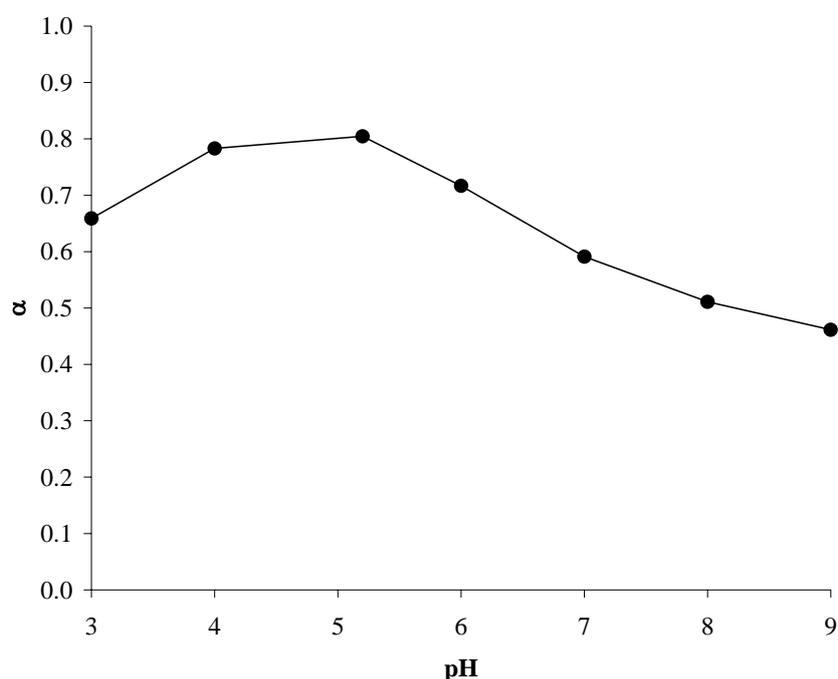


Figura 5.67 Influencia del pH sobre α , β -lactoglobulina-300 kDa.

Al igual que ocurría en casos anteriores, α presenta un máximo en el punto isoeléctrico (80.5%), descendiendo al alejarnos del mismo tanto para valores de pH superiores como inferiores, alcanzando el mínimo en pH 9 (46.1%). El aumento de la fracción de poros bloqueables al desplazarse hacia el punto isoeléctrico puede explicarse por la reducción del radio efectivo que pasa de 32.99 nm (pH 9) a 3.6 (pH 5.2), lo que permite que la proteína bloquee poros de menor tamaño. Adicionalmente la reducción de carga que experimenta la proteína aumenta la formación de agregados, lo que favorece la obstrucción de poros.

El efecto del pH sobre A se muestra a continuación:

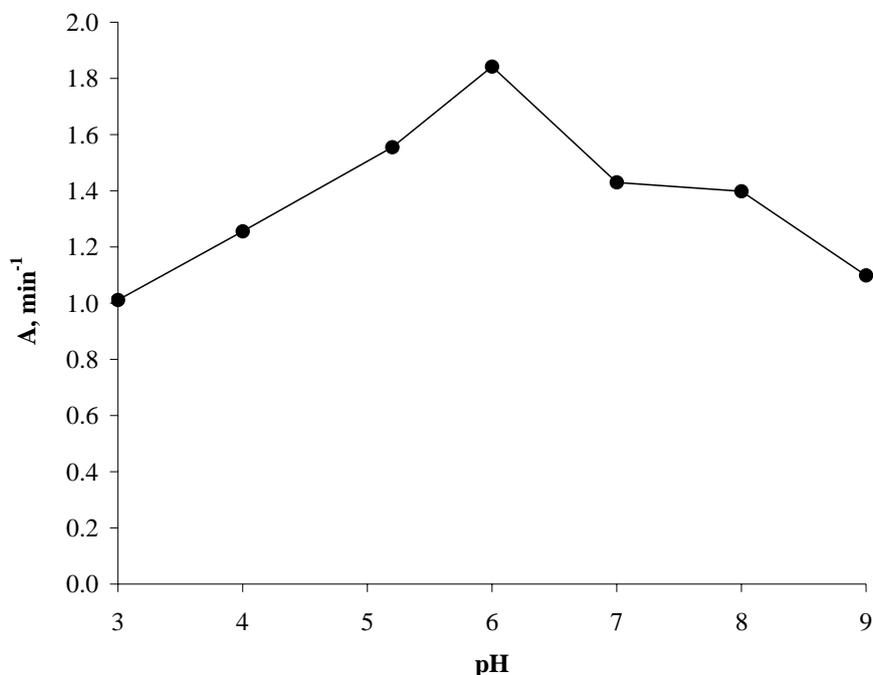


Figura 5.68 Influencia del pH sobre A, β -lactoglobulina-300 kDa.

De manera similar al sistema lisozima-300 kDa, A presenta sus valores máximos en la zona donde tanto la proteína como la membrana tienen cargas opuestas (pH 6) y donde una de las dos presenta carga neta nula. La evolución de este parámetro con el pH sugiere, como se indicó en el sistema anterior, que cuando existen fuerzas de atracción entre proteína y membrana se dan las condiciones óptimas para obtener la mayor velocidad de bloqueo de poros. Como es lógico, el siguiente escenario más favorable es cuando o la membrana o la proteína no tienen carga neta, y finalmente la peor situación se da cuando existen fuerzas de repulsión al tener carga de igual signo.

La variación de los parámetros B y C con el pH se representa seguidamente:

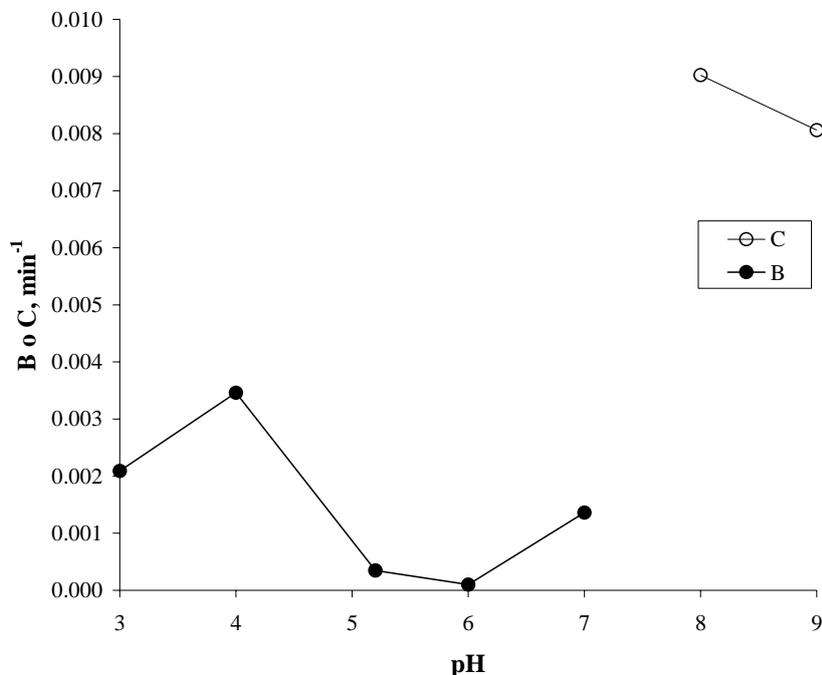


Figura 5.69 Influencia del pH sobre B y C, β -lactoglobulina-300 kDa.

Los resultados muestran algo inicialmente sorprendente, B muestra valores mínimos en los puntos donde la adsorción debería estar más favorecida, es decir, donde o bien la membrana o la proteína presentan carga neta nula o carga de distinto signo. Además, es en el punto donde presentan cargas opuestas donde se encuentra el mínimo del parámetro de bloqueo estándar (pH 6, $B = 0.000100 \text{ min}^{-1}$). Estos resultados parecen indicar que en esas condiciones, al estar la adsorción favorecida, la velocidad de adsorción en los primeros instantes ha sido muy elevada (Ko et al, 1993), quedando enmascarada por el descenso inicial marcado por el bloqueo de poros. Durante el resto del experimento, el proceso de adsorción a continuado pero a velocidad reducida, lo que explica el bajo valor del parámetro B y que presente el mínimo en pH 6

El parámetro de formación de torta, C, muestra un valor un 11 % menor en pH 9 que en pH 8. El descenso de C indica que la torta ofrece menor resistencia, resultado provocado por el

aumento de carga que experimenta la proteína (de -15.30 a -18.6), lo que provoca un aumento de las fuerzas repulsivas y por tanto una torta menos compacta.

Influencia de la fuerza iónica sobre el flujo de filtrado.

Los ajustes realizados con el modelo de bloqueo completo combinado con bloqueo estándar se resumen en las siguientes figuras:

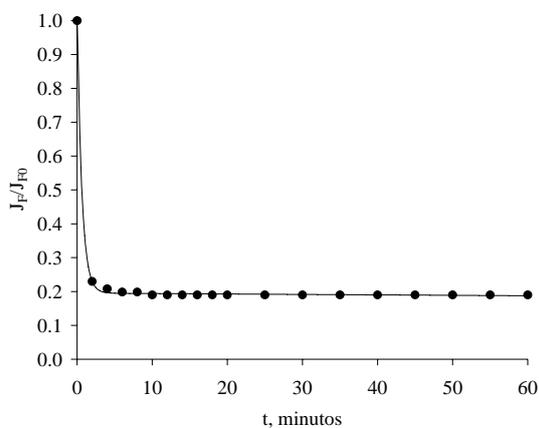


Figura 5.70 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-5.2-0.

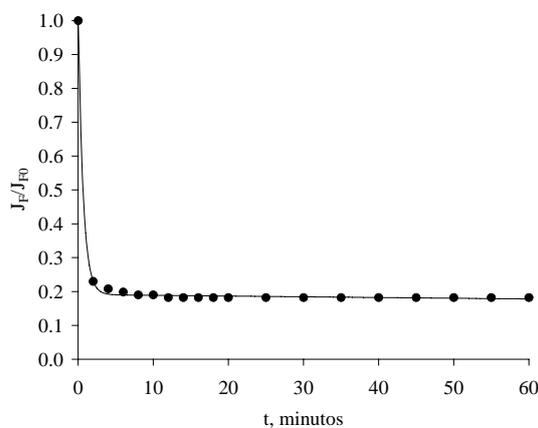


Figura 5.71 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-5.2-5.

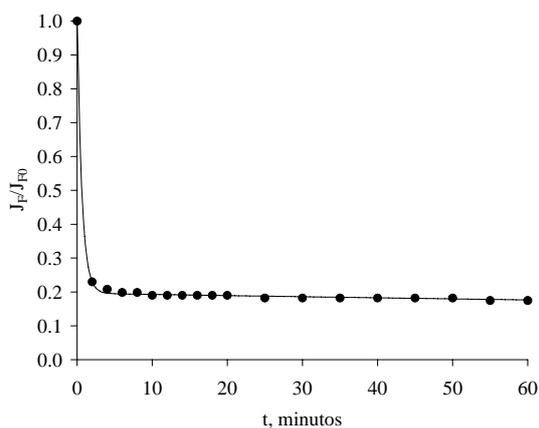


Figura 5.72 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-5.2-7.

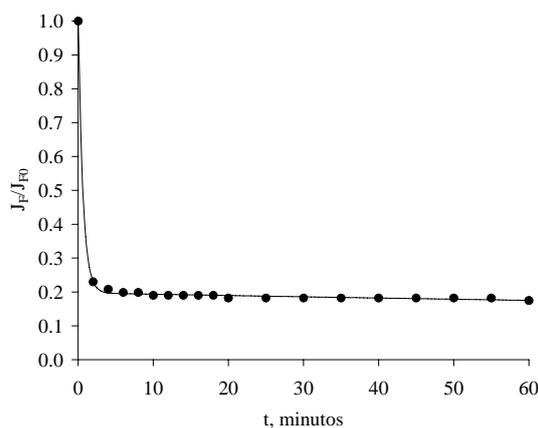


Figura 5.73 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-5.2-10.

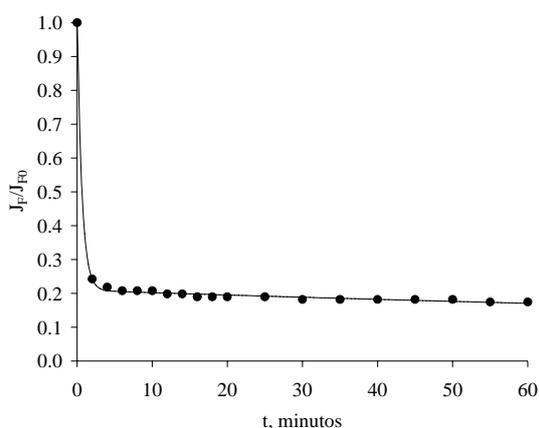


Figura 5.74 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-5.2-15.

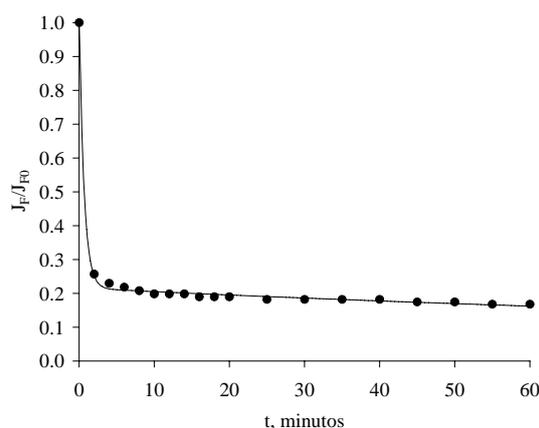


Figura 5.75 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BLg-5.2-20.

Los resultados del ajuste se muestran a continuación:

Tabla 5.13 Parámetros del modelo combinado en función de la fuerza iónica, β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} |
|-------------|-----|-------|----------|----------------------|----------------------|
| BLg-5.2-0 | 5.2 | 0 | 0.805 | 1.555 | 0.000347 |
| BLg-5.2-5 | 5.2 | 5 | 0.809 | 1.491 | 0.000599 |
| BLg-5.2-7 | 5.2 | 7 | 0.804 | 1.561 | 0.000912 |
| BLg-5.2-10 | 5.2 | 10 | 0.803 | 1.576 | 0.001028 |
| BLg-5.2-15 | 5.2 | 15 | 0.790 | 1.551 | 0.001803 |
| BLg-5.2-20 | 5.2 | 20 | 0.784 | 1.506 | 0.002545 |

En este sistema, la adición de fuerza iónica parece no tener un gran efecto sobre el parámetro α ya que los valores oscilan entorno a un valor medio de 0.799 con una desviación estándar de 0.010. El parámetro A tampoco parece verse afectado por la adición de sal, oscilando en torno a un valor medio de 1.540 min^{-1} con una desviación estándar de 0.034 min^{-1} , indicando que durante los dos primeros minutos se han bloqueado el 95% de los poros susceptibles de ello.

En este caso, el principal responsable de los cambios de flujo experimentados por la adición de sal es el parámetro característico del bloqueo estándar. Seguidamente se recoge la evolución del mismo con la fuerza iónica.

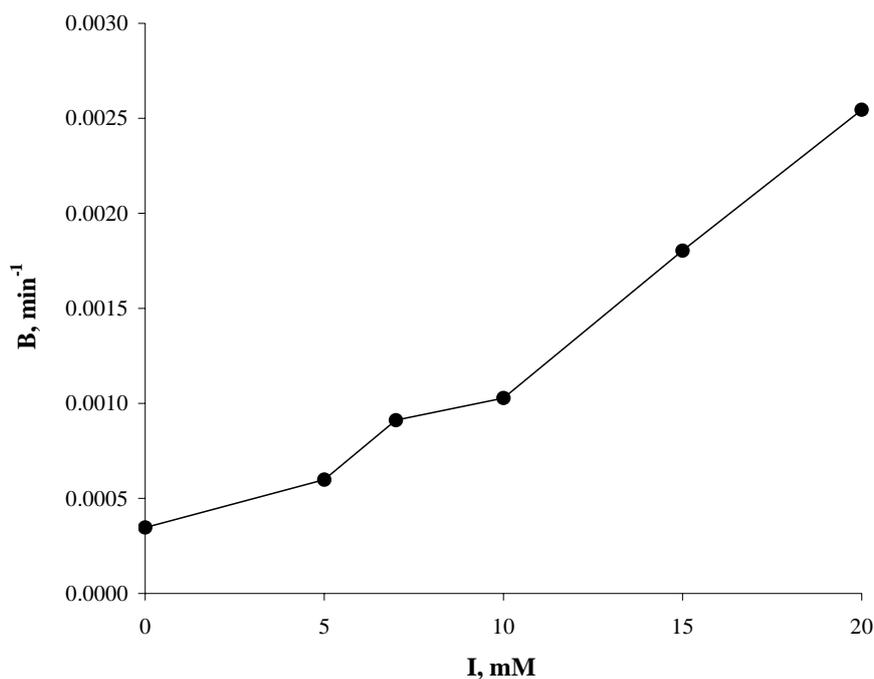


Figura 5.76 Influencia de la fuerza iónica sobre B, β -lactoglobulina-300 kDa.

El aumento de la fuerza iónica da lugar a un aumento de B, llegando a ser para la mayor fuerza iónica aproximadamente 7 veces mayor que cuando no hay adición de sal. Este aumento indica una adsorción más continuada en el tiempo y mayor. Este cambio en la adsorción puede ser consecuencia de que la adición de sal, cuando la β -lactoglobulina presenta carga neta nula, desplaza el equilibrio hacia la formación de monómeros (Verheul et al., 1999). Al existir mayor proporción de monómeros tenemos más cantidad de moléculas disponibles para interactuar en los puntos activos de los poros y por tanto la adsorción es mayor.

Transporte de proteína a través de la membrana.

Influencia del pH sobre el transporte de proteína.

Para este sistema se obtiene los siguientes resultados:

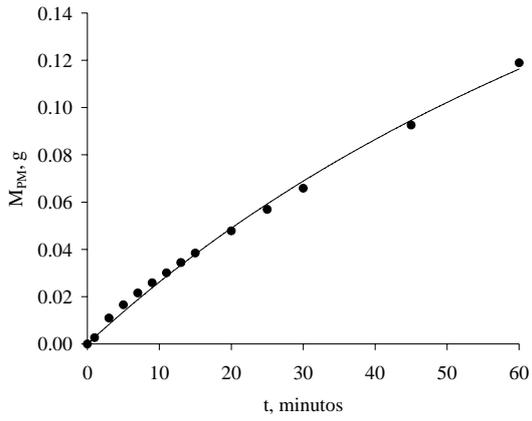


Figura 5.77 M_{PM} vs t. Exp BLg-3-0.

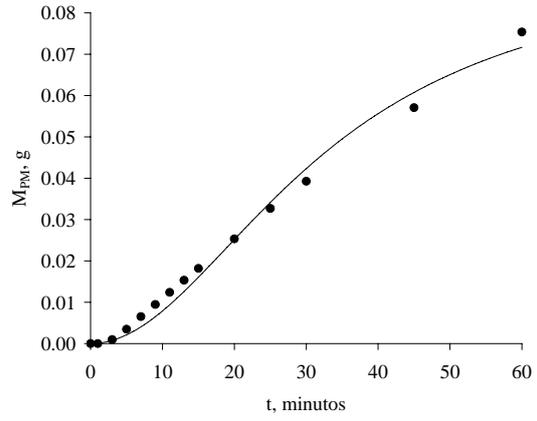


Figura 5.78 M_{PM} vs t. Exp BLg-4-0.

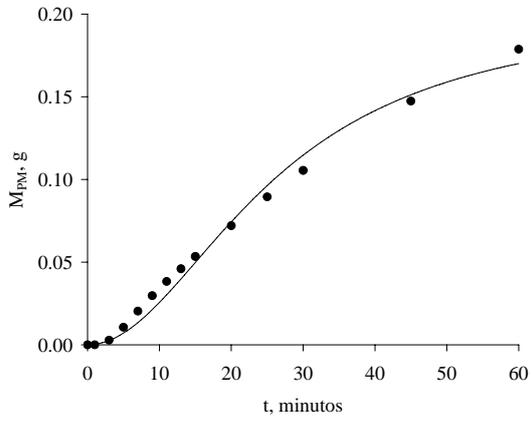


Figura 5.79 M_{PM} vs t. Exp BLg-5.2-0.

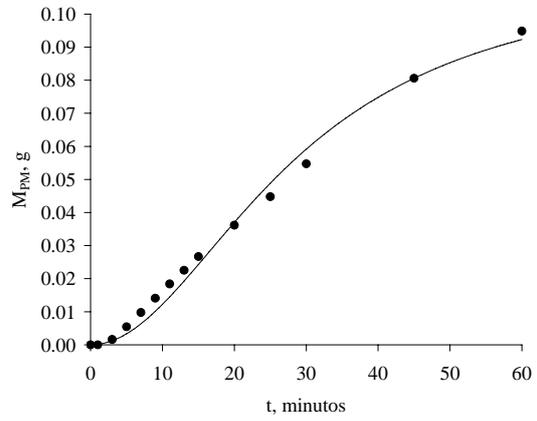


Figura 5.80 M_{PM} vs t. Exp BLg-6-0.

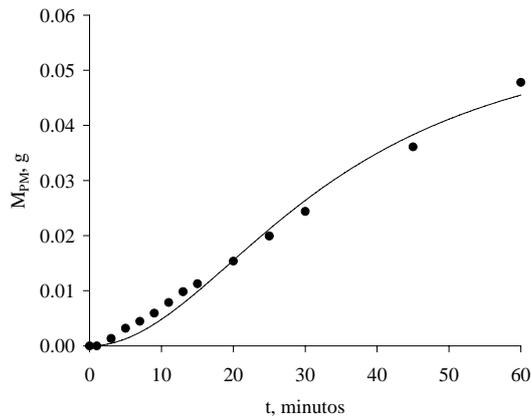


Figura 5.81 M_{PM} vs t. Exp BLg-7-0.

Los valores de los parámetros de ajuste, la velocidad de transmisión máxima, el tiempo de esa velocidad máxima y el valor de M_{PM} al finalizar el experimento se muestran a continuación.

Tabla 5.14 Parámetros para el ajuste hiperbólico de M_{PM} , β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_1 , g | f_1 , min | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, $g \cdot min^{-1}$ | M_{PM} , g |
|-------------|----|-------|-----------|-------------|-----------------|---|--------------|
| BLg-3-0 | 3 | 0 | 0.3727 | 132.32 | 0.00 | 0.00282 | 0.1189 |

Tabla 5.15 Parámetros para el ajuste sigmoideal de M_{PM} , β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, $g \cdot min^{-1}$ | M_{PM} , g |
|-------------|-----|-------|-----------|--------------------------|-----------------|---|--------------|
| BLg-4-0 | 4 | 0 | 0.0932 | 1082.03 | 18.99 | 0.00184 | 0.0754 |
| BLg-5.2-0 | 5.2 | 0 | 0.2027 | 691.15 | 15.18 | 0.00501 | 0.1788 |
| BLg-6-0 | 6 | 0 | 0.1135 | 826.94 | 16.60 | 0.00256 | 0.0949 |
| BLg-7-0 | 7 | 0 | 0.0600 | 1147.19 | 19.55 | 0.00115 | 0.0478 |

Se puede observar que, de los experimentos que responden al ajuste sigmoideal, el menor t_{max} se corresponden con el punto isoeléctrico y el punto de pH donde se tienen cargas opuestas, dándose en el punto isoeléctrico la mayor M_{PM} (0.1788 g). Estos resultados apoyan la idea de que la adsorción en esas condiciones se produce a gran velocidad en los primeros instantes de la filtración debido a la ausencia de carga neta en la proteína o a la presencia de fuerzas atractivas entre proteína y membrana. A pH 3 el máximo se obtiene a tiempo cero, lo que indica una adsorción reducida como consecuencia de las fuerzas repulsivas que se establecen entre proteína y membrana al presentar ambas carga positiva.

Influencia de la fuerza iónica sobre el transporte de proteína.

Las figuras que se representan a continuación (5.82 a 5.87) muestran los resultados obtenidos para los ajustes en los casos en los que se ha adicionado sal.

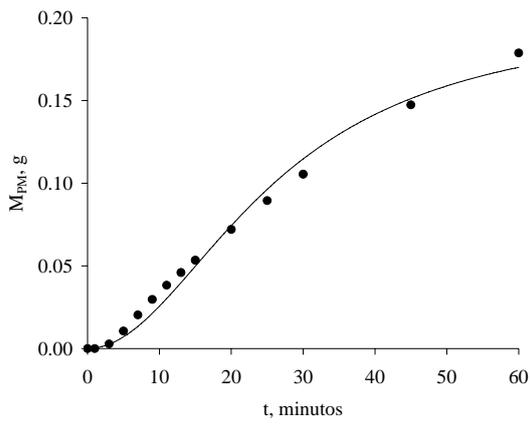


Figura 5.82 M_{PM} vs t. Exp BLg-5.2-0.

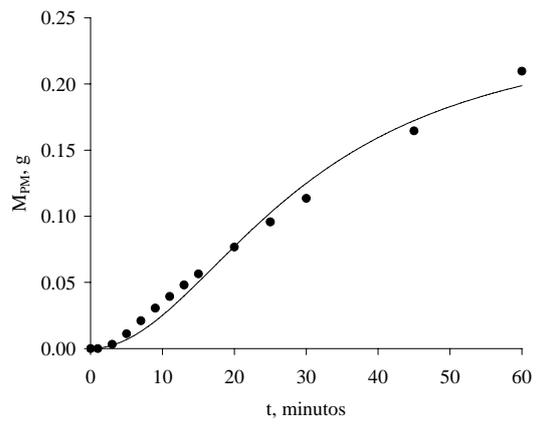


Figura 5.83 M_{PM} vs t. Exp BLg-5.2-5.

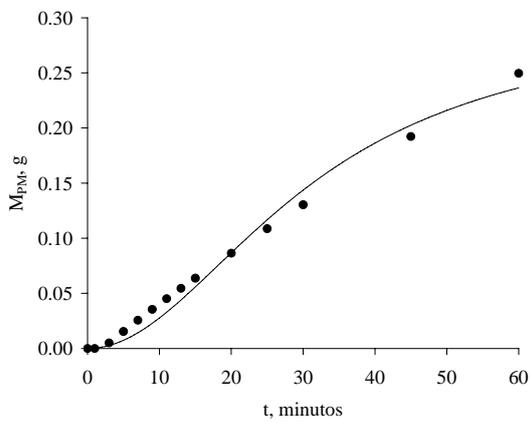


Figura 5.84 M_{PM} vs t. Exp BLg-5.2-7.

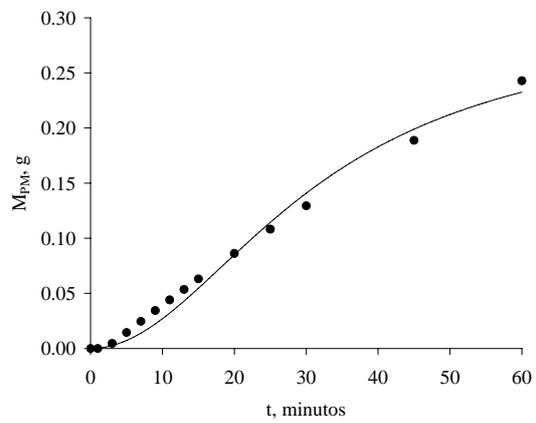


Figura 5.85 M_{PM} vs t. Exp BLg-5.2-10.

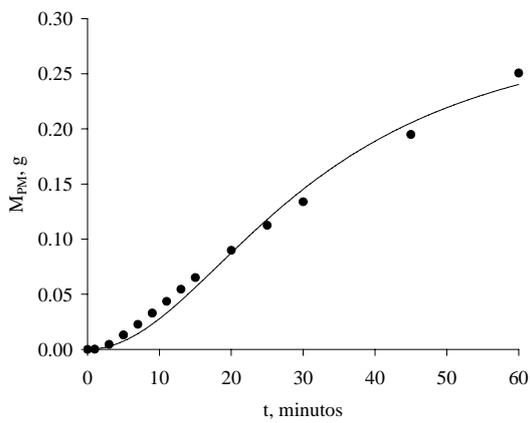


Figura 5.86 M_{PM} vs t. Exp BLg-5.2-15.

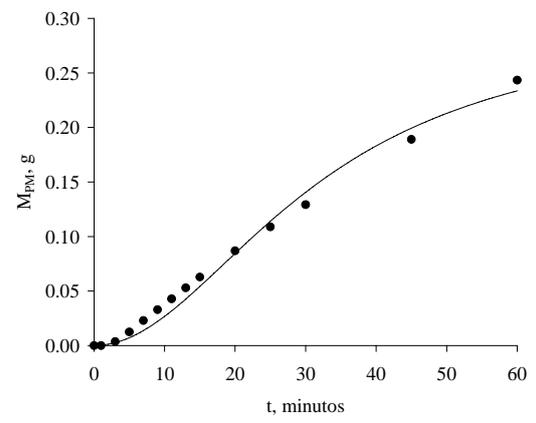


Figura 5.87 M_{PM} vs t. Exp BLg-5.2-20.

Tabla 5.16 Parámetros para el ajuste sigmoideal de M_{PM} , β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min^2 | t_{\max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$, $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ | M_{PM} , g |
|-------------|-----|-------|-----------|------------------------|------------------|--|--------------|
| BLg-5.2-0 | 5.2 | 0 | 0.2027 | 691.15 | 15.18 | 0.00501 | 0.1788 |
| BLg-5.2-5 | 5.2 | 5 | 0.2475 | 883.50 | 17.16 | 0.00541 | 0.2097 |
| BLg-5.2-7 | 5.2 | 7 | 0.3013 | 988.19 | 18.15 | 0.00623 | 0.2496 |
| BLg-5.2-10 | 5.2 | 10 | 0.2969 | 997.41 | 18.23 | 0.00611 | 0.2429 |
| BLg-5.2-15 | 5.2 | 15 | 0.3075 | 1005.56 | 18.31 | 0.00630 | 0.2508 |
| BLg-5.2-20 | 5.2 | 20 | 0.2997 | 1019.74 | 18.44 | 0.00610 | 0.2434 |

Se aprecia que la adición de sal desplaza t_{\max} a tiempos mayores (Tabla 5.16), desde 15.18 min sin adición de sal a 18.44 min cuando se adiciona 20 mM. Este retraso indica que la adsorción es mayor y más continuada en el tiempo, resultado que corrobora el aumento de adsorción indicado por el modelo de flujo y que se atribuyó a un mayor número de monómeros de proteína. La formación de monómeros contribuye a que se obtengan transmisiones más elevadas y estables en el tiempo, pasando del valor máximo del 83 % y final del 29% sin adición de sal, a 93% y 66% respectivamente con 20 mM. A consecuencia de lo anterior, se produce un aumento del 36% en la cantidad total de proteína transportada si comparamos las condiciones anteriormente citadas.

5.2.4. Sistema BSA-membrana de 300 kDa

En este sistema únicamente se realizó un experimento para el valor de pH del punto isoeléctrico (4.9) sin adición de fuerza iónica. En esas condiciones el radio efectivo de la BSA es de 3.5 nm (Persson et al., 2003) y presenta carga neta nula. A pesar de que su radio efectivo es menor que el radio de poro medio de la membrana (17.5 nm) no se obtuvo transmisión alguna. Esto hace sospechar que la formación de agregados, debido a la ausencia de carga neta de la proteína, es muy importante en esas condiciones.

Al no existir transmisión, el ajuste de la evolución del flujo de filtrado con el tiempo se realizó con el modelo combinado que contempla la formación de torta. Los resultados se muestran en la Figura 5.88:

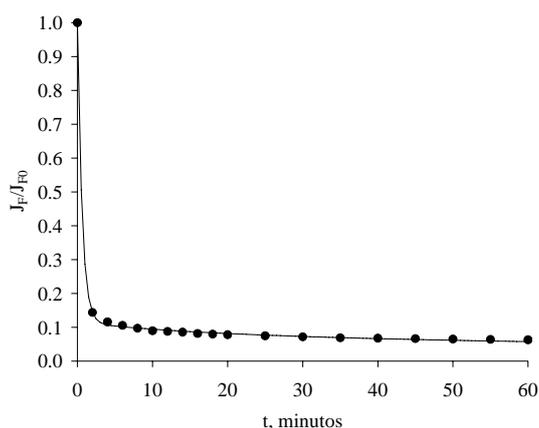


Figura 5.88 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-4.9-0.

El valor de los parámetros obtenidos se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 5.17 Parámetros de los modelos combinados en función del pH, lisozima-50 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | C, min^{-1} |
|-------------|-----|-------|----------|----------------------|----------------------|
| BSA-4.9-0 | 4.9 | 0 | 0.884 | 1.629 | 0.017486 |

Los resultados muestran que la fracción de poros bloqueables es muy alta, apoyando la idea de la formación de un gran número de agregados capaces de taponar la mayoría de los poros. El bloqueo de poros se produce rápidamente, así tras dos minutos de filtración se han bloqueado el 96% de la fracción que sufre bloque completo.

5.2.5. Sistemas Binarios y ternario

Por las razones expuestas en el apartado de resultados únicamente se ha estudiado el sistema binario BSA- β -lactoglobulina en la membrana de tamaño de corte de 300 kDa.

Cálculo del radio efectivo de las proteínas.

Los datos utilizados en este caso para el cálculo del radio efectivo son:

- Radio de Stokes del dímero de β -lactoglobulina: 3.6 nm.
- Radio de Stokes del monómero de BSA: 3.5 nm.
- Radio de poro medio: 17.5 nm.
- Carga de la β -lactoglobulina en función del pH:

| | | | | |
|--------------|-------|------|-------|--------|
| pH: | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Carga | 11.50 | 2.50 | -6.50 | -11.30 |

➤ Carga de la BSA en función del pH (Moon et al., 2000):

| | | | | |
|--------------|-------|-------|--------|--------|
| pH: | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Carga | 20.00 | -1.82 | -13.50 | -18.80 |

Teniendo en cuenta la fuerza iónica aportada por el ajuste del pH y las proteínas se obtienen los siguientes resultados:

| | | | | |
|---|-------|------|-------|-------|
| pH: | 4 | 5 | 6 | 7 |
| r_{eff} de β-lactoglobulina, nm | 18.00 | 8.19 | 11.37 | 19.75 |
| r_{eff} de BSA, nm | 48.17 | 5.64 | 37.76 | 49.35 |

Estos resultados indican que debería haber transmisión de ambas proteínas en pH 5 y de β -lactoglobulina en pH 6, y en efecto es lo que sucede. Llama la atención la retención total de BSA por la membrana de 300 kDa en la disolución unitaria y en su punto isoeléctrico y la transmisión observada de BSA en la disolución binaria con β -lactoglobulina. Este hecho podría explicarse asumiendo que la presencia de β -lactoglobulina puede dificultar la formación de agregados de BSA o incluso favorecer la formación de agregados constituidos por moléculas de ambas proteínas que faciliten el paso de BSA. A pH 4 no debería existir transmisión de ninguna de las proteínas, sin embargo, se obtiene una transmisión baja de ambas. Estos resultados, a priori sorprendentes, sugieren que las interacciones proteína-proteína conducen a un radio efectivo inferior al calculado teóricamente o bien a la posible formación de algún tipo de agregado mixto con menor radio efectivo.

Evolución temporal del flujo de filtrado.

Influencia del pH sobre el flujo de filtrado.

Se han dado dos situaciones distintas, para los pH 4, 5 y 6 se ha obtenido transmisión y para pH 7 no. Tras aplicar los modelos propuestos, ha resultado:

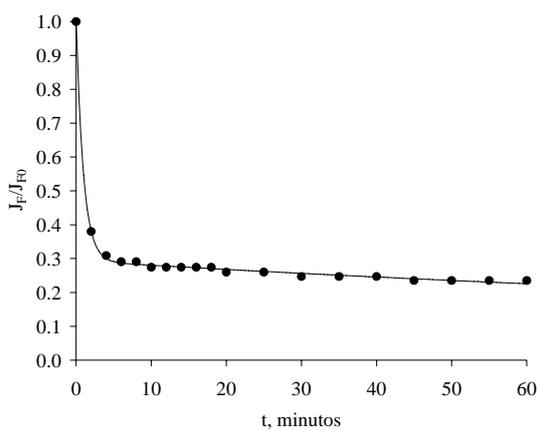


Figura 5.89 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-4-0.

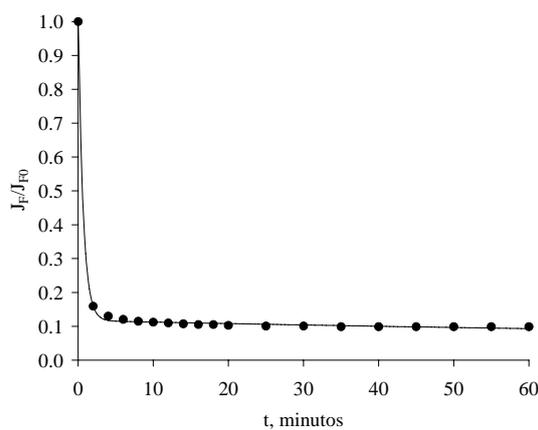


Figura 5.90 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-5-0.

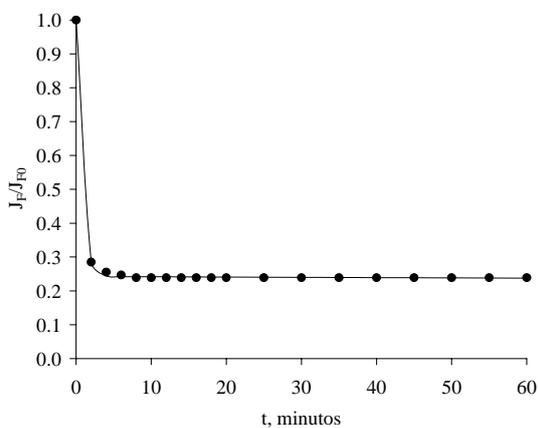


Figura 5.91 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-6-0.

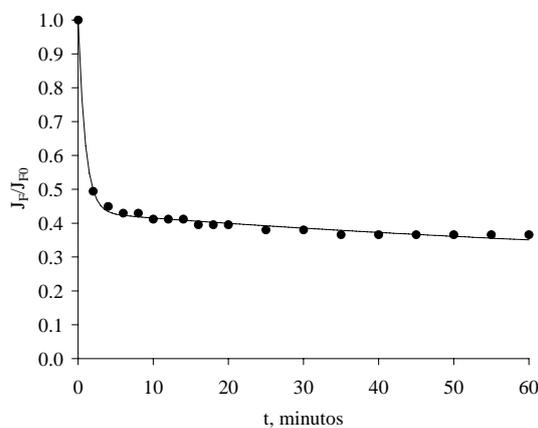


Figura 5.92 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-7-0.

Los valores de los parámetros de ajuste se muestran seguidamente:

Tabla 5.18 Parámetros de los modelos combinados en función del pH, BSA- β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min ⁻¹ | B, min ⁻¹ | C, min ⁻¹ |
|-------------|----|-------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| BSA-BLg-4-0 | 4 | 0 | 0.706 | 1.021 | 0.002332 | |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 0.883 | 1.492 | 0.002023 | |
| BSA-BLg-6-0 | 6 | 0 | 0.757 | 1.423 | 0.000178 | |
| BSA-BLg-7-0 | 7 | 0 | 0.567 | 1.053 | | 0.008758 |

Siguiendo la pauta de los sistemas unitarios, el bloqueo de poros se produce en los instantes iniciales; entre el 87% y el 95% de los poros susceptibles de bloqueo se taponan en los dos primeros minutos.

El efecto del pH sobre la fracción bloqueable se muestra en la Figura 5.93.

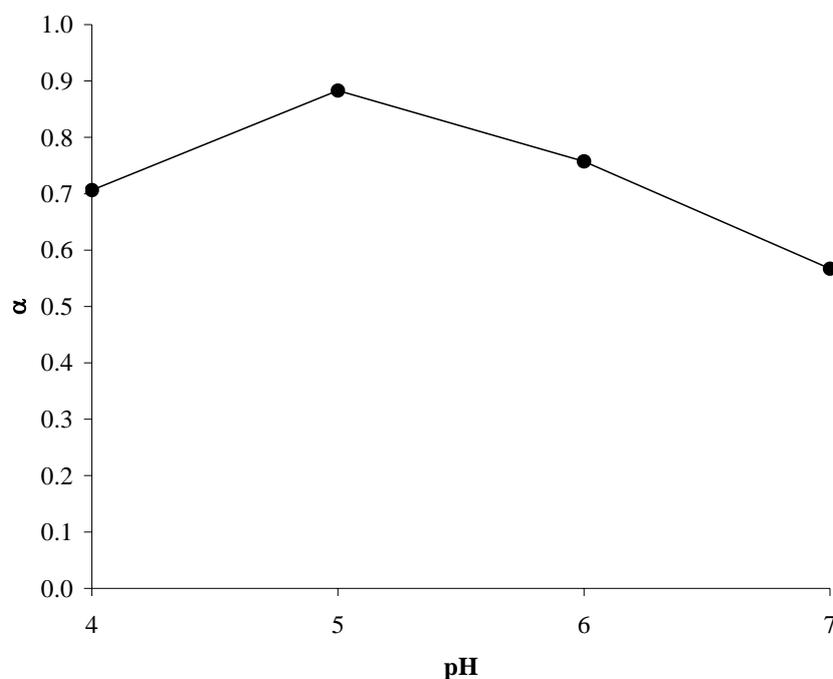


Figura 5.93 Influencia del pH sobre α , BSA- β -lactoglobulina-300 kDa.

De manera semejante a lo ocurrido en los sistemas unitarios, α muestra su valor máximo en las proximidades del punto isoeléctrico (88.3% para pH 5). Este valor es mayor que en el caso de la disolución unitaria de β -lactoglobulina en su punto isoeléctrico (80.5%) y muy similar al obtenido con la disolución de BSA (88.4%). Este máximo puede deberse a la reducción de radio efectivo para ambas proteínas que les permite bloquear poros de menor tamaño. Además, en ese pH presentan la mínima carga y de signo opuesto, lo que, dada la

ausencia de fuerza iónica, facilitará la formación de agregados y por tanto aumentará la obstrucción de poros.

El efecto del pH sobre A se recoge en la Figura 5.94:

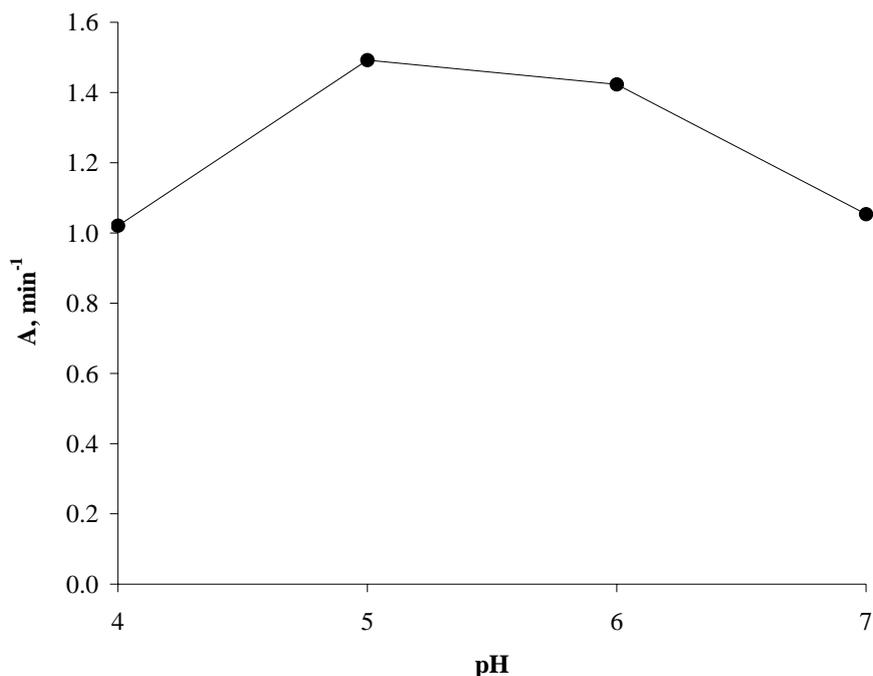


Figura 5.94 Influencia del pH sobre A, BSA-β-lactoglobulina -300 kDa.

A presenta sus valores máximos en las proximidades de los puntos isoeléctricos de ambas proteínas y cuando estas tienen carga de diferente signo que la membrana. Resultados lógicos, pues en esas condiciones se facilita la adsorción sobre la superficie de la membrana y por tanto el bloqueo de poros. Cuando la membrana presenta carga neta nula (pH 7) se obtiene un valor intermedio entre los anteriores y el de pH 4. Esto se debe a que la ausencia de carga neta en la membrana facilita la adsorción pero en menor medida que a pH 5 y 6, sin embargo, es un escenario mucho más favorable que cuando tanto proteínas como membrana tienen carga de igual signo como ocurre en pH 4. El valor de A obtenido para la mezcla binaria es hasta un 23% (para pH 6) menor que el obtenido para la β-lactoglobulina

lo que indica que las interacciones proteína-proteína están ralentizando el proceso de bloqueo completo de poros con respecto al caso de la proteína unitaria.

La variación de los parámetros B y C con el pH se muestra en la siguiente figura:

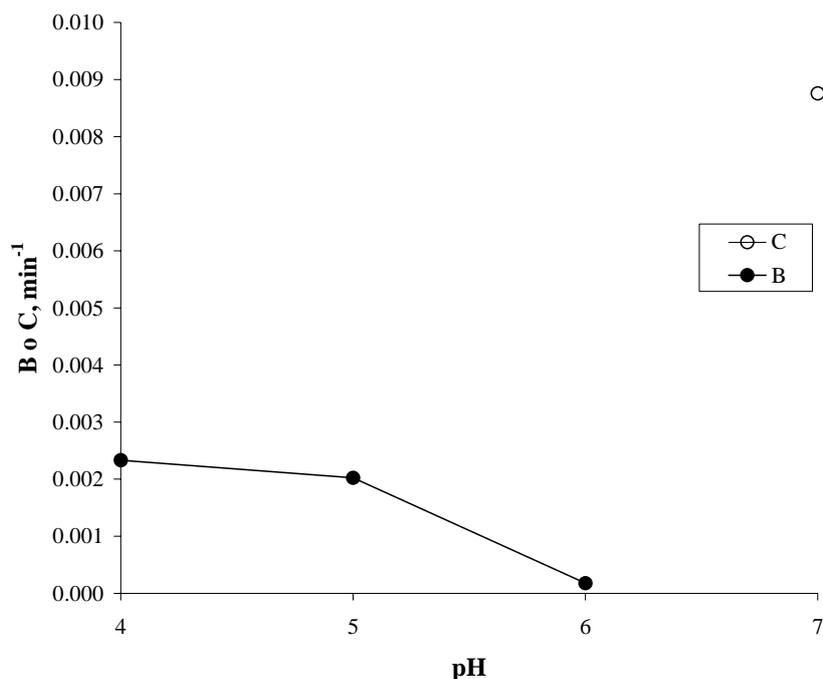


Figura 5.95 Influencia del pH sobre B y C, β -lactoglobulina-BSA-300 kDa.

A semejanza de lo ocurrido con el sistema β -lactoglobulina-300 kDa, B es mínima en las condiciones donde la adsorción debería ser máxima, es decir, donde o las proteínas presentan cargas netas prácticamente nulas o cargas contrarias a la membrana. Como ocurría en aquel sistema, es en el punto donde presentan cargas opuestas donde se halla el mínimo (pH 6, $B = 0.000178 \text{ min}^{-1}$). Estos resultados se explican de forma análoga al sistema unitario. Al estar la adsorción favorecida, la velocidad de adsorción en los primeros instantes ha sido muy alta quedando enmascarada por el descenso inicial marcado por el bloqueo de poros. Durante el resto del experimento, el proceso de adsorción ha continuado a velocidad reducida, lo que explica el bajo valor del parámetro B y que presente el mínimo en pH 6.

Influencia de la fuerza iónica sobre el flujo de filtrado.

Los ajustes realizados, así como el valor de los parámetros obtenidos se muestran a continuación:

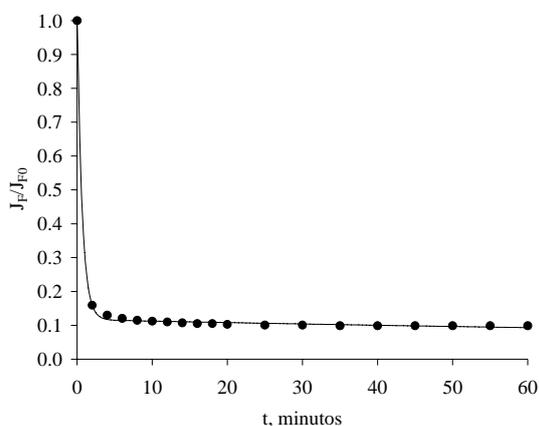


Figura 5.96 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-5-0.

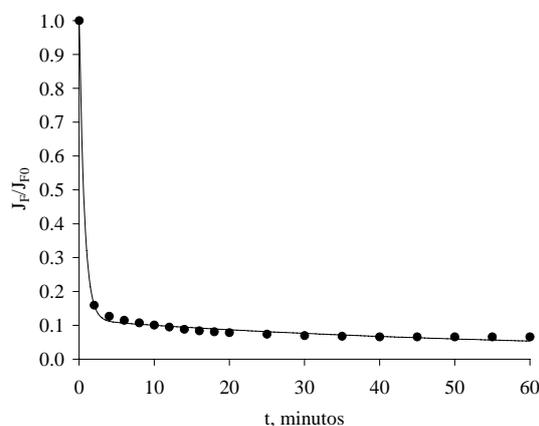


Figura 5.97 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-5-5.

Tabla 5.19 Parámetros del modelo en función de la fuerza iónica, BSA- β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | I, mM | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} |
|-------------|----|-------|----------|----------------------|----------------------|
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 0.883 | 1.492 | 0.002023 |
| BSA-BLg-5-5 | 5 | 5 | 0.883 | 1.456 | 0.007928 |

De manera similar a lo que ocurría con la β -lactoglobulina, el aumento de la fuerza iónica parece no afectar a los parámetros α y A, sin embargo, si afecta al parámetro B que ve su valor multiplicado prácticamente por 4. El aumento indica una mayor adsorción, posiblemente debida a que la presencia de iones salinos dificulta la formación de agregados entre las dos proteínas (que presentaban carga opuesta) y a que desplaza el equilibrio monómero-dímero de la β -lactoglobulina hacia la formación de monómeros (Verheul et al., 1999). Al existir un menor número de agregados, existe una mayor cantidad de moléculas disponibles para interactuar en los puntos activos de los poros y por tanto la adsorción es mayor.

Influencia de la presión transmembrana sobre el flujo de filtrado.

En este caso se obtienen los siguientes resultados:

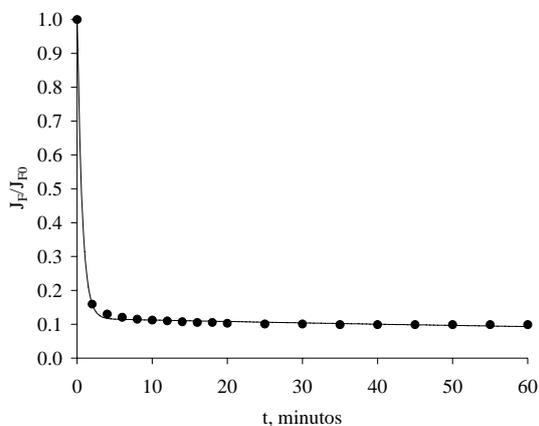


Figura 5.98 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-5-0.

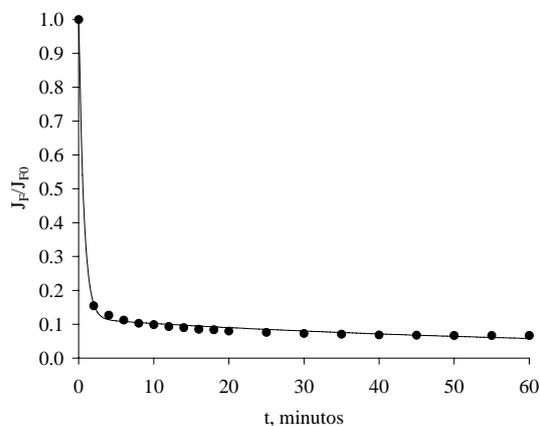


Figura 5.99 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-5-0.5.

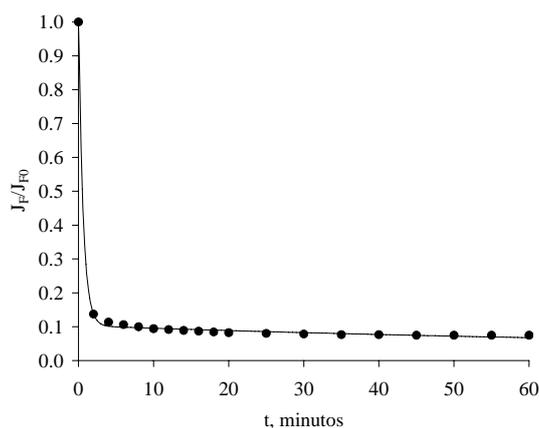


Figura 5.100 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-5-1.5.

Tabla 5.20 Parámetros del modelo en función de PTM, BSA- β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | PTM, bar | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} |
|---------------|----|----------|----------|----------------------|----------------------|
| BSA-BLg-5-0.5 | 5 | 0.5 | 0.883 | 1.468 | 0.00700 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 1 | 0.883 | 1.492 | 0.00202 |
| BSA-BLg-5-1.5 | 5 | 1.5 | 0.897 | 1.598 | 0.00394 |

La variación de la presión transmembrana (PTM) no muestra una influencia significativa en la fracción de poros bloqueables y el parámetro de bloqueo completo, lo que indica que estos parámetros dependen del ambiente fisicoquímico en el que se realice la operación. Sin embargo, sí afecta al parámetro de bloqueo estándar, el cual presenta su valor mínimo cuando se usa una PTM de 1 bar. El aumento de B al disminuir la presión transmembrana

podría deberse a que, al ser la velocidad de filtrado menor, se favorece la adsorción al aumentarse el tiempo de interacción entre la proteína y la superficie de los poros (Bowen et al., 1995). Al aumentar la presión por encima de 1 bar, vuelve a aumentar la adsorción. Este aumento se podría deber al aumento del esfuerzo de cizalladura que potencia la deposición de las proteínas y las interacciones entre ellas fomentando la formación de agregados (Marshall et al. 1997). Además, el aumento de velocidad en el interior del poro contribuye a fomentar los choques debido a la tortuosidad que presenta. Este aumento de choques puede fomentar la adsorción. Se obtendría así, a 1 bar, una situación en que tanto el esfuerzo de cizalladura como la velocidad son adecuados para minimizar la adsorción por los efectos anteriormente comentados.

Influencia del caudal de retenido sobre el flujo de filtrado.

Los resultados se muestran seguidamente:

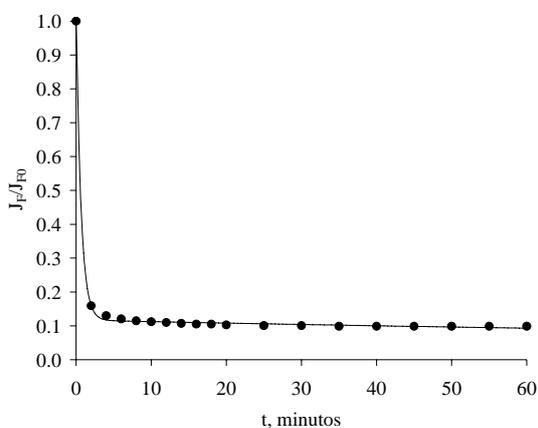


Figura 5.101 J_F/J_{FO} vs t. Exp. BSA-BLg-5-0.

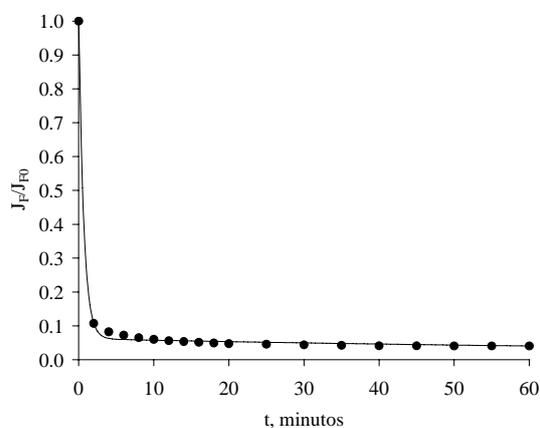


Figura 5.102 J_F/J_{FO} vs t. Exp. BSA-BLg-5-300.

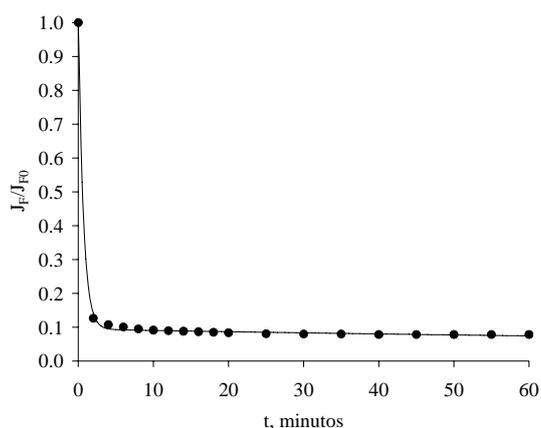


Figura 5.103 J_F/J_{F0} vs t. Exp. BSA-BLg-5-500.

Tabla 5.21 Parámetros del modelo en función del caudal de retenido, BSA- β -lactoglobulina-300 kDa.

| Experimento | pH | Q_R , L/h | α | A, min^{-1} | B, min^{-1} |
|---------------|----|-------------|----------|----------------------|----------------------|
| BSA-BLg-5-300 | 5 | 300 | 0.938 | 1.486 | 0.004041 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 400 | 0.883 | 1.492 | 0.002023 |
| BSA-BLg-5-500 | 5 | 500 | 0.906 | 1.468 | 0.002098 |

La variación del caudal de retenido no afecta al parámetro de bloqueo completo. Sobre el parámetro α tampoco muestra un efecto claro, si bien en el caso de 300 L/h es algo mayor posiblemente por la reducción de la velocidad en la superficie de la membrana lo que facilita el bloqueo de poros al disminuirse el efecto de barrido. El parámetro B si muestra una alteración en el caso de 300 L/h, pasando a valer prácticamente el doble que en los otros dos casos. Esto indica que una reducción de la velocidad tangencial y por tanto de la turbulencia a la entrada de los poros de la membrana fomenta la reducción del área transversal de los mismos, posiblemente por el aumento de la concentración en la entrada, lo que podría dar lugar a una mayor adsorción en el tramo del poro cercano a la boca.

Transporte de proteína a través de la membrana.

Influencia del pH sobre el transporte de proteína.

En las Figuras 5.104 a 5.106 se recogen los resultados de los ajustes.

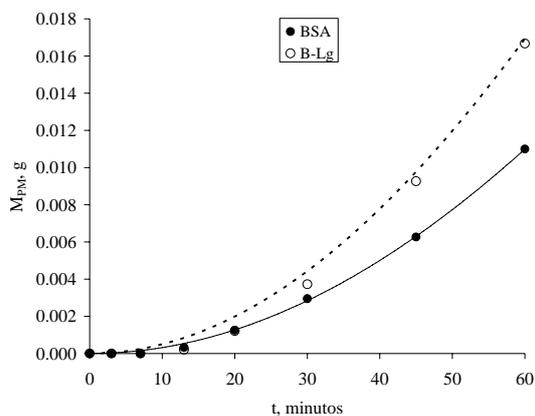


Figura 5.104 M_{PM} vs t. Exp BSA-BLg-4-0.

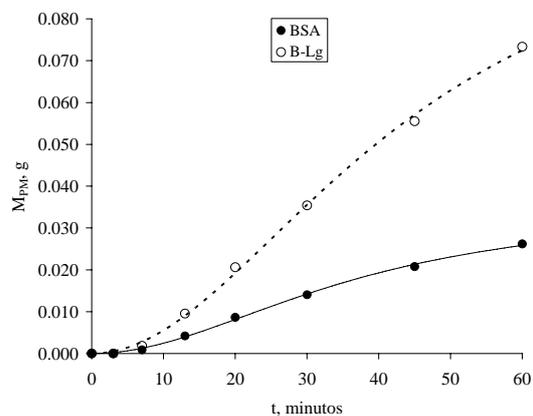


Figura 5.105 M_{PM} vs t. Exp BSA-BLg-5-0.

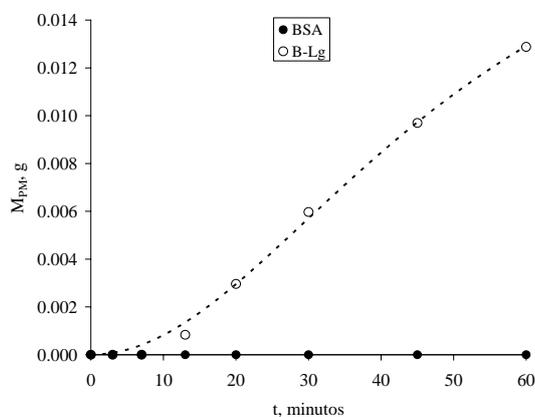


Figura 5.106 M_{PM} vs t. Exp BSA-BLg-6-0.

Los valores de los parámetros de ajuste, la velocidad de transmisión máxima, el tiempo de esa velocidad máxima y el valor de M_{PM} al finalizar el experimento para la β-lactoglobulina y la BSA se muestran en la Tabla 5.22 y la Tabla 5.23 respectivamente.

Tabla 5.22 Parámetros para el ajuste sigmoideal de M_{PM} para la β -lactoglobulina.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|-------------|----|-------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| BSA-BLg-4-0 | 4 | 0 | 0.2876 | 57545.88 | 138.50 | 0.00078 | 0.0167 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| BSA-BLg-6-0 | 6 | 0 | 0.0223 | 2620.43 | 29.55 | 0.00028 | 0.0129 |

t_{max} es muy parecido tanto para pH 5, cerca del punto isoeléctrico como en pH 6, donde proteína y membrana presentan cargas opuestas. Si bien es algo mayor para pH 6 debido a que las fuerzas atractivas que se dan en esas condiciones potencian la adsorción. El tiempo tan alto registrado a pH 4 responde al gran impedimento estérico que debe encontrar la β -lactoglobulina como consecuencia del alto radio efectivo que presenta (18 nm). Tanto la velocidad máxima como la cantidad total de proteína transmitida muestran que a pH 5 se encuentran las mejores condiciones para el paso de proteína.

Tabla 5.23 Parámetros para el ajuste sigmoideal de M_{PM} para la BSA.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|-------------|----|-------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| BSA-BLg-4-0 | 4 | 0 | 0.2582 | 80940.71 | 164.26 | 0.00059 | 0.0110 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |

En este caso, se vuelve a reproducir el hecho de un t_{max} muy alto para pH 4, lo que apoya la idea de un fuerte impedimento estérico. Llama la atención el hecho de que a pesar de tener un radio efectivo de 48.17 nm se obtenga BSA en la corriente de filtrado, lo que sugiere que, como ya se indicó, la falta de sales permite la formación de agregados entre moléculas de las dos proteínas que deben presentar un radio efectivo mucho menor.

Para analizar con mayor profundidad el proceso de fraccionamiento de la mezcla binaria, comparándolo con el sistema de β -lactoglobulina y la membrana de 300 kDa, se definen dos magnitudes: el rendimiento final (ecuación 5.27) y la selectividad final (ecuación 5.28).

$$\eta = \frac{M_{PM-BLg}}{M_{0-BLg}} \cdot 100 \quad [5.27]$$

donde η es el rendimiento final, definido como el cociente entre la cantidad de β -lactoglobulina transportada al final del experimento (M_{PM-BLg}) y la cantidad inicial de β -lactoglobulina en la disolución (M_{0-BLg}).

$$Sel = \frac{M_{PM-BLg}}{M_{PM-BSA}} \quad [5.28]$$

donde M_{PM-BLg} y M_{PM-BSA} son las cantidades finales de proteína transportada para la de β -lactoglobulina y la BSA respectivamente.

La Figura 5.107 muestra la evolución del rendimiento final en función del pH para la disolución unitaria y la mezcla binaria:

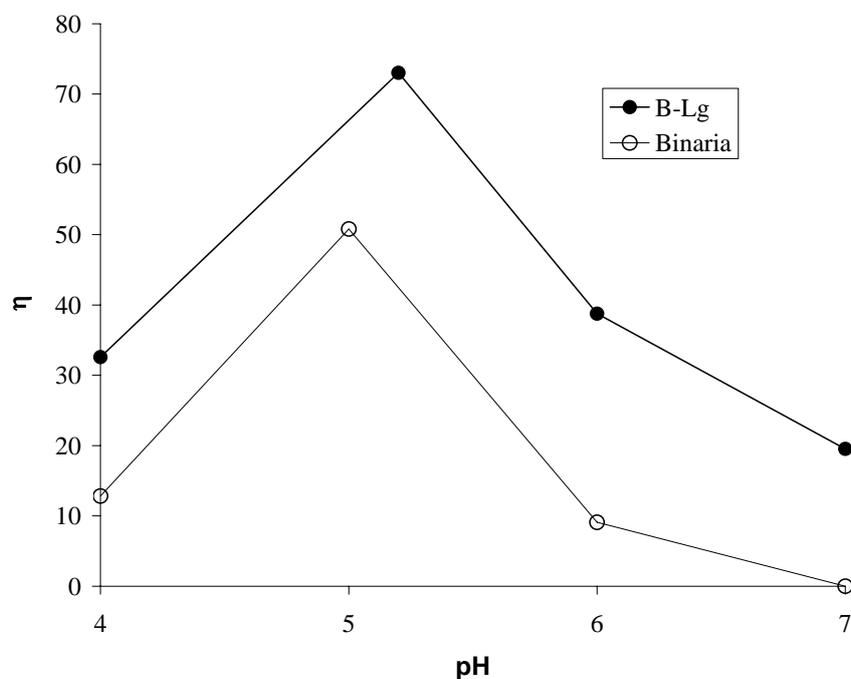


Figura 5.107 Influencia del pH sobre η para el sistema unitario y binario.

La evolución de η es similar para ambos casos, obteniéndose el valor máximo en los valores cercanos al punto isoeléctrico donde la β -lactoglobulina está débilmente cargada. La presencia de BSA produce una reducción del rendimiento en un 23 % de media, lo que indica que las interacciones proteína-proteína que se producen en el sistema binario están dificultando el paso de β -lactoglobulina.

En cuanto a la selectividad del fraccionamiento, para pH 6 y 7 no se produce transmisión de BSA lo que lógicamente proporciona la mejor separación, sin embargo, los rendimientos finales son muy bajos (9% a pH 6 y nulo a pH 7). De los dos valores de pH estudiados en los que se produce transmisión de BSA (pH 4 y pH 5), la mejor selectividad se obtiene para pH 5 (2.8 frente a 1.5 para pH 4). Teniendo en cuenta esto y que el rendimiento final también es mayor en esas condiciones, se observa en pH 5 se da las condiciones óptimas para llevar a cabo el fraccionamiento dentro del rango estudiado.

Influencia de la fuerza iónica sobre el transporte de proteína.

Las figuras que se recogen a continuación muestran los resultados obtenidos para los ajustes en los casos en los que se ha adicionado sal.

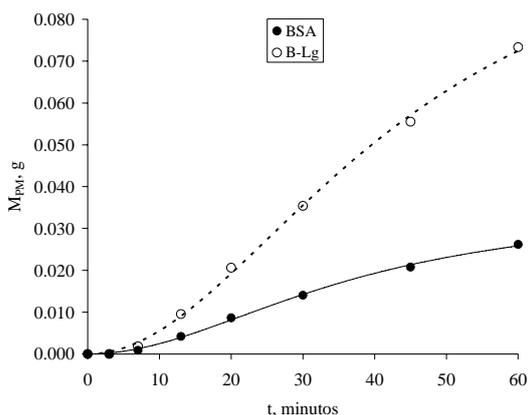


Figura 5.108 M_{PM} vs tiempo. Exp BSA-BLg-5-0.

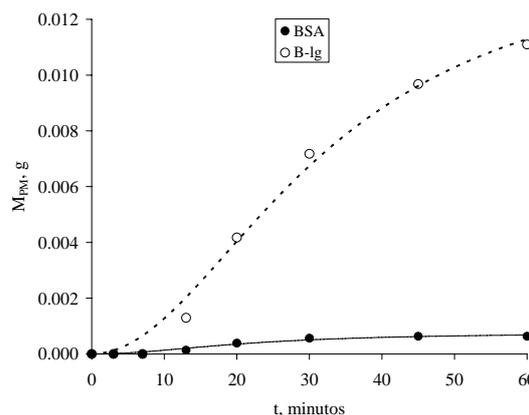


Figura 5.109 M_{PM} vs tiempo. Exp BSA-BLg-5-5.

Tabla 5.24 Parámetros para el ajuste sigmoideal de M_{PM} para la β -lactoglobulina.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min^2 | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{\text{max}}$, $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ | M_{PM} , g |
|-------------|----|-------|-----------|------------------------|------------------------|--|--------------|
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| BSA-BLg-5-5 | 5 | 5 | 0.0146 | 1044.33 | 18.66 | 0.00029 | 0.0111 |

Tabla 5.25 Parámetros para el ajuste sigmoideal de M_{PM} para la BSA.

| Experimento | pH | I, mM | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|-------------|----|-------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |
| BSA-BLg-5-5 | 5 | 5 | 0.0008 | 470.48 | 12.52 | 0.00002 | 0.0006 |

La adición de sal está dificultando el paso de la proteína a través de la membrana como muestra el hecho de que M_{PM} se reduce desde 0.0734 g a 0.0111 g para el caso de la β -lactoglobulina y de 0.0262 g a 0.0006 g para la BSA. Esto parece indicar que la adición de sal está afectando a la formación de agregados de moléculas de las dos proteínas. Como consecuencia de lo anterior, existe mayor proporción de BSA libre que presenta carga opuesta a la membrana por lo que su adsorción sobre las paredes de los poros está favorecida. El aumento de la adsorción de BSA provoca una reducción mayor del área transversal de los poros, como indicó el aumento del parámetro B del modelo de flujo, dificultando el paso de las dos proteínas.

Tabla 5.26 Selectividad final y rendimiento final en función de la fuerza iónica.

| Experimento | pH | I, mM | Sel | η |
|-------------|----|-------|------|--------|
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 0 | 2.8 | 50.80 |
| BSA-BLg-5-5 | 5 | 5 | 18.5 | 7.68 |

La Tabla 5.26 muestra la selectividad final y el rendimiento final alcanzados en los experimentos de fraccionamiento en función de la fuerza iónica. La adición de sales multiplica en casi 7 veces la selectividad, sin embargo y como se dijo anteriormente, dificulta el paso de proteína a través de la membrana dando lugar a una reducción del rendimiento muy acusada. Esta reducción del rendimiento no hace adecuada la adición de sales a la hora de llevar a cabo el fraccionamiento de la mezcla.

Influencia de la presión transmembrana sobre el transporte de proteína.

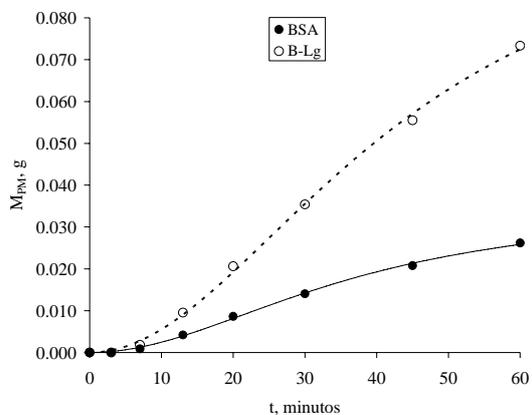


Figura 5.110 M_{PM} vs tiempo. Exp BSA-BLg-5-0.

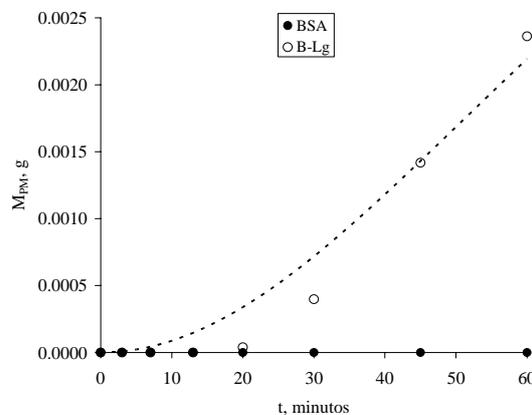


Figura 5.111 M_{PM} vs tiempo. Exp BSA-BLg-5-0.5.

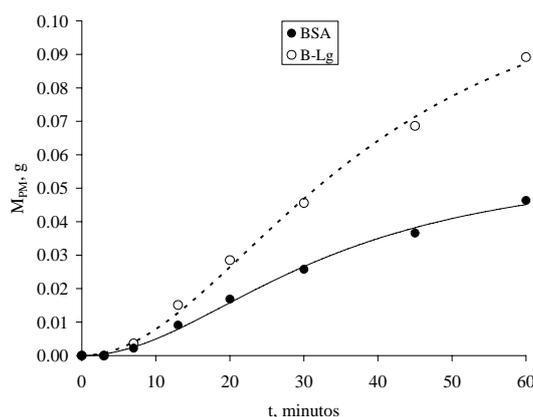


Figura 5.112 Figura 5.113 M_{PM} vs tiempo. Exp BSA-BLg-5-1.5.

Tabla 5.27 Parámetros para el ajuste sigmoial de M_{PM} para la β -lactoglobulina.

| Experimento | pH | PTM, bar | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|---------------|----|----------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| BSA-BLg-5-0.5 | 5 | 0.5 | 0.0070 | 7836.00 | 51.11 | 0.00005 | 0.0024 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 1 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| BSA-BLg-5-1.5 | 5 | 1.5 | 0.1225 | 1453.80 | 22.01 | 0.00209 | 0.0892 |

Tabla 5.28 Parámetros para el ajuste sigmoial de M_{PM} para la BSA.

| Experimento | pH | PTM, bar | d_2 , g | f_2 , min ² | t_{max} , min | $(dM_{PM}/dt)_{max}$, g·min ⁻¹ | M_{PM} , g |
|---------------|----|----------|-----------|--------------------------|-----------------|--|--------------|
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 1 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |
| BSA-BLg-5-1.5 | 5 | 1.5 | 0.0588 | 1089.68 | 19.06 | 0.00116 | 0.0464 |

El aumento de la presión transmembrana se traduce en un aumento de la cantidad total de proteína transportada, así al pasar de 0.5 a 1.5 bar se multiplica por 37 para el caso de la β -lactoglobulina y se produce un transporte importante para la BSA. El efecto del aumento de la presión transmembrana se debe a que provoca un aumento del caudal de filtrado y un incremento de la concentración en las proximidades del poro de la membrana obteniéndose mayores concentraciones en el filtrado. También se aprecia una reducción de t_{max} , que puede deberse al aumento de la cantidad de proteína que pasa a través de los poros, ya que al ser las condiciones de pH y fuerza iónica idénticas, el tiempo que tarda en formarse la capa de proteína adsorbida es función de la cantidad de proteína transportada.

El efecto de la presión transmembrana sobre el rendimiento y la selectividad finales quedan recogidos en la Tabla 5.29:

Tabla 5.29 Selectividad final y rendimiento final en función de la presión transmembrana.

| Experimento | pH | PTM, bar | Sel | η |
|---------------|----|----------|-----|--------|
| BSA-BLg-5-0.5 | 5 | 0.5 | - | 1.68 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 1 | 2.8 | 50.80 |
| BSA-BLg-5-1.5 | 5 | 1.5 | 1.9 | 61.90 |

Cuando la presión transmembrana es baja (0.5 bar) no aparece BSA en la corriente de filtrado. Esta situación, que es ideal, debe acompañarse de un rendimiento final alto para poder hablar de condiciones adecuadas para el fraccionamiento, pero en este caso no se cumple con la segunda condición ya que el rendimiento es muy bajo (1.68%). De las otras dos condiciones ensayadas, el aumento de la presión al pasar de 1 a 1.5 bar implica un incremento del rendimiento final de casi un 11% pero la selectividad se reduce en un 32%, valorando ambas variables se puede indicar que la presión óptima de entre las ensayadas es 1 bar.

Influencia del caudal de retenido sobre el transporte de proteína.

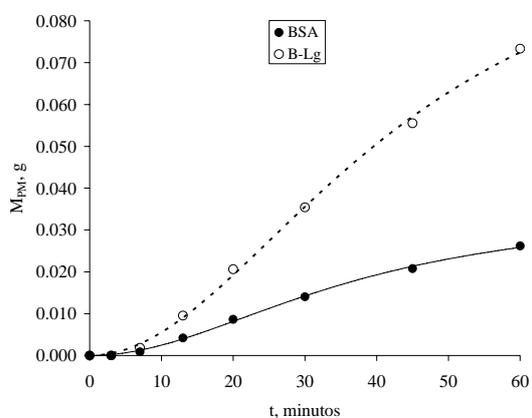


Figura 5.114 M_{PM} vs t. Exp BSA-BLg-5-0.

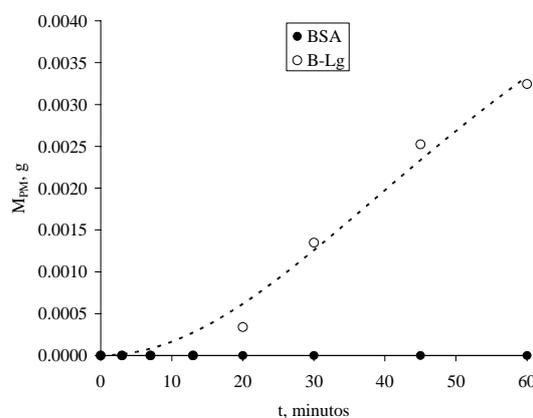


Figura 5.115 M_{PM} vs t. Exp BSA-BLg-5-300.

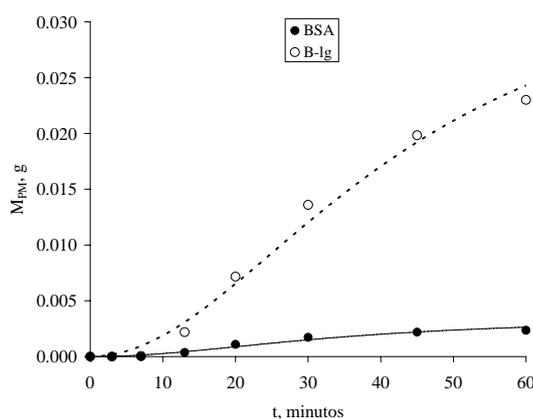


Figura 5.116 Figura 5.117 M_{PM} vs t. Exp BSA-BLg-5-500.

Tabla 5.30 Parámetros para el ajuste sigmoidal de M_{PM} para la β -lactoglobulina.

| Experimento | pH | $Q_R, L/h$ | d_2, g | f_2, min^2 | t_{max}, min | $(dM_{PM}/dt)_{max}, g \cdot min^{-1}$ | M_{PM}, g |
|---------------|----|------------|----------|--------------|----------------|--|-------------|
| BSA-BLg-5-300 | 5 | 300 | 0.0074 | 4402.27 | 38.31 | 0.00007 | 0.0032 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 400 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| BSA-BLg-5-500 | 5 | 500 | 0.0369 | 1857.94 | 24.89 | 0.00056 | 0.0230 |

Tabla 5.31 Parámetros para el ajuste sigmoidal de M_{PM} para la BSA.

| Experimento | pH | $Q_R, L/h$ | d_2, g | f_2, min^2 | t_{max}, min | $(dM_{PM}/dt)_{max}, g \cdot min^{-1}$ | M_{PM}, g |
|---------------|----|------------|----------|--------------|----------------|--|-------------|
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 400 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |
| BSA-BLg-5-500 | 5 | 500 | 0.0035 | 1268.2547 | 20.56 | 0.00006 | 0.0024 |

El aumento del caudal de retenido, es decir, de la velocidad tangencial tiene un efecto beneficioso en el transporte de proteína, así se multiplica por 23 en el caso de la β -lactoglobulina o pasa de no transmitir a hacerlo para la BSA al pasar de 300 L/h a 400 L/h. Sin embargo, un aumento excesivo de la velocidad muestra un efecto contraproducente, reduciéndose el transporte en 3 veces para la β -lactoglobulina y en 11 para la BSA al aumentar el caudal de retenido en otros 100 L/h. Esto parece indicar que tanto una velocidad tangencial baja (2.47 m/s, $Re=11050$) como una velocidad tangencial excesiva (4.11 m/s, $Re= 18417$) en las proximidades de la membrana dificultan el transporte de la proteína hasta la entrada de los poros. El efecto negativo de una velocidad tangencial baja puede deberse a que fomenta la adsorción en la boca de los poros como ya se vio por el aumento de B en el modelo de flujo. En el otro extremo, el efecto negativo de una velocidad tangencial excesiva puede deberse a que reduce la concentración de proteína en exceso en la entrada de los poros.

Los resultados del análisis del proceso de fraccionamiento se recogen en la Tabla 5.32.

Tabla 5.32 Selectividad final y rendimiento final en función del caudal de retenido.

| Experimento | pH | $Q_R, L/h$ | Sel | η |
|---------------|----|------------|-----|--------|
| BSA-BLg-5-0.5 | 5 | 300 | - | 2.24 |
| BSA-BLg-5-0 | 5 | 400 | 2.8 | 50.80 |
| BSA-BLg-5-1.5 | 5 | 500 | 9.6 | 16.37 |

Los resultados muestran que las condiciones óptimas para el fraccionamiento se dan para el caudal de retenido de 400 L/h pues coexisten una buena selectividad y un buen rendimiento. En el caso de 300 L/h, aunque no pasa BSA el rendimiento es muy bajo y por tanto no es una situación adecuada. Lo mismo ocurre con el caso de 500 L/h, pues aunque la selectividad es sensiblemente superior al de 400 L/h su rendimiento sigue siendo muy bajo, no superando el 17% tras una hora de filtración.

5.2.6. Análisis de las interacciones

El análisis de los resultados obtenidos en los sistemas estudiados permite extraer una serie de premisas sobre el efecto de las interacciones proteína-membrana y proteína-proteína en el proceso de filtración.

En primer lugar queda patente la importancia de las condiciones ambientales y de operación en el comportamiento del sistema. En ningún caso la evolución del caudal de filtrado puede

explicarse como consecuencia de un sólo mecanismo de colmatación predominante, sin embargo, se han obtenido resultados satisfactorios considerando combinaciones de dos mecanismos. En todos los casos, el descenso inicial del caudal de filtrado se explica por el mecanismo de bloqueo completo, que se produce de manera muy rápida en los primeros instantes del experimento. A partir de aquí, la evolución del caudal de filtrado se explica adecuadamente con el uso del modelo de bloqueo estándar cuando existe transmisión y del modelo de formación de torta en caso de retención total. Una vez expuestas estas consideraciones generales, se entrará en más detalle en el análisis de los datos obtenidos.

El pH afecta claramente a la fracción de poros bloqueables, aumentando al acercarnos al punto isoeléctrico por la reducción del radio efectivo de la proteína y la reducción de carga neta que fomenta la aparición de agregados.

En cuanto la velocidad a la que se produce el bloqueo completo, se aprecia que es mayor en el punto isoeléctrico de la proteína y en las zonas de pH donde membrana y proteína presentan carga contraria. Esto se debe a que es en esos casos cuando las interacciones electrostáticas proteína-membrana son más favorables para la deposición de proteína y el bloqueo de poros. Podría decirse que la velocidad de bloqueo completo está controlada mayoritariamente por la naturaleza de las interacciones electrostáticas. Por otra parte se ha puesto de manifiesto que esta velocidad se ve afectada por la relación entre el radio de poro medio de la membrana y el radio efectivo de la proteína. Cuando el radio efectivo de la proteína es mayor que el radio de poro medio se obtienen velocidades muy similares independientemente de la carga que presenten la proteína y la membrana; por lo que en esos casos son las interacciones estéricas las controlantes.

En cuanto a la adsorción, muestra un comportamiento desigual en función del sistema estudiado. Esta diversidad de comportamiento se debe a la naturaleza de cada una de las proteínas estudiadas. En general, se puede concluir que la adsorción es mayor en el punto isoeléctrico debido a la ausencia de carga neta en las proteínas, lo que facilita la adsorción en la membrana y sobre capas de proteína previamente adsorbida. La existencia de interacciones electrostáticas de origen atractivo entre proteína y membrana también favorecen la adsorción. Aunque estas directrices son generales para los sistemas estudiados, se observan claras diferencias en la velocidad a la que se produce la adsorción en función de la proteína considerada.

La adición de fuerza iónica muestra distintos efectos sobre la fracción de poros bloqueables en función de la proteína presente en el sistema. Así, cuando se trata de lisozima se aprecia un descenso de esta fracción, posiblemente debida al aumento del tamaño de la molécula de proteína por desequilibrios internos de fuerzas y la adsorción de iones salinos, unido a una disminución de la formación de agregados por ligeros incrementos en la carga neta. Sin embargo, cuando la proteína implicada es β -lactoglobulina o la mezcla binaria la adición de sal no afecta a la fracción de poros bloqueables.

En cuanto a la velocidad del proceso de bloqueo completo, en ninguno de los sistemas estudiados se ha observado una alteración de la misma al aumentar la fuerza iónica de la disolución.

La adsorción sí se ve afectada por la adición de sal, si bien, de nuevo la alteración de la adsorción está condicionada por la naturaleza de la proteína. En el caso de la lisozima, el aumento de la fuerza iónica produce una leve reducción de la adsorción en el interior de los poros debida, posiblemente, a alteraciones de las interacciones electrostáticas entre la proteína y la membrana. Sin embargo, en el caso de la β -lactoglobulina, el aumento de la concentración salina tiene el efecto contrario sobre la adsorción. El aumento puede deberse a la alteración en el equilibrio monómero-dímero de la proteína fomentando la aparición de más monómeros.

Es muy importante destacar el cambio de comportamiento de las proteínas al pasar de disoluciones unitarias a mezclas, posiblemente debido a la aparición de nuevas interacciones proteína-proteína así, en las mezclas se ve afectada la transmisión de las proteínas, incluso se puede dar el caso de obtener transmisión para proteínas que no transmitían en disolución unitaria. Además, la mezcla de proteínas afecta a los caudales de filtrado obtenidos. Esto señala que las observaciones obtenidas para sistemas unitarios no son fácilmente extrapolables para predecir el comportamiento de mezclas.

Ya se ha comentado el efecto del pH y la fuerza iónica en el sistema binario en las consideraciones anteriores, si bien cabe también indicar el efecto de estas dos variables sobre el fraccionamiento. En ambos casos, se obtienen unas condiciones óptimas para llevarlo a cabo atendiendo a los valores de rendimiento final y selectividad. Así para el pH el mejor valor es pH 5 y para la fuerza iónica es la no adición de sales que dificultan el paso de proteína a través de la membrana.

A continuación, se indican las observaciones extraídas del comportamiento del sistema binario frente a variaciones de la presión transmembrana y el caudal de retenido.

La variación de la presión transmembrana no afecta a la fracción de bloqueo de poros ni a la velocidad con la que se produce el bloqueo. Esto indica que ambos fenómenos están regidos por el ambiente fisicoquímico en el que se realiza la operación. Sí afecta a la adsorción, mostrando que tanto un exceso de presión como un defecto de la misma pueden aumentar la adsorción en el interior de los poros. Una presión transmembrana demasiado pequeña aumenta el tiempo de interacción proteína-membrana por lo que se favorece la adsorción. Y una presión transmembrana demasiado alta, aumenta el esfuerzo de cizalladura que potencia la deposición y la formación de agregados, así como un aumento de los choques en el interior de los poros al aumentar la velocidad del filtrado en el interior de los mismos. Al igual que ocurría con el pH y la fuerza iónica, existen unas condiciones de presión transmembrana más favorables para llevar a cabo el fraccionamiento, así una presión de 1 bar se traduce en unos valores aceptables de rendimiento y selectividad.

La variación del caudal de retenido, de nuevo, sólo afecta a la adsorción. Una reducción de la velocidad tangencial, es decir, de la turbulencia en la entrada a los poros parece fomentar la adsorción de proteína en la boca de los mismos, posiblemente por un aumento de la concentración de proteína en esas zonas. Aumentar la velocidad tangencial de manera excesiva tampoco es beneficioso ya que se traduce en una menor cantidad de proteína transportada a través de la membrana. Este efecto de la velocidad tangencial se debe, posiblemente, a que se produce una reducción de la concentración de la proteína en la entrada de los poros. En lo que respecta a los caudales de retenido ensayados, el más adecuado para llevar a cabo el fraccionamiento ha sido el de 400 L/h pues en los otros casos ensayados el rendimiento obtenido al finalizar el experimento era inferior al 17 %.

Los resultados obtenidos y el análisis realizado ponen de manifiesto la complejidad de la filtración de proteínas. Las interacciones electroestáticas y estéricas implicadas deben analizarse y particularizarse en cada caso para la comprensión y modelización del sistema. Esta complejidad, téngase en cuenta que se han estudiado sistemas binarios, y falta de generalización de los modelos mecanísticos lleva a plantearse la modelización mediante el empleo de redes neuronales artificiales

5.3. MODELADO MEDIANTE REDES NEURONALES

En los últimos años se han realizado un gran número de aproximaciones teóricas para la predicción de la evolución y el rendimiento de la ultrafiltración de suspensiones coloidales. Estas aproximaciones han mostrado cierto éxito, pero están sujetas a condiciones estrictas que limitan su aplicación a sólo unos cuantos casos (Curcio et al., 2005) y no explican la evolución dinámica en su totalidad (Razavi et al., 2003; Aydiner et al. 2005). Por esto, los métodos basados en el análisis de los datos experimentales surgen como una buena alternativa a los modelos basados en hipótesis fenomenológicas. Uno de estos métodos es el de las redes neuronales artificiales que, como se vio en la introducción, ha comenzado a utilizarse para el modelado de la ultrafiltración de proteínas gracias a que es un instrumento efectivo para el modelado de sistemas dinámicos no lineales. Por esta razón se ha decidido aplicar la estrategia de redes neuronales artificiales a los sistemas estudiados en esta investigación.

5.3.1. Redes propuestas

Se ha formulado cinco redes distintas, cuyas entradas y salidas se describen a continuación:

- Red RN1: Esta red se ha utilizado para el modelado del caudal de filtrado del sistema formado por la lisozima con los dos tamaños de corte estudiados. Tiene cuatro entradas: el tamaño de corte de la membrana, el pH, la fuerza iónica y el tiempo y una salida: el caudal de filtrado.
- Red RN2: Se modela la transmisión observada para el mismo sistema que en la red RN1. Las entradas son las mismas que en el caso anterior y la salida es la transmisión observada.
- Red RN3: Se utiliza para el sistema de β -lactoglobulina con la membrana de 300 kDa. En este caso se tienen tres entradas: pH, fuerza iónica y tiempo, obteniéndose dos salidas: transmisión observada y caudal de filtrado.
- Red RN4: Se plantea para el modelado del caudal de filtrado del sistema binario. Presenta cinco entradas: presión transmembrana, caudal de retenido, pH, fuerza iónica y tiempo, para obtener una salida: caudal de filtrado.

- Red RN5: Se formula para el mismo sistema que RN4 pero con el objeto de modelar la transmisión de las dos proteínas. Presenta siete entradas: presión transmembrana, caudal de retenido, peso molecular de la proteína, punto isoelectrico de la proteína, pH, fuerza iónica y tiempo. La salida en este caso es la transmisión.

El tipo de red utilizada, así como su estructura y características se recogen en el apartado de materiales y métodos. Para cada red se evaluó el uso de distinto número de neuronas en la capa oculta, variándolo en intervalos de 5 desde 5 hasta 60 neuronas.

5.3.2. Tratamiento de los datos de la red

Cada red ha sido entrenada treinta veces, obteniéndose para cada caso valores finales de los errores de entrenamiento, validación y prueba. Además la red proporciona el ajuste lineal de los datos calculados frente a los experimentales para cada entrenamiento. Estos datos se han tratado de la siguiente forma:

- Se ha calculado el valor medio y la desviación estándar de los mismos para cada red.
- Se ha definido como dato anómalo aquel cuya diferencia con la media es mayor a tres veces la desviación estándar.
- Se han eliminado los datos anómalos.
- Se ha calculado el valor medio y la desviación estándar de los datos restantes, lo que permite mostrar los valores medios de los tres errores y de los parámetros del ajuste lineal en función del número de neuronas.
- Para mostrar el comportamiento de cada red se ha escogido el número de neuronas que ha dado mejor resultado. Una vez escogido el tamaño de red, se ha seleccionado un entrenamiento mostrando la evolución de los errores con las iteraciones y el ajuste de los datos calculados frente a los experimentales. Para escoger la red se ha empleado el siguiente algoritmo:

$$E_p = X_{\text{entrenamiento}} \cdot E_{\text{entrenamiento}} + X_{\text{validación}} \cdot E_{\text{validación}} + X_{\text{prueba}} \cdot E_{\text{prueba}} \quad [5.29]$$

donde E_p es el error ponderado y E y X son el error y la fracción de datos utilizados en los conjuntos de entrenamiento, validación y prueba según indican sus subíndices.

5.3.3. Red RN1: lisozima-caudal de filtrado

El comportamiento de la red se presentará mediante el análisis de los errores de entrenamiento, validación y prueba, así como de los parámetros del ajuste lineal de los datos calculados por la red frente a los experimentales.

En la Figura 5.118 se recoge la evolución del valor medio de los errores con el número de neuronas en la capa oculta de la red.

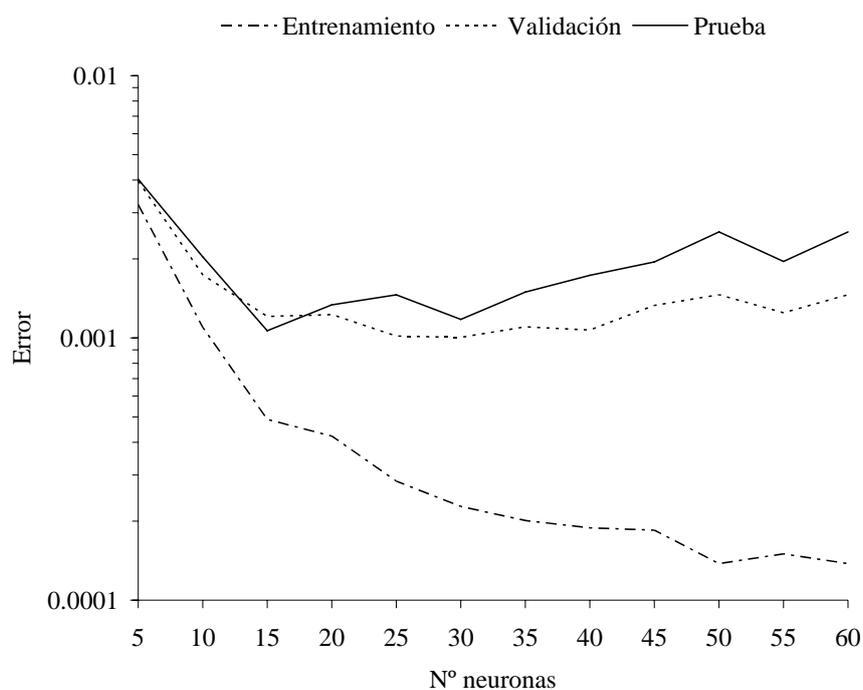


Figura 5.118 Errores de validación, entrenamiento y prueba, RN1.

Se observa como el error de entrenamiento desciende continuamente al aumentar el número de neuronas, sin embargo, la evolución del error de validación y del error de prueba es diferente. En el caso del error de validación, se aprecia una clara disminución hasta que la red cuenta con 20-25 neuronas, no sufriendo grandes variaciones hasta 40 neuronas,

finalmente experimenta un ligero ascenso en los tamaños mayores. La evolución del error de prueba es similar a la del error de validación aunque su incremento para los mayores números de neuronas es más significativo. A priori, un aumento del número de neuronas de la capa oculta debería mejorar el funcionamiento de la red, sin embargo, la evolución de los errores indica que, una vez que se alcanza un cierto tamaño, el aumento produce el efecto contrario posiblemente debido al sobre ajuste que origina el usar un elevado número de parámetros.

En las Figuras de la 5.119 a 5.121 se recoge la evolución del valor medio de los parámetros del ajuste lineal de los datos calculados frente a los experimentales en función del tamaño de la red:

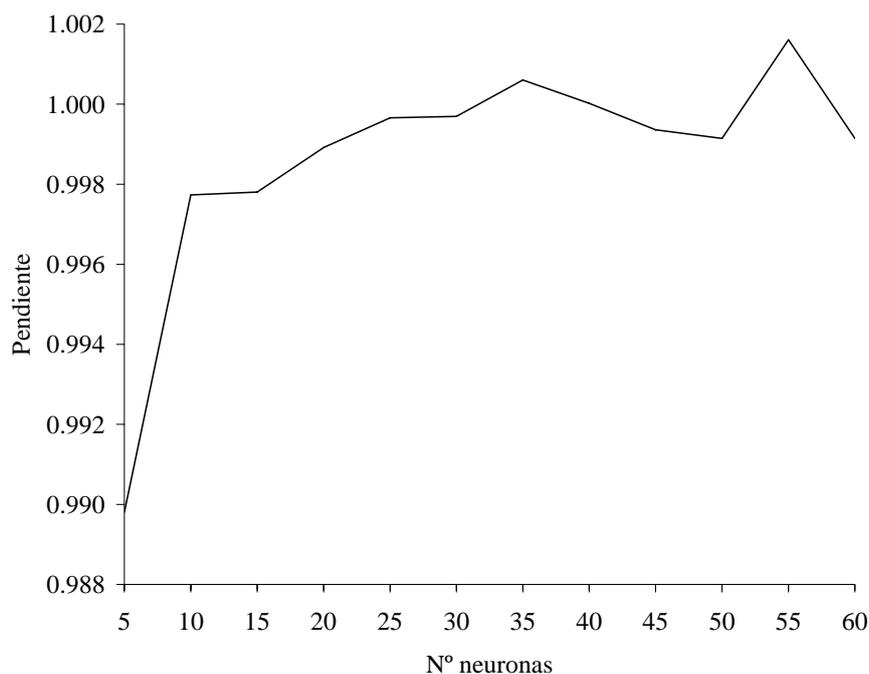


Figura 5.119 Valor de la pendiente del ajuste lineal, RN1.

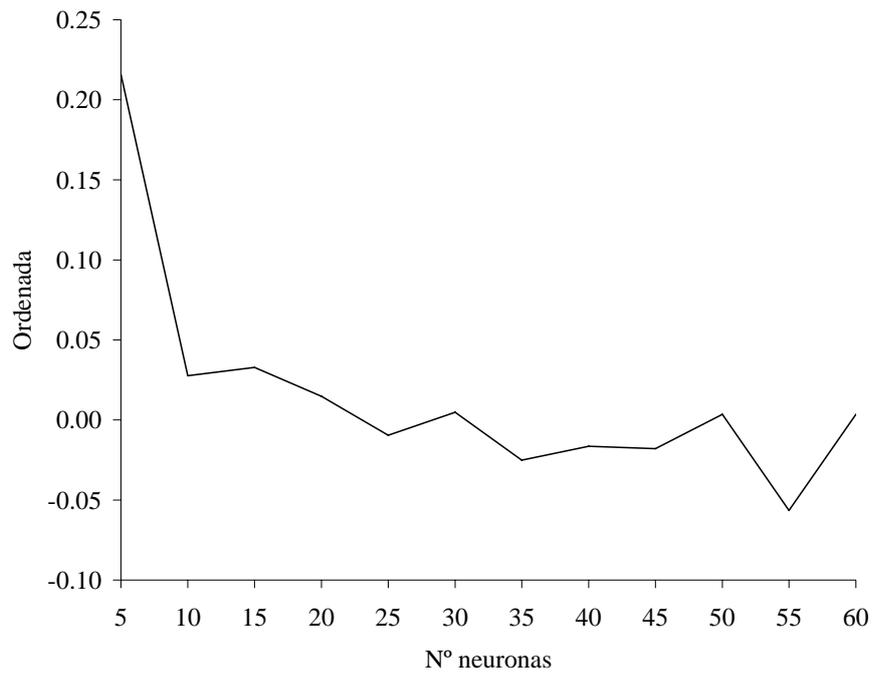


Figura 5.120 Valor de la ordenada en el origen del ajuste lineal, RN1.

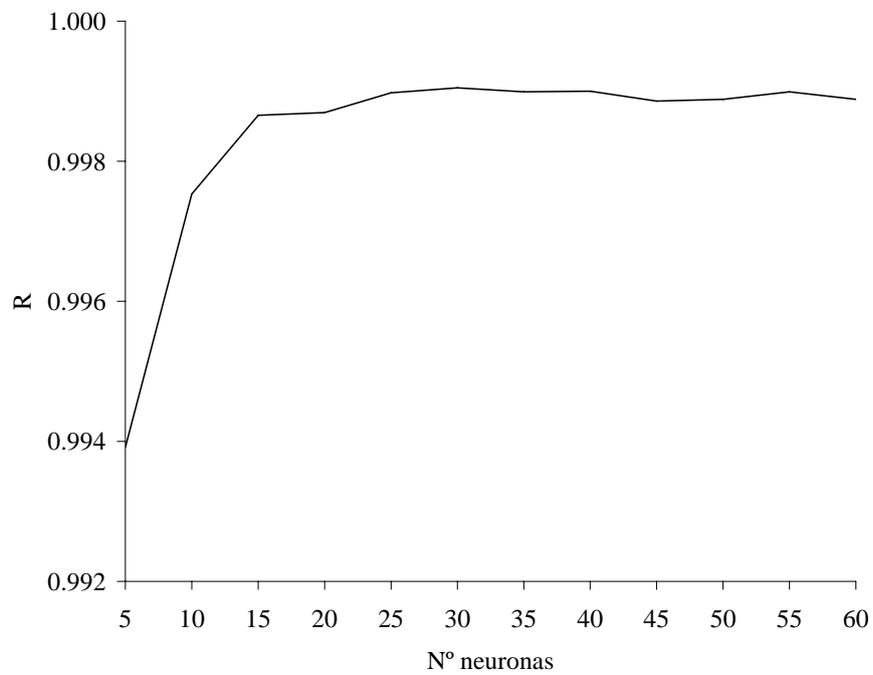


Figura 5.121 Valor del coeficiente de regresión del ajuste lineal, RN1.

Las figuras muestran que todas las redes proporcionan un buen ajuste de los datos obteniéndose pendientes muy próximas a la unidad, ordenadas en el origen cercanas a cero y coeficientes de regresión superiores a 0.99. También se puede apreciar como los resultados mejoran al aumentar el número de neuronas en la capa oculta, si bien, esta mejora no es indefinida, obteniendo resultados muy similares a partir de 25 neuronas e incluso empeorando para tamaños superiores a 45 neuronas. Este comportamiento con el aumento del número de neuronas es consistente con el mostrado por los errores recogido en la Figura 5.118.

Una vez analizada la red en función del tamaño de su capa oculta, se procede al cálculo del error ponderado con objeto de mostrar su respuesta (Figura 5.122).

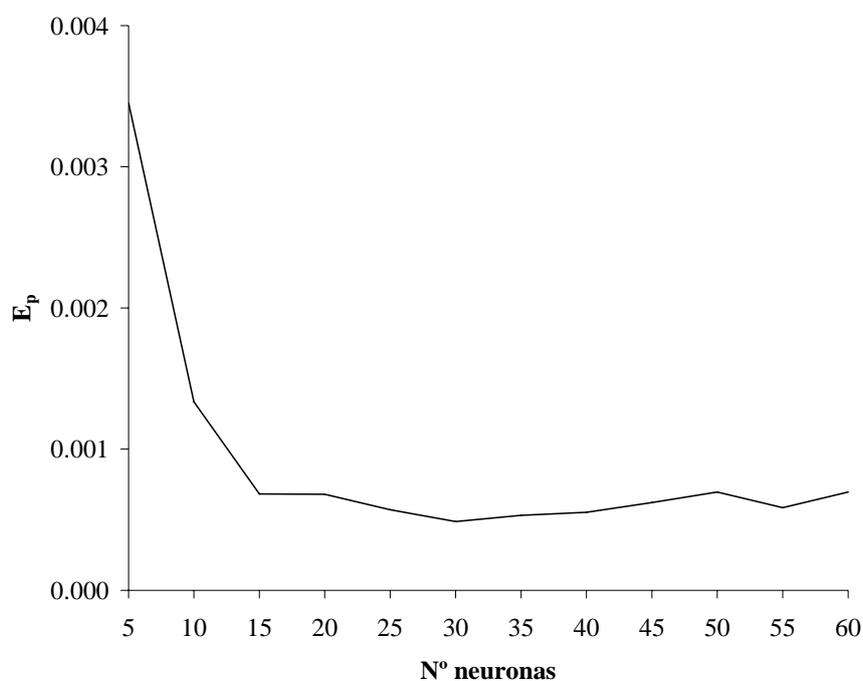


Figura 5.122 Error ponderado, RN1

La red que muestra un menor error ponderado es la de 30 neuronas para su capa oculta. Seguidamente (Figuras 5.123 y 5.124) se muestra la evolución de los errores con las iteraciones y los datos calculados frente a los experimentales para un entrenamiento de esa red. Las líneas punteadas de la Figura 5.124 representan una desviación del 10%.

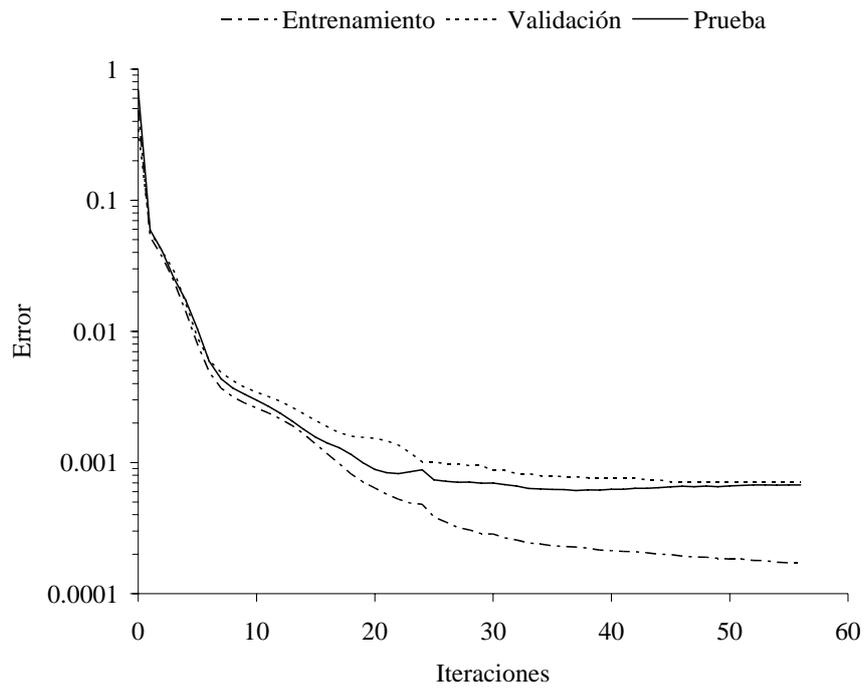


Figura 5.123 Evolución de los errores con el número de iteraciones, RN1 30 neuronas.

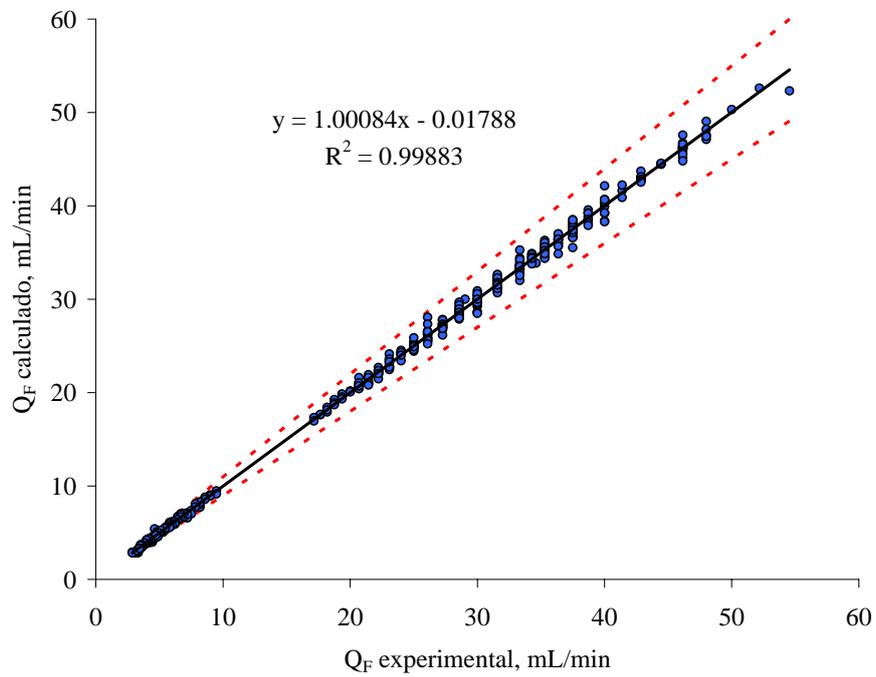


Figura 5.124 Q_F calculado frente a experimental, RN1 30 neuronas.

5.3.4. Red RN2: lisozima-transmisión observada

A igual que en el caso anterior se evaluarán los errores de entrenamiento, validación y prueba, así como de los parámetros del ajuste lineal para conocer el funcionamiento de la red propuesta para el modelado de la transmisión observada. En la Figura 5.125 se recoge la evolución del valor medio de los errores en función del tamaño de la red.

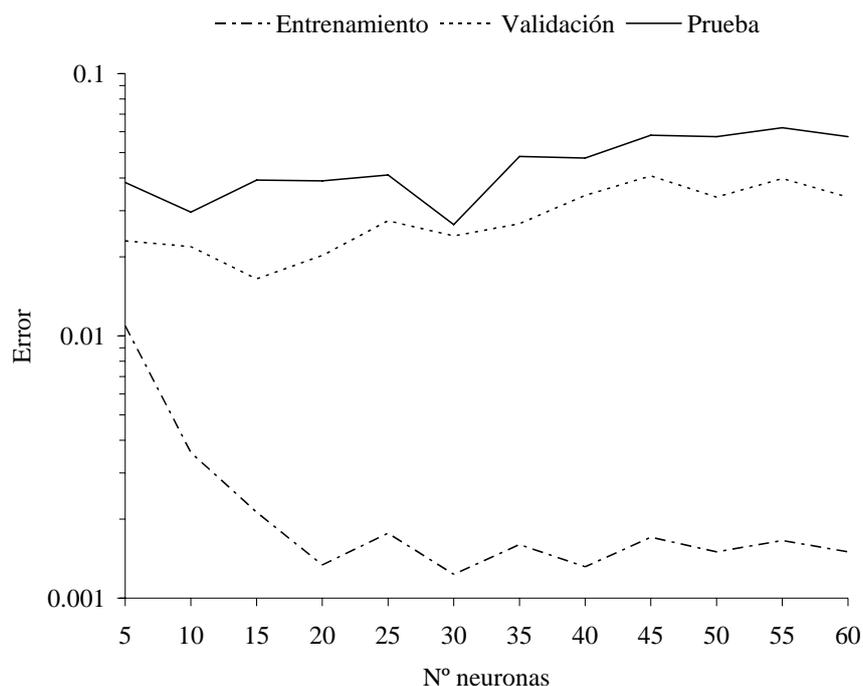


Figura 5.125 Errores de validación, entrenamiento y prueba, RN2.

De manera similar a la red anterior, se aprecia un descenso continuado del error de entrenamiento con el incremento del número de neuronas, especialmente entre 5 y 20 neuronas. De nuevo, la evolución de los otros dos errores es diferente, pero en este caso no se aprecia el descenso inicial de los errores de validación y prueba con el número de neuronas. Ambos errores se mantienen en valores similares para tamaños entre 5 y 30 neuronas para luego mostrar un aumento en los tamaños mayores, debido posiblemente al sobre ajuste.

Seguidamente, se recoge la evolución de los parámetros del ajuste lineal de los datos calculados frente a los experimentales para esta red:

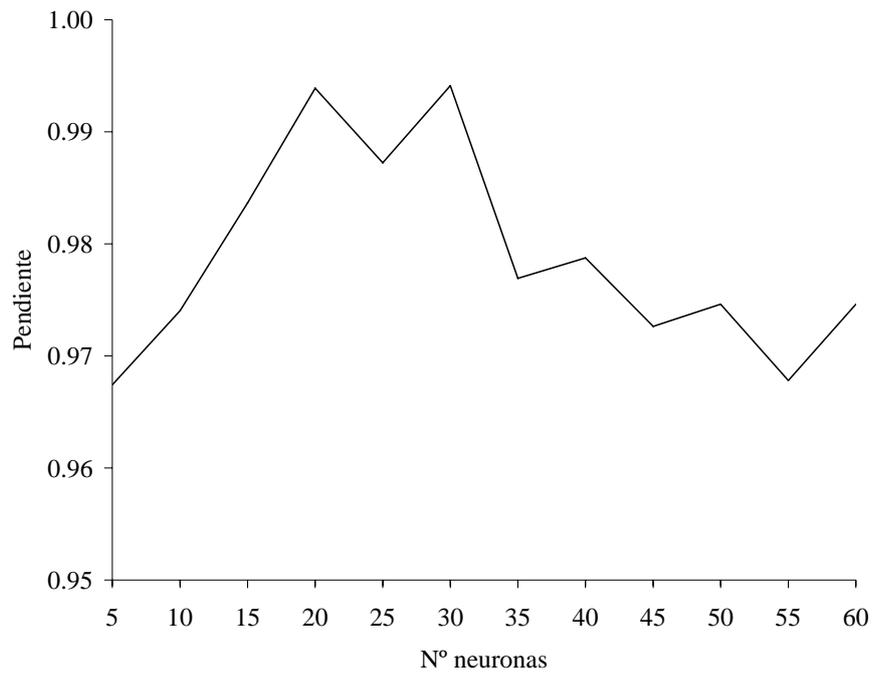


Figura 5.126 Valor de la pendiente del ajuste lineal, RN2.

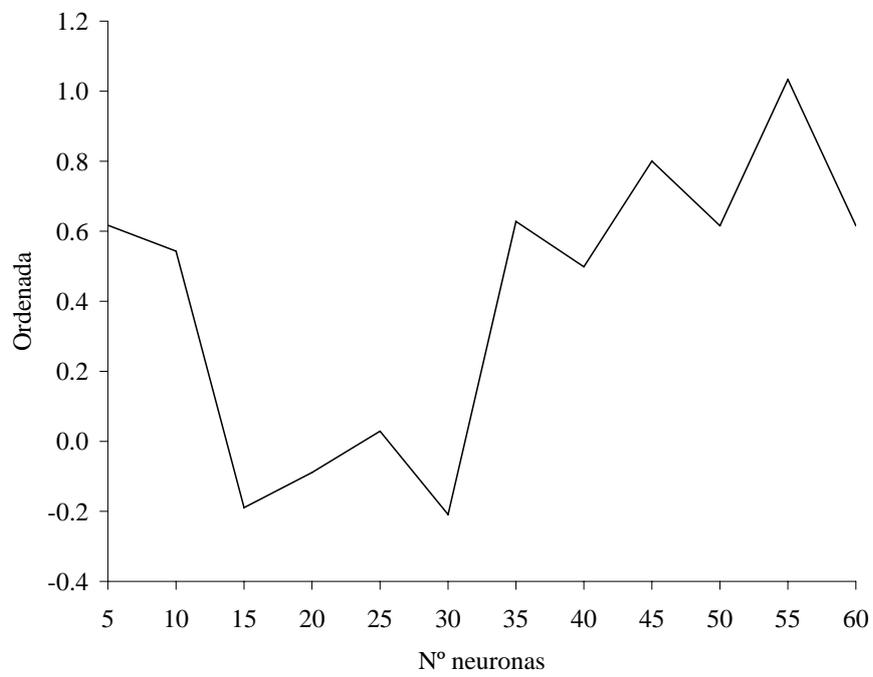


Figura 5.127 Valor de la ordenada en el origen del ajuste lineal, RN2.

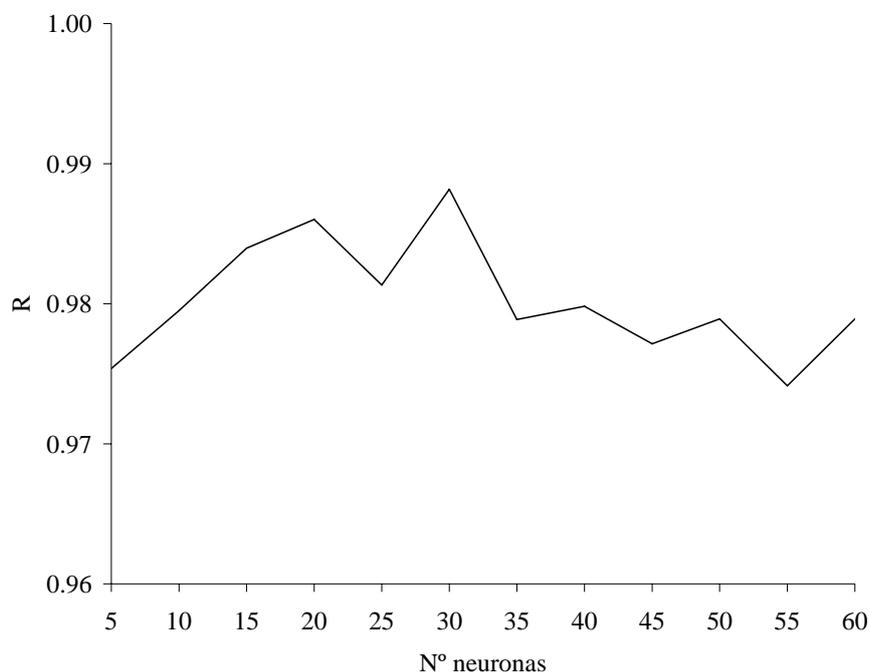


Figura 5.128 Valor del coeficiente de regresión del ajuste lineal, RN2.

Todas las redes proporcionan un excelente ajuste como indican los valores de los parámetros. Se puede apreciar como el ajuste mejora al aumentar el número de neuronas desde 5 a 15, proporcionando los mejores resultados para los tamaños comprendidos entre 15 y 30. A partir de 30 neuronas, un aumento de las mismas repercute negativamente en el ajuste, alejándose la pendiente de la unidad, aumentando la ordenada en el origen y empeorando el coeficiente de regresión. Esto indica posiblemente un sobre aprendizaje por parte de la red al utilizar demasiados parámetros.

El error ponderado para esta red (Figura 5.129) indica que el tamaño elegido para este caso es el de 30 neuronas en la capa oculta. En las Figuras 5.130 y 5.131 se muestran los resultados para un entrenamiento del tamaño elegido.

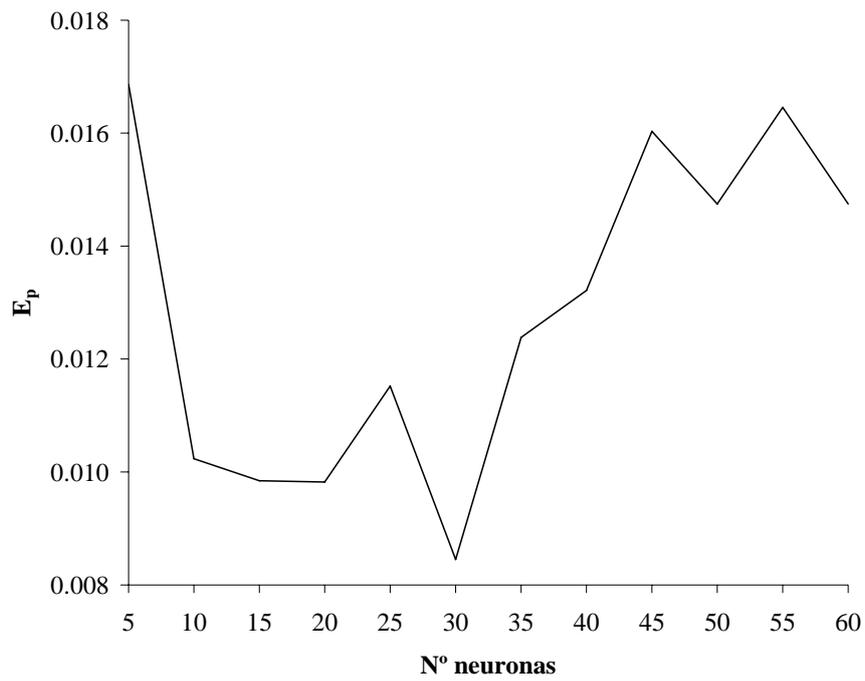


Figura 5.129 Error ponderado, RN2.

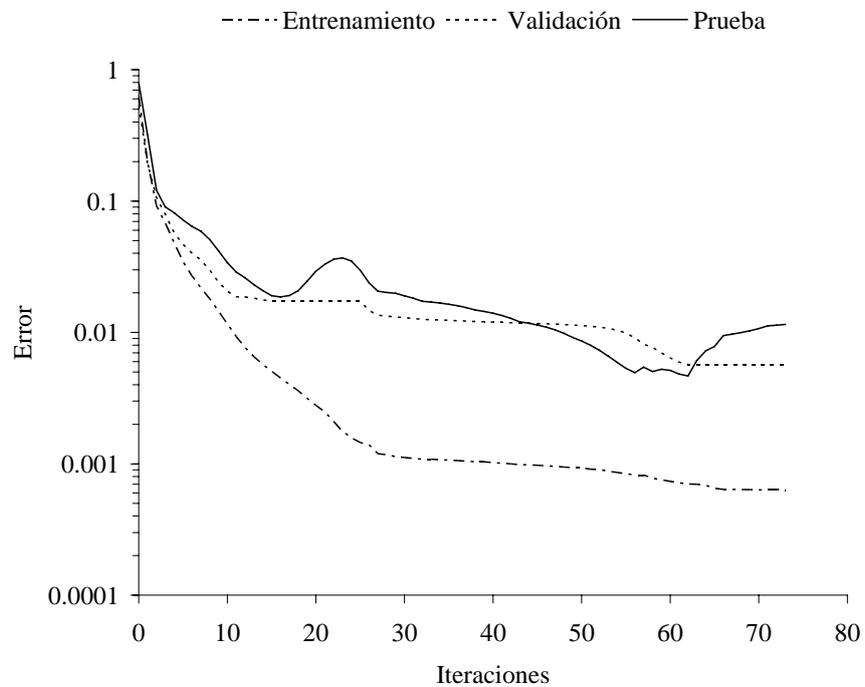


Figura 5.130 Evolución de los errores con el número de iteraciones, RN2 30 neuronas.

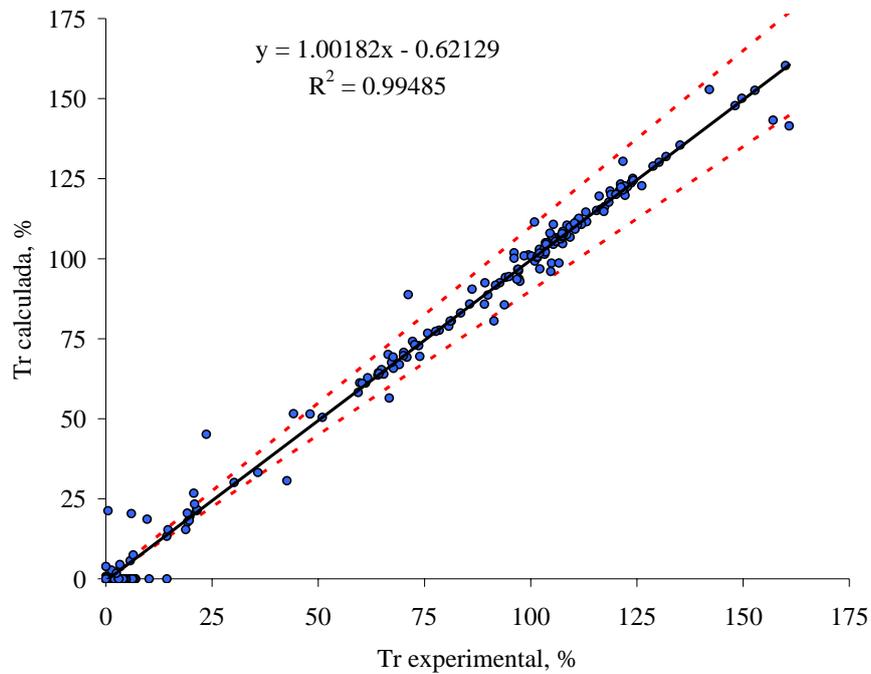


Figura 5.131 Tr calculado frente a experimental, RN2 30 neuronas.

5.3.5. Red RN3: β -lactoglobulina-transmisión observada y caudal de filtrado

Los elementos para estudiar el comportamiento de esta red son los mismos que los utilizados en las dos redes precedentes, sin embargo, en este caso se dispondrán de dos ajustes lineales distintos pues la red proporciona dos salidas, la transmisión observada y el caudal de filtrado. Los resultados se recogen en las figuras de la 5.132 a la 5.135.

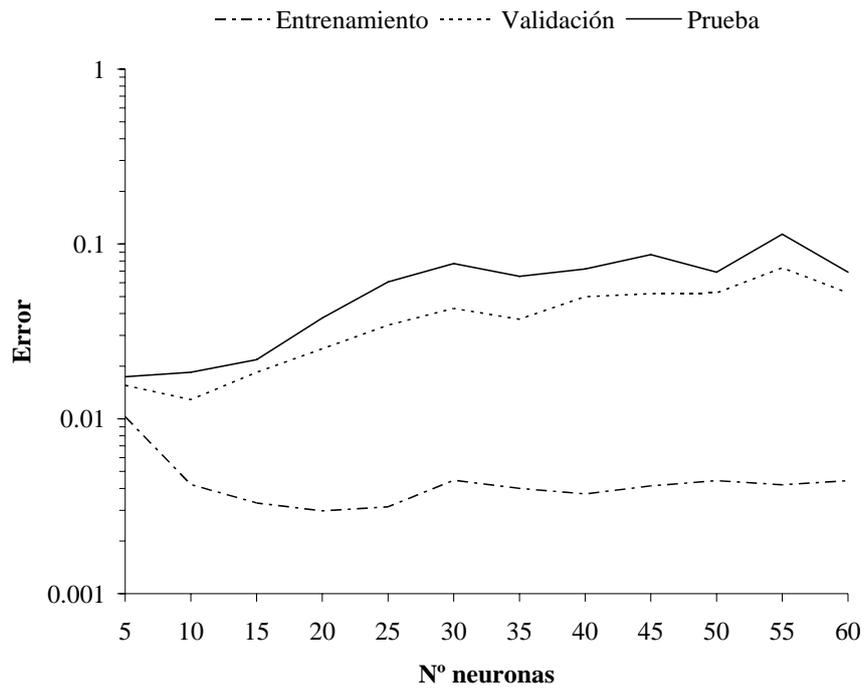


Figura 5.132 Errores de validación, entrenamiento y prueba, RN3.

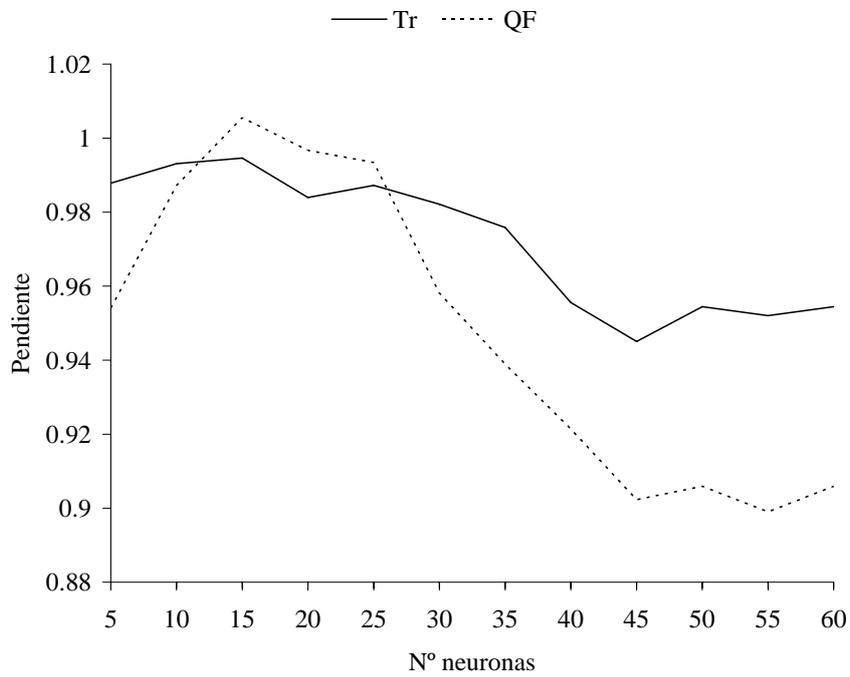


Figura 5.133 Valor de la pendiente del ajuste lineal, RN3.

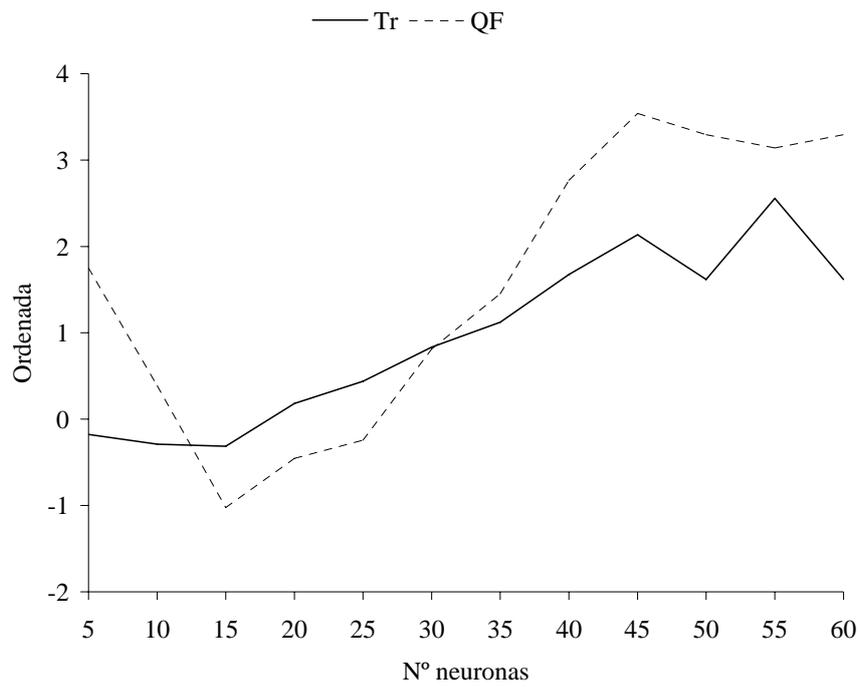


Figura 5.134 Valor de la ordenada en el origen del ajuste lineal, RN3.

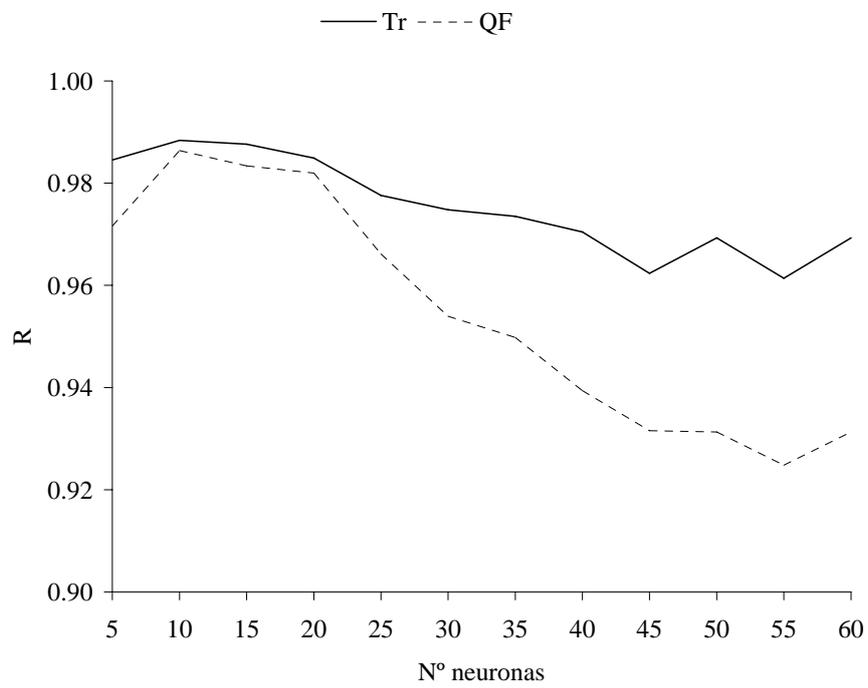


Figura 5.135 Valor del coeficiente de regresión del ajuste lineal, RN3.

En esta red la evolución del error de entrenamiento sigue siendo igual que en las otras. En lo referente al error de validación alcanza su valor mínimo para 10 neuronas, a partir de ahí aumenta considerablemente para llegar a ser del orden de 6 veces mayor para el caso de 45 neuronas. La evolución del error de prueba es semejante a la del error de validación, siendo su valor 6 veces superior al comparar el valor obtenido con 45 neuronas frente al proporcionado por la red de menor tamaño. Este comportamiento del error de validación y prueba con el aumento de tamaño de la red neuronal se explica por el mismo motivo que en los dos casos anteriores.

En cuanto al ajuste de los datos proporcionados por la red se observa que el ajuste es bueno para las dos salidas. La pendiente para el caudal de filtrado se ve más afectada por el cambio del número de neuronas, obteniéndose los mejores resultados para tamaños entre 10 y 25 neuronas. En el caso de la transmisión se obtienen valores de pendiente superiores a 0.98 para tamaños de red de hasta 30 neuronas. La ordenada en el origen sigue un comportamiento muy similar, siendo de nuevo más sensible al cambio de tamaño la correspondiente al ajuste del caudal de filtrado. Los mejores ajustes se obtienen para los mismos tamaños que los comentados en el caso de la pendiente. Finalmente, la evolución del coeficiente de regresión confirma lo anterior, es decir, que un aumento del número de neuronas por encima de 25 empeora el ajuste lineal. Esta situación refuerza la idea de que las redes de menor tamaño proporcionan mejor resultado que las de gran tamaño si estas experimentan sobre aprendizaje.

A continuación se muestran los resultados del cálculo del error ponderado para la red RN3 (Figura 5.136), los cuales muestran que la red con mejor comportamiento es la que posee 10 neuronas en la capa oculta. Las Figuras 5.137 a 5.139 muestran los resultados de un entrenamiento para ese tamaño de capa oculta.

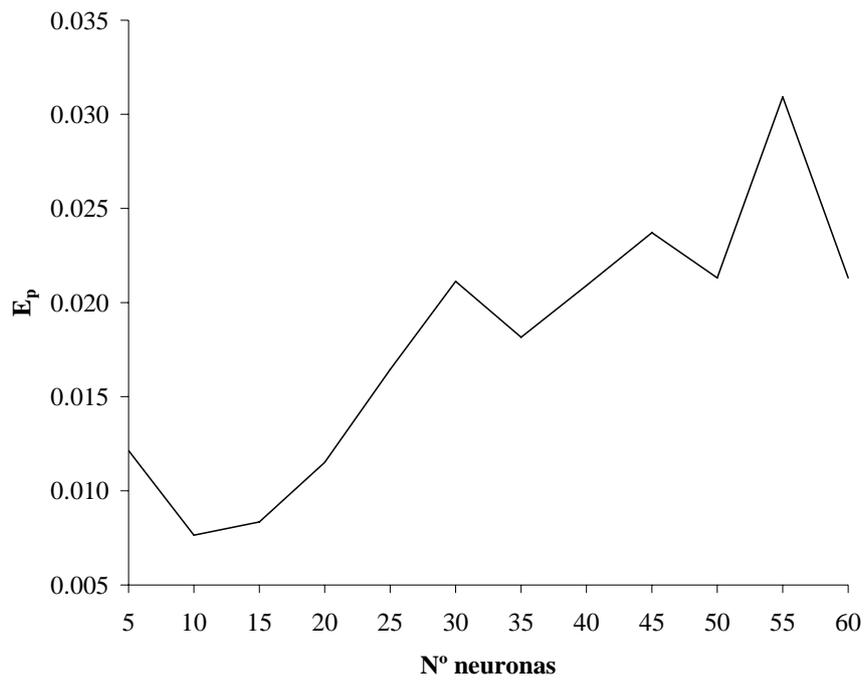


Figura 5.136 Error ponderado, RN3.

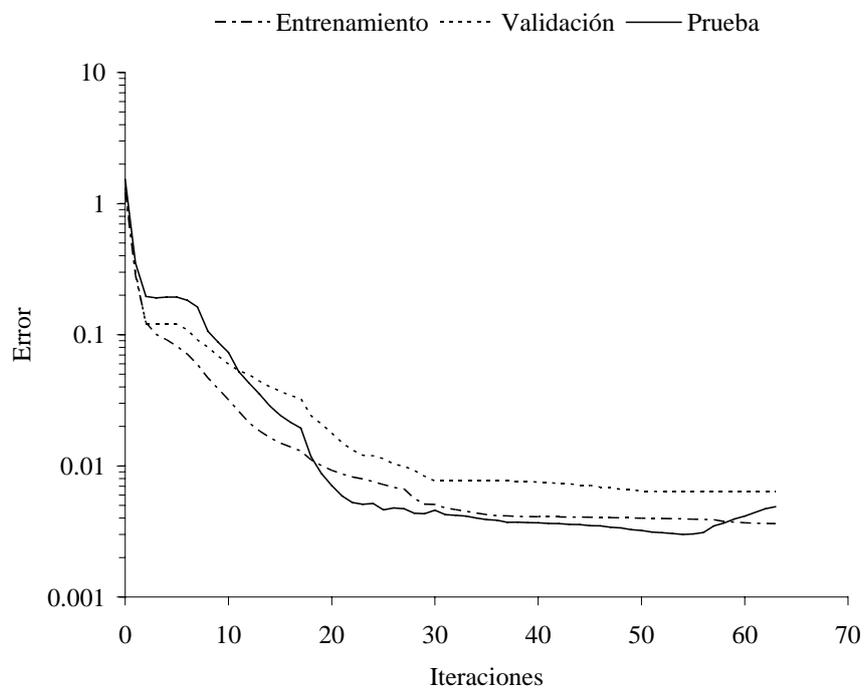


Figura 5.137 Evolución de los errores con el número de iteraciones, RN3 10 neuronas.

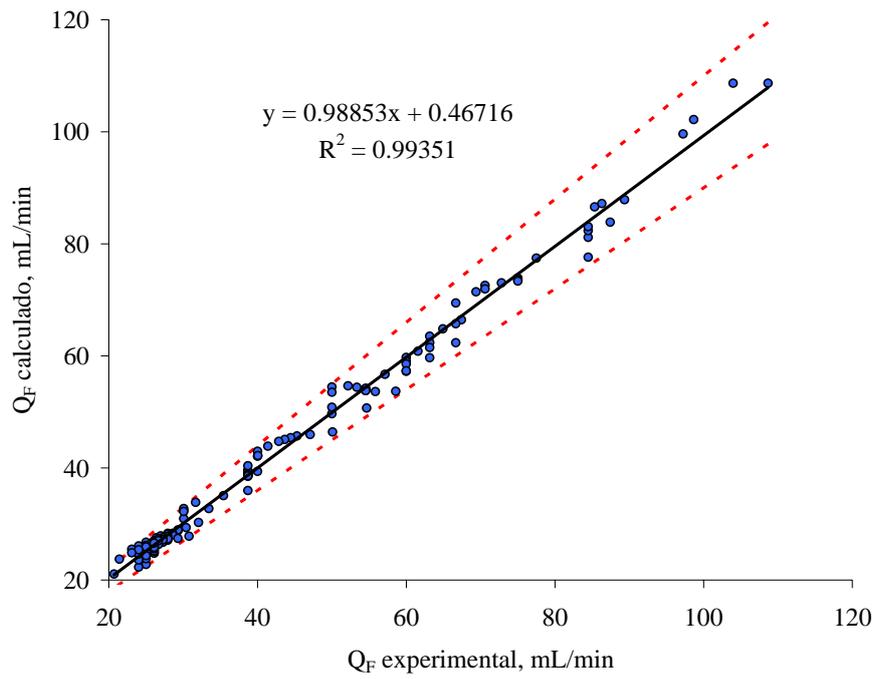


Figura 5.138 Q_F calculado frente a experimental, RN3 10 neuronas.

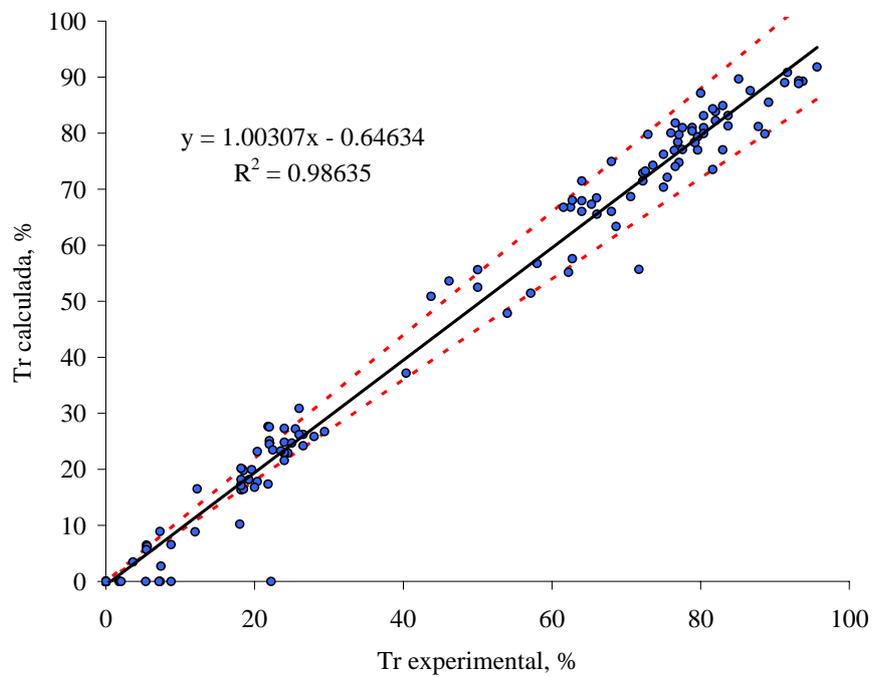


Figura 5.139 Tr calculado frente a experimental, RN3 10 neuronas.

5.3.6. Red RN4: Binaria-caudal de filtrado

En las figuras de la 5.140 a la 5.143 se recogen los resultados de esta red.

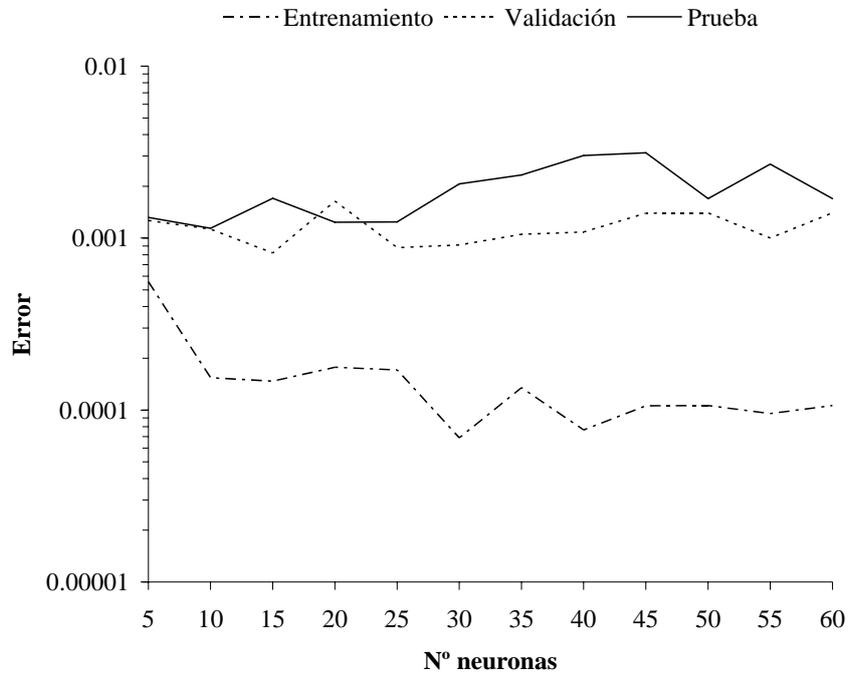


Figura 5.140 Errores de validación, entrenamiento y prueba, RN4.

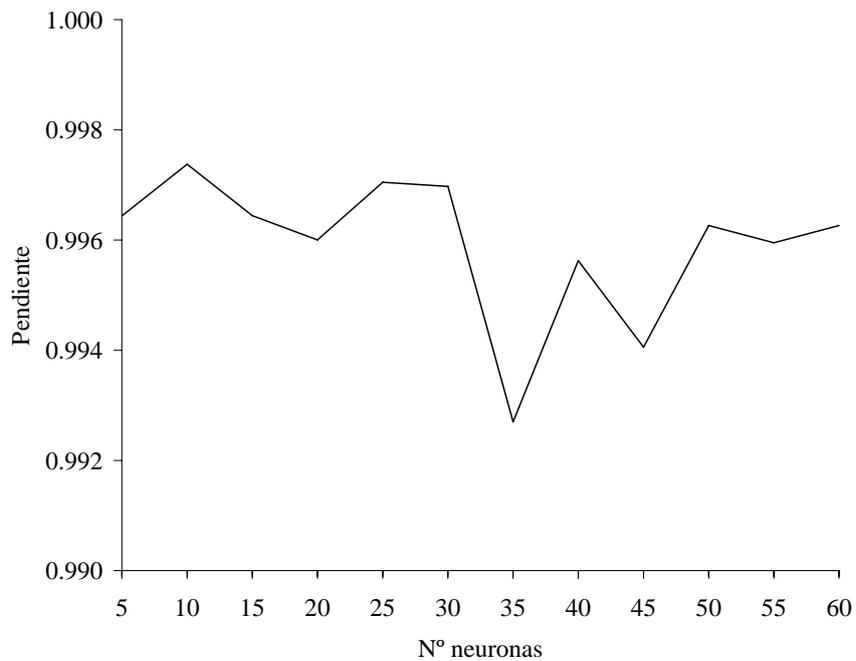


Figura 5.141 Valor de la pendiente del ajuste lineal, RN4.

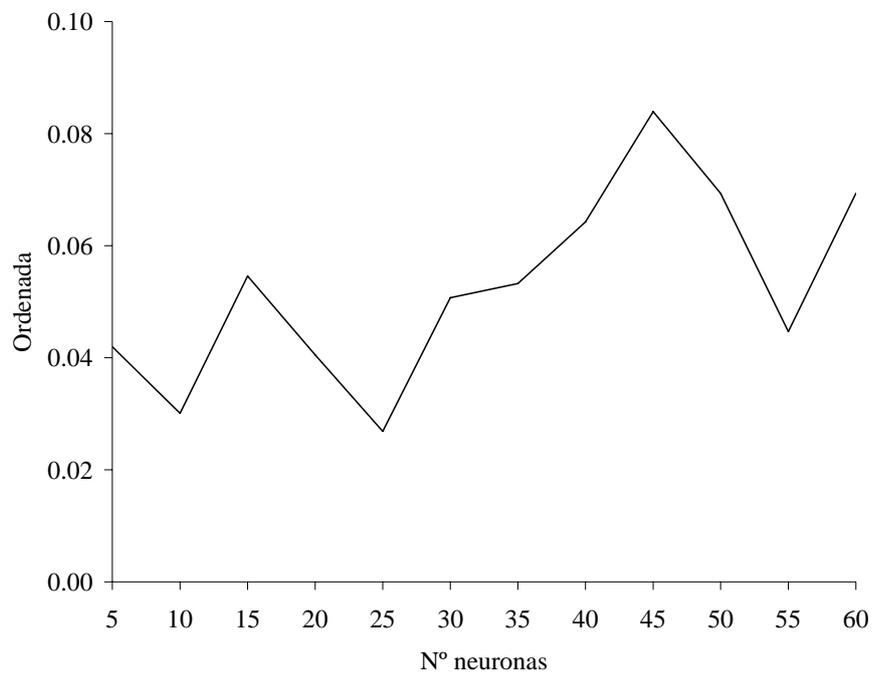


Figura 5.142 Valor de la ordenada en el origen del ajuste lineal, RN4.

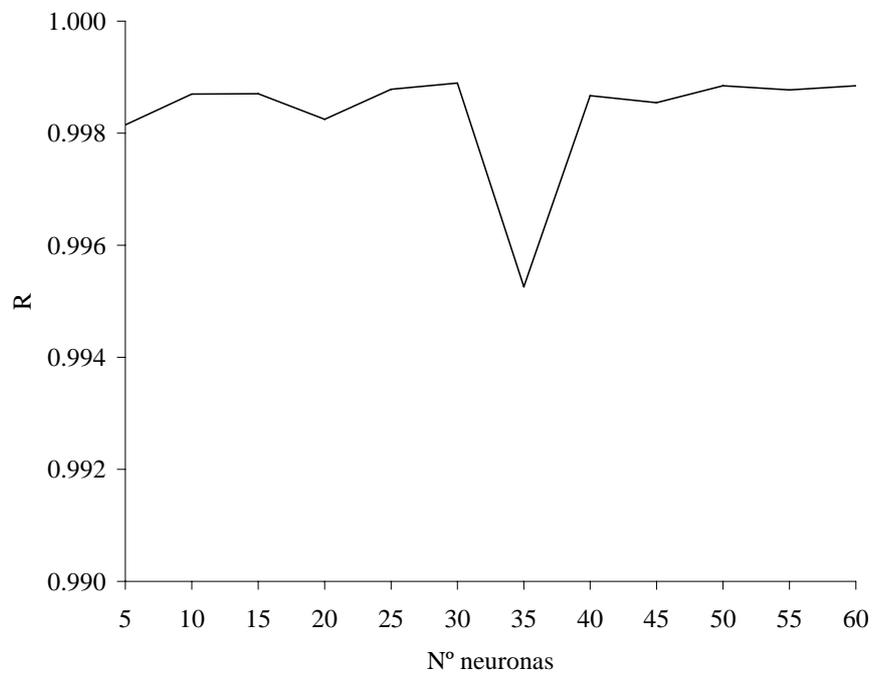


Figura 5.143 Valor del coeficiente de regresión del ajuste lineal, RN4.

El comportamiento de los errores con el aumento del tamaño de la red es igual al de los casos anteriores, si bien menos acentuado para los casos del error de validación y prueba. El error de validación oscila entre 0.0008 para 15 neuronas y 0.0016 para 20. Mientras el error de prueba multiplica su valor por tres al pasar de 10 a 45 neuronas.

En el caso del ajuste lineal, la red proporciona unos valores realmente excelentes con pendientes superiores a 0.992, ordenadas en el origen inferiores a 0.1 y coeficientes de regresión mayores a 0.995. Estos resultados junto con la evolución del error hacen pensar que no se está produciendo sobre ajuste al aumentar el número de neuronas, por otra parte el aumento tampoco mejora los resultados. Ante esto parece más adecuado usar las redes de menor tamaño.

Para mostrar la respuesta de la red se usa la de 25 neuronas en la capa oculta al ser la que muestra un menor error ponderado (Figura 5.144).

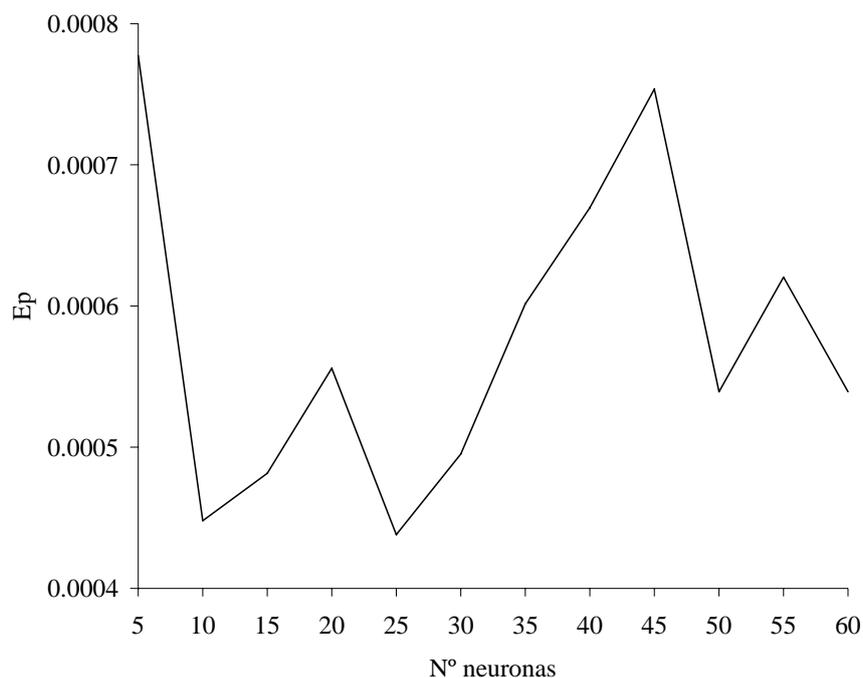


Figura 5.144 Error ponderado, RN4.

Las Figuras 5.145 y 5.146 recogen los resultados de un entrenamiento del tamaño de red elegido.

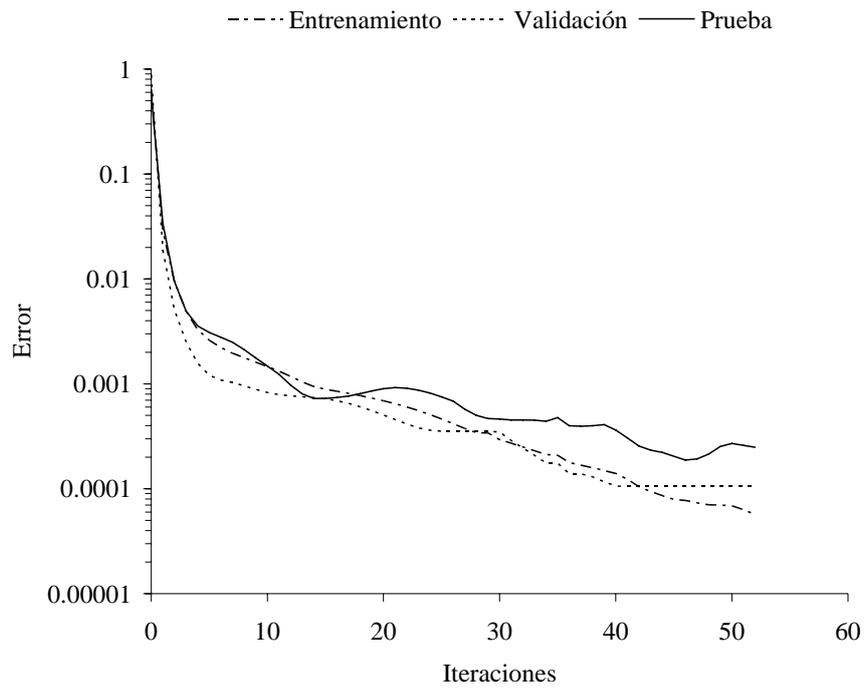


Figura 5.145 Evolución de los errores con el número de iteraciones, RN4 25 neuronas.

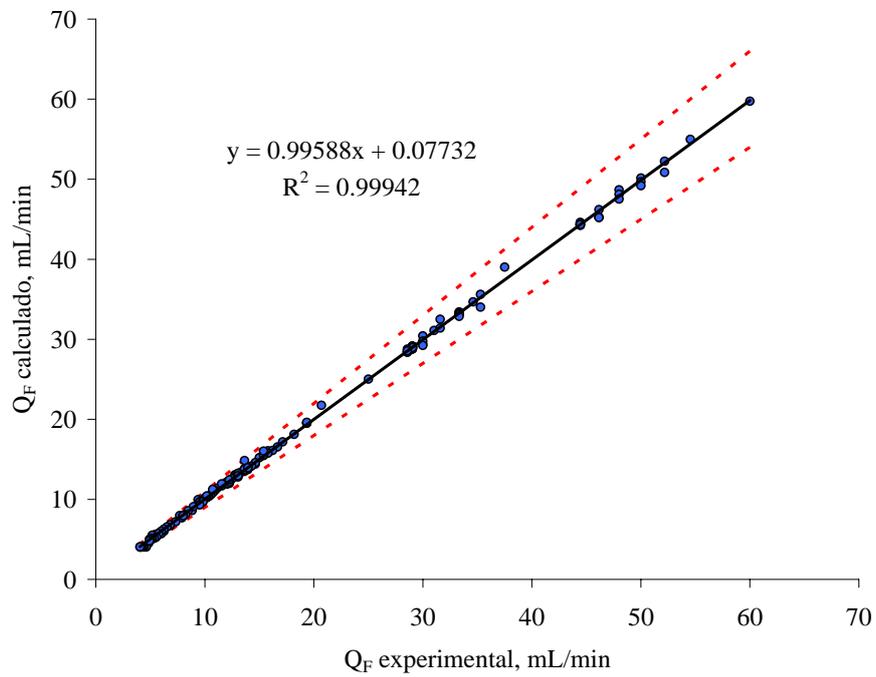


Figura 5.146 Q_F calculado frente a experimental, RN4 25 neuronas.

5.3.7. Red RN5: Binaria-transmisión observada.

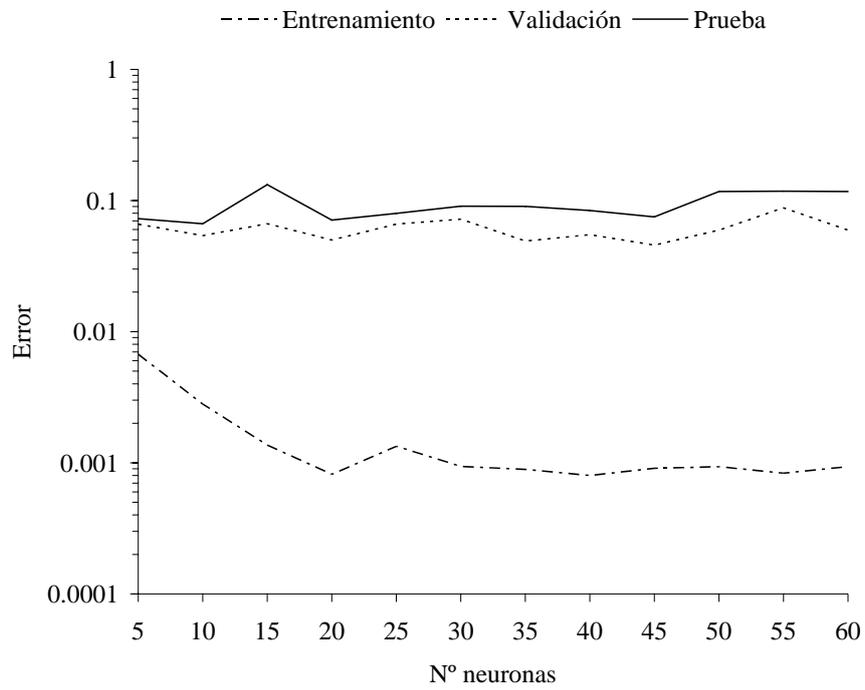


Figura 5.147 Errores de validación, entrenamiento y prueba, RN5.

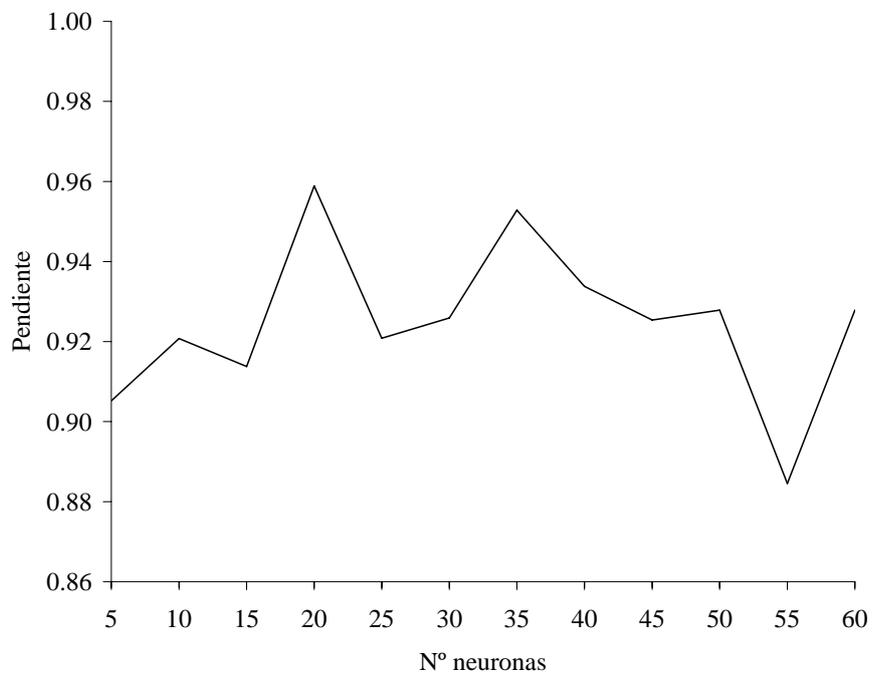


Figura 5.148 Valor de la pendiente del ajuste lineal, RN5.

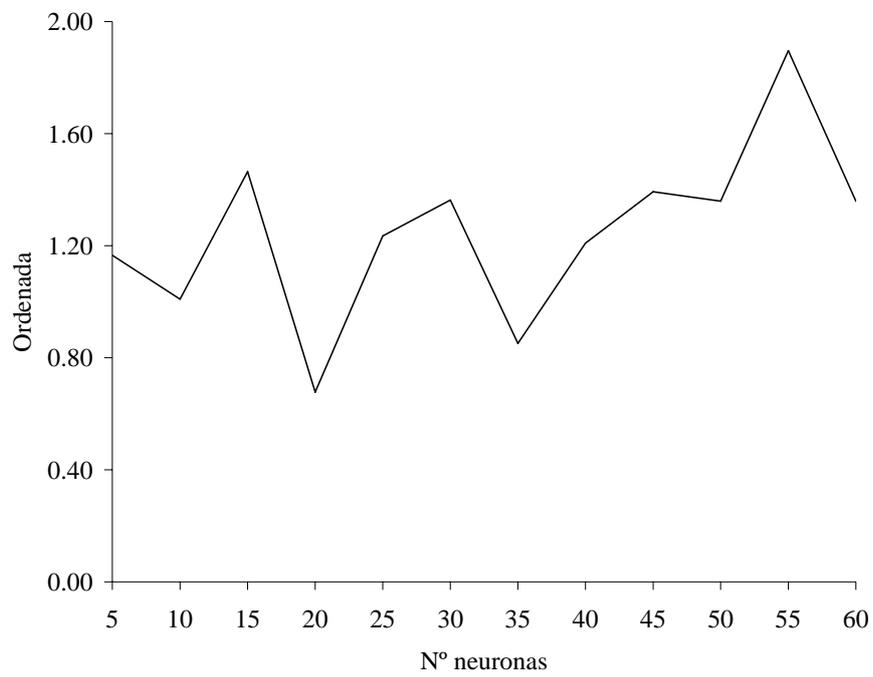


Figura 5.149 Valor de la ordenada en el origen del ajuste lineal, RN5.

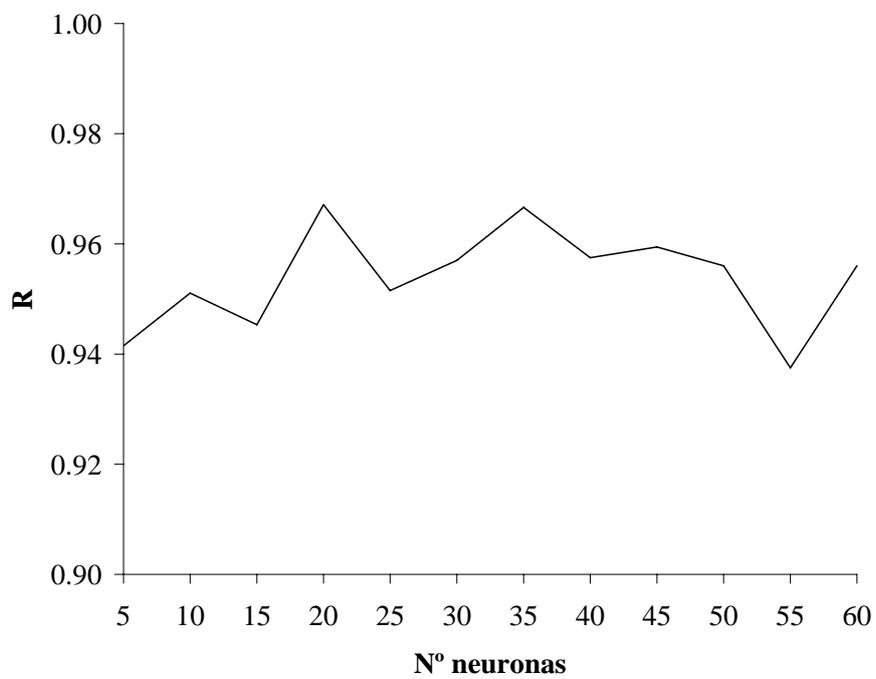


Figura 5.150 Valor del coeficiente de regresión del ajuste lineal, RN5.

Para esta red (Figuras 5.147 a 5.150), el comportamiento de los errores es muy parecido al de la red RN4. Los errores de validación y prueba no muestran ninguna tendencia clara con el aumento del número de neuronas. En cuanto al ajuste lineal, los resultados son buenos, siendo las redes de 20 y 35 neuronas las que mejores ajustes muestran con pendientes en torno a 0.96, ordenadas en el origen inferiores a 0.9 y coeficientes de regresión sobre 0.97.

A continuación se muestra el error ponderado para esta red (Figura 5.151). Se observa que la red con menor error es la que posee 20 neuronas en la capa oculta y será por tanto la utilizada para mostrar la respuesta de la red (Figuras 5.152 y 5.153).

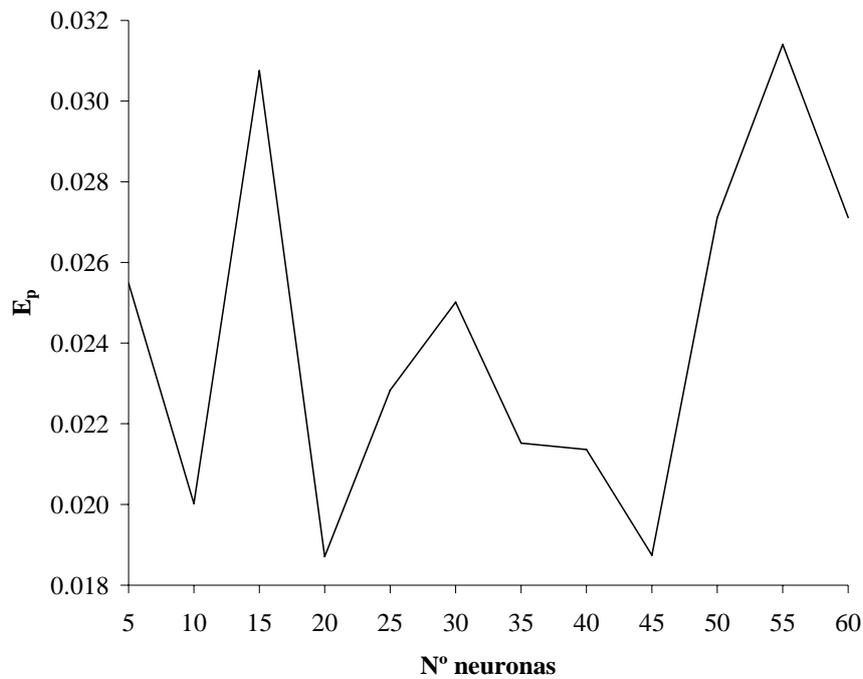


Figura 5.151 Error ponderado, RN5.

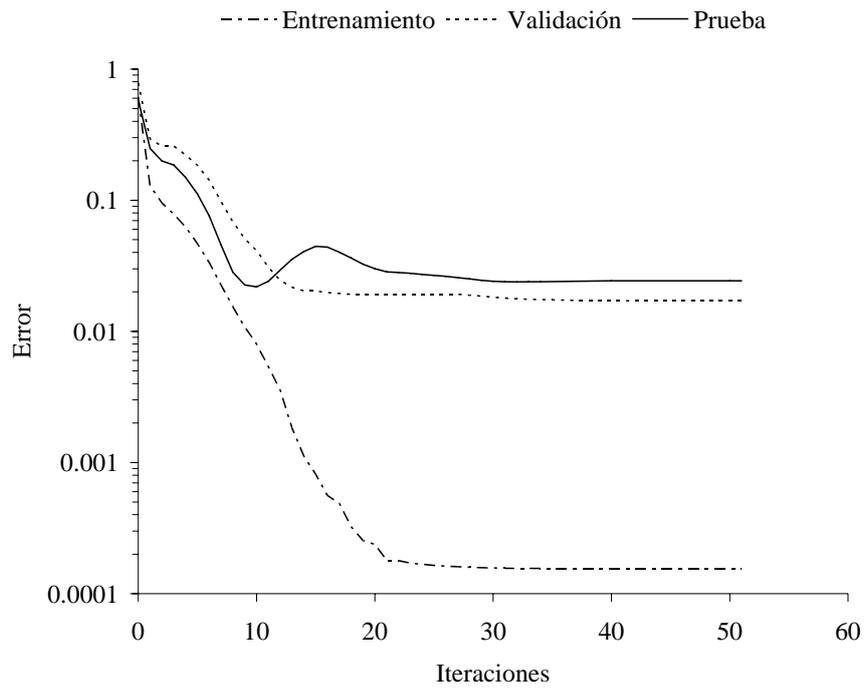


Figura 5.152 Evolución de los errores con el número de iteraciones, RN5 20 neuronas.

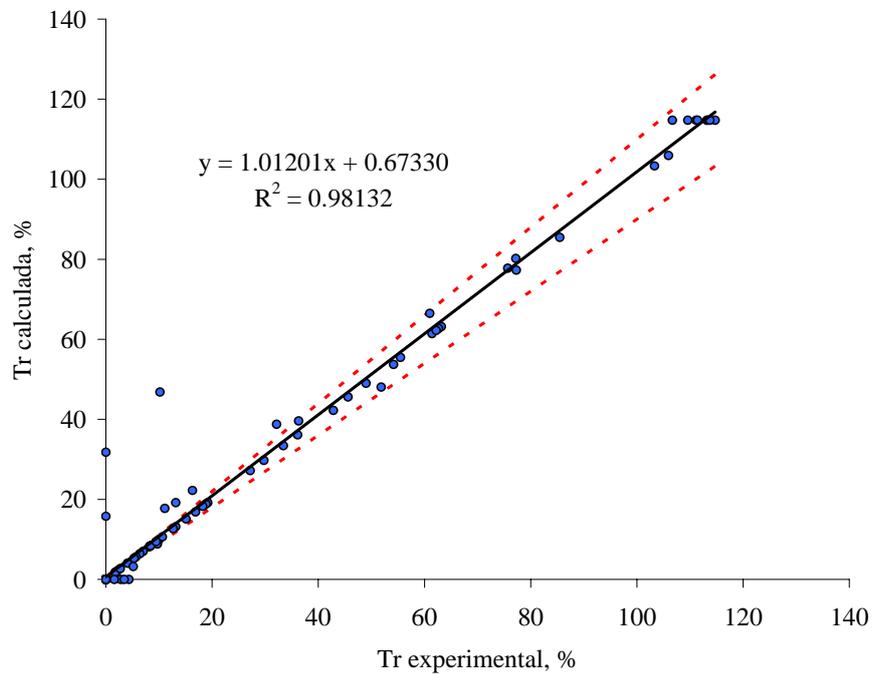


Figura 5.153 Tr calculado frente a experimental, RN5 20 neuronas.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de la investigación realizada permiten llegar a las siguientes conclusiones:

Los modelos de flujo utilizados muestran que la evolución temporal del flujo de filtrado no se puede explicar con un único mecanismo de colmatación predominante, sin embargo, la aplicación de modelos que combinan dos mecanismos de colmatación ha explicado dicha evolución de manera satisfactoria. Estos modelos combinados consideran que el descenso inicial del flujo que se produce en los instantes iniciales es consecuencia del bloqueo completo de poros y que el resto de la evolución del flujo se debe bien a un bloqueo estándar (si hay transmisión) o a la torta de filtración (si no hay transmisión).

El pH afecta a la fracción de poros bloqueables siendo ésta máxima en el punto isoeléctrico de la proteína. También afecta a la velocidad con la que se bloquea dicha fracción, observándose una mayor velocidad en el punto isoeléctrico de la proteína y en las zonas de pH donde membrana y proteína presentan carga contraria. Finalmente el efecto del pH sobre la adsorción es desigual en función de la proteína implicada. De forma general, se puede concluir que la adsorción es mayor en el punto isoeléctrico y que la existencia de interacciones electrostáticas de origen atractivo entre proteína y membrana también la favorecen.

La fuerza iónica afecta de diferente manera a la fracción de poros bloqueables en función de la proteína presente. En lo referente a la velocidad del proceso de bloqueo completo, la adición de sal no mostró efectos significativos en ninguno de los sistemas estudiados. No ocurre igual con la adsorción que se ve afectada al aumentar la fuerza iónica, aunque, de nuevo, el efecto de la fuerza iónica sobre la adsorción depende mucho de la proteína presente.

En lo referente al efecto del pH y la fuerza iónica en el fraccionamiento de mezclas de proteínas, se aprecia la existencia de unas condiciones óptimas para llevarlo a cabo atendiendo a valores de rendimiento y selectividad. Estas condiciones óptimas se han obtenido para valores de pH próximos al punto isoeléctrico de las proteínas implicadas y sin adición de sal.

La variación de la presión transmembrana no afecta a la fracción de bloqueo de poros ni a la velocidad con la que se produce el bloqueo, sin embargo, sí afecta a la adsorción, mostrando la existencia de un valor óptimo de presión que la minimiza. En cuanto al fraccionamiento, al igual que ocurría con el pH y la fuerza iónica, existen unas condiciones de presión transmembrana más favorables que coinciden con el óptimo desde el punto de vista de la adsorción.

La variación del caudal de retenido afecta a la adsorción mostrando que una velocidad tangencial baja fomenta la adsorción en la boca de los poros. Un aumento excesivo de la velocidad tangencial muestra efectos negativos sobre la cantidad de proteína transportada a través de la membrana.

Los resultados obtenidos reflejan la enorme complejidad de la filtración de proteínas que obliga a realizar un análisis particular de cada sistema e impide generalizar. Esta complejidad sugiere la utilización de redes neuronales artificiales para el modelado de la transmisión y el flujo. Se han planteado 5 redes neuronales para modelar tanto los sistemas unitarios como el binario. En todos los casos el modelado ha tenido éxito, empleando para ello una red con una única capa oculta y el algoritmo de aprendizaje de Levenberg-Marquardt.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbas A y Al-Bastaki N (2005) Modelling of an RO water desalination unit using neural networks. *Chem. Eng. J.* 114, 139-143.

Abdulbary A F, Lai L L, Al-Gobasi D M K y Husain A (1993). Experience of using the neural network approach for identification of MSF desalination plants. *Desalination*. 92, 323-331.

Abrabri M, Larbot A, Persia M, Sarrazin J, Rafia M, Cot L. (1998). Potassium titanium phosphate membranes: surface properties and application to ionic solution filtration. *J. Membrane Sci.* 139, 275-283.

Agashichev S P (2001). Modelling temperature and concentration polarization phenomena in ultrafiltration of non-Newtonian fluids under non-isothermal conditions. *Sep. Purif. Technol.* 25, 355-368.

Almécija M C, Ibáñez R, Guadix A y Guadix E M (2007). Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *J. Membrane Sci.* 288, 28-35.

Aydiner C, Demir I y Yildiz E (2005). Modeling of flux decline in crossflow microfiltration using neural networks: the case of phosphate removal. *J. Membrane Sci.* 248, 53-60.

Babu P R y Gaikar V G (2001). Membrane characteristics as determinant in fouling of UF membranes. *Sep. Purif. Technol.* 24, 23-34.

Balakrishnan M, Agarwal G P y Cooney C L (1993). Study of protein transmission through ultrafiltration membranes. *J. Membrane Sci.* 85, 111-128.

Barba D, Evangelista F, Wang H y Spera D (1997). The effects of osmotic pressure and fouling during a concentration process of BSA solutions by ultrafiltration. *Desalination* 114, 183-188.

Bellara S R y Cui Z F (1998). A Maxwell-Stefan approach to modelling the cross-flow ultrafiltration of protein solutions in tubular membranes. *Chem. Eng. Sci.* 12, 2153-2166.

Bowen W R, Calvo J I y Hernández A (1995). Steps of membrane blocking in flux decline during protein microfiltration. *J. Membrane Sci.* 101, 153-165.

Bowen W R, Mongruel A y Williams P M (1996). Prediction of the rate of cross-flow ultrafiltration of colloids with concentration-dependent diffusion coefficient and viscosity – theory and experiment. *Chem. Eng. Sci.* 56, 3083-3099.

Bowen W R, Jones M G y Yousef H N S (1998 a). Prediction of the rate of crossflow membrane ultrafiltration of colloids: A neural network approach. *Chem. Eng. Sci.* 53, 3793-3802.

Bowen W R, Jones M G y Yousef H N S (1998 b). Dynamic ultrafiltration of proteins – A neural network approach. *J. Membrane Sci.* 146, 225-235.

Bowen W R, Jones M G, Welfoot J S y Yousef H N S (2000). Predicting salt rejections at nanofiltration membranes using artificial neural networks. *Desalination* 129, 147-162.

Bowen W R y Williams P M (2001). Prediction of the rate of cross-flow membrane Ultrafiltration: A colloidal interaction approach. *Chem. Eng. Sci.* 51, 4321-4333.

Bramaud C, Aimar P y Daufin G (1997). Optimization of a whey protein fractionation process based on the selective precipitation of α -lactalbumin. *Lait* 77, 411-423.

Burns D G y Zydney A L (1999). Effect of solution pH on protein transport through ultrafiltration membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 27-37.

Burns D G y Zydney A L (2001). Contributions to electrostatic interactions on protein transport in membrane systems. *AICHE J.* 47, 1101-114.

Cayot P y Lorient D. Structure-function relationships of whey proteins en Food proteins and their applications, pp.225-256. Marcel Dekker (Ed). New York, 1977.

Chan R, Chen V y Bucknall M P (2002). Ultrafiltration of protein mixtures: measurement of apparent critical flux, rejection performance, and identification of protein deposition. *Desalination* 146, 83-90.

Chaufer B y Rabiller-Baudry M (2001). Role of electrophoretic mobility of protein on its retention by an ultrafiltration membrane comparison to chromatography mechanisms. *J. Chromatogr. B.* 753, 3-16.

Cheang B y Zydney A L (2003). Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin using membrane ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 201-209.

Cheang B y Zydney A L (2003). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *J. Membrane Sci.* 231, 159-167.

Chen H y Kim A S (2006). Prediction of permeate flux decline in crossflow membrane filtration of colloidal suspension: a radial basis function neural network approach. *J. Membrane Sci.* 192, 415-428.

Chellan S (2005). Artificial neural network model for transient crossflow microfiltration of polydispersed suspensions. *J. Membrane Sci.* 258, 35-42.

Cherkasov A N y Polotsky A E (1996). The resolving power of ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 110, 79-82.

Cheryan M. Ultrafiltration handbook. Technomic Publishing. 1998.

Cheryan M. Ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic Publishing. 1998.

Clark W M, Bamsal A, Sontakke M y Ma Y H (1991). Protein adsorption and fouling in ceramic ultrafiltration membranes. *J. Membrane Sci.* 55, 21-38.

Cui Z F, Bellara S R, Homewood P (1997). Airlift crossflow membrane filtration - a feasibility study with dextran ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 128, 83-91.

Curcio S, Scilingo G, Calabrò V y Iorio G (2005 a). A theoretical analysis of transport phenomena in membrane concentration of liquorice solutions: A FEM approach. *J. Food Eng.* 71, 252-264.

Curcio S, Scilingo G, Calabrò V y Iorio G (2005 b). Ultrafiltration of BSA in pulsating conditions: an artificial neural networks approach. *J. Membrane Sci.* 246, 235-247.

Darnon E, Lafitte L, Belleville M P, Rios G M (2002). A global approach of ultrafiltration of complex biological solutions. *Sep. Purif. Technol.* 26, 283-293.

De la Casa E J (2006). Estudio de las interacciones proteína-membrana en los procesos de filtración tangencial. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

De la Casa E J, Guadix A, Ibáñez R y Guadix E M (2007). Influence of pH and salt concentration on the cross-flow ultrafiltration of BSA through a ceramic membrane. *Biochem. Eng. J.* 33, 110-115.

Delgrange N, Cabassud C, Cabassud M, Durand-Bourlier L y Lainé J M (1998). Neural networks for prediction of Ultrafiltration transmembrana pressure - application to drinking water production. *J. Membrane Sci.* 150, 111-123

Demuth H y Beale M (2002) *Neural network toolbox: For use with MATLAB. User's guide version 4.* The Math Works, inc.

Dornier M, Decloux M, Trystran G y Lebert A (1995). Dynamic modeling of crossflow microfiltration using neural networks. *J. Membrane Sci.* 98, 263-273.

Elgar D F, Norris C S, Ayers J S, Pritchard M, Otter D E y Palmano K P (2000). Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropetide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *J. Chromatogr. A.* 878, 183-196

El-Hawary M E (1993). Artificial neural networks and possible applications to desalination. *Desalination.* 92, 125-147.

Fane A G, Fell C J D y Suki A (1983). The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. *J. Membrane Sci.* 16, 195-210.

Field R W, Wu D, Howell J A y Gupta B B (1995). Critical flux concept for microfiltration fouling. *J. Membrane Sci.* 100, 259-272.

Filipe C D M y Ghosh R (2005). Effects of protein-protein interaction in ultrafiltration based fractionation processes. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 678-687.

Fogolari F, Ragona L, Licciardi S, Romagnoli S, Michelutti R U y Molinari H. Electrostatic properties of Bovine β -lactoglobulin (2000). *Proteins: Structure, Functions and Genetics.* 39, 317-330.

Ghosh R y Cui Z F (1998). Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane pretreatment. *J. Membrane Sci.* 139, 17-28.

Ghosh R y Cui Z F (2000). Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. *J. Membrane Sci.* 167, 47-53.

Ghosh R, Sudarshana S y Cui Z F (2000). Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. *Biochem. Eng. J.* 6, 19-24.

Ghosh R (2003). Protein bioseparation using ultrafiltration: theory, applications and new developments. Imperial College Press/World Scientific Publishing Pte Ltd. London, Reino Unido.

Grangeon A, Lescoche P (2000). Flat ceramic membranas for the treatment of dairy products: comparison with tubular ceramic membranas. *Lait.* 80, 5-14.

Grund G, Campbell W R, Bernard R G (1992). Protein Type effects on steady-state crossflow membrane ultrafiltration fluxes and protein transmission. *J. Membrane Sci.* 70, 177-192.

Hagan M T y Menhaj M B (1994). Training feedforward networks with the Marquardt algorithm. *IEEE Trans. Neural Networks.* 5, 989-993.

Hamachi M, Cabassud M, Davin A y Mietton Peuchot M (1999). Dynamic modelling of crossflow microfiltration of bentonite suspension using recurrent neural networks. *Chem. Eng. Process.* 38, 203-210.

Heeboll-Nielsen A, Justesen S F L y Thomas O R T (2004). Fractionation of whey proteins with high-capacity superparamagnetic ion-exchangers. *J. Biotechnol.* 113 247-262.

Hermia J (1982). Constant pressure blocking filtration laws - application to power-law non-Newtonian fluids. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 60, 183-187.

Hinrichs J (2004). Fractionation of whey proteins by ultra-high pressure. *Bull. Int. Dairy Federat.* 389, 24-28.

Ho C y Zyney A L (2000). A combined pore blockage and cake filtration model for protein fouling during microfiltration. *J. Colloid Interface Sci.* 232, 389-399.

Howell J A, Wu D y Field R W (1999). Transmission of bovine serum albumin under controlled flux-ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 152, 117-127.

Huisman I H, Prádanos P y Hernández A (2000). The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 179, 79-90.

Iritani E, Mukai Y y Murase T (1997). Separation of binary protein mixtures by ultrafiltration. *Filtr. Separat.* 34, 967-973.

Jaffrin M Y, Ding L H, Couvreur C y Khari P (1997). Effect of ethanol on ultrafiltration of bovine albumin solutions with organic membranes. *J. Membrane Sci.* 124, 233-241

Jones K L y O'Melia C R (2000). Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. *J. Membrane Sci.* 165, 31-46.

Jones K L y O'Melia C R (2001). Ultrafiltration of protein and humic substances: effect of solution chemistry on fouling and flux decline. *J. Membrane Sci.* 193, 163-173.

Kanal K M, Fullerton G D y Cameron I L (1994). A study of the molecular sources of nonideal osmotic pressure of bovine serum albumin solutions as a function of pH. *Biophysical Journal* 66, 153-160.

Kanani D M, Ghosh R y Filipe C D M. A novel approach for high-resolution protein-protein separation by ultrafiltration using a dual-facilitating agent. *J. Membrane Sci.* 243 (2004) 223-228.

Kermani B G, Schiffman S S y Nagle H T (2005). Performance of the Levenberg-Marquardt neural network training method in electronic nose applications. *Sensors and Actuators B.* 110, 13-22.

Ko M K, Pellegrino J J, Nassimbene R y Marko P (1993). Characterization of the adsorption-fouling layer using globular proteins on ultrafiltration membranes. *J. Membrane Sci.* 76, 101-120.

Levi V y González Flecha F L (2002). Reversible fast-dimerization of bovine serum albumin detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1599, 141-148.

Lucas D, Rabiller-Baudry M, Michel F y Chaufer B (1998). Role of physico-chemical environment on ultrafiltration of lysozyme with modified inorganic membrane. *Colloids Surf. A*, 136, 109-122.

Luque S. Introduction and Basic Principles of Membrana Processes en *Membrane Applications in the food & Dairy Industry*, pp.3-22. Servicio de Publicaciones. Universidad de Oviedo (Ed). Oviedo, 1999.

Magueijo V, Pinho N, Geraldes V (2002). Numerical and experimental study of mass transfer in lysozyme ultrafiltration. *Desalination* 145, 193-199.

Magueijo V, Semião V y de Pinho M N (2005). Fluid flow and mass transfer modelling in lysozyme ultrafiltration. *Int. J. Heat Mass Transfer* 48, 1716-1726.

Marshall A D, Munro P A, Trägårdh G (1997). Influence of permeate flux on fouling during the microfiltration of β -lactoglobulin solutions under cross-flow conditions. *J. Membrane Sci.* 130, 23-30.

Martínez S (1999). Presentación de las membranas, equipos y modos de funcionamiento. Universidades de Santiago. Aula de productos lácteos. II Curso de filtración tangencial en industrias lácteas.

Mathews K C, van Holde K E y Ahern K G. *Biochemistry*. Addison Wesley Longman, 2000.

Mehta A y Zydney A L (2006). Effect of membrane charge on flow and protein transport during ultrafiltration. *Biotechnol. Progr.* 22, 484-492.

Menon M y Zydney A L (1999). Effect of ion binding on protein transport through ultrafiltration membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 298-307.

Metsämuuronen S y Nyström M (2005). Critical flux in cross-flow ultrafiltration of protein solutions. *Desalination*. 175, 37-47.

Mhurchú J N y Foley G (2006). Dead-end filtration of yeast suspensions: Correlating specific resistance and flux data using artificial neural networks. 281, 325-333.

Mingard D, Glass D H (2001). Fouling during the cross-flow ultrafiltration of proteins: a mass-transfer model. *J. Membrane Sci.* 186, 133-143.

Millesime L, Ameil C y Chaufer B (1994). Ultrafiltration of lysozyme and bovine serum albumin with polysulfone membranes modified with quaternized polyvinylimidazole. *J. Membrane Sci.* 89, 223-234.

Millesime L, Dulieu J y Chaufer B (1995). Protein retention with modified and unmodified inorganic ultrafiltration membranes: model of ionic strength controlled retention. *J. Membrane Sci.* 108, 143-159.

Moon Y U, Curtis R A, Anderson C O, Blanch H W y Prausnitz J M (2000). Protein-Protein interactions in aqueous ammonium sulfate solutions. Lysozyme and Bovine Serum Albumin (BSA). *J. Solution Chem.* 29, 699-717.

Müller C H, Agarwal G P, Melin Th y Wintgens Th (2003). Study of ultrafiltration of a single and binary protein solution in a thin spiral channel module. *J. Membrane Sci.* 227, 51-69.

Mullet M, Fievet P, Szymczyk A, Foissy A, Reggiani J C y Pagetti J (1999). A simple and accurate determination of the point of zero charge of ceramic membranes. *Desalination.* 121, 41-48.

Mulvihill D M, Donovan M (1987). Whey proteins and their thermal denaturation, A review. *Irish J. Food Sci. Technol.* 11, 43-75.

Nesmelova I y Fedetov V (1998). Self-diffusion and self-association of lysozyme molecules in solution. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2, 311-316.

Niemi H, Bulsari A y Palosaari S (1995). Simulation of membrane separation by neural networks. *J. Membrane Sci.* 102, 185-191.

Noordman T R, Ketelaar T H, Donkers T H y Wesselingh J A (2002). Concentration and desalination of protein solutions by ultrafiltration. *Chem. Eng. Sci.* 57, 693-703.

Nyström M, Pihlajamäki A y Ehsani N (1994). Characterization of ultrafiltration membranes by simultaneous streaming potential and flux measurements. *J. Membrane Sci.* 87, 245-256.

Nyström M, Aimar P, Luque S, Kulovaara M y Metsämuuronen S (1998). Fractionation of model proteins using their physicochemical properties. *Colloids Surf. A*, 138, 185-205.

Oppenheim S F, Phillips C B y Rodgers V G J (1996). Analysis of initial protein surface coverage on fouled ultrafiltration membranes. *J. Colloid Interf. Sci.* 184, 639-651.

Outinen M, Tossavainen O, Tupasela T, Koskela P, Koskinen H, Rantamäki P, Syväoja E L, Antila P y Kankare V (1996). Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes. *LWT-Food Sci. Technol.* 29, 411-417.

Palacio L (1999). Caracterización estructural y superficial de membranas microporosas. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid.

Palacio L, Calco J I, Prádanos P, Hernández A, Avisasen P y Nyström M (1999). Contact angles and external protein adsorption onto UF membranes. *J. Membrana Sci.* 152, 189-201.

Palmano K P, Elgar D F (2002). Detection and quantification of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *J. Chromatogr. A.* 947, 307-311.

Palosaari S y Bulsari A (1995). A study of optimization techniques for neural networks. *Proceedings of the Annual Conference of Japanese Neural Networks Society, Iizuka, July*, 199-200.

Paris J, Guichardon P and Charbit F (2002). Transport phenomena in ultrafiltration: a new two-dimensional model compared with classical models. *J. Membrane Sci.* 207, 43-58.

Perkins T W, Saksena S y Van Reis R (1999). A dynamic film model for ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 158, 243-256.

Persson A, Jönsson A S y Zacchi G (2003). Transmisión of BSA during cross-flow microfiltration: influence of pH and salt concentration. *J. Membrane Sci.* 223, 11-21.

Piron E, Latrille E y René F (1997). Application of artificial neural networks for crossflow microfiltration modelling: “black box” and semi-physical approaches. *Computers chem. Engng.* 21, 1021-1030.

Prádanos P, Hernández A, Calvo J I, Tejerina F (1996). Mechanisms of protein fouling in cross-flow UF through an asymmetric inorganic membrane. *J. Membrane. Sci.* 114, 115-126.

Pujar N S y Zydney A L (1994). Electrostatic and electrokinetic interactions during protein transport through narrow pore membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 33, 2473-2482.

Pujar N S y Zydney A L (1998). Electrostatic effects on protein partitioning in size exclusion chromatography and membrane ultrafiltration. *J. Chromatogr. A* 796, 229-238.

Rabiller-Baudry M, Chaufer B, Aimar P, Bariou B y Lucas D (2000). Application of a convection-diffusion-electrophoretic migration model to ultrafiltration of lysozyme at different pH values and ionic strengths. *J. Membrane Sci.* 179, 163-174.

Rabiller-Baudry M, Chaufer B, Lucas D y Michel F (2001). Ultrafiltration of mixed protein solutions of lysozyme and lactoferrin: role of modified inorganic membranes and ionic strength on the selectivity. *J. Membrane Sci.* 184, 137-148.

Rao S y Zydney A L. Controlling protein transport in ultrafiltration using small charged ligands. *Biotechnol. Bioeng.* 91 (2005) 733-742.

Razavi S M A, Mousavi S M y Mortazavi S A (2003 a). Dynamic prediction of milk ultrafiltration performance. A neural network approach. *Chem Eng Sci.* 58, 4185-4195.

Razavi S M A, Mortazavi A y Mousavi M (2003 b). Dynamic modelling of milk ultrafiltration by artificial neural network. *J. Membrane Sci.* 220, 47-58.

Remard D, Lefebvre J, Griffin M C A y Griffin W G (1998). Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 41-49.

Ricq L, Pierre A, Reggiani J C, Zaragoza-Piqueras S, Pagetti J y Daufin G (1996). Effects of proteins on electrokinetic properties of inorganic membranes during ultra- and micro-filtration. *J. Membrane Sci.* 114, 27-38.

Ricq L, Narçon S, Reggiani J C y Pagetti J (1999). Streaming potential and protein transmission ultrafiltration of single proteins and proteins in mixture: β -lactoglobulin and lysozyme. *J. Membrane Sci.* 156, 81-96.

Riedmiller M y Braun H (1993). A direct adaptive method for faster backpropagation learning: The RPROP algorithm. *Proceedings of the IEEE International Conference on Neural Networks.* 586-591.

Roxby R y Tanford C (1971). Hydrogen Ion Titration Curve of Lysozyme in 6 M Guanidine Hydrochloride. *Biochemistry.* 10, 3348-3352.

Saksena S y Zydney A L (1994). Effects of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins (igG) by selective filtration. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 960-968.

Saksena S y Zydney A L (1997). Influence of protein-protein interactions on bulk mass transport during ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 125, 93-108.

Schlatterer B, Baeker R y Schlatterer K (2004). Improved purification of β -lactoglobulin from acid whey by means of ceramic hydroxyapatite chromatography with sodium fluoride as a displacer. *J. Chromatogr. B.* 807, 223-228.

Scott K y Hughes R. *Industrial Membrane Separation Technology.* Chapman & Hall 1996.

Shetty G R, Malki H y Cellam S (2003). Predicting contaminant removal during municipal drinking water nanofiltration using artificial neural networks. *J. Membrane Sci.* 212, 99-112.

Shetty G R y Cellam S (2003). Predicting membrane fouling during municipal drinking water nanofiltration using artificial neural networks. *J. Membrane Sci.* 217, 69-86

Shukla R, Balakrishnan M y Agarwal G P (2000). Bovine serum albumin-hemoglobin fractionation: significance of ultrafiltration system and feed solution characteristics. *Bioseparation* 9, 7-19.

Sirkar K K (2001). Application of membrane technologies in the pharmaceutical industry. *Innovation in pharmaceutical manufacturing: a symposium honouring Dr. Ed Pau.. Nevada, EEUU.*

Sourirajan S. *Reverse Osmosis and Synthetic Membranes.* National Research Council. 1977.

Teng M, Lin S, Wu C y Juang R (2006). Factors affecting selective rejection of proteins within a binary mixture durin cross-flow ultrafiltration. *J. Membrane Sci.* 281, 103-110.

Turhan K N y Etzel M R (2004). Whey protein isolate and α -lactalbumin recovery from lactic acid whey using cation-exchange chromatography. *J. Food Sci.* 69, 66-70.

Van Den Berg G B y Hanemaaijer J H (1987). Ultrafiltration of protein solutions; the role of protein association in rejection and osmotic pressure. *J. Membrane Sci.* 31, 307-320.

Van Reis R, Gadam S, Frautschy L N, Orlando S, Goodrich E M, Saksena S, Kuriyel R, Simpson C M, Pearl S y Zydney A L (1997). High performance tangential flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 71-82.

Van Reis R y Zydney A L (2001). Membrane separations in biotechnology. *Curr. Opin. Biotech.* 12, 208-211.

Velasco C, Ouammou M, Calvo J I y Hernández A (2003). Protein fouling in microfiltration: deposition mechanism as a function of pressure for different pH. *J. Colloid Interf. Sci.* 266, 148-152.

Verheul M, Pedersen J S, Roefs S, de Kruif K G (1999). Association Behavior of Native β -Lactoglobulin. *Biopolimers.* 49, 11-20.

Vilker V L , Colton C K y Smith A (1981). The osmotic pressure of concentrated protein solutions: effect of concentration and pH in saline solutions of bovine serum albumin. *J. Colloid Interf. Sci.* 79, 548-566.

Wesselingh J A y Vonk P (1995). Ultrafiltration of a large polyelectrolyte. *J. Membrane Sci.* 99, 21-27.

Yakup M, Bayramoglu G (2005). Purification of lysozyme from egg by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. *Process Biochem.* 40, 1433-1442.

Yen HM, Dong J H y Shi M Y (2004). Momentum balance analysis of flux and pressure declines in membrane ultrafiltration along tubular modules. *J. Membrane Sci.* 241, 335-345.

Zeman L J y Zydney A L. *Microfiltration and ultrafiltration. Principles and Applications.* Marcel Dekker, Inc. 1996.

Zydney A L (1992). Concentration effects on membrane sieving: development of a stagnant film model incorporating the effects of solute-solute interactions. *J. Membrane Sci.* 68, 183-190.

Zydney A L, Aimar P, Meireles M, Pimbley J M y Belfort G (1994). Use of the long-normal probability function to analyze membrane pore size distributions: Functional forms and discrepancies. *J. Membrane Sci.* 91, 293-298.

Zydney A L (1998). Protein separations using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation. *Int. Dairy J.* 8, 243-250.

Zydney A L y van Reis R (2001). High performance tangential flow filtration, in: W. K. (Ed.), *Membrane Separations in Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, pp.277-298.

Zulkali M M D, Ahmad A L, Derek C J C (2005). Membrane application in proteomic studies: Preliminary studies on the effect of pH, ionic strength and pressure on protein fractionation. *Desalination.* 179, 381-390.

SUMMARY OF THE THESIS

STUDY OF THE ULTRAFILTRATION OF MODEL PROTEINS WITH CERAMIC MEMBRANES

1. INTRODUCTION

Protein fractionation is an important field for the bioprocessing industry, so the development of effective isolation processes is of high scientific and industrial interest. However, traditional methods used in the laboratory scale have not been implemented at industrial scale owing to their difficult scale-up, high cost and low performance. The use of membranes for protein fractionation has generated a great expectation during the last years because they present significant advantages with respect to others techniques, namely, use of mild operation conditions, absence of contaminants in the final product and easy scale-up. Here, selectively permeable membranes and pressure as usual driving force let some proteins pass through the barrier easier than others which are rejected.

Since the development of the high performance tangential flow filtration in the late 90's, several strategies like an appropriate selection of pH and ionic strength allow the fractionation of protein mixtures even with similar molecular weights. In this technique, the differences in hydrodynamic volume of the proteins are maximised, while the electrostatic interactions between protein and membrane are controlled.

The main objective of this doctoral thesis was to study the applicability of high performance tangential flow filtration in protein fractionation, specifically in the following terms:

- **Experimental study with model proteins:** Three proteins with different molecular weight and isoelectric point were selected: bovine serum albumin (BSA), β -lactoglobulin and lysozyme. The filtration of single protein solutions and binary mixtures were studied as a function of the molecular weight cut off of the membrane, pH, ionic strength, retentate flow and transmembrane pressure.
- **Analysis of electrostatic and steric interactions in the systems:** Experimental data were discussed taking into account the point of zero charge of the membrane and the isoelectric point of the proteins in order to understand the mechanisms which take place.
- **Development of a mathematical model for the prediction of the time evolution of the filtration process:** Artificial neural networks were employed for this purpose as empirical modelling system. This computational technique has been successfully applied to other operations in chemical engineering.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Proteins

The proteins selected for this research work were BSA (monomer molecular weight 69 kDa, isoelectric point 4.9), β -lactoglobulin (monomer molecular weight 18.3 kDa, isoelectric point 5.2) and lysozyme (monomer molecular weight 14.3 kDa, isoelectric point 10.7) and. They were obtained from Sigma (St. Louis MO, USA).

2.2. Membranes

The ceramic membranes employed were Inside Céram 25 3-channel modules from Tami Industries (Nyons, France). These membranes are tubular with a length of 25 cm and a surface area of 94 cm². The support is made of aluminium, titanium and zirconium oxides, whereas titanium oxide is used for the filtering layer. They can be used at extreme pH conditions, high temperatures (including sterilisation) and up to 10 bar of pressure. The molecular weight cut off employed ranged between 50 and 300 kDa.

The filtering layer of the inorganic membranes has surface sites that can be ionised in an aqueous solution. This gives them an amphoteric behaviour. As a result, they present an excess of positive or negative charges as a function of pH. A characteristic parameter of these membranes is the pH value called point of zero charge, in which the membrane has no net charge. The point of zero charge of the membranes employed in this research work was 7.0.

2.3. Experimental rig

The experimental rig (Figure 1) consisted of a 1 L feed tank immersed in a thermostatic bath at 30 °C (1), a precision positive displacement recirculation pump (Procon, Murfreesboro TN, USA) (2), a membrane housing (4), one back-pressure valve (6), two manometers located before and after the membrane (3, 5), a flowmeter (Badger Meter, Milwaukee WI, USA) (7) and a temperature probe (8).

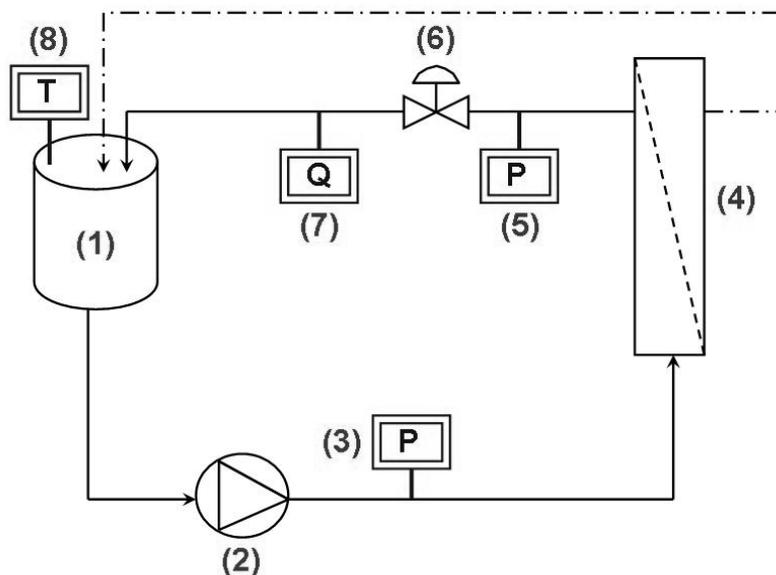


Figure 1

2.4. Ultrafiltration experiments

Prior to operation, the membrane was conditioned by recirculation of Milli-Q water at 30 °C and working pH for 10 min. Then, 1 L of protein solution was prepared with a total protein concentration of 0.25 g/L using Milli-Q water.

In order to study the influence of pH, this variable was adjusted adding HCl or NaOH in the range 3-12. To determine the effect of the ionic strength, the pH was set to the isoelectric point and the ionic strength was adjusted adding NaCl in the range 0-20 mM. For proteins mixtures, the effects of retentate flow (300-500 L/h) and transmembrane pressure (0.5-1.5 bar) was investigated.

The cross-flow ultrafiltration experiments were performed at 30 °C in the total recycle mode, i.e. both retentate and permeate were returned to the feed tank. Permeate flow and protein concentrations (both at the retentate and filtrate sides) were monitored along the experiments, which were followed for 60 min.

The membranes were regenerated after use by performing a cleaning procedure as follows: (a) initial rinse with demineralised water, (b) total recirculation of a solution of 20 g/L NaOH + 2 g/L SDS at 50 °C for 60 min, (c) final rinse with demineralised water until neutrality. If necessary, a further recirculation of a 2.5 mL/L nitric acid (60%) solution at 50 °C for 10 min was added.

In this research work, the following 4 protein-membrane systems were studied in detail . First, a 50 kDa membrane was employed to filter lysozyme. Then, the cut-off was increased to 300 kDa. In third place, β -lactoglobulin and a 300 kDa membrane were employed. Finally, the binary mixture β -lactoglobulin and BSA was ultrafiltered through 300 kDa.

2.5. Analytical methods

Samples from filtrate and retentate of single protein solutions were analyzed by UV spectrophotometry with detection at 280 nm in order to determine protein concentration.

For proteins mixtures, individual protein concentrations were determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RPHPLC). The HPLC system (Waters, Milford MA, USA) consisted of an Alliance Separation Module 2690 interfaced with a M-474 absorbance detector and a Millennium data acquisition and manipulation system. A 1-mL Resource RPC column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was operated at room temperature at a flow-rate of 1 mL/min. Solvent A was 0.1% v/v trifluoroacetic acid (TFA) in Milli-Q water and solvent B was 0.09 % v/v TFA, 90% v/v acetonitrile in Milli-Q water. Detection was by absorbance at 214 nm. Prior to RP-HPLC analysis, all samples were filtered through 0.22 μ m nylon syringe filters and buffers were filtered through 0.45 μ m Durapore membrane filters (Millipore, Bedford MA, USA) and degassed.

2.6. Artificial neural networks

The implementation of the artificial neural network modelling was done by employing the Matlab 6.5 Neural Networks Toolbox. Feedforward networks with a single hidden layer including a number of neurons between 5 and 60 were tested. The sigmoid function was selected as transfer function in the hidden layer, while for the output layer, a saturated symmetric lineal function was used. In order to minimise the mean squared error between experimental and predicted values, the networks were trained with the Levenberg-Marquardt algorithm, allowing a maximum of 10000 iterations.

Early stopping was employed for improving generalization. After normalization, the available data was divided into three subsets: training set (70 %), validation set (15 %) and test set (15 %). The training set is used for computing the gradient and updating the network weights and biases. The validation error is used to avoid overfitting because when the networks begins to overfit the data, this error will typically begin to rise. When the validation error increases for a specified number of iterations (10), the training is stopped,

and the weights and biases at the minimum of the validation error are returned. The test set error is not used during the training, but it is used to evaluate the predictive capability of the network. This error is also useful to know if a good division of the data set has been done.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Experimental data processing

Experiments were monitored by measuring filtrate flow (Q_F), retentate protein concentration (C_R) and filtrate protein concentration (C_{Fa}). It is necessary to process this data in order to obtain secondary data for a better understanding of the entire ultrafiltration process. Subsequently, the calculation of new variables was performed as follows:

- Observed transmission: $Tr(\%) = \frac{C_{Fa}}{C_R} \cdot 100$
- Relative filtrate flows and fluxes: $\frac{Q_F}{Q_{F0}} = \frac{J_F}{J_{F0}}$, calculated with respect to initial values.
- Filtrate volume: $V_F = \int_0^t Q_F dt$, which is calculated by numerical integration up to the final filtration time (t).
- Filtrate concentration: $C_F = \frac{C_{Fa}}{1 - \exp\left(-\frac{V_F}{V_{CF}}\right)}$, which is affected by the mixture produced in the volume of the filtrate chamber (V_{CF}).
- Mass of protein deposited at the membrane: $M_d = M - V_R C_R - V_{Fil} C_{Fa}$, where M is the total mass in the system, V_R is the volume of retentate and V_{Fil} is the volume of the filtrate circuit.
- Protein mass transported through the membrane: $M_{PM} = \int_0^t Q_F C_F dt$

3.2. Mechanisms of membrane fouling and protein transport

Experimental data showed an important decrease of filtrate flow at the beginning of the experiment, followed by a slower one. Two possible combinations of fouling models were

considered to explain this behaviour. Both of them use complete blocking to explain the initial fall. If transmission occurs, this mechanism is combined with standard blocking; on the contrary, cake filtration was added.

The membrane is assumed to possess a fraction α of pores susceptible of suffering complete blocking, while the remaining pores suffer the other mechanism:

- Complete blocking + standard blocking: $\frac{Q_F}{Q_{F0}} = \frac{J_F}{J_{F0}} = \alpha \cdot e^{-A \cdot t} + \frac{(1-\alpha)}{(1+B \cdot t)^2}$
- Complete blocking + cake filtration: $\frac{Q_F}{Q_{F0}} = \frac{J_F}{J_{F0}} = \alpha \cdot e^{-A \cdot t} + \frac{(1-\alpha)}{\sqrt{1+C \cdot t}}$

These two models have been used for experimental data fitting by non-linear regression. The parameters involved are α, A, B y α, A, C , respectively. A is the complete blocking constant and is associated with the membrane surface blocked per unit of total volume permeated through the membrane. B is the standard blocking constant and it is linked with the decrease in the cross section area of the pores (due to adsorption on the pore walls) per unit of total permeate volume. Finally, C is the cake filtration constant, which is related to the evolution of the filtration volume and the hydraulic resistance of the cake.

With respect to the protein transport through the membrane, M_{PM} was fitted by using two different equations:

- Hyperbolic function when a fast increase is detected at the beginning of the experiment: $M_{PM} = \frac{d_1 \cdot t}{f_1 + t}$. The maximum velocity of proteins transport is equal to

$$\left(\frac{dM_{PM}}{dt} \right)_{\max} = \frac{d_1}{f_1}, \text{ which takes place at } t_{\max} = 0.$$

- Sigmoid function when a slow increase is observed at the beginning: $M_{PM} = \frac{d_2 \cdot t^2}{f_2 + t^2}$.

$$\text{Here, the maximum velocity is } \left(\frac{dM_{PM}}{dt} \right)_{\max} = 0.650 \frac{d_2}{\sqrt{f_2}} \text{ at } t_{\max} = \sqrt{\frac{f_2}{3}}.$$

3.3. System lysozyme - 50 kDa membrane

In Figure 2, Figure 3 and Figure 4, it can be seen the application of the combined fouling models to the ultrafiltration of lysozyme through a 50 kDa membrane. Respectively, the fitted parameters α , A, B or C are plotted against the working pH.

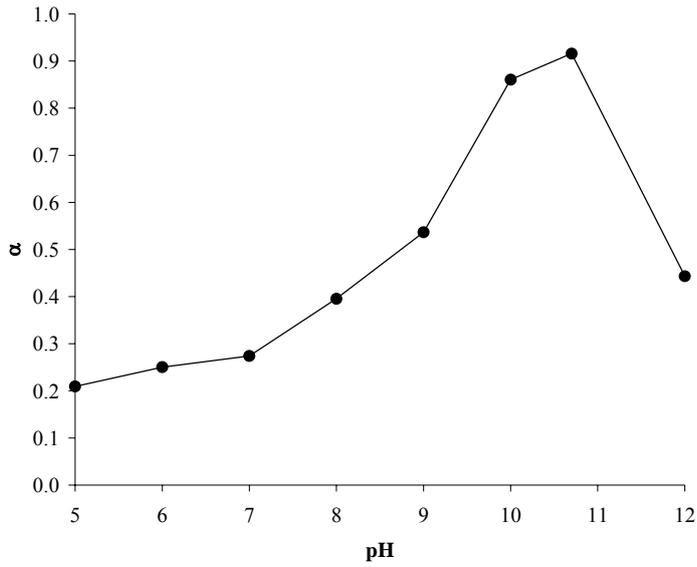


Figure 2

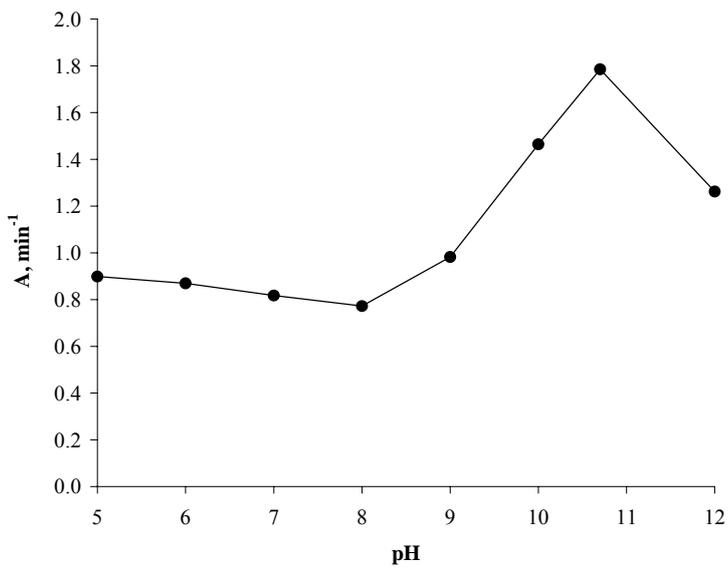


Figure 3

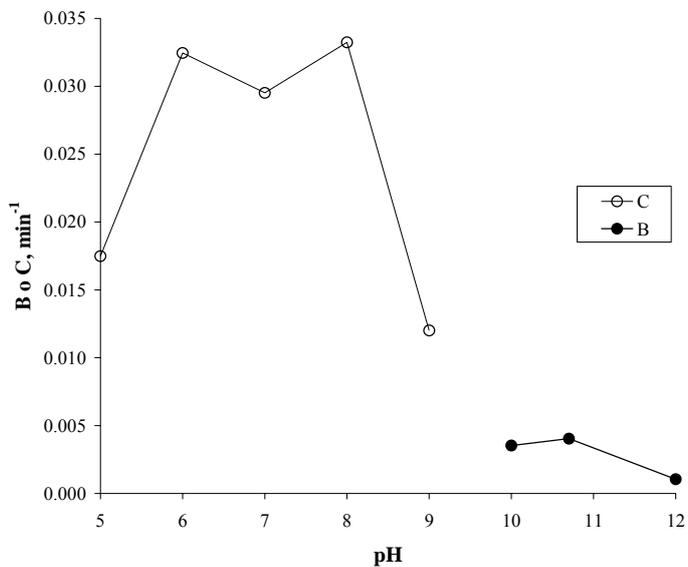


Figure 4

The parameters of the fouling models as a function of the ionic strength are represented in Figure 5 and Figure 6. A presents a value around 1.8 min⁻¹ in all cases.

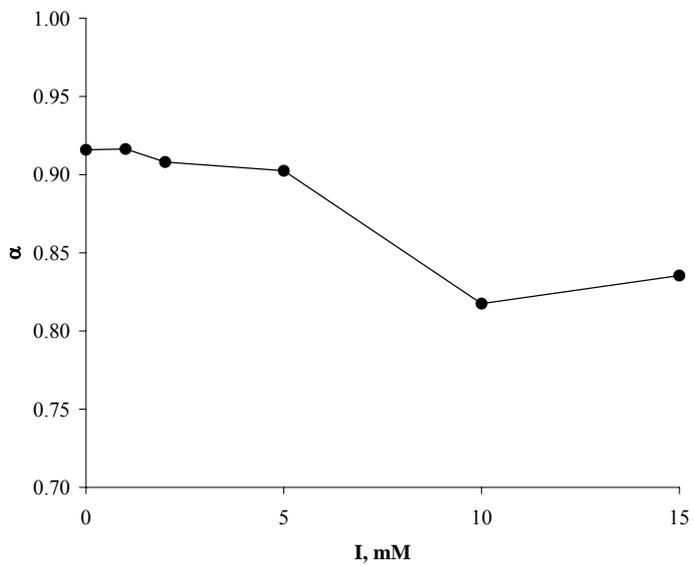


Figure 5

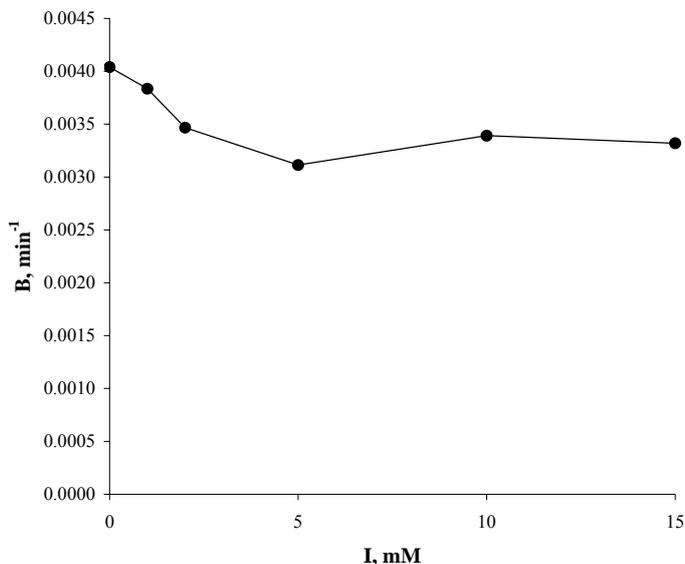


Figure 6

Regarding the influence of pH on the transport of lysozyme, the parameters of the sigmoid (Table 1) and hyperbolic functions (Table 2) are shown next. For the rest of the pH values assayed which are not reflected in the tables, null transmission was observed.

| pH | d_2 (g) | f_2 (min ²) | t_{max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{max}$ (g·min ⁻¹) | M_{PM} (g) |
|------|--------------|------------------------------|--------------------|--|-----------------|
| 10 | 0.0963 | 73959.75 | 157.01 | 0.00023 | 0.0050 |
| 10.7 | 0.6523 | 72569.80 | 155.53 | 0.00157 | 0.0322 |

Table 1

| pH | d_1 (g) | f_1 (min) | t_{max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{max}$ (g·min ⁻¹) | M_{PM} (g) |
|----|--------------|----------------|--------------------|--|-----------------|
| 12 | 1.5319 | 349.35 | 0.00 | 0.00439 | 0.2250 |

Table 2

Finally for this system, it is shown in Table 3 the parameters of the sigmoid function as a function of ionic strength. These results were obtained at the isoelectric point of lysozyme (10.7).

| I (mM) | d_2 (g) | f_2 (min ²) | t_{max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{max}$ (g·min ⁻¹) | M_{PM} (g) |
|-----------|--------------|------------------------------|--------------------|--|-----------------|
| 0 | 0.6523 | 72569.80 | 155.53 | 0.00157 | 0.0322 |
| 1 | 0.3599 | 40560.65 | 116.28 | 0.00116 | 0.0313 |
| 2 | 0.2176 | 16556.68 | 74.29 | 0.00110 | 0.0407 |
| 5 | 0.1726 | 12538.28 | 64.65 | 0.00100 | 0.0401 |
| 10 | 0.1614 | 2347.62 | 27.97 | 0.00216 | 0.0985 |
| 15 | 0.1579 | 3812.98 | 35.65 | 0.00166 | 0.0764 |

Table 3

3.4. System lysozyme - 300 kDa membrane

The parameters α , A and B for the ultrafiltration of lysozyme through a 300 kDa membrane are represented as a function of pH in Figure 7, Figure 8 and Figure 9.

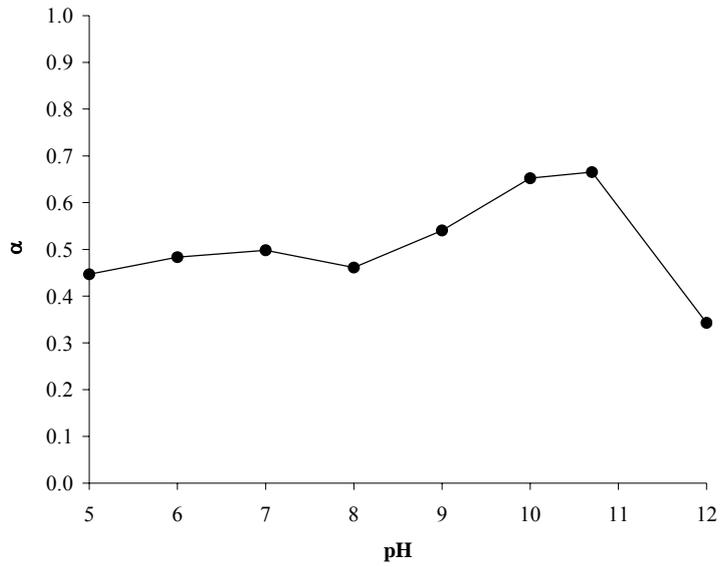


Figure 7

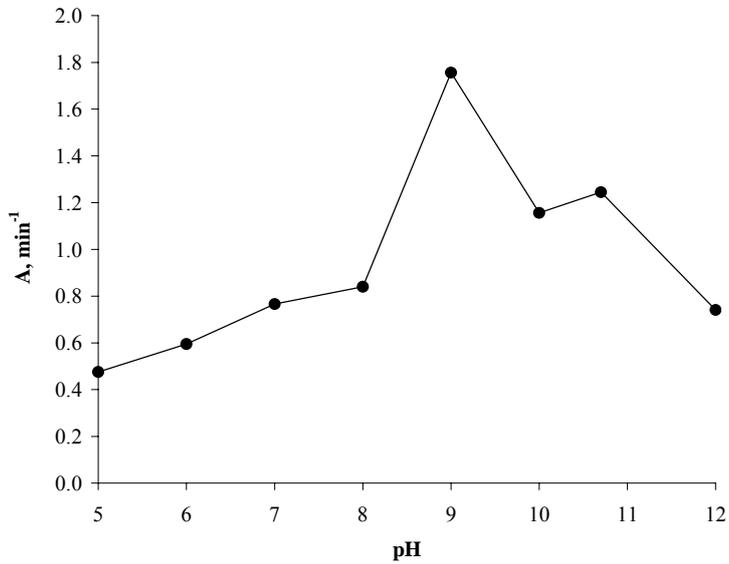


Figure 8

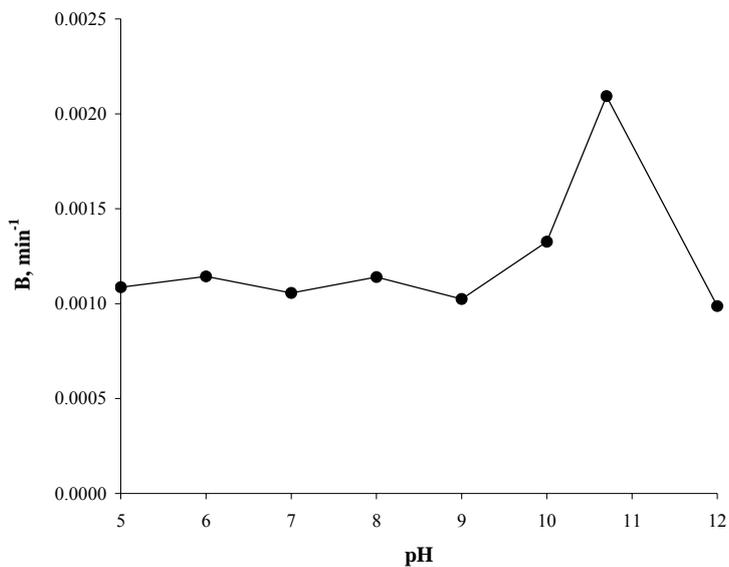


Figure 9

The parameter α of the fouling model as a function of the ionic strength is shown in Figure 10. In all cases, A and B are around 1.250 and 0.00201 min⁻¹, respectively.

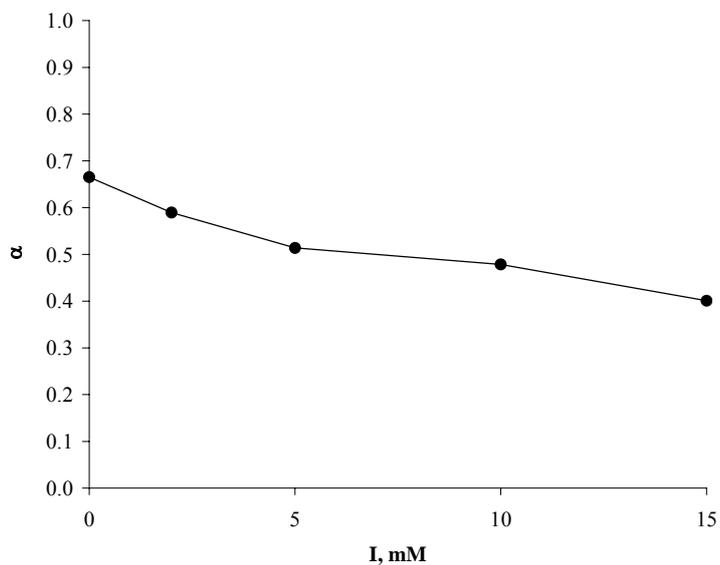


Figure 10

The parameters of the sigmoid and hyperbolic functions which describe the influence of pH on the transport of lysozyme are shown in Table 4 and Table 5.

| pH | d_2 (g) | f_2 (min ²) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ (g·min ⁻¹) | M_{PM} (g) |
|------|--------------|------------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 5 | 0.0557 | 4182.46 | 37.34 | 0.00056 | 0.0260 |
| 6 | 0.0448 | 3491.16 | 34.11 | 0.00049 | 0.0229 |
| 7 | 0.0516 | 3169.09 | 32.50 | 0.00060 | 0.0276 |
| 8 | 0.0377 | 3721.32 | 35.22 | 0.00040 | 0.0185 |
| 9 | 0.0411 | 414.03 | 11.75 | 0.00131 | 0.0367 |
| 10 | 0.3270 | 982.90 | 18.10 | 0.00677 | 0.2676 |
| 10.7 | 0.4263 | 1297.45 | 20.80 | 0.00769 | 0.3271 |

Table 4

| pH | d_1 (g) | f_1 (min) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ (g·min ⁻¹) | M_{PM} (g) |
|----|--------------|----------------|---------------------|---|-----------------|
| 12 | 2.4998 | 261.37 | 0.00 | 0.00956 | 0.4685 |

Table 5

In Table 6, it can be seen the fit of the sigmoid function with respect to the ionic strength.

| I (mM) | d_2 (g) | f_2 (min ²) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ (g·min ⁻¹) | M_{PM} (g) |
|-----------|--------------|------------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 0 | 0.4263 | 1297.45 | 20.80 | 0.00769 | 0.3271 |
| 2 | 0.4807 | 1158.63 | 19.65 | 0.00917 | 0.3818 |
| 5 | 0.5390 | 1108.08 | 19.22 | 0.01052 | 0.4340 |
| 10 | 0.5423 | 1090.69 | 19.07 | 0.01067 | 0.4387 |
| 15 | 0.5928 | 1057.95 | 18.78 | 0.01184 | 0.4830 |

Table 6

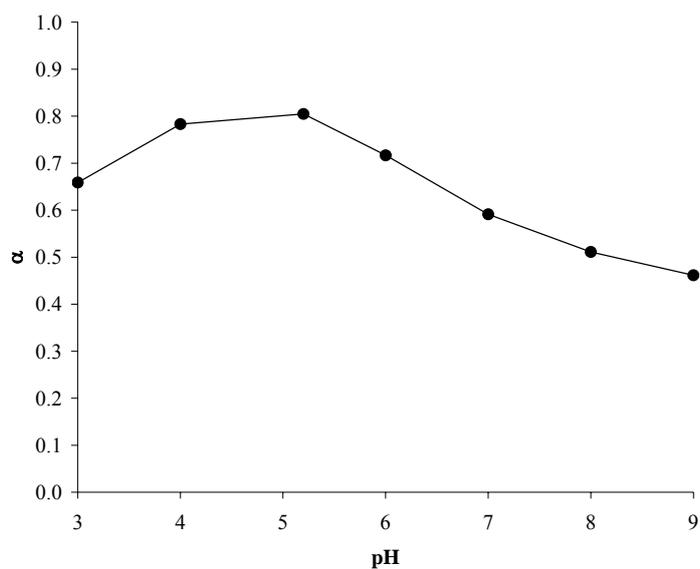


Figure 11

3.5. System β -lactoglobulin - 300 kDa membrane

The fit to the combined fouling models of the ultrafiltration of β -lactoglobulin through a 300 kDa membrane can be seen in Figure 11, Figure 12 and Figure 13.

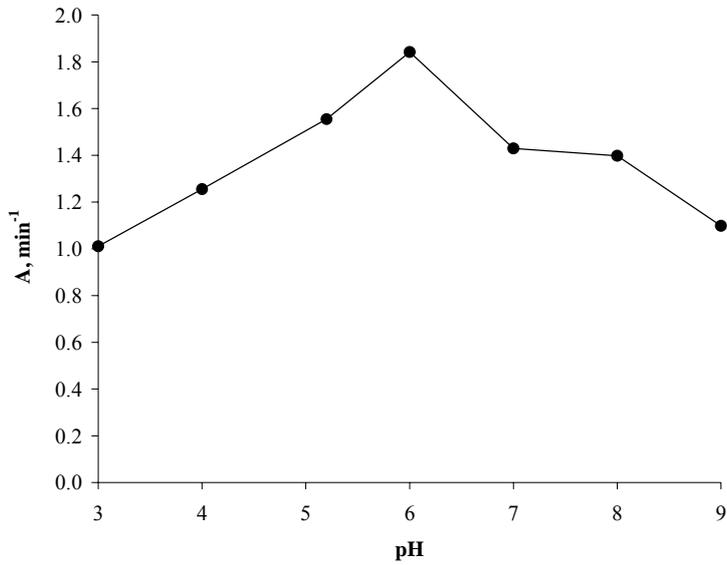


Figure 12

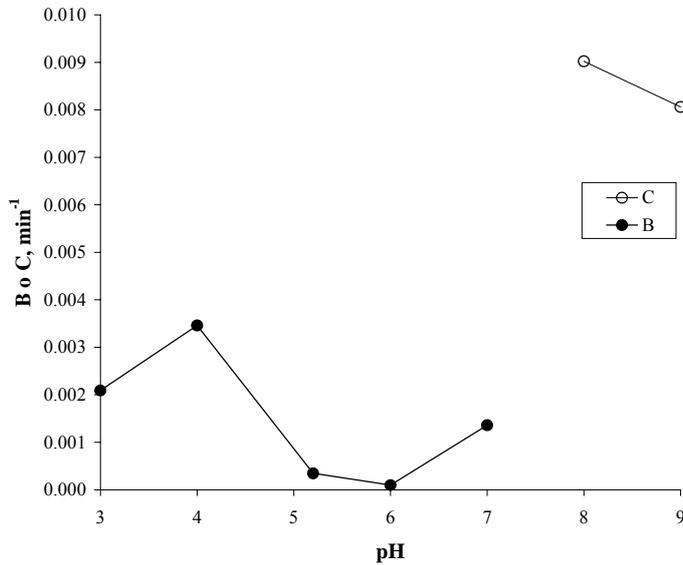


Figure 13

With respect to the ionic strength, the parameters α , and A take a approximately constant value around 0.799 and 1.540 min⁻¹, respectively. The value of B is plotted in Figure 14.

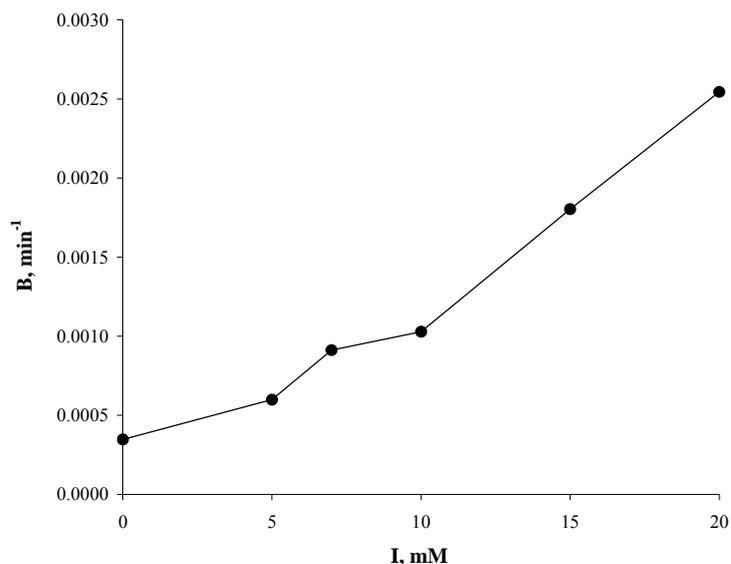


Figure 14

On the other hand, the parameters obtained for the influence of pH on the transport of protein are shown in Table 8 and Table 9. No transmission was observed for pH values above 7.

| pH | d ₁ (g) | f ₁ (min) | t _{max} (min) | (dM _{PM} /dt) _{max} (g·min ⁻¹) | M _{PM} (g) |
|----|-----------------------|-------------------------|---------------------------|---|------------------------|
| 3 | 0.3727 | 132.32 | 0.00 | 0.00282 | 0.1189 |

Table 7

| pH | d ₂ (g) | f ₂ (min ²) | t _{max} (min) | (dM _{PM} /dt) _{max} (g·min ⁻¹) | M _{PM} (g) |
|-----|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------|---|------------------------|
| 4 | 0.0932 | 1082.03 | 18.99 | 0.00184 | 0.0754 |
| 5.2 | 0.2027 | 691.15 | 15.18 | 0.00501 | 0.1788 |
| 6 | 0.1135 | 826.94 | 16.60 | 0.00256 | 0.0949 |
| 7 | 0.0600 | 1147.19 | 19.55 | 0.00115 | 0.0478 |

Table 8

Sigmoid curves (Table 9) were obtained in all cases when the effect of ionic strength on β -lactoglobulin transport was studied.

| I (mM) | d ₂ (g) | f ₂ (min ²) | t _{max} (min) | (dM _{PM} /dt) _{max} (g·min ⁻¹) | M _{PM} (g) |
|-----------|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------|---|------------------------|
| 0 | 0.2027 | 691.15 | 15.18 | 0.00501 | 0.1788 |
| 5 | 0.2475 | 883.50 | 17.16 | 0.00541 | 0.2097 |
| 7 | 0.3013 | 988.19 | 18.15 | 0.00623 | 0.2496 |
| 10 | 0.2969 | 997.41 | 18.23 | 0.00611 | 0.2429 |
| 15 | 0.3075 | 1005.56 | 18.31 | 0.00630 | 0.2508 |
| 20 | 0.2997 | 1019.74 | 18.44 | 0.00610 | 0.2434 |

Table 9

3.6. System β -lactoglobulin and BSA - 300 kDa

The binary system consisting of a mixture of β -lactoglobulin and BSA which were filtered through 300 kDa was again fitted to the combined fouling equations. The effect of pH can be seen in Figure 15, Figure 16 and Figure 17.

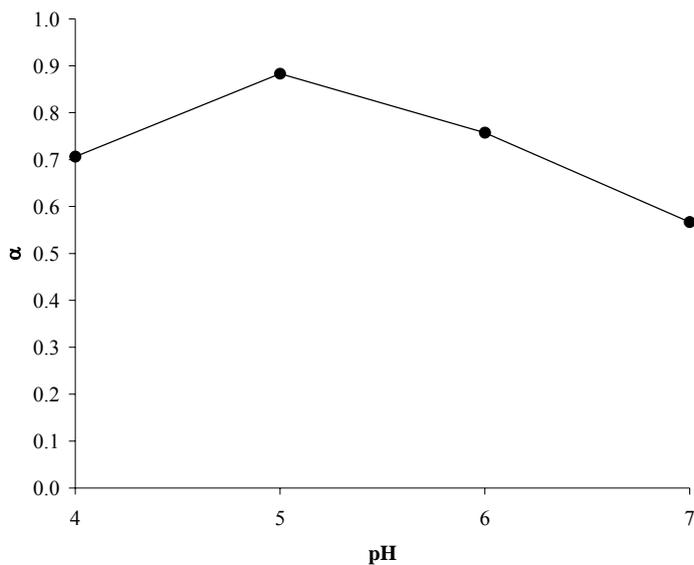


Figure 15

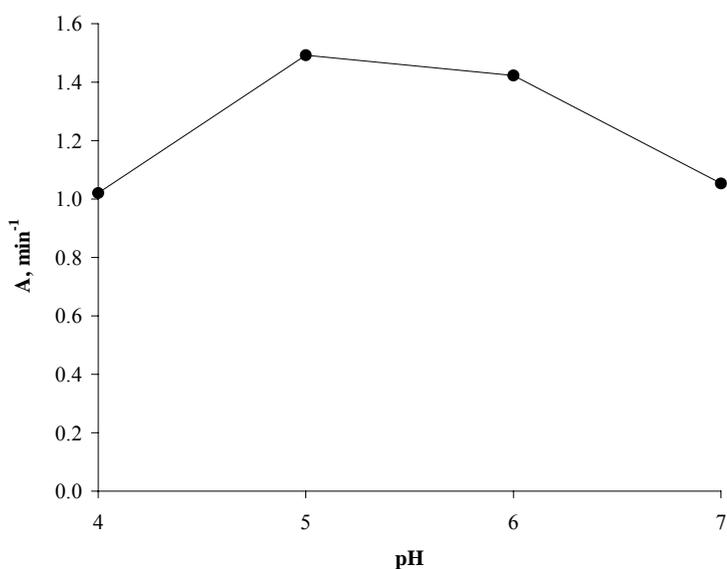


Figure 16

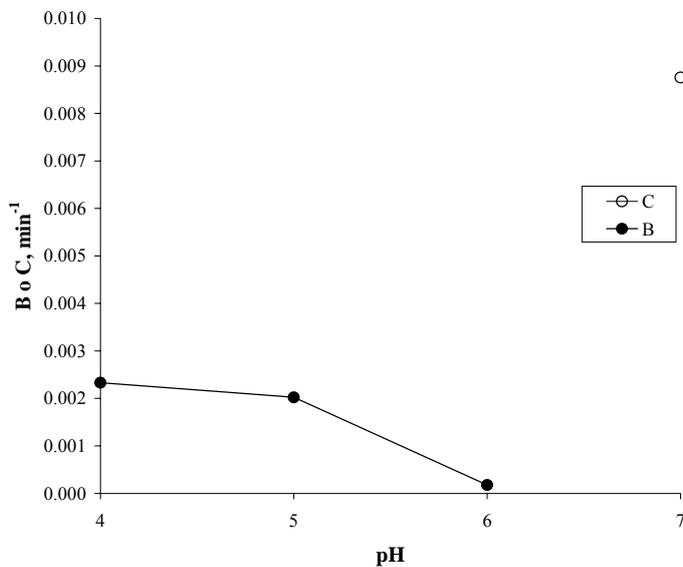


Figure 17

To the same end, the influence of ionic strength (Table 10), transmembrane pressure (Table 11) and retentate flow (Table 12) was also evaluated.

| I (mM) | α | A (min ⁻¹) | B (min ⁻¹) |
|--------|----------|------------------------|------------------------|
| 0 | 0.883 | 1.492 | 0.002023 |
| 5 | 0.883 | 1.456 | 0.007928 |

Table 10

| PTM (bar) | α | A (min ⁻¹) | B (min ⁻¹) |
|-----------|----------|------------------------|------------------------|
| 0.5 | 0.883 | 1.468 | 0.00700 |
| 1 | 0.883 | 1.492 | 0.00202 |
| 1.5 | 0.897 | 1.598 | 0.00394 |

Table 11

| Q _R (L/h) | α | A (min ⁻¹) | B (min ⁻¹) |
|----------------------|----------|------------------------|------------------------|
| 300 | 0.938 | 1.486 | 0.004041 |
| 400 | 0.883 | 1.492 | 0.002023 |
| 500 | 0.906 | 1.468 | 0.002098 |

Table 12

For β -lactoglobulin and BSA, the respective effects of pH (Table 13 and Table 14), ionic strength (Table 15 and Table 16), transmembrane pressure (Table 17 and Table 18) and

Summary of the thesis

retentate flow (Table 19 and Table 20) on the transport of both proteins through the membrane were assessed.

| pH | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|----|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 4 | 0.2876 | 57545.88 | 138.50 | 0.00078 | 0.0167 |
| 5 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| 6 | 0.0223 | 2620.43 | 29.55 | 0.00028 | 0.0129 |

Table 13

| pH | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|----|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 4 | 0.2582 | 80940.71 | 164.26 | 0.00059 | 0.0110 |
| 5 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |

Table 14

| I (mM) | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|-----------|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 0 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| 5 | 0.0146 | 1044.33 | 18.66 | 0.00029 | 0.0111 |

Table 15

| I (mM) | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|-----------|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 0 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |
| 5 | 0.0008 | 470.48 | 12.52 | 0.00002 | 0.0006 |

Table 16

| PTM (bar) | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|--------------|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 0.5 | 0.0070 | 7836.00 | 51.11 | 0.00005 | 0.0024 |
| 1 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| 1.5 | 0.1225 | 1453.80 | 22.01 | 0.00209 | 0.0892 |

Table 17

| PTM (bar) | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|--------------|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 1 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |
| 1.5 | 0.0588 | 1089.68 | 19.06 | 0.00116 | 0.0464 |

Table 18

| QR (L/h) | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|-------------|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 300 | 0.0074 | 4402.27 | 38.31 | 0.00007 | 0.0032 |
| 400 | 0.1109 | 1907.34 | 25.21 | 0.00165 | 0.0734 |
| 500 | 0.0369 | 1857.94 | 24.89 | 0.00056 | 0.0230 |

Table 19

| QR (L/h) | d_2 (g) | f_2 (min^2) | t_{\max} (min) | $(dM_{PM}/dt)_{\max}$ ($\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$) | M_{PM} (g) |
|-------------|--------------|-----------------------------|---------------------|---|-----------------|
| 400 | 0.0355 | 1345.89 | 21.18 | 0.00063 | 0.0262 |
| 500 | 0.0035 | 1268.2547 | 20.56 | 0.00006 | 0.0024 |

Table 20

3.7. Analysis of the interactions in the protein-membrane systems

It is clear that the time evolution of filtrate flow could not be modelled by a single fouling mechanism. Nevertheless, combined fouling models can explain this behaviour in all the cases studied. The initial decrease of filtrate flow was assigned to complete pore blocking which takes place rapidly at the beginning of the experiment. After this, the decrease in filtrate flow was due to standard blocking (if transmission occurs) and cake filtration (if protein does not pass through the membrane).

pH had an important effect on the fraction of pores susceptible of suffering complete blocking, which reached a maximum at the isoelectric point, possibly due to a reduction of both the effective protein radius and the protein net charge, which promotes the formation of aggregates. Regarding the complete blocking velocity, it was higher at the isoelectric point and at pH zones where protein and membrane were oppositely charged. This was because of the favourable electrostatic interactions which make protein deposition and pore blocking easier. Although it could be thought that complete blocking velocity was controlled exclusively by electrostatic interactions, this velocity was also affected by the ratio between pore and protein effective radii. When protein effective radius was bigger than the pore, approximately constant velocities were obtained independently of the charges of protein and membrane. In fact, steric interactions were more important than electrostatic ones in these cases.

Adsorption showed different trends as a function of protein involved in the system. Generally, it could be concluded that adsorption was higher at the isoelectric point because of the null protein net charge, which facilitated the deposition onto the membrane and/or layers of protein deposited previously. The existence of attractive forces between membrane and protein molecules was also a good situation that made adsorption easier. Although these observations are general for all the studied systems, significant differences were observed in adsorption velocity for different proteins, which indicated the importance of the nature of the protein over the interactions.

Ionic strength showed different effects on α as a function of the protein. For lysozyme, α decreased with the addition of salt, probably due to an increase of the protein size by unbalanced of internal forces and adsorption of ions. This was related to a decrease in the formation of aggregates due to a small increase of protein net charge. On the contrary, for β -lactoglobulin or binary mixtures, salt addition did not show any influence on α . With

respect to the pore blocking velocity, it was not affected by ionic strength for all the systems studied.

Protein adsorption was affected by salt addition but again strongly protein-dependent. For lysozyme, an increase of ionic strength involved a slight reduction of protein adsorption. This was probably due to alterations of the electrostatic interactions between protein and membrane. However, for β -lactoglobulin, protein adsorption increased with the salt concentration, which modified the monomer-dimer equilibrium by favouring the monomeric state.

It is worthy to note the different behaviour observed for a given protein in single solution when compared to binary mixture. For example, transmission of β -lactoglobulin was affected by the presence of BSA. This protein-protein interactions suggests that observations of single protein systems can not be extrapolated to protein mixtures.

Changes in transmembrane pressure did not affect α nor complete blocking velocity, which means that these phenomena are basically controlled by the physical-chemical environment. However, protein adsorption was effectively affected with a minimum at intermediate transmembrane pressure values. Longer contact times between protein and membrane inside the pores were available at low pressures, while high pressures promoted protein aggregation and collisions between protein molecules and pore walls.

Variations in retentate flow only had effects on the adsorption of protein. A reduction of retentate flow promoted adsorption at the pore entrance. This could be explained by an increase of protein concentration in these zones. A high retentate flow provoked a reduction of transported protein mass, probably due to a lower protein concentration at pore entrances.

3.8. Mathematical modelling using artificial neural networks

Five artificial neural networks were proposed in order to model empirically the ultrafiltration experiments described in this research work. In spite of the deterministic nature of the Levenberg-Marquardt algorithm, the initial values of weights and biases are assigned randomly which suggests that a network has to be trained a number of times high enough to obtain a representative population. Therefore, 30 training cycles were performed for each network. As a result of each training cycle, relevant parameters were obtained such as the training, validation and test errors, as well as those from a linear fit of simulated vs

experimental data (slope, intercept and R^2). Finally, the mean value of each parameter was calculated after removing the outliers, which were defined as those values that were numerically distant from the original mean more than 3 standard deviations.

In order to optimise the network architecture (i.e. the number of neurons in the hidden layer) a weighted sum of errors was defined by multiplying the training, validation and test errors by the respective fraction of the dataset.

3.8.1. Artificial neural network 1

The first variable modelled was the filtrate flow in the ultrafiltration of lysozyme through the 50 and 300 kDa membranes. Then, the network inputs were membrane cut-off, pH, ionic strength and filtration time. The mean values of training, validation and test errors as a function of the number of neurons in the hidden layer can be seen in Figure 18. The optimal network architecture was obtained at 30 neurons. As illustrative example, the linear fit of simulated vs experimental data for one of the training cycles corresponding to 30 neurons is shown in Figure 19, in which the dashed line represents a deviation of $\pm 10\%$. The excellent fit obtained demonstrates the applicability of the approach proposed.

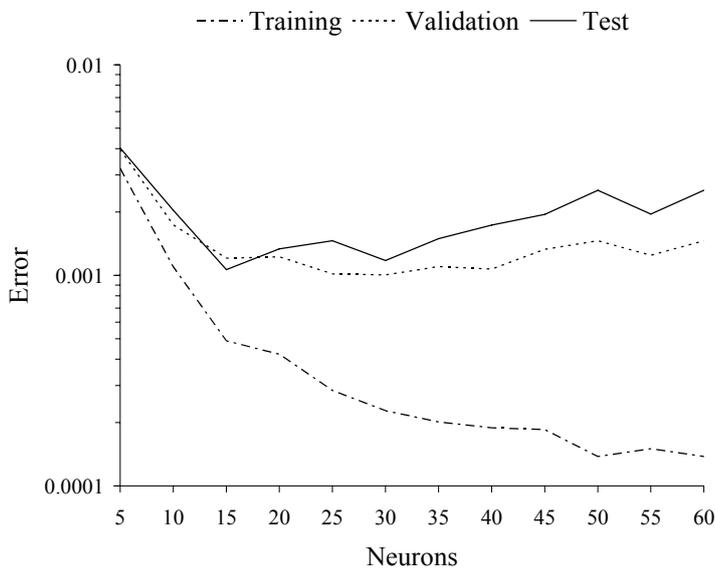


Figure 18

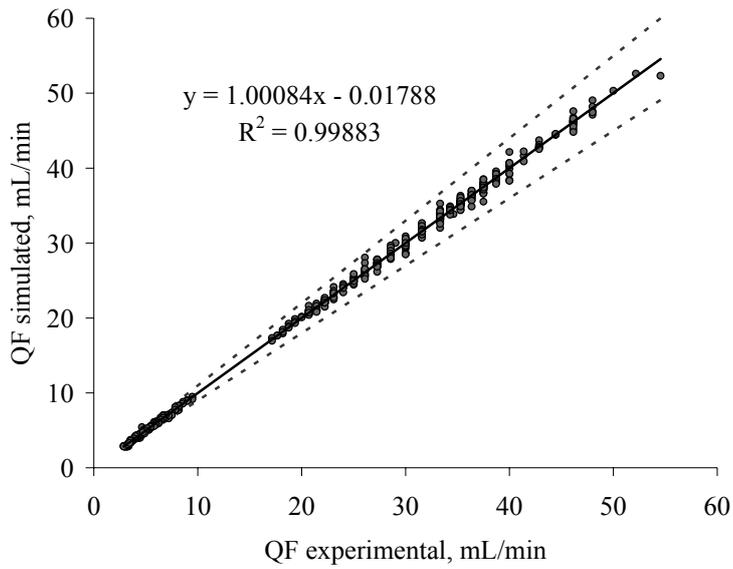


Figure 19

3.8.2. Artificial neural network 2

Here, the observed lysozyme transmission was selected as output variable, while the inputs were identical to those used in the first network.

In Figure 20 are represented the mean values of the errors, while in Figure 21 it is shown the linear fit of simulated vs experimental transmission corresponding to a 30-neuron network, which resulted to be optimal.

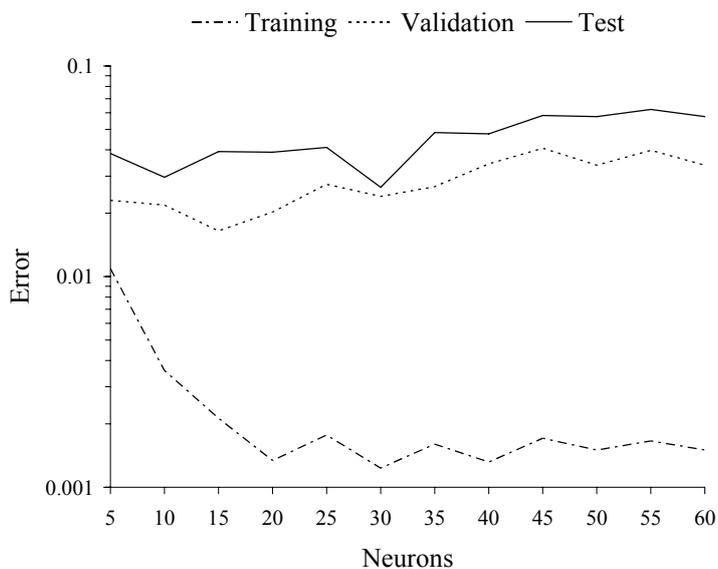


Figure 20

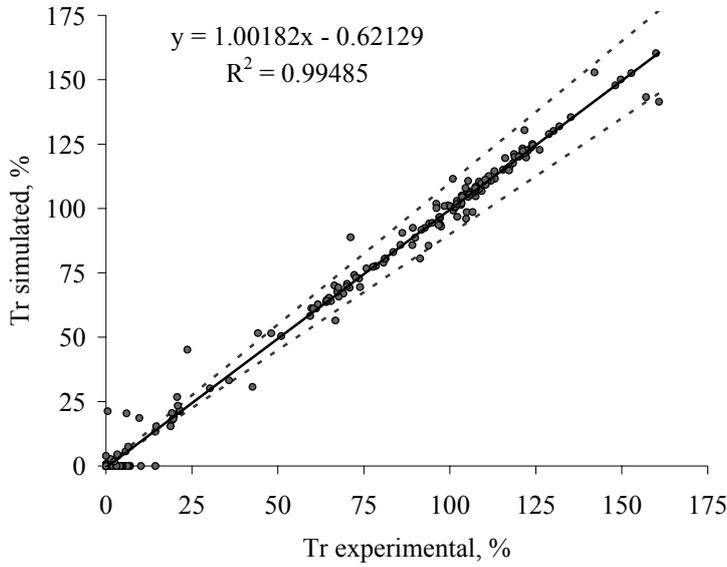


Figure 21

3.8.3. Artificial neural network 3

The third network studied models the ultrafiltration of β -lactoglobulin through the 300 kDa membrane and included 2 outputs: observed transmission and filtrate flow, while pH, ionic strength and filtration time were the network inputs. The mean errors against the number of neurons are represented in Figure 22. Now, the optimal network was found for 10 neurons. Simulated and experimental values of the outputs can be seen in Figure 23 and Figure 24.

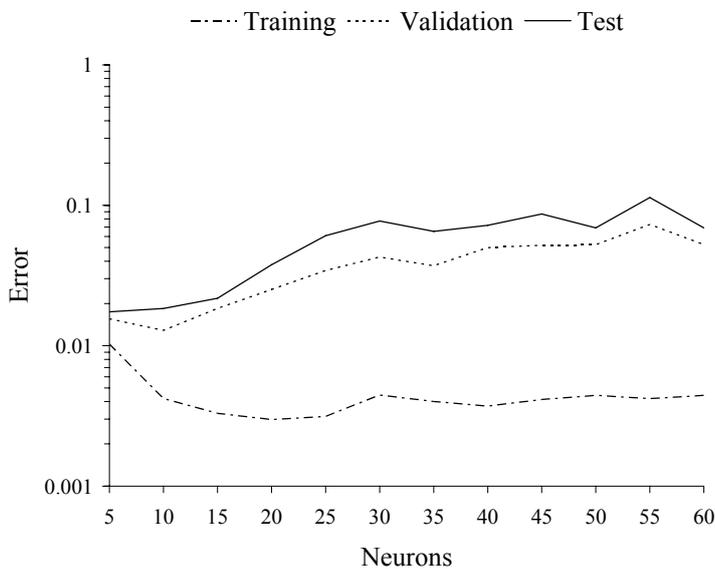


Figure 22

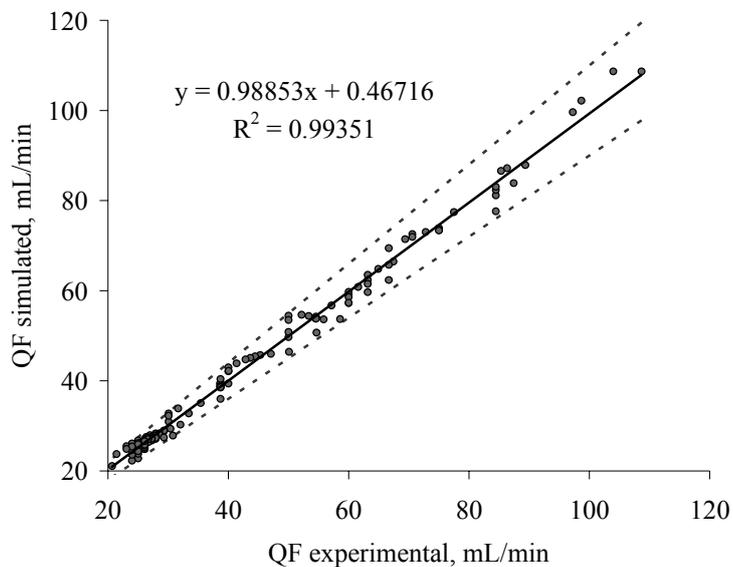


Figure 23

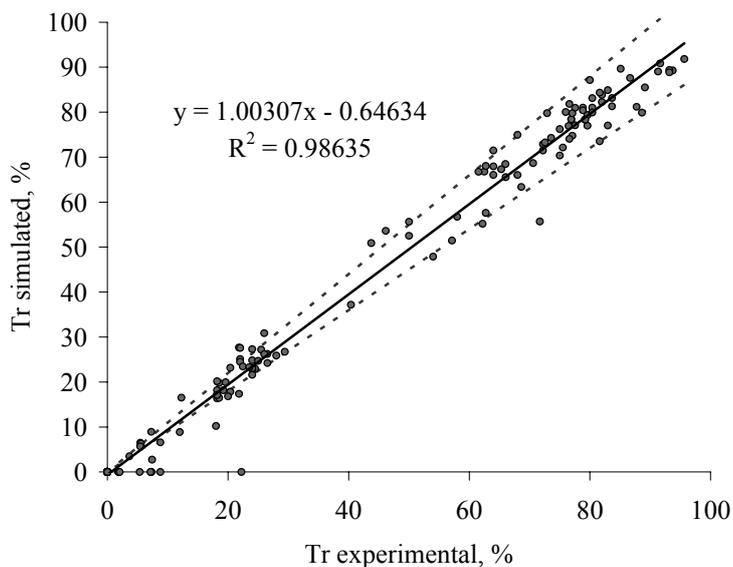


Figure 24

3.8.4. Artificial neural network 4

The filtrate flow of the binary protein system β -lactoglobulin-BSA was fitted by training a network with 5 inputs: transmembrane pressure, retentate flow, pH, ionic strength and filtration time. Again, the errors and the comparison between predicted and experimental data are plotted in Figure 25 and Figure 26. Optimal results were obtained with 25 neurons.

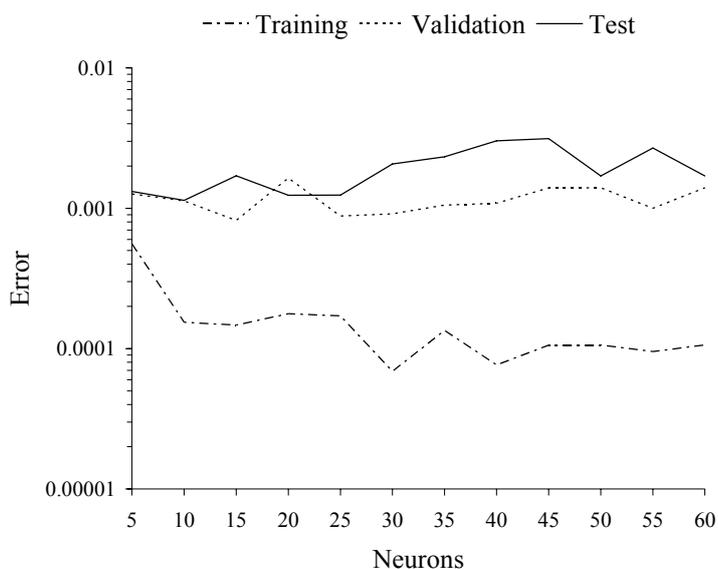


Figure 25

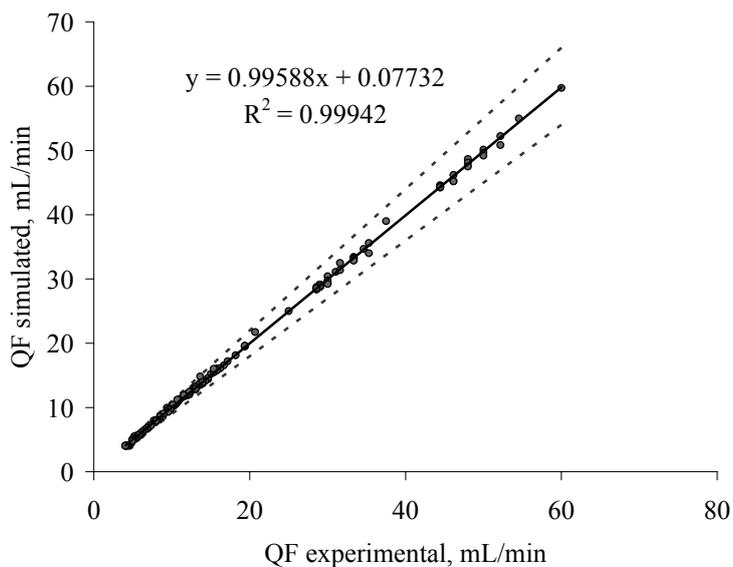


Figure 26

3.8.5. Artificial neural network 5

The last variable modelled in this research work was the observed transmission of the binary system β -lactoglobulin-BSA. Additional inputs with respect to the former network corresponded to specific parameters of the proteins involved: molecular weight and isoelectric point. Along with the value of the errors (Figure 27), an acceptable agreement between network output and experiments was achieved as shown in Figure 28.

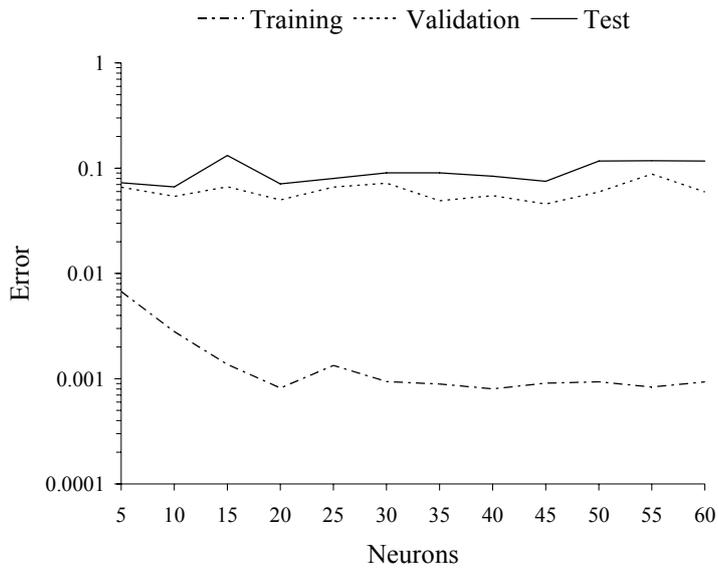


Figure 27

The network which has the minimum balanced error is the 20 hidden neurons net.

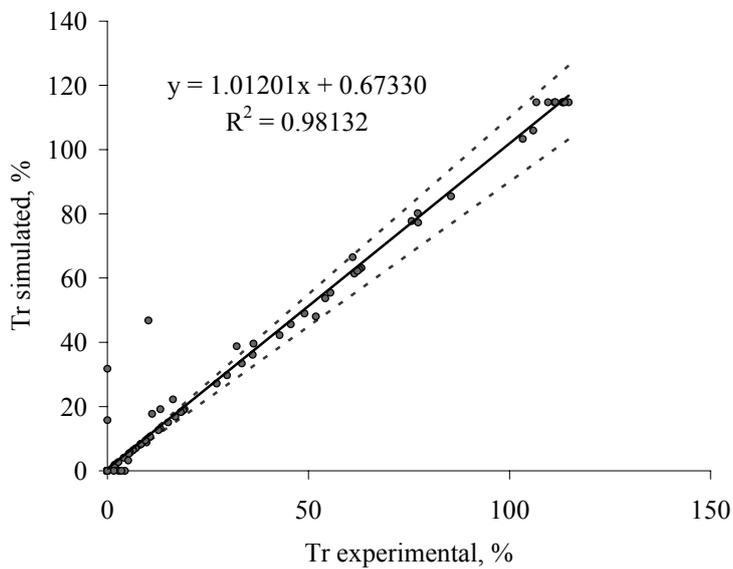


Figure 28

4. CONCLUSIONS

In this thesis, the ultrafiltration with tubular ceramic membranes of lysozyme, β -lactoglobulin and BSA in single and binary solution has been studied. The importance of the electrostatic interactions between protein and membrane has been highlighted. The

effects of variables such as pH, ionic strength, transmembrane pressure and retentate flow on the time evolution of permeate flow and protein transport have been analysed by developing both mechanistic and empirical models.

The behaviour of permeate flow was described by combining fouling models such as complete blocking and standard blocking, if transmission occurs, or cake formation if otherwise. Maximum velocities of protein transport and their respective times were calculated by employing hyperbolic and sigmoid functions.

Finally, both permeate flow and protein transmission were satisfactorily predicted for various systems by artificial neural networks. The Levenberg-Marquardt algorithm was used to train each network proposed, while early stopping allowed to improve generalization.