

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



OBTENCIÓN DE LACTOFERRINA BOVINA
MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN DE LACTOSUERO

TESIS DOCTORAL

MARÍA DEL CARMEN ALMÉCIJA RODRÍGUEZ

2007



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

Emilia María Guadix Escobar y Antonio María Guadix Escobar, directores de la Tesis Doctoral titulada “OBTENCIÓN DE LACTOFERRINA BOVINA MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN DE LACTOSUERO”, de la que es autora María del Carmen Alméjija Rodríguez,

AUTORIZAN

la presentación de la referida Tesis para su defensa.

Granada, 14 de noviembre de 2007

María del Carmen Alméjija Rodríguez
DOCTORANDO

Emilia María Guadix Escobar
DIRECTORA DE LA TESIS

Antonio
Guadix

Antonio María Guadix Escobar
DIRECTOR DE LA TESIS



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Comisión de Doctorado

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

DEPARTAMENTO: INGENIERÍA QUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORADO: TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE LOS ALIMENTOS

D./Dña. María Eugenia Martínez Sancho ,Secretario/a de este Departamento,

CERTIFICO:

que este Departamento, en su reunión del día 25 / 10 / 2007 , ha dado su conformidad para la presentación de la Tesis Doctoral de D./Dña.: María del Carmen Almécija Rodríguez

TITULO DE LA TESIS: Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero

DIRECTOR/ES: Emilia María Guadix Escobar, Antonio María Guadix Escobar

Y para que conste a los efectos pertinentes en la Comisión de Doctorado, expido la presente con el Vº Bº del Director de este Departamento.

Granada, 12 de Noviembre de 2007.

Vº Bº

Fdo.: Encarnación Jurado Alameda
Directora del Departamento

EL SECRETARIO,

Fdo.: María Eugenia Martínez Sancho



Sello del Departamento

SR. PRESIDENTE DE LA COMISION DE DOCTORADO, UNIVERSIDAD DE GRANADA

AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que de forma directa o indirecta han hecho posible la realización de esta tesis doctoral. Me gustaría dejar constancia de todas ellas y agradecerles sinceramente su participación.

En primer lugar, quiero agradecer a los doctores Emilia M^a Guadix Escobar y Antonio M^a Guadix Escobar su dedicación y dirección de este trabajo, así como su gran apoyo científico y personal durante todos estos años.

También quiero agradecer a Juan Moliz, técnico de HPLC del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, la ayuda prestada para la realización de la analítica de la tesis.

Por otra parte, le doy las gracias al grupo de “Superficies y Materiales Porosos” y en especial, a José Ignacio, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Valladolid, por su amabilidad y apoyo durante mi estancia en dicho departamento.

Agradezco a la Dra. Olga Martínez del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada por su colaboración en algunas medidas analíticas.

Quiero agradecer a todos los compañeros del Departamento de Ingeniería Química su colaboración durante todos estos años, en especial a Rosi y Antonio Carmona por estar siempre dispuestos a prestarme su ayuda.

A todos mis compañeros de laboratorio, a los que siguen y a los que ya no están, le doy las gracias por haberme apoyado y hecho pasar tantos buenos ratos: Emilio, Carlos, Marian, José Edgar, Antonio Martínez, Raúl, Cristina, Fran y Ruth.

De forma especial quiero agradecer a mi compañero Rubén, con el que he compartido la mayor parte de este camino, su inestimable apoyo tanto en lo referente al trabajo como en el plano personal.

A mis mejores amigos: José y M^a del Mar, Juanjo, Rafa y Encarni, José y Vero, José A. Palomino, Mariu, y Miguel y M^a Jesús que me han soportado y motivado cuando más lo necesitaba. Una mención especial a Encarni, mi amiga y además, compañera de “café”, que siempre ha estado dispuesta a escucharme y ayudarme.

Por supuesto, mi más sincero agradecimiento a toda mi familia y, muy especialmente, a las tres personas responsables de cada uno de mis logros en la vida. Muchas gracias de todo corazón a mi madre, a mi hermana y a José.

A mi madre, mi hermana y José

*“No hay asunto, por complicado que sea, que estudiado con
paciencia e inteligencia no se complique más.”*

S.H. Simmons

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES	9
2.1. LACTOSUERO	11
2.1.1. Aprovechamiento integral: lactosuero en polvo	17
2.1.2. Aprovechamiento de la lactosa: cristalización y fermentaciones	18
2.1.3. Aprovechamiento de las proteínas: concentración, hidrólisis y separación	24
<i>2.1.3.1. Aprovechamiento del conjunto de proteínas</i>	24
<i>2.1.3.2. Aprovechamiento individual de las proteínas</i>	30
2.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO	44
2.2.1. Precipitación selectiva	44
2.2.2. Métodos cromatográficos	49
2.2.3. Filtración con membranas	56
2.3. FRACCIONAMIENTO POR TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS	59
2.3.1. Mezclas modelo	60
2.3.2. Mezclas reales	72
2.4. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN	77
3. MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.1. PREPARACIÓN DEL LACTOSUERO ÁCIDO BOVINO	81
3.2. MEMBRANA	82

3.2.1. Determinación del punto de carga cero	83
3.2.2. Determinación de la permeabilidad de la membrana	84
3.3. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL	88
3.3.1. Modo de operación: diafiltración continua	88
3.3.2. Modo de operación: recirculación total	90
3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	91
3.5. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN PROTEÍNAS INDIVIDUALES	93
4. SIMULACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LACTOFERRINA POR ULTRAFILTRACIÓN	97
4.1. INTRODUCCIÓN	99
4.2. ASPECTOS TEÓRICOS	101
4.2.1. Modelo del proceso	101
4.2.2. Estructura primaria	104
4.2.3. Cálculo de la carga neta	107
4.2.4. Cálculo del peso molecular	111
4.2.5. Cálculo del radio de Stokes	111
4.2.6. Cálculo del radio efectivo	113
4.2.7. Cálculo de la fuerza iónica mínima	117
4.3. OPTIMIZACIÓN	121
4.3.1. Planteamiento	121
4.3.2. Resultado	122

4.3.3. Curvas de titración. Fuerza iónica mínima.	128
4.3.4. Evaluación de la función objetivo alrededor del óptimo	132
4.4. CONCLUSIONES	140
5. PRETRATAMIENTO	141
5.1. INTRODUCCIÓN	143
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	144
5.2.1. Clarificación del lactosuero ácido bovino	144
5.2.2. Procedimiento experimental	146
5.2.3. Métodos analíticos	147
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	151
5.3.1. Influencia del pretratamiento en la composición en proteínas individuales	151
5.3.2. Evolución del flujo de filtrado	152
5.3.3. Proteína total en retenido y filtrado acumulado	158
5.3.4. Lactosa en retenido y filtrado acumulado	160
5.4. CONCLUSIONES	163
6. SELECCIÓN DEL TAMAÑO DE CORTE DE LA MEMBRANA	165
6.1. INTRODUCCIÓN	167
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	168
6.2.1. Procedimiento experimental	168
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	169
6.3.1. Composición del lactosuero ácido pretratado	169

6.3.2. Evolución del flujo de filtrado	169
6.3.3. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado	173
6.3.4. Diafiltración de lactosuero al pH óptimo de la primera etapa	177
6.4. CONCLUSIONES	180
7. INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS EN LA ULTRAFILTRACIÓN DE LACTOSUERO	181
7.1. INTRODUCCIÓN	183
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	184
7.2.1. Procedimiento experimental	184
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	185
7.3.1. Evolución del flujo de filtrado	185
7.3.2. Transmisión de proteínas	188
7.4. CONCLUSIONES	193
8. INFLUENCIA DEL PH EN EL FRACCIONAMIENTO DE LACTOSUERO	195
8.1. INTRODUCCIÓN	197
8.2. MATERIALES Y MÉTODOS	199
8.2.1. Procedimiento experimental	199
8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	201
8.3.1. Evolución del flujo de filtrado	201
8.3.2. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado	203

8.3.3. Mejora de la pureza de las proteínas retenidas	212
8.4. CONCLUSIONES	214
9. ESTRATEGIA DE FRACCIONAMIENTO DE LACTOSUERO PARA LA RECUPERACIÓN DE LACTOFERRINA	215
9.1. INTRODUCCIÓN	217
9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	219
9.2.1. Composición del lactosuero ácido pretratado	219
9.2.2. Selección del número de diavolúmenes adecuado para la primera etapa	219
9.2.2.1. <i>Evolución del flujo de filtrado</i>	221
9.2.2.2. <i>Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado</i>	222
9.2.2.3. <i>Número de diavolúmenes seleccionado para la primera etapa</i>	225
9.2.3. Estrategia I	225
9.2.3.1. <i>Evolución del flujo de filtrado</i>	226
9.2.3.2. <i>Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado</i>	228
9.2.3.3. <i>Etapas de centrifugación</i>	230
9.2.3.4. <i>Fracciones resultantes y mejora de la pureza de la lactoferrina</i>	231
9.2.4. Estrategia II	234
9.2.4.1. <i>Evolución del flujo de filtrado</i>	236
9.2.4.2. <i>Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado</i>	237
9.2.4.3. <i>Fracciones resultantes y mejora de la pureza</i>	240
9.2.5. Estrategia III	242

<i>9.2.5.1. Evolución del flujo de filtrado</i>	243
<i>9.2.5.2. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado</i>	245
<i>9.2.5.3. Fracciones resultantes y mejora de la pureza de la lactoferrina</i>	249
10. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	253
11. BIBIOGRAFÍA	259

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Composición del lactosuero (promedios por 100 g).	12
Tabla 2.2. DBO ₅ para distintos fluyentes (mg de oxígeno/L fluyente).	14
Tabla 2.3. Propiedades físicas de la α -lactosa y β -lactosa.	19
Tabla 2.4. Concentración de las principales proteínas del lactosuero.	24
Tabla 3.1. Gradiente utilizado en RP-HPLC para cuantificar las proteínas individuales.	93
Tabla 3.2. Concentración de cada una de las proteínas en la mezcla de patrones empleada para las curvas de calibrado.	94
Tabla 3.3. Pendientes y coeficientes de correlación de las rectas de calibrado de las proteínas individuales.	95
Tabla 4.1. Código de aminoácidos de 1 letra.	104
Tabla 4.2. Secuencia de aminoácidos de α -lactoalbúmina.	104
Tabla 4.3. Secuencia de aminoácidos de β -lactoglobulina.	105
Tabla 4.4. Secuencia de aminoácidos de seroalbúmina bovina.	105
Tabla 4.5. Secuencia de aminoácidos de lactoferrina.	106
Tabla 4.6. Secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina-G.	107
Tabla 4.7. Número de aminoácidos que contribuyen a la carga positiva en α -lactoalbúmina (ALA), β -lactoglobulina (BLG), seroalbúmina bovina (BSA), lactoferrina (LF) e inmunoglobulinas G (IgG) y pK _a de cada uno de ellos.	108
Tabla 4.8. Número de aminoácidos que contribuyen a la carga negativa en α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina bovina, lactoferrina e inmunoglobulinas G y pK _a de cada uno de ellos.	108
Tabla 4.9. Punto isoeléctrico de las proteínas del lactosuero.	110

Tabla 4.10. Peso molecular de las proteínas del lactosuero.	111
Tabla 4.11. Proteínas modelo para el calibrado del radio de Stokes.	111
Tabla 4.12. Radio de Stokes de las proteínas del lactosuero.	112
Tabla 4.13. Planteamiento del problema de optimización.	121
Tabla 4.14. Solución del problema de optimización.	122
Tabla 4.15. Radios efectivos de las proteínas del lactosuero en las condiciones de operación óptimas.	125
Tabla 4.16. Regiones delimitadas por las restricciones para fuerza iónica y pH en la primera etapa. Restricciones que no se cumplen en cada una de ellas.	136
Tabla 4.17. Regiones delimitadas por las restricciones para fuerza iónica y pH en la primera etapa. Restricciones que no se cumplen en cada una de ellas.	139
Tabla 5.1. Parámetros de ajuste del modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar para la evolución temporal del flujo de filtrado durante la filtración de lactosuero sin pretratar y de lactosuero pretratado.	157
Tabla 5.2. Masa de proteína total retirada en las muestras tomadas respecto a la masa de proteína total inicial, cada 0.5 diavolumenes, para lactosuero pretratado y sin pretratar.	160
Tabla 5.3. Rendimiento de lactosa en filtrado acumulado teórico y real para el lactosuero pretratado y sin pretratar en función del número de diavolumenes.	162
Tabla 6.1. Parámetros de ajuste del modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar para la evolución temporal del flujo de filtrado durante la filtración de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa y 0.14 μm .	172
Tabla 6.2. Carga y radio efectivo de las proteínas individuales del lactosuero para pH 7.3 para la membrana de 300 kDa (radio de poro 17.5 nm) y 0.14 μm .	175

Tabla 7.1. Parámetros de ajuste del modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar para la evolución temporal del flujo de filtrado durante la recirculación total de BSA, β -lactoglobulina y de la mezcla binaria.	187
Tabla 7.2. Concentración de BSA y β -lactoglobulina en retenido y filtrado durante las filtraciones de las disoluciones unitarias.	188
Tabla 7.3. Concentración de BSA y β -lactoglobulina en retenido y filtrado durante la filtración de la mezcla binaria.	189
Tabla 8.1. Concentración inicial de las proteínas individuales del lactosuero ácido pretratado.	203
Tabla 9.1. Concentración inicial de las proteínas individuales del lactosuero ácido pretratado.	219
Tabla 9.2. Rendimientos de proteína individual en la fracción precipitada, fracción precipitada de cada proteína respecto al total de dicha proteína en el retenido antes de centrifugar y pureza de la fracción precipitada. Estrategia I.	230
Tabla 9.3. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el lactosuero inicial.	231
Tabla 9.4. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el filtrado acumulado de la etapa 1 y en el retenido final de la estrategia I.	232
Tabla 9.5. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en la fracción precipitada y sobrenadante de la estrategia I.	233
Tabla 9.6. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el filtrado acumulado de la etapa 1, filtrado acumulado de la etapa 2 y en las dos fracciones juntas de la estrategia II.	241
Tabla 9.7. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el retenido final, en el retenido N=10 y en la suma del filtrado acumulado de la etapa 1 y etapa 2 con N=10 para la estrategia II.	241

Tabla 9.8. Rendimiento de proteína individual en el retenido final (N=12) y el retenido final redisuelto (N=12 redisuelto) de la estrategia III. 248

Tabla 9.9. Suma de los rendimientos de proteína individual en el retenido final redisuelto (N=12 redisuelto) y en el filtrado acumulado final (N=12) en la estrategia III. 249

Tabla 9.10. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el filtrado acumulado de la etapa 1, filtrado acumulado de la etapa 2 y en las dos fracciones juntas de la estrategia III. 250

Tabla 9.11. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el retenido final y en el retenido final redisuelto de la estrategia III. 250

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de la estrategia seleccionada de fraccionamiento de lactosuero para la recuperación de lactoferrina bovina mediante HPTFF.	4
Figura 1.2. Esquema de la estrategia I propuesta para la obtención de lactoferrina a partir de lactosuero.	6
Figura 1.3. Esquema de la estrategia II propuesta para la obtención de lactoferrina a partir de lactosuero.	6
Figura 1.4. Esquema de la estrategia III propuesta para la obtención de lactoferrina a partir de lactosuero.	7
Figura 2.1. Distribución de la producción de lactosuero en el mundo. Año 2005.	13
Figura 2.2. Distribución de la producción de lactosuero en Europa. Año 2005.	13
Figura 2.3. Evolución de la producción anual de lactosuero en España (2000-2005).	14
Figura 2.4. Alternativas para la utilización y el procesado del lactosuero (Hill, 2006).	16
Figura 2.5. Secado de lactosuero en dos etapas: secado por atomización unido a secado en lecho fluidizado.	18
Figura 2.6. Fórmula estructural de la β -lactosa.	19
Figura 2.7. Proceso de purificación de lactosa a partir de lactosuero.	21
Figura 2.8. Línea de proceso de obtención de lactosa grado alimentario.	22
Figura 2.9. Diagrama de proceso de obtención de concentrado de proteínas a partir de lactosuero.	26
Figura 2.10. Proceso de producción de WPI a partir de lactosuero mediante tecnología de membranas (IONICS-Food Center, 2006).	28
Figura 2.11. Diagrama estructural de α -lactoalbúmina.	30
Figura 2.12. Diagrama estructural de β -lactoglobulina.	33

Figura 2.13. Diagrama estructural de BSA.	35
Figura 2.14. Formas isoméricas de la BSA en función del pH (Foster, 1997).	35
Figura 2.15. Estructura de la forma N de la BSA y las formas E y F propuestas (Carter y Ho, 1994).	36
Figura 2.16. Diagrama estructural de una unidad básica de inmunoglobulina.	38
Figura 2.17. Diagrama estructural de LF.	40
Figura 2.18. Posibles funciones de la lactoferrina (Brock, 2002).	41
Figura 2.19. Posibles mecanismos del efecto de la lactoferrina bovina y sus fragmentos, obtenidos por hidrólisis, para prevenir la carcinogénesis en diferentes órganos (Tsuda <i>et al.</i> , 2002).	43
Figura 2.20. Proceso genérico de filtración con membranas.	57
Figura 3.1. Módulo y membranas empleadas.	82
Figura 3.2. Determinación del punto de carga cero de las membranas cerámicas Inside Céram.	84
Figura 3.3. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana para la membrana de 50 kDa.	86
Figura 3.4. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana para la membrana de 300 kDa.	86
Figura 3.5. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana para la membrana de 0.14 μm .	87
Figura 3.6. Dispositivo experimental para el modo de diafiltración continua.	88
Figura 3.7. Fotografía del dispositivo experimental.	89
Figura 3.8. Dispositivo experimental para el modo de recirculación total.	90
Figura 4.1. Esquema del proceso de diafiltración continua. Dos etapas teóricas.	100

Figura 4.2. Carga neta de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG en función del pH.	110
Figura 4.3. Recta de calibrado del radio de Stokes en función del peso molecular.	112
Figura 4.4. Radio efectivo de la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG en función del pH y fuerza iónica, para un valor fijo de radio de poro (20 nm).	115
Figura 4.5. Radio efectivo de la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG en función de λ para varios valores de pH ($\text{pH}_1=3$, $\text{pH}_2=6$ y $\text{pH}_3=9$), manteniendo constante la fuerza iónica (0.1 M).	116
Figura 4.6. Evolución con cada iteración de r_{p1} , pH_1 , r_{p2} , pH_2 , I_1 , I_2 , N_1 , N_2 y N desde el valor inicial hasta el valor óptimo.	124
Figura 4.7. Tamaños relativos de las proteínas del lactosuero y radios de poro en las condiciones óptimas.	125
Figura 4.8. Evolución con el número de diavolúmenes de C_R y C_F , para cada proteína, en la primera etapa.	127
Figura 4.9. Evolución con el número de diavolúmenes de C_R y C_F , para cada proteína, en la segunda etapa.	127
Figura 4.10. Evolución con el número de diavolúmenes de C_R/C_{R0} , para cada proteína, a lo largo de todo el proceso.	128
Figura 4.11. Titración ácida y básica de la primera etapa.	129
Figura 4.12. Titración ácida y básica de la segunda etapa.	130
Figura 4.13. Fuerza iónica mínima en función del pH para la primera etapa.	131
Figura 4.14. Fuerza iónica mínima en función del pH para la segunda etapa.	131
Figura 4.15. Límites de optimización para el radio de poro en la primera etapa, para valores de fuerza iónica y pH óptimos.	132

- Figura 4.16. Límites de optimización para el radio de poro en la segunda etapa, para valores de fuerza iónica y pH óptimos. 133
- Figura 4.17. Límites de optimización para pH y fuerza iónica en la primera etapa, con el valor del radio de poro óptimo. 135
- Figura 4.18. Límites de optimización para pH y fuerza iónica en la segunda etapa, con el valor del radio de poro óptimo. 137
- Figura 4.19. Límites de optimización para pH y fuerza iónica en la segunda etapa, con el valor del radio de poro óptimo. Ampliación de la figura 4.14. 138
- Figura 5.1. Diagrama del pretratamiento del lactosuero ácido. 145
- Figura 5.2. Imagen de lactosuero pretratado y lactosuero sin pretratar. 146
- Figura 5.3. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado y lactosuero sin pretratar. 147
- Figura 5.4. Cromatograma de RP-HPLC de lactosuero sin pretratar y lactosuero pretratado. Las concentraciones de las proteínas individuales en cada caso se recogen en el cuadro de texto. 152
- Figura 5.5. Evolución temporal del flujo de filtrado para la diafiltración continua de lactosuero pretratado (3 diavolumenes) y lactosuero sin pretratar (1 diavolumen) con membrana cerámica de 50 kDa. 153
- Figura 5.6. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero sin pretratar. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua). 156
- Figura 5.7. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero pretratado. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua). 156
- Figura 5.8. Rendimiento de proteína total en retenido y filtrado acumulado en función del número de diavolumenes para la diafiltración de lactosuero pretratado y sin pretratar. 159

- Figura 5.9. Rendimiento de lactosa en retenido y filtrado acumulado en función del número de diavolúmenes para la diafiltración de lactosuero pretratado y sin pretratar. 161
- Figura 6.1. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 7.3 a través de la membrana de 300 kDa y 0.14 μm . 168
- Figura 6.2. Cromatograma de RP-HPLC del lactosuero ácido pretratado. La concentración de las proteínas individuales se indica en el cuadro de texto. 169
- Figura 6.3. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la diafiltración continua de lactosuero ácido pretratado a pH 7.3 con membranas cerámicas de 300 kDa y 0.14 μm . 170
- Figura 6.4. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua). 171
- Figura 6.5. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero empleando la membrana de 0.14 μm . Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua). 171
- Figura 6.6. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●-300 kDa y ■-0.14 μm) y filtrado acumulado (○- 300 kDa y □-0.14 μm) en función del número de diavolúmenes para la diafiltración continua de lactosuero pretratado a pH 7.3 para las membranas de 300 kDa y 0.14 μm . 174
- Figura 6.7. Evolución temporal del flujo de filtrado para la diafiltración de lactosuero a pH 5 empleando la membrana de 300 kDa. 177
- Figura 6.8. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y lactoferrina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolúmenes para la diafiltración continua de lactosuero a pH 5 empleando la membrana de 300 kDa. 179
- Figura 7.1. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la recirculación total de BSA, β -lactoglobulina y BSA + β -lactoglobulina. 186

Figura 7.2. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la recirculación total de BSA, β -lactoglobulina y de la mezcla binaria empleando la membrana de 300 kDa. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua). 187

Figura 7.3. Transmisión observada de BSA en función del tiempo para la recirculación total de la disolución unitaria y de la mezcla binaria a pH 5. 190

Figura 7.4. Transmisión observada de β -lactoglobulina en función del tiempo para la recirculación total de la disolución unitaria y de la mezcla binaria a pH 5. 191

Figura 8.1 Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 3-10. 200

Figura 8.2. Evolución temporal del flujo de filtrado para varios valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado. 202

Figura 8.3. Rendimiento de α -lactoalbúmina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado. 205

Figura 8.4. Rendimiento de β -lactoglobulina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado. 206

Figura 8.5. Rendimiento de BSA en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado. 207

Figura 8.6. Rendimiento de IgG en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado. 209

Figura 8.7. Rendimiento de lactoferrina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado. 211

Figura 8.8. Factor de mejora de pureza conseguido para las proteínas retenidas (BSA, IgG y LF) en función del pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido pretratado.	213
Figura 9.1. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 9 durante 8 diavolumenes.	220
Figura 9.2. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 9 durante 4 + 4 diavolumenes.	220
Figura 9.3. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la diafiltración continua de lactosuero ácido pretratado a pH 9 durante 8 diavolumenes y 4 + 4 diavolumenes.	222
Figura 9.4. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●-N=4+4 y ■-N=8) y filtrado acumulado (○-N=4+4 y □-N=8) en función del número de diavolumenes para la diafiltración continua de lactosuero pretratado a pH 9 para los experimentos de N=8 y N=4+4.	224
Figura 9.5. Esquema de la estrategia I de fraccionamiento.	226
Figura 9.6. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 1 de la estrategia I, N=0-4 y N=4-8.	226
Figura 9.7. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la etapa 1 de la estrategia I.	227
Figura 9.8. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes para la estrategia I.	229
Figura 9.9. Factor de mejora de pureza de lactoferrina en función del número de diavolumenes para la estrategia I.	234
Figura 9.10. Esquema de la estrategia II de fraccionamiento.	235
Figura 9.11. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 1 de la estrategia II, N=0-4 y N=4-8.	235
Figura 9.12. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 2 de la estrategia II (N=8-12).	235

- Figura 9.13. Evolución temporal del flujo de filtrado durante las dos etapas de la estrategia II. 236
- Figura 9.14. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolúmenes para las dos etapas de la estrategia II. 239
- Figura 9.15. Esquema de la estrategia III de fraccionamiento. 242
- Figura 9.16. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 1 de la estrategia III, N=0-4 y N=4-8. 243
- Figura 9.17. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 2 de la estrategia III (N=8-12). 243
- Figura 9.18. Evolución temporal del flujo de filtrado durante las dos etapas de la estrategia III. 244
- Figura 9.19. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolúmenes para las dos etapas de la estrategia III. 247
- Figura 9.20. Factor de mejora de pureza de lactoferrina en función del número de diavolúmenes para la estrategia III. 251
- Figura 10.1. Efecto de la adición de proteínas del suero lácteo sobre la producción de IL-8 en células HT-29. Todas las proteínas fueron adicionadas al medio de cultivo en la concentración de 1 mg/mL. Tras 24 h de incubación se determinó la concentración de IL-8 en el medio de cultivo mediante ELISA. Se muestran los datos como media \pm sem de dos experimentos (n=6). C: control, LF: lactoferrina, BSA: albúmina sérica bovina; GMP: glycomacropéptido bovino; β -LG: β -lactoglobulina; α -LA: α -lactoalbúmina, IgG: inmunoglobulinas. Se realizó un ANOVA de una vía y un test a posteriori de LSD. *: vs C, $p < 0.05$. 257
- Figura 10.2. Efecto de la adición de lactoferrina (LF), de lactosuero (WP) y de la fracción de proteínas enriquecida en lactoferrina (WPLF) sobre la producción de IL-8 por células HT-29. Todos los productos fueron añadidos en concentraciones finales de 1mg de proteína

por mL de medio de cultivo. Tras 24 h de incubación con los distintos productos se determinó la concentración de IL-8 en el medio de cultivo mediante ELISA. Se muestran los datos como media \pm sem de dos experimentos (n=6). Se realizó un ANOVA de una vía para células no estimuladas y otra para células estimuladas con LPS y un test a posteriori de LSD.

257

1. RESUMEN

El lactosuero es un subproducto de la industria quesera que contiene una serie de proteínas (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina bovina, lactoferrina e inmunoglobulinas) en concentraciones relativamente bajas pero con un alto valor biológico. Estas proteínas son muy usadas en la industria alimentaria por sus propiedades nutricionales y su solubilidad. Además, cada proteína, individualmente, tiene características biológicas, nutricionales y funcionales que las hacen muy interesantes para la mejora de fórmulas infantiles, alimentos funcionales y nutracéuticos. La lactoferrina, en particular, tiene propiedades antibacterianas, antivíricas, antiinflamatorias, estimula el sistema inmunológico y tiene facilidad para enlazar hierro. En animales de experimentación se ha observado que la lactoferrina suprime el crecimiento tumoral y metástasis e, incluso, puede inhibir la angiogénesis.

Desafortunadamente, las técnicas existentes para la purificación o el fraccionamiento de proteínas a escala de laboratorio no han podido ser implantadas a escala industrial o suponen un coste elevado, únicamente viables para productos farmacéuticos. En este sentido, estudios recientes en procesos de filtración con membranas han proporcionado resultados alentadores. La filtración tangencial de alta resolución (HPTFF) ha sido sugerida como técnica viable para el fraccionamiento de proteínas a gran escala. Esta técnica se basa en las interacciones electrostáticas proteína-proteína y proteína-membrana, permitiendo la separación de moléculas de similar tamaño mediante el control de las condiciones de operación, fundamentalmente pH y fuerza iónica.

Así, el objetivo de la investigación de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de un proceso para la obtención de lactoferrina bovina a partir de lactosuero mediante la técnica de filtración tangencial de alta resolución. Para ello se ha diseñado, en primer lugar, la estrategia de fraccionamiento del suero para la recuperación de lactoferrina. Seguidamente, se ha llevado a cabo el estudio teórico de la recuperación de lactoferrina bovina por ultrafiltración empleando dicha estrategia. Por último, se ha realizado el estudio experimental del fraccionamiento de lactosuero para comprobar la viabilidad del proceso propuesto.

La estrategia seleccionada de fraccionamiento de lactosuero para recuperar lactoferrina mediante HPTFF se muestra en la Figura 1.1. En este proceso se emplean dos etapas de ultrafiltración en cascada. En la primera etapa se deben retener inmunoglobulinas y

lactoferrina, pasando a filtrado, preferentemente, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA. En la segunda etapa, el retenido de la etapa anterior se hace pasar por otra membrana, seleccionada de forma que la lactoferrina se recoja en el filtrado, quedando retenidas las inmunoglobulinas. Esta estrategia de fraccionamiento fue sugerida por Zydney en 1998.

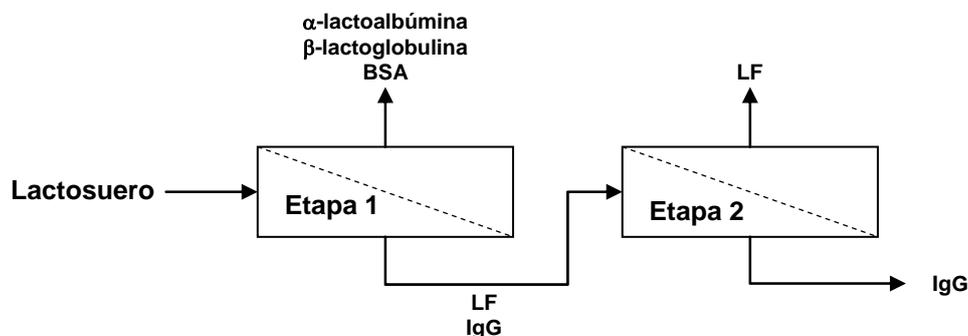


Figura 1.1. Esquema de la estrategia seleccionada de fraccionamiento de lactosuero para la recuperación de lactoferrina bovina mediante HPTFF.

En el estudio teórico se ha realizado la simulación de la recuperación de lactoferrina bovina a partir de lactosuero mediante la estrategia indicada anteriormente. Para ello, en primer lugar ha sido necesario el cálculo de la carga neta, peso molecular, radio de Stokes y radio efectivo de cada una de las proteínas, así como el cálculo de la fuerza iónica mínima en cada una de las etapas. El modelo del proceso está formado por ecuaciones diferenciales y algebraicas resultantes del planteamiento de balances de materia y ecuaciones de transporte de soluto a través de los poros de la membrana, asumiendo como premisas: modo de diafiltración continua, transmisión de proteína constante durante la filtración, no interacción entre las moléculas de proteínas y transmisión observada de cada proteína igual a la asintótica. Con todo ello, empleando la herramienta Solver de MS Excel, se ha resuelto el problema de optimización consistente en la determinación del pH, fuerza iónica y radio de poro para cada etapa, con el fin de minimizar el número de diavolúmenes totales del proceso, cumpliendo las siguientes restricciones:

- Primera etapa: concentración final en retenido superior al 90 % de la inicial para IgG y LF; e inferior al 10 % para ALA, BLG y BSA.

- Segunda etapa: concentración final en retenido igual a la inicial para ALA, BLG y BSA; superior al 90 % para IgG; e inferior al 10 % para LF.

La simulación de esta estrategia ha puesto de manifiesto la posibilidad de fraccionamiento mediante dos etapas de diafiltración continua con las condiciones de operación siguientes:

- Etapa 1: pH = 5.04, $r_p = 31.0$ nm, I = 0.0082 M, N = 2.59
- Etapa 2: pH = 8.35, $r_p = 12.7$ nm, I = 0.0030 M, N = 4.28

En el estudio experimental del fraccionamiento de lactosuero para comprobar la viabilidad del proceso propuesto, se obtuvieron los siguientes resultados:

- El proceso de clarificación de lactosuero consistente en aumentar el calcio iónico y el pH, acompañado por calentamiento, para provocar la agregación de los complejos lipídicos y partículas de fosfato cálcico, da lugar a la mejora de la permeabilidad de la membrana, en términos de flujo de filtrado y transmisión de proteína, sin afectar a su composición proteica.
- La membrana comercial más adecuada para llevar a cabo el fraccionamiento de lactosuero es la membrana de 300 kDa.
- Las interacciones proteína-proteína son determinantes en cada una de las etapas, dando lugar a radios efectivos distintos de los teóricos y, consecuentemente, a transmisiones diferentes a las esperadas. Así, al pH óptimo de la primera etapa (pH 5) se han obtenido rendimientos en filtrado acumulado de tan sólo 8 y 2% para α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, respectivamente, y nulo para BSA.
- La cuantificación individualizada de las posibles interacciones electrostáticas existentes resulta muy complicada dada la complejidad del lactosuero como mezcla real de proteínas y otros diversos componentes. Por tanto, ha sido necesario estudiar experimentalmente el efecto del pH sobre el fraccionamiento de lactosuero para poder determinar el óptimo para la primera etapa. Como consecuencia de este estudio, los valores de pH adecuados para la primera etapa han sido 3, 7 y 9.

➤ Se han propuesto tres estrategias de fraccionamiento:

- Estrategia I (Figura 1.2): filtración a pH 9 seguida de centrifugación a pH 4.9. Como resultado de esta estrategia se ha obtenido una fracción enriquecida en lactoferrina con un rendimiento de 45.2%, con un factor de mejora de la pureza de 366%.

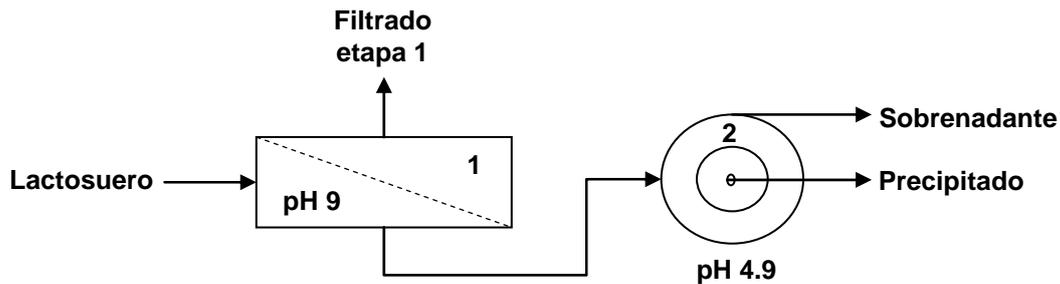


Figura 1.2. Esquema de la estrategia I propuesta para la obtención de lactoferrina a partir de lactosuero.

- Estrategia II (Figura 1.3): filtración a pH 7 seguida de filtración a pH 4.9. Como resultado de esta estrategia se ha obtenido una fracción enriquecida en lactoferrina con un rendimiento de 6.2%, con un factor de mejora de la pureza de 225%. En esta estrategia cabe destacar que se consigue recuperar en los filtrados acumulados el 94 y 86% de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina iniciales, respectivamente.

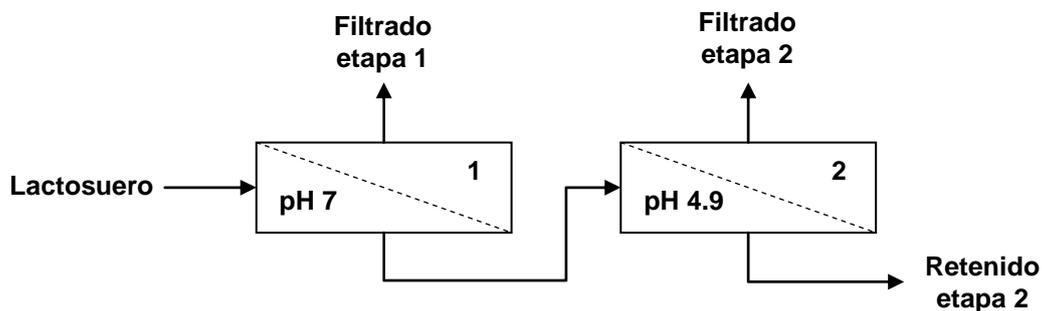


Figura 1.3. Esquema de la estrategia II propuesta para la obtención de lactoferrina a partir de lactosuero.

- Estrategia III (Figura 1.4): filtración a pH 3 seguida de filtración a pH 4.9. Como resultado de esta estrategia se ha obtenido una fracción enriquecida en lactoferrina con un rendimiento de 85.4%, con un factor de mejora de la pureza de 392%.

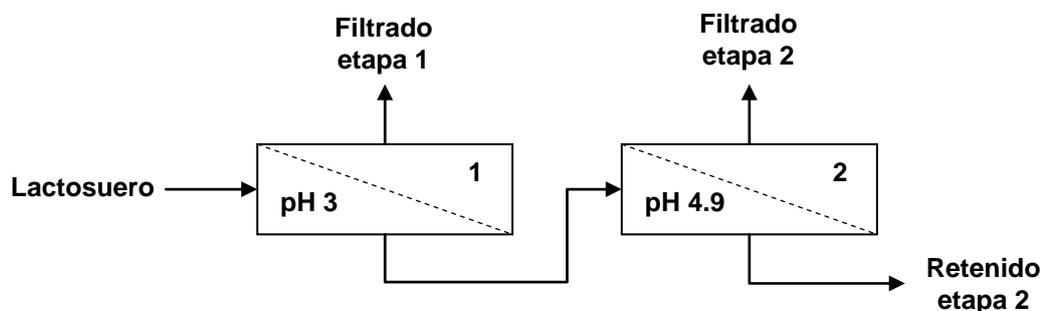


Figura 1.4. Esquema de la estrategia III propuesta para la obtención de lactoferrina a partir de lactosuero.

2. ANTECEDENTES

2.1. LACTOSUERO

El lactosuero es la fracción de leche que no precipita por acción del cuajo o por la acción de ácidos durante la elaboración de queso. La mayor parte del agua contenida en la leche se concentra en el suero y en ella se encuentran todas las sustancias solubles, como la lactosa, proteínas solubles y algo de grasa.

La composición del lactosuero depende no solamente de la composición de la leche empleada y el contenido de humedad del queso sino, de manera muy significativa, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada. Así, se pueden distinguir dos tipos de lactosuero en función de que su acidez sea superior o inferior a 18 grados Dornic (°D) (mL NaOH N/9 /100 mL lactosuero \equiv 1 °D \equiv 0.01% ácido láctico):

- Sueros ácidos: se producen en su mayor parte en la fabricación de caseína por la incorporación de un ácido, normalmente ácido clorhídrico, que produce su coagulación. La otra producción, minoritaria, procede de la coagulación de la caseína mediante la siembra de bacterias lácticas en la fabricación de quesos de pasta fresca y blanda.
- Sueros dulces: se obtienen en la elaboración de quesos de pasta prensada, utilizando para la coagulación cuajo, quimosina o cuajos de hongos o vegetales.

El lactosuero representa del 80 al 90 % del volumen total de la leche que se utiliza en el proceso de elaboración de queso y contiene alrededor del 50 % de los nutrientes de la leche original. En la Tabla 2.1 se muestra la composición media del lactosuero ácido y dulce. Se observa que el componente mayoritario del lactosuero es agua (93.5 %), pero presenta una cantidad importante de materia orgánica (lactosa y proteínas principalmente).

Tabla 2.1. Composición del lactosuero (promedios por 100 g).

	Agua	Lactosa	Materias			Ácido láctico
			Nitrogenadas	Grasas	Minerales	
Suero dulce	93.5	4.5	0.9	0.3	0.6	0.2
Suero ácido	93.5	4.0	1.0	0.1	0.8	0.6-1.0

La producción de lactosuero es muy elevada. Por término medio, por cada Kg de queso fabricado se obtienen de 9 a 12 L de lactosuero (Sandoval, 2005), dependiendo del tipo de queso y de la cantidad de agua utilizada durante el proceso. Teniendo en cuenta la proporción más desfavorable (9 L de lactosuero/Kg queso producido) y los datos de producción mundial de queso (FAOSTAT), la producción mundial de lactosuero en el año 2005 fue de $1.66 \cdot 10^{11}$ litros. En la Figura 2.1 se puede ver cómo se repartió dicha producción en los distintos continentes. El mayor tanto por ciento correspondió a Europa, con un 53 % de la producción mundial. La distribución de la producción en este continente se recoge en la Figura 2.2. Alemania, Francia e Italia, con un 22, 18 y 14 %, respectivamente, fueron los mayores productores de lactosuero en Europa en dicho año. En lo que respecta a España, su producción de lactosuero representó un 1 % de la producción europea. En la Figura 2.3 se representa la producción anual de lactosuero en España desde el año 2000 hasta el año 2005 (últimos datos disponibles). En el año 2005, la producción fue $1.21 \cdot 10^9$ L.

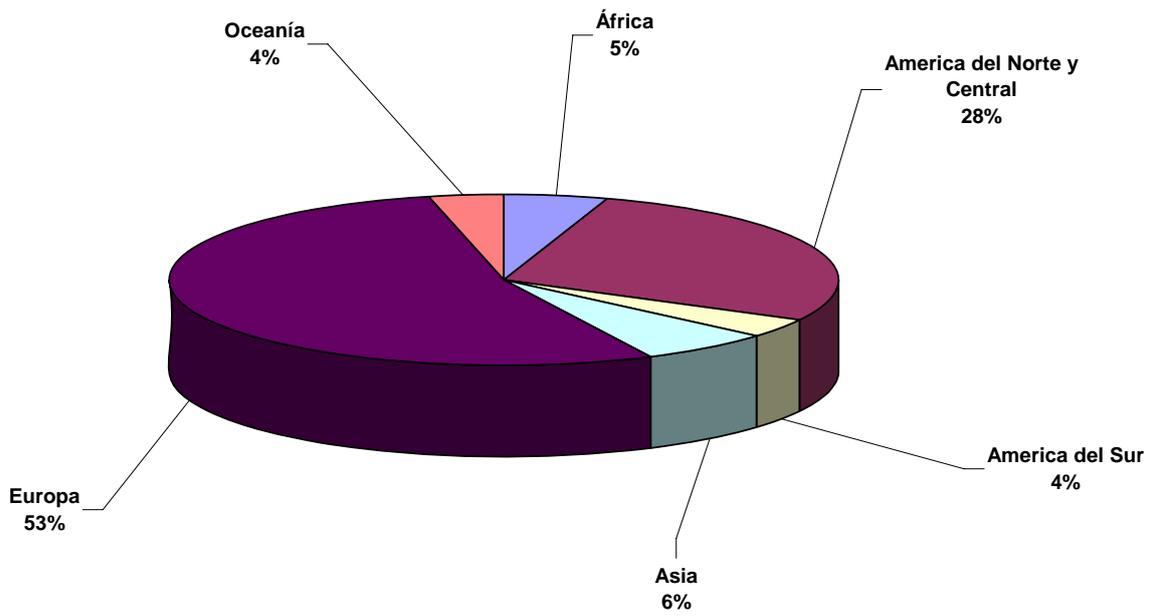


Figura 2.1. Distribución de la producción de lactosuero en el mundo. Año 2005.

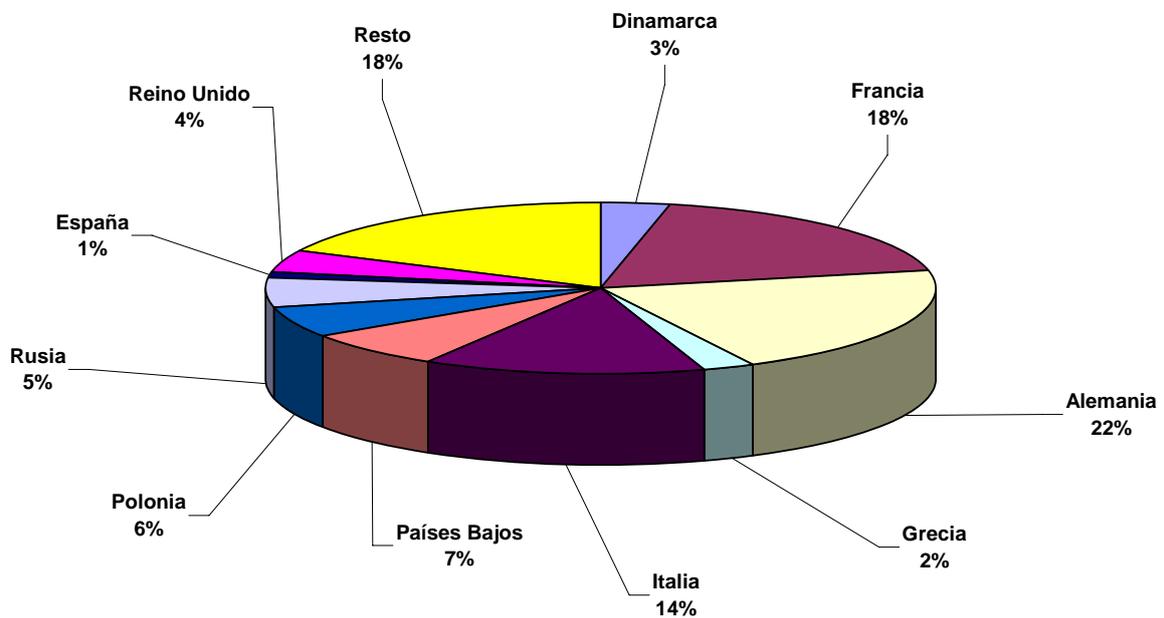


Figura 2.2. Distribución de la producción de lactosuero en Europa. Año 2005.

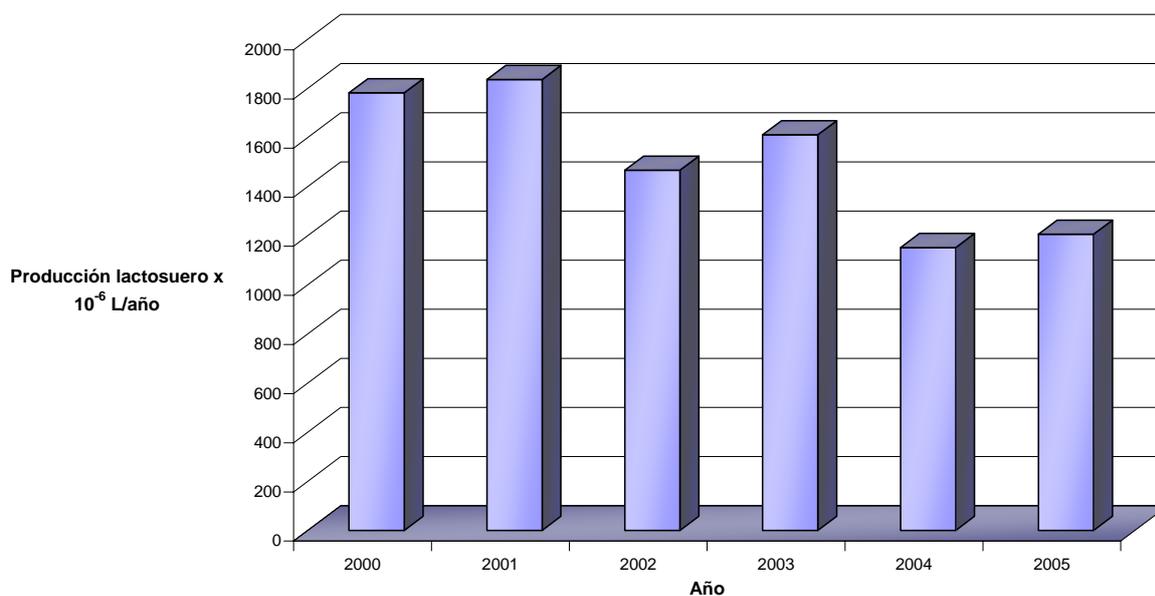


Figura 2.3. Evolución de la producción anual de lactosuero en España (2000-2005).

El lactosuero es un residuo con un alto poder contaminante, uno de los más contaminantes que existen en la industria alimentaria, debido a la gran cantidad de materia orgánica presente en su composición.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno de cinco días, DBO₅, es un parámetro utilizado para indicar el poder contaminante de un fluente. En la Tabla 2.2 se compara la DBO₅ del lactosuero con la de otros fluyentes (Laín, 2000)

Tabla 2.2. DBO₅ para distintos fluyentes (mg de oxígeno/L fluente).

	DBO ₅
Agua de río limpia	1-4
Agua residual depurada	10-25
Agua residual doméstica	150-300
Agua de lavado de una central láctea	2000-3000
Lactosuero	35000-50000

La forma habitual de expresar la carga contaminante de un fluyente industrial es mediante el valor habitante-equivalente (h-e). 1 h-e se define (Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre) como la carga biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno de cinco días de 60 gramos de oxígeno por día. Teniendo en cuenta esta definición, el valor de DBO₅ del lactosuero y la producción mundial del lactosuero en el año 2005, la contaminación diaria de lactosuero en dicho año fue equivalente a la contaminación de una población de 266 a 380 millones de habitantes.

Hasta hace dos o tres décadas, la utilización industrial del lactosuero planteaba numerosos problemas por lo que un volumen considerable de este producto iba a parar a ríos y desagües. Actualmente, la lucha contra la polución ambiental prohíbe esta práctica, y el vertido del suero en un curso de agua debe ir precedido necesariamente de una depuración. Esta operación, en la que, por otro lado, se eliminan los componentes más valiosos del lactosuero: lactosa y proteínas, es muy costosa. Si a esto se añade el interés creciente sobre las necesidades de la alimentación humana y animal, en la actualidad es preferible utilizar técnicas apropiadas para aprovechar el lactosuero antes que realizar su depuración.

Existen dos formas fundamentales de aprovechar el lactosuero (Figura 2.4): el aprovechamiento del suero no transformado, principalmente destinado a la alimentación animal, y el aprovechamiento industrial. Los procesos industriales actuales se encaminan a eliminar el agua, recoger las sales minerales, cristalizar la lactosa e intentar recuperar las proteínas del suero, sin alterar sus propiedades. La utilización industrial del lactosuero, por tanto, depende del componente del mismo que se quiera aprovechar.

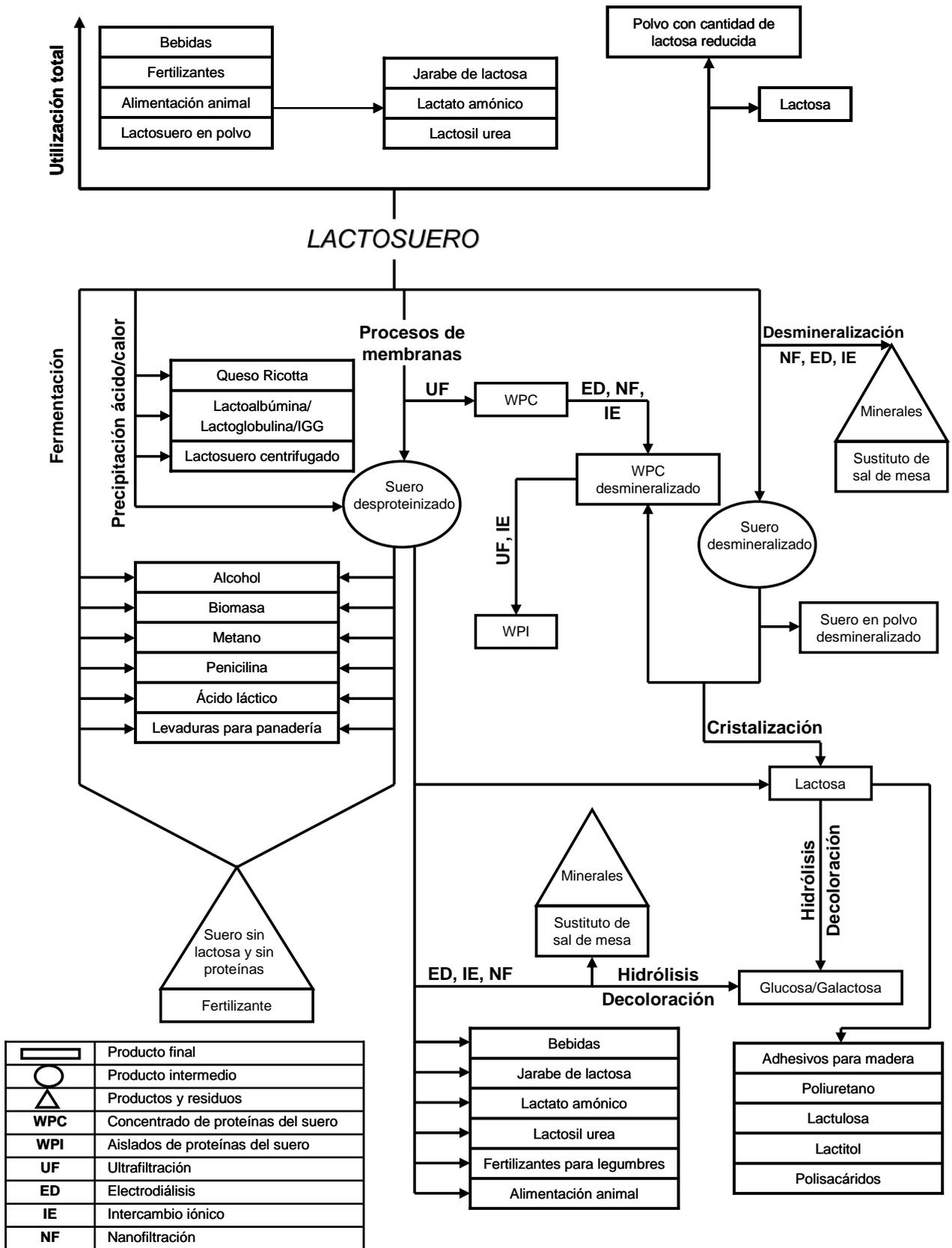


Figura 2.4. Alternativas para la utilización y el procesado del lactosuero (Hill, 2006).

2.1.1. Aprovechamiento integral: lactosuero en polvo

La deshidratación del lactosuero es un procedimiento muy utilizado en numerosos países ya que permite obtener, en un volumen reducido, un producto nutritivo de gran interés que puede entrar a formar parte de numerosos alimentos. Si bien, la aplicación principal del lactosuero en polvo es su uso en fórmulas infantiles. Este aprovechamiento del lactosuero tiene la ventaja añadida de que la industria láctea puede utilizar para la fabricación del suero en polvo las mismas instalaciones que para la deshidratación de la leche y, como consecuencia, obtener una reducción en los gastos de producción.

La deshidratación puede efectuarse sobre un suero entero, pero normalmente se realiza una desmineralización previa. Para desmineralizar el lactosuero, éste puede someterse a nanofiltración, con lo que se produce una desmineralización parcial, o a electrodiálisis y/o a intercambio iónico, con lo que se reduce el contenido mineral en más del 90 %.

Generalmente, tras la desmineralización y, previo a la deshidratación, se realiza una concentración en un evaporador de múltiple efecto para economizar combustible. Esta concentración permite, además, controlar la cristalización de la lactosa en forma α -monohidrato, para obtener un polvo no higroscópico. Normalmente, la operación de evaporación da lugar a un suero con una concentración en sólidos del 50-60 %. Tras la concentración, el suero se enfría y se envía a unos tanques donde se introducen pequeños cristales de lactosa con el fin de provocar la cristalización parcial del azúcar en su forma α -monohidrato. La deshidratación del suero concentrado puede realizarse por el método de cilindros calientes (por contacto o por película) o por secado por atomización o pulverización. Este último método, que permite obtener un suero en polvo de buena calidad, es básicamente el sistema utilizado de forma general.

El secado por atomización (pulverización): consiste en pulverizar el concentrado de suero en una cámara llena de aire caliente o atravesada por corrientes de aire caliente. Las gotitas de suero son recogidas y arrastradas por una corriente de aire caliente que les aporta el calor necesario para que se produzca la evaporación del agua. El agua evaporada es evacuada por la propia corriente de aire. Las partículas secas, por el contrario, caen al fondo del secadero y se descargan. La temperatura de entrada del aire calefactor oscila entre los 170-250 °C, mientras que la del producto a desecar es de aproximadamente 45-50 °C. Esta diferencia de

temperatura permite un rápido traspaso del calor, lo que se traduce en una desecación rápida del producto. Para evitar desnaturalización térmica del producto, el proceso se divide en varias etapas con distintas relaciones de temperatura-tiempo (Figura 2.5). En la desecación primaria, que se hace en torre de secado, es donde se vaporiza rápidamente la mayor parte del agua, dejando el producto con un 10-20% de humedad y en forma de aglomerados de tamaño variable. En la desecación secundaria, que se suele llevar a cabo en lecho fluidizado, se termina de desecar el producto. Por último, hay una aglomeración moderada con aire caliente o vapor de agua a temperaturas menores a 100 °C y un enfriamiento por medio de aire frío deshumectado a la temperatura adecuada para el almacenamiento o el envasado.

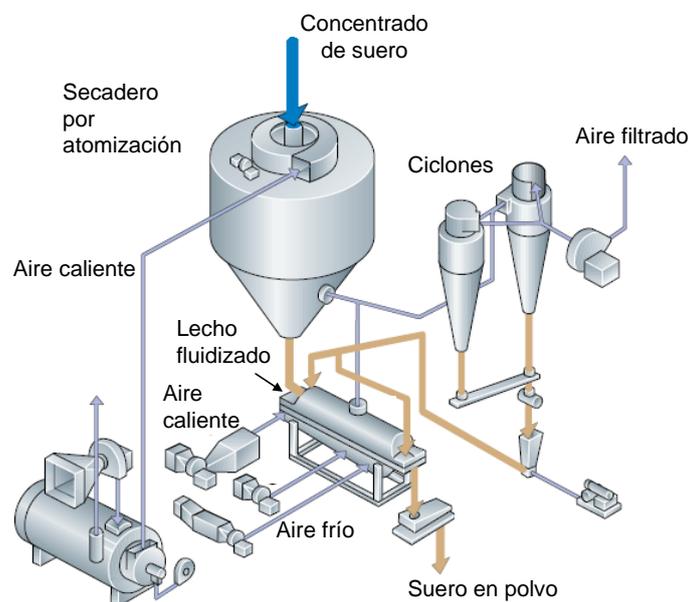


Figura 2.5. Secado de lactosuero en dos etapas: secado por atomización unido a secado en lecho fluidizado.

2.1.2. Aprovechamiento de la lactosa: cristalización y fermentaciones

La lactosa, el llamado azúcar de la leche, es un disacárido natural con peso molecular 342 g/mol. En la Figura 2.6 se observa que la lactosa está formada por la unión $\beta(1-4)$ de la β -D-galactopiranososa (galactosa) y la α ó β -D-glucopiranososa (glucosa). Existe bajo dos formas isómeras: α y β , que se diferencian, estructuralmente, sólo en la posición del -OH en el carbono monomérico de la glucosa. Sin embargo, difieren apreciablemente en sus

propiedades físicas (Tabla 2.3) (Kellam, 1998), lo que conduce a que tengan distintas aplicaciones comerciales.



Figura 2.6. Fórmula estructural de la β -lactosa.

Tabla 2.3. Propiedades físicas de la α -lactosa y β -lactosa.

	Unidades	α -lactosa	β -lactosa
Peso molecular	Da	360.3*	342.3
Punto de fusión	° C	202	252
Densidad	g/mL	1.545	1.590
Rotación óptica específica	α_{589}^{20}	+91.1	+33.5
Calor de disolución	J/g	-50.24	-9.62
Solubilidad en agua a 20 °C	g/100 mL	7.4	50.0

* forma monohidratada, en la cual la lactosa se encuentra en forma cristalina.

Cuando se disuelve lactosa en agua, ocurren mutarrotaciones, es decir, los isómeros se interconvierten, dando lugar a una disolución del 62.7% de β -lactosa a 20 ° C. Como la α -lactosa es la especie mucho menos soluble, la concentración de la disolución da lugar a la precipitación de α -lactosa y a más mutarrotaciones para mantener la misma posición de equilibrio.

El polvo de lactosa cristalizado es muy utilizado en la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales. Así, por ejemplo, se utiliza en confitería, pastelería, salsas, zumos

o helados, debido a su reducción del dulzor (30 % de la sacarosa), aumento de viscosidad, mejora de la textura y realce del sabor. Debido a su balance nutricional, se utiliza en fórmulas infantiles y en alimentos para diabéticos. Por sus propiedades de solubilidad y absorción, la lactosa es muy utilizada como vehículo en aromas volátiles y colorantes alimenticios. Además, la forma más pura de α -lactosa es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica como excipiente: componente químicamente inerte, que se añade al sistema de fabricación para proteger o mejorar la disponibilidad biológica del medicamento o mejorar cualquier aspecto de seguridad de dicho medicamento. Así, la α -lactosa es el segundo componente más empleado como relleno en comprimidos, cápsulas y otras formas de medicamentos orales.

En la Figura 2.7 se recoge el proceso de purificación de lactosa a partir de lactosuero (Kellam, 1998). En primer lugar se efectúa una concentración mediante la evaporación del lactosuero. Tras esta operación, se alcanza una concentración de, aproximadamente, 65 % de sólidos. En estas condiciones de concentración y en frío, se puede inducir la cristalización de la lactosa. Normalmente, se añaden cristales de lactosa para acelerar la cristalización. Después de este proceso, que puede llegar a durar varios días, los cristales de lactosa se enjuagan y se separan del licor madre mediante centrifugación y posterior secado en lecho fluidizado. Tras este proceso se obtiene lactosa con grado alimentario. El licor madre, que contiene cantidades significativas de proteína, minerales, vitaminas y sobre un 18 % de la lactosa, se suele utilizar como suplemento alimentario para ganado. En la Figura 2.8 se muestra la línea, anteriormente descrita, de producción de lactosa grado alimentario a partir de lactosuero.

Para obtener lactosa con grado farmacéutico, es necesario un proceso de refinado. Este proceso consiste en redissolver los cristales de lactosa y tratar la solución con carbón activo, que adsorbe gran número de solutos, incluida riboflavina, así como proteínas y proteasas. El carbón activo se separa por floculación y posterior filtración. Tras esto, se lleva a cabo la cristalización y separación de los cristales por centrifugación. Tras el secado de estos cristales, se obtiene lactosa con grado farmacéutico. Para obtener cristales con una distribución de tamaño específica, se lleva a cabo la molienda o tamizado de dichos cristales.

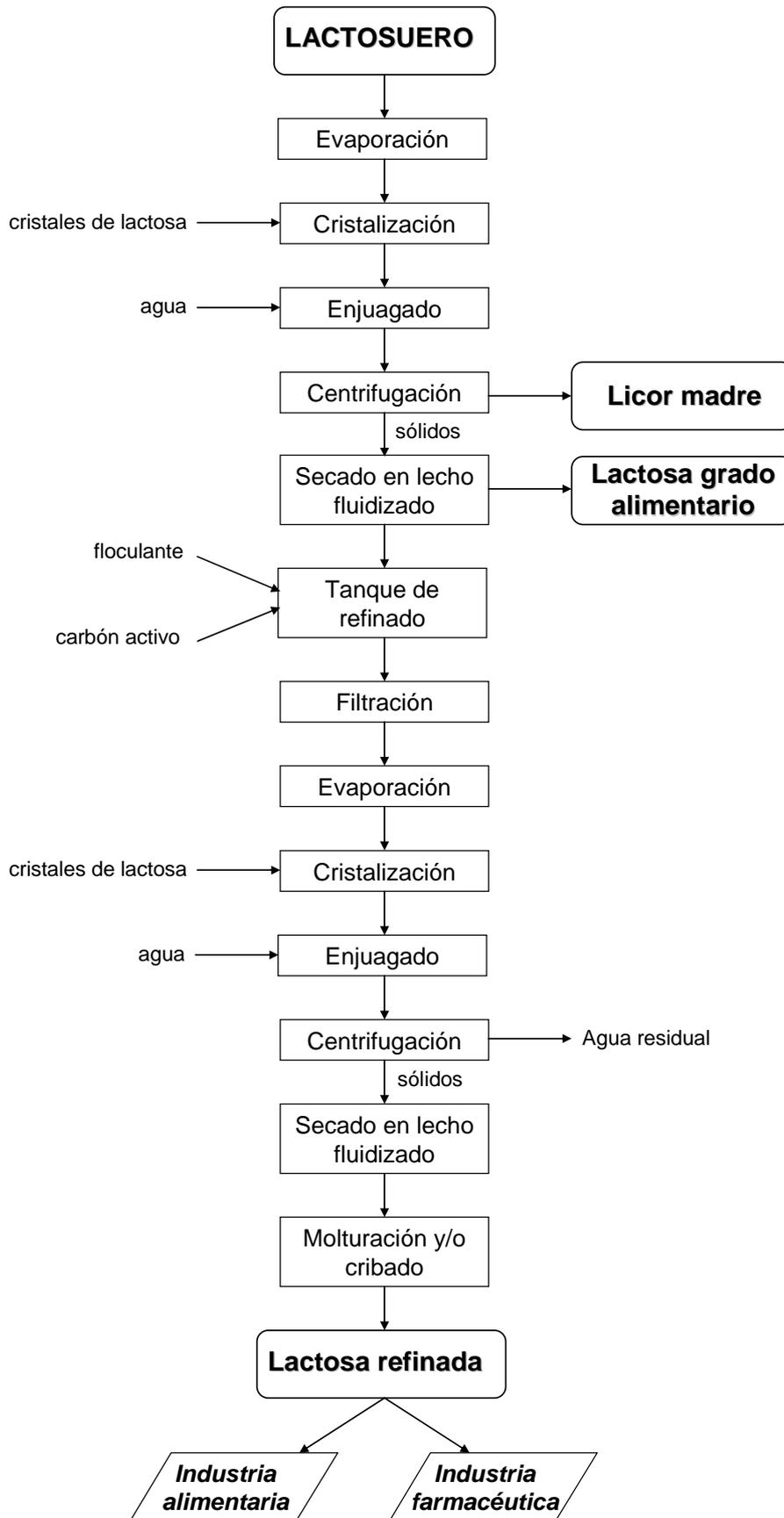


Figura 2.7. Proceso de purificación de lactosa a partir de lactosuero.

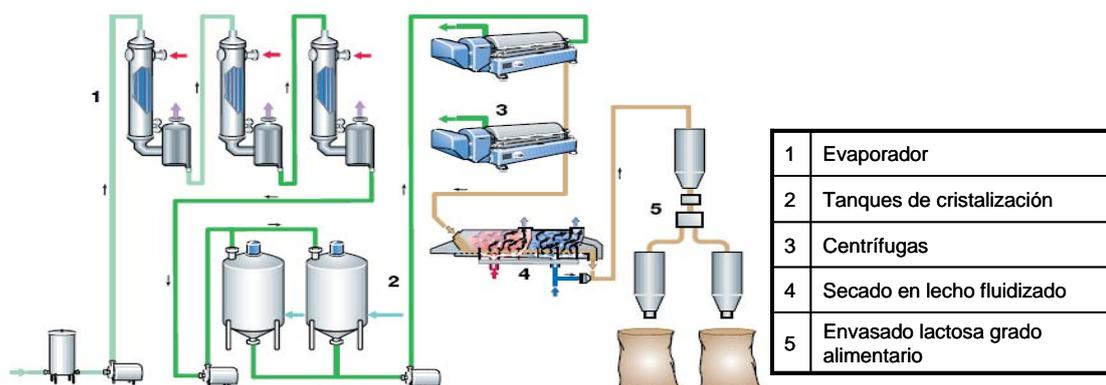


Figura 2.8. Línea de proceso de obtención de lactosa grado alimentario.

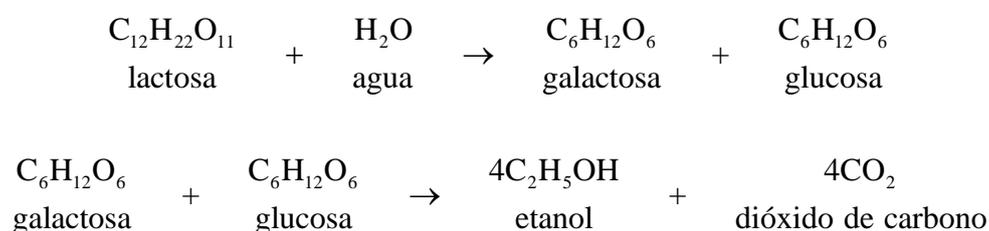
La lactosa es muy utilizada también como materia prima para producir derivados de lactosa. Los derivados de lactosa de mayor interés (Audic *et al.*, 2003) son: lactulosa, ampliamente utilizado en la industria farmacéutica; lactitol, utilizado en productos para diabéticos, edulcorantes bajos en calorías y productos para adelgazar; ácido lactobiónico, con aplicación en la conservación de órganos para trasplantes y en el fotoenvejecimiento cutáneo; lactosil urea, usado en alimentación de rumiantes; así como galacto-oligosacáridos o siropes de lactosa hidrolizada, mayoritariamente usados en la industria alimentaria.

La primera aplicación de la lactosa fue como medio de crecimiento de *Penicillium*, para la producción de penicilina, pero a partir de los años 50 se empezaron a utilizar sustratos más económicos. Sin embargo, hoy día se siguen obteniendo productos de fermentación usando lactosa como sustrato. La fermentación de la lactosa es muy usada para obtener, en función del organismo utilizado, productos tales como etanol, metano, ácidos orgánicos (láctico, cítrico, acético, etc), polisacáridos, vitaminas u otros productos de fermentación. Por tanto, la vía fermentativa es una de las alternativas para el aprovechamiento del lactosuero, existiendo procesos implantados a nivel industrial. Uno de estos procesos es la producción de metano o biogas por digestión anaerobia de lactosuero. Este proceso comprende tres etapas: hidrólisis de lactosa (y proteínas), fermentación y metanogénesis. La etapa previa de hidrólisis es necesaria puesto que los microorganismos no son capaces de fermentar la lactosa, pero sí la lactosa hidrolizada. El proceso metanogénico convierte sobre un 90 % de la materia orgánica hidrolizada en biogas (CH_4 y CO_2) (Audic, 2003). Aunque teóricamente 1 Kg de lactosa produciría 0.75 m^3 de biogas (que contendría, aproximadamente, un 50 % en volumen de metano), existen algunos problemas para

conseguir estos rendimientos teóricos. Entre ellos cabe destacar la lentitud en la inicialización del proceso, el requerimiento de un tiempo de residencia elevado y la generación de corrientes residuales con alta DBO₅.

El lactosuero constituye un excelente medio de cultivo, principalmente para los organismos capaces de metabolizar la lactosa. Basándose en esta propiedad, la lactosa contenida en el lactosuero se ha destinado a la producción de levaduras que constituyen, solas o mezcladas con el medio de cultivo, un alimento de alto valor biológico utilizable, principalmente, como suplemento para alimentación animal.

Otro de los procesos para aprovechar el lactosuero es la producción de etanol mediante fermentación. El etanol obtenido se utiliza en la industria farmacéutica, en perfumes y tintas, así como en bebidas. Normalmente, el lactosuero se encuentra a temperaturas superiores a 60 °C para evitar la contaminación bacteriana. Por tanto, tras una primera etapa de enfriamiento del lactosuero hasta la temperatura de fermentación, se añade la biomasa. Durante la fermentación, cuya duración total es de unas 24 horas, se llevan a cabo dos reacciones: una primera descomposición de lactosa en los dos azúcares que la componen y una posterior fermentación de dichos azúcares a etanol.



Una vez concluida la fermentación, se separa la biomasa del suero fermentado mediante separadores o por decantación. El etanol, contenido en dicho líquido, se separa por destilación, pudiéndose producir ocho grados diferentes de etanol, según el uso industrial que se le vaya a dar.

2.1.3. Aprovechamiento de las proteínas: concentración, hidrólisis y separación

2.1.3.1. Aprovechamiento del conjunto de proteínas

Las proteínas del lactosuero, que representan alrededor del 20 % de las proteínas de la leche de vaca, se definen como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar las caseínas a pH 4.6, a una temperatura de 20 °C.

Las proteínas del lactosuero se caracterizan por tener un alto valor biológico, es decir, son absorbidas casi en su totalidad por el sistema digestivo. Los principales componentes, así como su concentración (Zydney, 1998) se resumen en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Concentración de las principales proteínas del lactosuero.

Proteína	Concentración (g/L)
β -lactoglobulina	2.70
α -lactoalbúmina	1.20
Inmunoglobulinas	0.65
Seroalbúmina bovina	0.40
Lactoferrina	0.10

Estas proteínas son muy utilizadas en la industria alimentaria debido a su amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales. Entre estas últimas destacan la solubilidad, viscosidad, capacidad de retención de agua y sus cualidades como agentes gelificantes, emulsificantes y espumantes (Christiansen *et al.*, 2004; Neiryneck *et al.*, 2004; Firebaugh y Daubert, 2005; Herceg *et al.*, 2007).

Para aprovechar todas las propiedades anteriormente citadas de las proteínas del lactosuero, una de las técnicas más utilizadas es la ultrafiltración, mediante la cual se obtiene el llamado concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) y los aislados de proteínas del lactosuero (WPI). La diferencia entre ambos es que el WPC contiene hasta un máximo de 80 % de proteína, mientras que el WPI llega a contener hasta un 90 %.

En la Figura 2.9 se indican las etapas necesarias para obtener un concentrado de proteínas a partir de lactosuero. En primer lugar se separa la nata con el fin de reducir el contenido de grasa del lactosuero. Tras esta operación, se procede a calentar el suero para evitar la contaminación bacteriana. En el caso de lactosuero ácido, el tratamiento térmico se realiza a bajas temperaturas. En la mayoría de las empresas queseras, antes de transportar el lactosuero a las empresas que producen WPC, se realiza una pre-concentración mediante evaporación, ósmosis inversa, nanofiltración o ultrafiltración con el fin de reducir costes de transporte. Antes de la etapa de ultrafiltración se pueden realizar pretratamientos adicionales, como desmineralización o modificaciones enzimáticas. Si el modo de operación de la etapa de ultrafiltración es concentración, los concentrados de proteínas que se obtienen contienen hasta, aproximadamente, un 70 % de proteína. Sin embargo, si se trabaja en diafiltración, se puede eliminar más lactosa e impurezas, consiguiéndose concentrados de proteínas de hasta un 80 % de proteína. Tras la ultrafiltración, el concentrado es calentado, enfriado y nuevamente calentado para proceder al secado. Dicho secado se lleva a cabo, al igual que en el caso de lactosuero en polvo, en secaderos por atomización en los que la temperatura del aire a la entrada es de 175-190 °C. De esta forma se obtiene como producto final WPC en polvo. Sin embargo, en ocasiones, se comercializa WPC líquido, cuyo proceso de elaboración coincide con el producto en polvo, salvo por la eliminación de la etapa de secado.

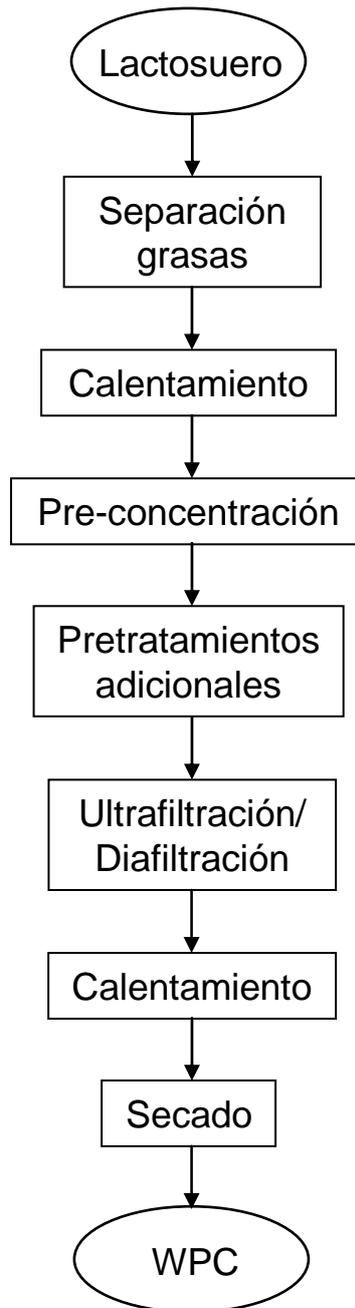


Figura 2.9. Diagrama de proceso de obtención de concentrado de proteínas a partir de lactosuero.

Los aislados de proteínas del lactosuero se pueden obtener, principalmente, por dos métodos: tecnología de membranas o por intercambio iónico. Durante el proceso de intercambio iónico, el lactosuero líquido se hace pasar a través de resinas especiales, a las que, mediante enlaces químicos, se unen las moléculas de proteína, quedando así separadas de la corriente de lactosuero. Esta unión proteínas-resina es reversible dependiendo del valor de pH. De este modo, mediante el ajuste del pH se consigue eluir dichas proteínas

que, posteriormente, son concentradas mediante ultrafiltración. Generalmente, los intercambiadores iónicos comerciales son capaces de separar todas las fracciones proteicas mayoritarias del lactosuero, a excepción de la fracción de glicomacropéptidos. El proceso de intercambio iónico modifica químicamente a las proteínas ya que el calcio es reemplazado por sodio durante las etapas de unión y desunión. Esto provoca una desnaturalización de las proteínas que da lugar a que los WPIs procedentes de intercambio iónico suelen tener más propiedades gelificantes y espumantes.

La tecnología de membranas utiliza etapas en serie de ultrafiltración y microfiltración para obtener WPI. Las membranas de microfiltración empleadas para tal fin se diseñan para retener partículas en suspensión en el rango de micras, como es el caso de grasas presentes en el lactosuero concentrado. Por otro lado, las membranas de ultrafiltración empleadas, se diseñan para retener los constituyentes del lactosuero en el rango molecular, como es el caso de las proteínas, separándolas de lactosa y otras impurezas presentes en el lactosuero. Esta técnica produce WPI que difiere del obtenido por intercambio iónico en que no hay modificación química de las proteínas y que la fracción de glicomacropéptidos es retenida junto con las demás. Si no hay ajuste de pH y el proceso se lleva a cabo a temperaturas intermedias, el producto final está casi completamente exento de proteínas desnaturalizadas.

En la Figura 2.10 se representa un posible proceso de producción de WPI a partir de lactosuero utilizando tecnología de membranas. El lactosuero clarificado y pasterizado se concentra de 5 a 6 veces mediante una primera etapa de ultrafiltración, obteniéndose un concentrado de proteínas con un contenido en proteína entre 35 y 45 %. Este WPC contiene pequeñas cantidades de grasa natural. Esta grasa se reduce utilizando un proceso de microfiltración en modo de diafiltración continua. El filtrado de este proceso es WPC 35-45 % desgrasado y es la alimentación a una segunda etapa de ultrafiltración, en la que se trabaja también en diafiltración continua, cuyo retenido final es un aislado de proteínas de lactosuero (WPI) con un contenido superior al 90 % de proteína.

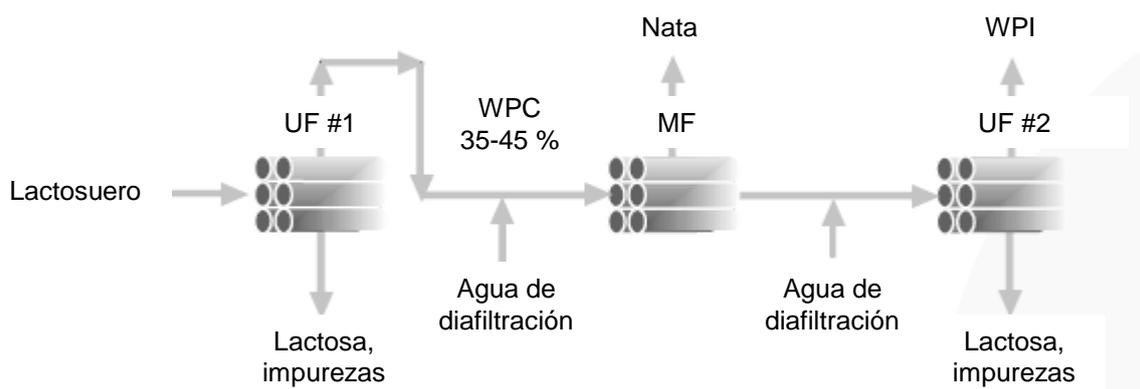


Figura 2.10. Proceso de producción de WPI a partir de lactosuero mediante tecnología de membranas (IONICS-Food Center, 2006).

En ambos procesos, tanto en el intercambio iónico como en la tecnología de membranas, el WPI obtenido (producto líquido) es secado por atomización para obtener el producto final deseado, WPI en polvo.

Las proteínas del lactosuero, además de tener sus propiedades específicas, parcialmente hidrolizadas son una importante fuente de péptidos bioactivos, que encuentran aplicación en la industria alimentaria. Así, por ejemplo, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina son precursores de las *lactorfinas*, que presentan actividad opioide (FitzGerald y Meisel, 1999; Pihlanto-Leppälä, 2001). Estos péptidos son capaces de unirse a receptores opioides situados, principalmente, en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal. La α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina son también precursores de las *lactokininas*, inhibidoras de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) (FitzGerald y Meisel, 1999; Pihlanto-Leppälä, 2001). La ACE está relacionada con la regulación de la presión sanguínea. Esta enzima eleva la presión sanguínea al convertir la angiotensina I en angiotensina II, que es un potente vasoconstrictor. La ACE, además, cataliza la degradación de la bradiquinina, que es un péptido vasodilatador, y estimula la liberación de aldosterona en la corteza suprarrenal. Por tanto, los inhibidores de la ACE podrían ejercer un efecto antihipertensivo como consecuencia de la disminución de angiotensina II y un aumento simultáneo en la actividad de la bradiquinina. La BSA, por su parte, es precursor de la *serorfina*, que tiene actividad opioide (McIntosh *et al.*, 1998); y de la *albutensina A*, inhibidora de la ACE (Mullally *et al.*, 1997). La *lactoferricina B* y la *lactoferrampina* son biopéptidos procedentes de la lactoferrina. La lactoferricina B presenta actividad antibacteriana, fungicida, antivírica y antitumoral, mayor incluso que la proteína nativa;

además de presentar propiedades anti-inflamatorias (van der Kraan *et al.*, 2004). En cuanto a la lactoferrapina, presenta actividad antimicrobiana (van der Kraan *et al.*, 2004).

Existen muchos métodos de obtención de estos péptidos con actividad biológica a partir del lactosuero. Aunque algunos de ellos se basan en hidrólisis ácida o básica, la mayoría de los procesos para obtener péptidos bioactivos son vía hidrólisis enzimática. Las enzimas más utilizadas son las pancreáticas, preferentemente tripsina, si bien, otros tipos de enzimas y combinaciones de proteasas (entre las que se incluyen alcalasa, quimotripsina, pepsina así como enzimas de origen bacteriano y fúngico) también se están empleando para generar péptidos bioactivos. El método de producción de hidrolizados enzimáticos de proteínas tradicional es el reactor tipo tanque agitado en funcionamiento discontinuo, ya que presenta la ventaja de su simplicidad de diseño y operación. Sin embargo, presenta considerables inconvenientes como el coste elevado de enzima (porque la enzima no se reutiliza), el alto coste energético y de mano de obra, así como la lentitud, bajo rendimiento y baja productividad del proceso. Como alternativa para solventar las desventajas de este tipo de proceso, se han ensayado métodos de inmovilización de enzima. Pero, debido a la pérdida de actividad de la enzima y restricciones en la difusión del sustrato por los poros de soporte, esta técnica no es muy utilizada a nivel industrial. Uno de los procesos más utilizados para paliar estos problemas o desventajas de los procesos tradicionales es el de reactor de membrana. Éste es un sistema de reacción que integra tres etapas: hidrólisis enzimática, separación del producto y recuperación del catalizador. La reacción se lleva a cabo en un reactor tipo tanque agitado. El producto de reacción pasa a un módulo de membrana, donde con un tamaño de corte adecuado, los péptidos liberados en la reacción pasan a través de la misma, constituyendo la corriente de filtrado. Las especies retenidas (entre ellas la enzima) se devuelven al tanque-reactor, que se alimenta continuamente con una disolución de sustrato. Con este sistema se pueden utilizar enzimas solubles, se consigue una elevada conversión de sustrato ya que se eliminan inhibidores, se controla el tamaño molecular del producto y se obtiene alta productividad debido a la reutilización de la enzima. A pesar de estas ventajas, también existen algunos inconvenientes como la disminución en el flujo de filtrado debido a la colmatación de la membrana así como la necesidad de purgar periódicamente para eliminar el sustrato que no reacciona y que dificulta el control del proceso (Prieto *et al.*, 2007).

2.1.3.2. Aprovechamiento individual de las proteínas

➔ α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina es una proteína que se encuentra en la leche de casi todas las especies, con la excepción de algunas focas. Su misión biológica es la síntesis de la lactosa, siendo la estructura reguladora de una galactosiltransferasa, que en ausencia de α -lactoalbúmina, transfiere la galactosa a las glicoproteínas. La α -lactoalbúmina se sintetiza como respuesta a los procesos hormonales que inducen la lactación. Una vez sintetizada, es transportada al aparato de Golgi, donde se une a la galactosiltransferasa. Esta unión hace aumentar la afinidad de esta enzima por la glucosa.

La α -lactoalbúmina es una proteína formada por una sola cadena polipeptídica, de 123 aminoácidos, con un peso molecular de 14147 g/mol (Zydney, 1998). Su estructura terciaria, muy compacta, globular, está mantenida por cuatro puentes disulfuro, con una zona de hélice α y otra de hojas plegadas β (Figura 2.11). Es una proteína ácida con un punto isoeléctrico entre 4.5 y 4.8 (Zydney, 1998).



Figura 2.11. Diagrama estructural de α -lactoalbúmina.

La α -lactoalbúmina es la segunda proteína en concentración en el lactosuero de vaca, y la más abundante en el lactosuero humano. Tiene un ión calcio unido, que es imprescindible en el mantenimiento de su estructura y de su actividad como reguladora de la galactosiltransferasa. La eliminación del calcio produce la estructura llamada "molten globule", que es un estado intermedio de desnaturalización, en el que la proteína mantiene su estructura secundaria, pero una estructura terciaria muy poco definida.

En disolución, la α -lactoalbúmina forma agregados con distinto grado de polimerización en función del pH al que se encuentre dicha disolución (Yang *et al.*, 2006). A pH 3, la α -lactoalbúmina presenta la estructura “molten globule”. Desde pH 3 a 1.5, mantiene dicha estructura, si bien conforme se desciende hasta pH 1.5, la estructura terciaria tiende a ser más flexible. Entre pH 4 y pH 4.5 esta proteína se encuentra en forma dímica. Entre pH 6 y 8.5, no hay prácticamente agregación. Por encima de pH 9.5, se produce una expansión pero sin agregación (Boye *et al.*, 1997).

Una de las principales aplicaciones de esta proteína es su utilización como nutracéutico debido a su alto contenido en triptófano (Beulens *et al.*, 2004). La serotonina o 5-hidroxitriptamina, es una sustancia que actúa sobre todo como neurotransmisor y es un importante regulador del apetito, influye en la preferencia por macronutrientes y afecta al estado de ánimo (Beulens *et al.*, 2004). Un aumento en serotonina lleva asociado una disminución de apetito, un aumento por la preferencia relativa por proteínas en lugar de carbohidratos y una mejora del estado de ánimo. La serotonina es sintetizada a partir del aminoácido triptófano (Trp), que compete para atravesar la barrera hematoencefálica con otros aminoácidos neutros grandes (LNAAs): valina, leucina, isoleucina, tirosina y fenilalanina. Por tanto, la disponibilidad de triptófano en el cerebro no depende sólo de la concentración total de triptófano en el plasma, sino que depende, principalmente, de la relación entre el triptófano y la suma de los otros aminoácidos neutros LNAAs (Trp/LNNA). Consecuentemente, un aumento en el plasma de la relación Trp/LNNA se traduciría en un aumento del triptófano disponible en el cerebro y, por tanto, en un aumento de los niveles de serotonina. El triptófano suele ser un aminoácido limitante en la mayoría de fuentes proteicas. Es más, la mayoría de las proteínas causan una disminución en la relación Trp/LNNA, de ahí que no sean apropiadas para el aporte de triptófano. Sin embargo, la α -lactoalbúmina es un candidato potencial para suplementar triptófano, ya que puede aumentar la relación Trp/LNNA en el plasma hasta un 48 % más que la caseína (Markus *et al.*, 2000).

Otra de las principales aplicaciones de la α -lactoalbúmina es su uso como aditivo en fórmulas infantiles (Lien, 2003). La leche bovina y humana difieren sustancialmente en la relación entre las proteínas del lactosuero y la caseína presente (\approx 60:40 en la leche humana y \approx 20:80 en la bovina), así como en las proporciones de proteínas específicas. Por tanto, si

se adiciona concentrado de proteínas del lactosuero bovino en fórmulas infantiles, para mantener la proporción entre proteínas del lactosuero y caseína presente en la leche humana se obtendrían fórmulas con un exceso en β -lactoglobulina y una concentración de α -lactoalbúmina relativamente baja; mientras que si lo que se intenta es mantener el perfil de aminoácidos esenciales presente en la leche materna, dichas fórmulas tendrían un exceso de proteínas. Con el fin de conseguir fórmulas infantiles más semejantes a la leche humana se está optando por adicionar α -lactoalbúmina. Este tipo de fórmulas enriquecidas en α -lactoalbúmina ofrecen al recién nacido la ventaja de disponer de concentraciones de triptófano en plasma iguales a las que tendrían si se alimentaran con leche materna, y elimina la desventaja de fórmulas anteriores en las que se proporcionaba al recién nacido un exceso de nitrógeno, no beneficioso para su organismo.

Recientemente, se ha descubierto que una variante de la α -lactoalbúmina puede entrar selectivamente en células tumorales e inducir la apoptosis de dichas células (Chatterton *et al.*, 2006). Consiste en la forma molten globule de la α -lactoalbúmina, que se estabiliza con un cofactor que es un ácido graso. Estos complejos proteína-lípido se conocen con el nombre de HAMLET/BAMLET para la α -lactoalbúmina humana/bovina, respectivamente. Hay que resaltar que esta unión es estereo-específica y que sólo un ácido graso *cis* insaturado puede enlazarse con la α -lactoalbúmina y, dentro de estos, sólo la unión con el ácido oleico en una conformación compacta es activa contra las células tumorales. Sin embargo, a pesar de que este tipo de complejos pueden ser considerados como candidatos potenciales para tratamientos terapéuticos, se requiere seguir investigando desde el punto de vista científico y clínico acerca de si tales complejos se forman o no durante la digestión y si son beneficiosos o no para la digestión humana (principalmente para los recién nacidos).

➤ *β -lactoglobulina*

La β -lactoglobulina es la proteína más abundante en el lactosuero bovino, representando alrededor de la mitad de las proteínas presentes. A pesar de que la β -lactoglobulina puede unirse *in vitro* a gran variedad de sustancias hidrofóbicas, entre las que destacan retinol (vitamina A) y ácidos grasos de cadena larga, la función fisiológica de esta proteína aún no es muy conocida. Pérez *et al.* (1992) demostraron que la β -lactoglobulina aumentaba la actividad de una lipasa pre-gástrica mediante la unión con los ácidos grasos que inhibían la

acción de dicha enzima. Por tanto, la β -lactoglobulina podría participar en la digestión de los lípidos lácteos durante el periodo de lactancia. Por otro lado, Kushibiki *et al.* (2001) realizaron un estudio sobre el efecto de la β -lactoglobulina en la absorción intestinal de retinol, triglicéridos y ácidos grasos de cadena larga en terneros, observándose una mejora en dicha absorción. De ahí que especularan que la β -lactoglobulina puede tener como función biológica la absorción y subsiguiente metabolismo de ácidos grasos.

Está formada por una sola cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de 18362 g/mol y un punto isoelectrico de 5.2 (Zydney, 1998). En la Figura 2.12 se puede observar la estructura de la β -lactoglobulina. Existen varias variantes genéticas, siendo las más comunes las llamadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A tiene una valina en la posición 118, y un aspártico en la posición 64, mientras que la variante B tiene alanina y glicina, respectivamente.

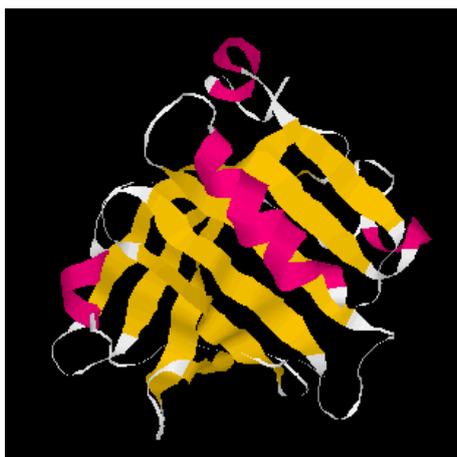


Figura 2.12. Diagrama estructural de β -lactoglobulina.

La estructura terciaria de los monómeros de la β -lactoglobulina contiene un grupo tiol (-SH) y está mantenida por dos puentes disulfuro (-S-S-). Aunque es la más hidrofóbica de las proteínas del lactosuero, la β -lactoglobulina es muy soluble en agua debido a que la mayoría de los componentes no polares están en el interior de la proteína y la mayoría de los polares están en la superficie.

Dependiendo de las condiciones de la solución, la β -lactoglobulina puede existir en uno de los distintos estados estructurales dependientes del pH (Taulier y Chalikian, 2001). Por debajo de pH 3, la β -lactoglobulina se presenta en forma de monómeros. Alrededor de pH

4.5, tiende a formar estructuras de hasta ocho moléculas. Al pH de la leche, se presenta en forma de dímeros, con los monómeros unidos de forma no covalente. Estos dímeros se forman entre pH 4 y pH 8. Por encima de pH 8, se produce la desnaturalización irreversible de la β -lactoglobulina, que se presenta en forma de monómeros que pierden su estructura terciaria rígida y parte de su estructura secundaria.

La β -lactoglobulina tiene muy buenas características gelificantes, por lo que es muy utilizada en alimentos en los que se requiera retener agua y que presenten buena textura (Chatterton *et al.*, 2006). Así, se utiliza en carnes, productos con pescado, productos de confitería y otros muchos alimentos prefabricados. Además, el rango de aplicaciones de productos enriquecidos con esta proteína se amplía gracias a la flexibilidad de los geles que se forman, ya que éstos pueden ser translúcidos, opacos, elásticos o inelásticos según las condiciones químicas, fundamentalmente pH y fuerza iónica, en las que ocurra la gelación (Chatterton *et al.*, 2006).

Otra de las principales aplicaciones de la β -lactoglobulina es como espumante y emulsionante (Dunlap y Côté, 2005), por lo que es ampliamente utilizada en formulaciones alimentarias como merengues y productos similares.

La β -lactoglobulina presenta muy buena solubilidad y claridad en un rango amplio de pH, es estable a tratamientos a altas temperaturas y tiene un valor nutricional elevado. Todas estas propiedades hacen que sea una proteína muy usada como agente activo en bebidas enriquecidas con proteína, como zumos de frutas y bebidas para deportistas, y en bebidas de larga duración (Chatterton *et al.*, 2006).

➔ BSA

La seroalbúmina bovina es una de las proteínas más abundantes en el sistema circulatorio sanguíneo. Su principal función biológica se debe a su habilidad para unirse a gran variedad de ligandos (Grybos *et al.*, 2004). Así, sirve de transporte de los ácidos grasos, insolubles en el plasma sanguíneo; aísla radicales libres de oxígeno o inactiva metabolitos lipófilos que son tóxicos.

Es una proteína relativamente grande, 69000 g/mol (Zydney, 1998), con una cadena formada por 583 aminoácidos. Al igual que la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, es

una proteína ácida, presentando carga neta nula a valores de pH entre 4.7 y 4.9 (Zydney, 1998). Su estructura tridimensional (Figura 2.13) está compuesta por tres dominios, cada uno de ellos formado por diez segmentos helicoidales. Su estructura secundaria, en su forma nativa, es principalmente alfa-helicoidal y contiene 17 puentes disulfuro.

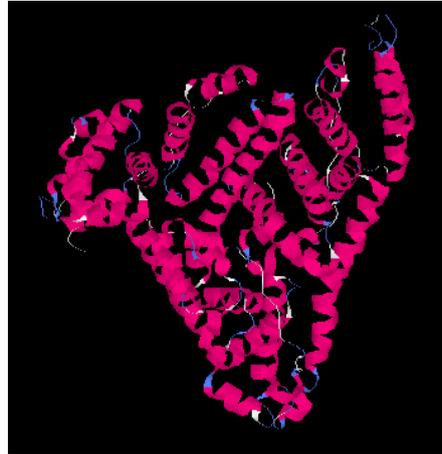


Figura 2.13. Diagrama estructural de BSA.

La BSA presenta diferentes estados de isomerización en función del pH al que se encuentre. En la Figura 2.14 se indican estos estados, el pH de transición de un estado a otro, así como el porcentaje de estructura alfa helicoidal que presenta (Foster, 1997).

pH de transición:		2.7		4.3		8.0		10.0	
	E	←-----→	F	←-----→	N	←-----→	B	←-----→	A
Nombre del estado:	Expandido		Rápido		Normal		Básico		Envejecido
% helicoidal:	35		45		55		48		48

Figura 2.14. Formas isoméricas de la BSA en función del pH (Foster, 1997).

La transición de N a F implica el desdoblamiento del dominio III. La forma F se caracteriza por un gran aumento de la viscosidad, mucha menor solubilidad y una significativa pérdida del contenido helicoidal. A valores de pH inferiores a 4, la BSA sufre otra expansión, debida a la pérdida de las hélices entre dominios (hélice 10 del dominio I que está conectada con la hélice 1 del dominio II, y hélice 10 del dominio II conectada a la hélice 1 del dominio III). Esta forma expandida (forma E) lleva consigo un aumento intrínseco de la viscosidad, y un aumento axial en el radio hidrodinámico. Sin embargo, estudios recientes (Grybos *et al.*, 2004) indican lo contrario. Estos autores obtuvieron diámetros reales de la

molécula de BSA de 10 ± 2.5 nm, 11 ± 4 nm, 13 ± 6 nm y 22 ± 5 nm para pH 2.0, 3.5, 5.0 y 7.0, respectivamente. En la Figura 2.15 se muestran las formas N y las formas E y F propuestas por Carter y Ho (1994). A pH 9, la BSA cambia su conformación a la forma básica (B). Si se mantiene la disolución de BSA a pH 9 y baja fuerza iónica a 3 ° C durante 3 o 4 días, ocurre otra isomerización, conocida como la forma A.

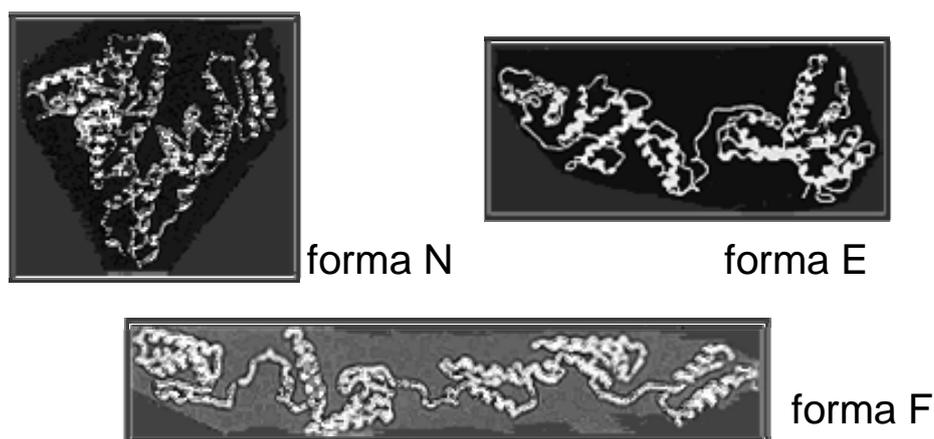


Figura 2.15. Estructura de la forma N de la BSA y las formas E y F propuestas (Carter y Ho, 1994).

La BSA es muy utilizada tanto en la industria alimentaria como para fines terapéuticos (Zydney, 1998). Estas aplicaciones son debidas a sus principales propiedades: capacidad espumante, propiedades gelificantes y capacidad de enlazar ligandos. La primera de ellas es consecuencia de que su difusión a través de la interfase aire-agua le permite reducir la tensión superficial, creando y estabilizando las emulsiones. En esta interfase, las moléculas de BSA se desdoblán parcialmente y se asocian para producir una película intermolecular elástica. Esta capacidad espumante se ve mejorada cuando la BSA interacciona con otras proteínas, principalmente básicas, como protaminas (Glaser *et al.*, 2007), lisozima y clupeína (Poole *et al.*, 1984). Cuando se utiliza BSA sola actúa mejor en valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico, donde la repulsión electrostática es mínima. Sin embargo, cuando se utiliza con proteínas básicas, la expansión y estabilidad de la emulsión es mayor para pH entre 8 y 9, que son valores intermedios entre los puntos isoeléctricos de la BSA y de las proteínas básicas, es decir, cuando las proteínas se encuentran cargadas con signo opuesto.

A temperatura ambiente la estructura terciaria de la BSA está bien definida y estabilizada. Sin embargo, al aumentar la temperatura, algunas regiones moleculares pierden su conformación, haciéndose accesibles a nuevas interacciones con otras moléculas, produciéndose agregados solubles mediante enlaces disulfuro y enlaces no covalentes (Militello *et al.*, 2003). El mecanismo de gelación se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa ocurre el desdoblamiento o disociación de las moléculas de proteína, mientras que en la segunda se dan las reacciones de asociación o agregación. La naturaleza de los geles obtenidos (ordenados o desordenados, estructura y tipo de los agregados) depende de las condiciones del proceso de gelación, principalmente pH, temperatura, tiempo de calentamiento y concentración de proteína (Militello *et al.*, 2004).

Probablemente, la propiedad más importante de la BSA es su capacidad para unirse reversiblemente a una gran variedad de ligandos. Entre ellos caben destacar los ácidos grasos de cadena larga, insolubles en el plasma, que son transportados gracias a su unión con la BSA (Álvarez *et al.*, 1996). Estos ácidos grasos enlazados a la BSA no son tóxicos y son utilizados para formar diferentes tejidos en el organismo. Sin embargo, en su forma libre, tienen propiedades detergentes, desnaturalizan proteínas y causan distintos problemas en órganos celulares. Además, la BSA transporta y sirve de depósito de óxido nítrico, que está implicado en procesos fisiológicos importantes, como, por ejemplo, la neurotransmisión (Stamler *et al.*, 1992). Otra de las propiedades de la BSA es como antioxidante (Kouoh *et al.*, 1999), función debida a la unión de la BSA con radicales oxigenados libres que son, por tanto, retirados del plasma sanguíneo.

➔ *Inmunoglobulinas*

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas cuya función esencial es la de unirse a un antígeno. Esta unión tiene una gran especificidad, de tal manera que una inmunoglobulina se unirá fundamentalmente y con mayor avidez a un antígeno determinado. Para la destrucción de dicho antígeno requieren de la colaboración de otros elementos. Así, cuando las inmunoglobulinas detectan los antígenos, se unen a ellos y actúan de transductores de la información de la presencia de los mismos que serían destruidos por macrófagos, polimorfonucleares o células NK.

Se conocen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgM, IgA, IgG, IgD e IgE. La inmunoglobulina G es la más abundante, representando más del 70 % de las

inmunoglobulinas séricas, mientras que la inmunoglobulina M representa del 5-10 %, la IgA del 10-15 % y las IgD e IgE se presentan en mucha menor proporción.

Las inmunoglobulinas tienen un punto isoeléctrico entre 5.5-8.3 y un peso molecular que varía entre 150000-1000000 g/mol (Zydney, 1998). Están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas, dependiendo del tipo de inmunoglobulina, en una o varias unidades estructurales básicas. Cada unidad estructural básica tiene forma de Y como puede observarse en la Figura 2.16 y está compuesta por dos cadenas de bajo peso molecular, denominadas cadenas ligeras o cadenas L; y otras dos de alto peso molecular, llamadas cadenas pesadas o cadenas H. Las cadenas ligeras están formadas por unos 200 aminoácidos, mientras que las pesadas poseen unos 400 aminoácidos. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un puente disulfuro, mientras que las cadenas pesadas, que están glicosiladas, se unen entre sí mediante dos puentes disulfuro.

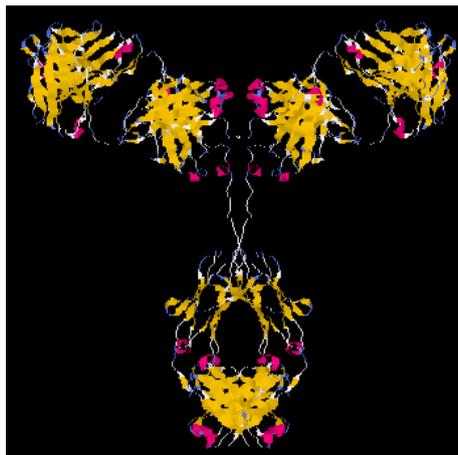


Figura 2.16. Diagrama estructural de una unidad básica de inmunoglobulina.

Mehra *et al.* (2006) recogieron en su revisión las principales propiedades de las inmunoglobulinas. Entre ellas se encuentra la capacidad para prevenir el ataque de patógenos al tejido epitelial, que es un paso crítico en el establecimiento de una infección. Es decir, las inmunoglobulinas suponen una protección inmunológica pasiva contra infecciones microbianas. Por otro lado, cuando las infecciones ya están establecidas, las inmunoglobulinas pueden ser utilizadas con efectos terapéuticos, si bien sólo ha sido comprobado en enfermedades donde la infección se mantiene mediante constantes reataques y reinfecciones, como es el caso de las caries; o en aquellas en las que están involucradas toxinas o componentes inflamatorios. Por todo ello, se comercializan

alimentos enriquecidos en inmunoglobulinas destinados tanto a la alimentación de animales de granja, como a suplementar la dieta humana.

✦ *Lactoferrina*

La lactoferrina es una proteína fijadora de hierro, emparentada estructuralmente con la transferrina de la sangre y con la ovotransferrina de huevo. La lactoferrina de la leche está muy poco saturada en hierro, ya que una de sus funciones biológicas es la protección del recién nacido mediante la absorción de hierro, haciendo éste indisponible para las bacterias y para la formación de radicales libres en las reacciones de oxidación.

La lactoferrina es una glicoproteína con un peso molecular de 78000 g/mol y con un punto isoeléctrico en la zona básica, 9.0 (Zydney, 1998). La secuencia de aminoácidos de la lactoferrina bovina consiste en una cadena polipeptídica simple de 689 aminoácidos (Moore *et al.*, 1997), dos aminoácidos menos que la lactoferrina humana. A pesar de que las secuencias de la lactoferrina bovina y la humana coinciden en un 69 %, ambas moléculas presentan la misma estructura tridimensional. En la Figura 2.17 se observa que la lactoferrina está constituida por dos lóbulos (lóbulo N y lóbulo C, correspondientes a las mitades de la molécula que contienen el N terminal y el C terminal, respectivamente), que tienen una secuencia coincidente en, aproximadamente, un 40 %. Estos lóbulos, que se dividen a su vez en dos dominios (N1, N2, C1 y C2) (Baker y Baker, 2005), están unidos mediante una hélice de tres vueltas.

Los puntos de unión del hierro están localizados en posiciones equivalentes en ambos lóbulos. La unión del hierro es reversible y tiene lugar en presencia de un ión carbonato o bicarbonato por cada ión férrico. El hierro se une directamente a los grupos laterales de dos tirosinas, una histidina y un aspártico, mientras que el ión carbonato (o bicarbonato), también unido al hierro, interacciona con la cadena lateral de una arginina.



Figura 2.17. Diagrama estructural de LF.

La lactoferrina bovina forma complejos no covalentes con la β -lactoglobulina y la BSA, con una relación molar lactoferrina-proteína de 2:1 y 1:1, respectivamente (Lampreave *et al.*, 1990). Sin embargo, no hay evidencias de asociación de la lactoferrina con la α -lactoalbúmina.

Debido a su semejanza con las transferrinas, las primeras investigaciones acerca de las funciones de la lactoferrina se centraban en su capacidad para enlazar hierro: absorción de hierro, actividad antimicrobiana y regulación del metabolismo del hierro durante procesos de inflamación. Sin embargo, investigaciones posteriores han revelado gran cantidad de funciones, muchas de ellas no relacionadas con el enlace de hierro. En la Figura 2.18 se recogen estas posibles funciones.

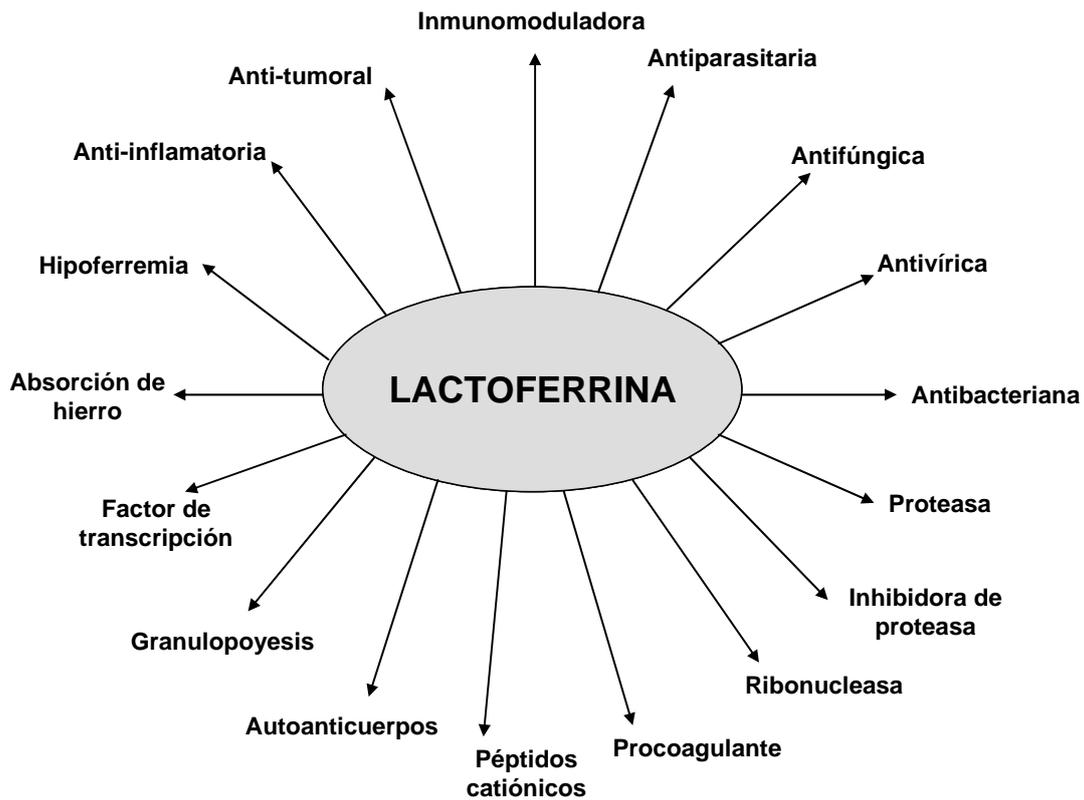


Figura 2.18. Posibles funciones de la lactoferrina (Brock, 2002).

Una de las funciones más importantes de la lactoferrina es su actividad antimicrobiana contra gran cantidad de bacterias, hongos y virus. Su primera función antimicrobiana es bacteriostática, es decir, detiene el crecimiento de las bacterias. Gracias a su gran capacidad para enlazar hierro, la lactoferrina retira éste de las zonas de infección, no permitiendo a los patógenos disponer de este nutriente esencial para su crecimiento. Además, la lactoferrina tiene una segunda función antimicrobiana, mediante actuación directa sobre los microorganismos. La apolactoferrina (forma de la lactoferrina desprovista de hierro) puede unirse a la membrana externa de bacterias, causando una rápida liberación de lipopolisacáridos y, por tanto, un aumento de la permeabilidad de la membrana, siendo más susceptible a choques osmóticos, a lisozima y a otras moléculas bacterianas. Recientemente se ha descubierto una tercera función antibacteriana de la lactoferrina, una actividad proteolítica. Mediante proteólisis, la lactoferrina degrada a ciertos microorganismos, disminuyendo así su patogenicidad (Valenti y Antonini, 2005). En cuanto a su actividad antivírica, la lactoferrina bovina es un potente inhibidor del desarrollo de diferentes virus tales como el virus del herpes simplex 1 y 2, el virus de la inmunodeficiencia humana o los virus de la hepatitis B y C (Valenti y Antonini, 2005).

Otra de las funciones destacables de la lactoferrina es la regulación de las respuestas inmune y antiinflamatoria. A nivel celular, la lactoferrina actúa como promotor de la activación, diferenciación y proliferación de las células del sistema inmunológico (Legrand *et al.*, 2006). En los focos de inflamación, la lactoferrina retira las moléculas de hierro libre, previniendo de este modo que sirva de catalizador en la producción de radicales libres dañinos (Legrand *et al.*, 2005). Además la lactoferrina puede realizar esta función antiinflamatoria de forma directa al unirse a las endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos), mediadores en la respuesta inflamatoria en infecciones bacterianas (Brock, 2002).

En los últimos años se ha estudiado en animales el efecto inhibitorio de la lactoferrina en el desarrollo de tumores experimentales cuando se administra oralmente en el estado de post-iniciación. Se ha encontrado inhibición de carcinogénesis de colon, esófago, pulmón y vejiga en ratas (Tsuda *et al.*, 2002). En la Figura 2.19 se recogen los posibles mecanismos de acción de la lactoferrina y fragmentos de ésta para prevenir la carcinogénesis en diferentes órganos. La inhibición de la carcinogénesis de colon parece deberse a la supresión de enzimas de fase I, como citocromo P450 1A2 (CYP1A2), que es preferentemente inducido por aminas heterocíclicas carcinogénicas. Otro posible mecanismo encontrado en la metástasis de células en el intestino delgado supone la estimulación de la producción de Interleukina 18 (IL-18) y caspasa-1 en las células epiteliales, que conlleva una inducción de las células positivas de interferon (INF- γ +). Esto supone que la inmunidad de la mucosa intestinal mejore sustancialmente. Por otro lado, la lactoferrina ejerce una actividad anti-virus de la hepatitis C (HCV) en pacientes con hepatitis activa crónica. Por último, mediante la mejora de la microflora, la lactoferrina inhibe la producción de ácidos bólicos libres (tóxicos) que favorecen la proliferación celular y, por tanto, la carcinogénesis. Con todo esto se concluye que, mediante la ingesta oral de la lactoferrina bovina, se puede prevenir el cáncer de colon, reducir la metástasis de células tumorales, aumentar la inmunidad intestinal y actuar como agente anti-virus de la hepatitis C.

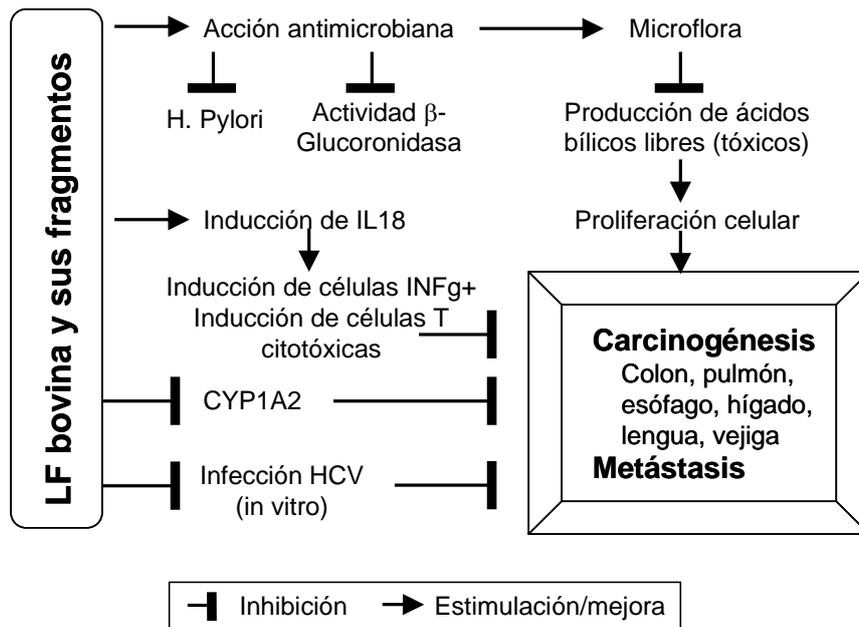


Figura 2.19. Posibles mecanismos del efecto de la lactoferrina bovina y sus fragmentos, obtenidos por hidrólisis, para prevenir la carcinogénesis en diferentes órganos (Tsuda *et al.*, 2002).

En resumen, las proteínas del lactosuero, individualmente, presentan propiedades biológicas, nutricionales y funcionales que las hacen muy interesantes para la mejora de fórmulas infantiles, alimentos funcionales y nutracéuticos. Es por ello que el fraccionamiento del suero lácteo para la recuperación y aislamiento de las proteínas que contiene es de gran interés científico y comercial. En el próximo epígrafe se abordarán los diferentes métodos utilizados para tal fin.

2.2. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO

Los métodos para separar las proteínas del lactosuero intentan explotar las diferencias existentes entre dichas proteínas: solubilidad, tamaño, concentración, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas. De este modo, los principales procesos propuestos para el fraccionamiento de las proteínas del lactosuero se pueden clasificar en tres categorías:

- Precipitación selectiva
- Métodos cromatográficos
- Filtración con membranas

2.2.1. Precipitación selectiva

La precipitación selectiva es uno de los métodos más antiguos y simples para separar proteínas. Es un proceso que consiste en el ajuste de las propiedades físico-químicas de una disolución para promover la insolubilidad de alguno/s de sus componentes. Cada una de las proteínas del lactosuero presenta una solubilidad diferente en función del pH, temperatura y fuerza iónica a la que se encuentre. Por tanto, variando el ambiente físico-químico del lactosuero se conseguirá obtener dos fracciones: un sobrenadante más diluido que la alimentación y un precipitado más concentrado en el ó los componentes insolubles en esas condiciones. Otra de las estrategias para insolubilizar una o varias proteínas presentes en una mezcla consiste en la adición de un agente que reaccione selectivamente con ella/s, provocando así su precipitación y retirada de la mezcla líquida.

Existen muchos procesos propuestos para fraccionar las proteínas del lactosuero utilizando el método de precipitación selectiva, en el que la estrategia utilizada depende de la proteína que se desee insolubilizar. A continuación se detallan los estudios más recientes y relevantes que emplean esta técnica para el fraccionamiento del lactosuero o purificación de alguna de sus proteínas.

Outinen *et al.* (1996) estudiaron dos métodos de precipitación selectiva mediante tratamiento térmico para, a partir de lactosuero, separar la α -lactoalbúmina de la β -

lactoglobulina. El método 1 tenía una primera etapa de concentración (4 veces) del lactosuero mediante ultrafiltración; mientras que en el método 2, el lactosuero se concentraba 3 veces mediante un evaporador a vacío. En ambos procesos se consiguió la precipitación de la α -lactoalbúmina, BSA e inmunoglobulinas mediante tratamiento térmico a 55°C durante 30 min a pH 3.6. Esta fracción desnaturalizada se separó mediante centrifugación y, tras dispersión en agua y neutralización, se liofilizó. El sobrenadante, compuesto básicamente por β -lactoglobulina se neutralizó y, en el método 1 se liofilizó directamente, mientras que en el método 2 se ultrafiltró hasta contener un 70% en proteína antes de liofilizarlo. En ambos casos se produjo una pérdida importante de proteína a lo largo del proceso.

Bramaud *et al.* (1997) realizaron una optimización sobre la precipitación selectiva de α -lactoalbúmina mediante tratamiento térmico suave. Como la precipitación de la α -lactoalbúmina a su punto isoelectrico está controlada por el equilibrio de complejación calcio-proteína, la adición de citrato, un quelante de calcio, reduce la concentración de calcio iónico libre, desplazando el fenómeno de precipitación a rangos de temperatura menores. De este modo, el tratamiento térmico (a pH 3.9) se pudo llevar a cabo a 35 °C, en lugar de 55°C, consiguiendo así que permaneciese soluble más del 98% de la β -lactoglobulina y que la cantidad de BSA e inmunoglobulinas co-precipitadas se viese reducida. La fracción de α -lactoalbúmina precipitada dependió de las condiciones de temperatura y de la concentración inicial de la misma.

Gésan-Guiziuo *et al.* (1999) investigaron un proceso de precipitación de α -lactoalbúmina a escala de laboratorio y planta piloto. El proceso constaba de una primera etapa de clarificación del concentrado de proteínas de lactosuero, seguido por la precipitación térmica (pH 3.9, 55°C, 30 o 150 min) de la α -lactoalbúmina, BSA e inmunoglobulinas. La β -lactoglobulina se separó del precipitado mediante diafiltración o microfiltración. El precipitado se resolubilizó y se concentró mediante diafiltración o microfiltración. A escala de laboratorio, se obtuvieron purezas en el rango de 52-83% y 85-94% para la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, respectivamente. Sin embargo, a escala de planta piloto, sólo se consiguió recuperar el 6% de la α -lactoalbúmina y el 51% de la β -lactoglobulina.

Konrad *et al.* (2000) analizaron un nuevo proceso, a escala de planta piloto, para obtener un aislado de β -lactoglobulina a partir de lactosuero. El método comprendió un primer tratamiento enzimático con pepsina porcina del lactosuero (pH 1.9, 40°C, 2h) con el que todas las proteínas excepto la β -lactoglobulina fueron hidrolizadas. Mediante una segunda etapa con membranas: 1) microfiltración con membrana de 0.1 μm , 40°C, pH 1.9, 2) ultrafiltración para concentrar 15 veces el retenido y, 3) diafiltración con 10 KDa, 40°C, pH 1.9, las proteínas hidrolizadas fueron recogidas en el filtrado mientras que la β -lactoglobulina permaneció en el retenido. Con este proceso se consiguió recuperar el 67.3% de la β -lactoglobulina inicial.

Kiesner *et al.* (2000) propusieron un proceso combinado de precipitación selectiva y filtración con membranas para obtener suero enriquecido en α -lactoalbúmina. En la primera etapa se realizó un tratamiento térmico a 90°C que provocó una desnaturalización moderada de la α -lactoalbúmina (73.8%) y una desnaturalización casi completa de la β -lactoglobulina (99.2%). En la segunda etapa, el suero pretratado térmicamente se filtró a través de una membrana cerámica de 0.1 μm , a 50 °C y 0.7 bar de presión transmembrana. Como resultado de este proceso combinado se obtuvo un filtrado con el 7.5% de la α -lactoalbúmina inicial y solamente el 0.02% de la β -lactoglobulina. Los autores indicaron que, aunque la recuperación de α -lactoalbúmina era baja, la técnica propuesta era simple.

Rodrigues *et al.* (2001) desarrollaron un sistema de extracción líquido-sólido para obtener una fracción rica en α -lactoalbúmina y otra rica en β -lactoglobulina a partir de una mezcla ideal de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina y de un concentrado de proteínas de lactosuero. El sistema de extracción estaba formado por un polímero (Polietilenglicol) y una sal inorgánica ((NH₄)₂SO₄). En las condiciones óptimas y utilizando la mezcla ideal se consiguió recuperar el 96.7% de la α -lactoalbúmina en la fase superior y el 83.8% de la β -lactoglobulina en la fase inferior; con coeficientes de partición de 12.8 y 0.34, respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizó el concentrado de proteínas, estos valores fueron muy inferiores, debido a la complejidad de la mezcla. Utilizando esta misma estrategia, pero partiendo de suero ácido y utilizando el sistema Tween 80/(K₂HPO₄ y NaH₂PO₄), Liu *et al.* (2006) consiguieron recuperar el 87.6% de la α -lactoalbúmina en la fase polimérica sólida y el 98.2% de la β -lactoglobulina en la fase acuosa salina. La fase

sólida, mediante la adición de agua y sales, sufrió una nueva extracción líquido-sólido, recuperándose el 85.1% de la α -lactoalbúmina en la fase acuosa salina.

Alomirah y Alli (2004) investigaron la separación de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina a partir de distintos preparados de proteína de lactosuero. Se basaron en la solubilidad de la β -lactoglobulina a bajo pH en presencia de sal, en la débil unión de calcio con la α -lactoalbúmina a pH inferior a 3.9, y en la facilidad de secuestro de calcio mediante quelantes, lo que provoca la desestabilización y precipitación de la forma libre de calcio de la α -lactoalbúmina. Se adicionó al suero inicial citrato sódico y hexametáfosfato sódico (agentes quelantes), ajustando el pH a 3.9 e incubando durante 45 min a 35°C, provocando la precipitación de la α -lactoalbúmina libre de calcio. Tras centrifugación se obtuvo el primer producto, el sobrenadante, conteniendo del 47-69% de la β -lactoglobulina inicial con una pureza del 84-95%, en función del suero inicial. El precipitado se resolubilizó añadiendo CaCl_2 , recuperándose la forma de α -lactoalbúmina saturada en calcio. Se centrifugó y se obtuvo la segunda fracción final, la de α -lactoalbúmina sin ajuste de pH, con el 23-89% de recuperación de α -lactoalbúmina y purezas del 83-90%. Por último, el precipitado de esta segunda centrifugación se resolubilizó con CaCl_2 y se ajustó el pH a 7.5. Se centrifugó y se obtuvo en el sobrenadante del 11 al 43% de la α -lactoalbúmina inicial con purezas entre el 68 y 73%.

Fuda *et al.* (2005) optimizaron la separación selectiva de β -lactoglobulina de suero dulce mediante la utilización de microburbujas estabilizadas generadas por agitación intensa de un surfactante catiónico (bromuro de cetil trimetil amonio). La mezcla de estas microburbujas con el suero provocó la complejación de la β -lactoglobulina, que quedó así separada del resto de proteínas del lactosuero. Tras el estudio de parámetros del proceso como pH, fuerza iónica y relación de la cantidad de surfactante/proteína, llegaron a unas condiciones óptimas (pH 8, fuerza iónica 0.018 M y masa surfactante/masa proteína total 0.26-0.35) en las que el 80-90% de la β -lactoglobulina fue retirada de la fase líquida como precipitado, mientras que el 75% de la LF y lactoperoxidasa, el 80% de la BSA, el 95% de las inmunoglobulinas y el 65% de la α -lactoalbúmina fueron recuperadas en la fracción líquida. Empleando esta misma técnica pero con un surfactante aniónico, bis(2-etilhexil)sulfosuccinato sódico, Fuda *et al.* (2004) separaron el 90% de la LF y

lactoperoxidasa presentes en el suero dulce inicial. Sin embargo, la adsorción de otras proteínas además de las pretendidas hizo que la selectividad del proceso fuese baja.

Ekici *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre el fraccionamiento, mediante formación de espumas, de BSA, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina presentes en lactosuero. Investigaron la influencia del pH y el tiempo en el proceso, proponiendo una posible estrategia de separación consistente en una primera etapa a pH 6.2 durante 1 h que daría lugar a una recuperación del 45.2% de la β -lactoglobulina, 31.4% de la α -lactoalbúmina y únicamente un 6.5% de la BSA. El suero restante podría volver a sufrir el proceso de fraccionamiento pero a pH 2, con lo que se obtendría BSA pura. La fracción espumosa resultante de la primera etapa podría volver a espumarse a pH 3.5 y después de 5 min, la nueva fracción espumosa contendría el 88% de β -lactoglobulina y el 12% de α -lactoalbúmina.

Da Fonseca y Bradley (2005) patentaron un método para fraccionar las proteínas del lactosuero utilizando goma xántica como agente complejante de la β -lactoglobulina. El sobrenadante obtenido tenía una pureza del 95% de α -lactoalbúmina, mientras que el precipitado tenía una pureza del 95% de β -lactoglobulina.

Lucena *et al.* (2006) precipitaron simultáneamente α -lactoalbúmina, BSA e inmunoglobulinas presentes en un concentrado de proteínas de lactosuero mediante la adición, a pH 4, de ácido láctico para retirar iones calcio. Mediante centrifugación se separó el precipitado, que se resolubilizó restaurando el pH inicial. Con este proceso se obtuvieron dos fracciones: una solución enriquecida en α -lactoalbúmina (86% de recuperación con una pureza del 74%) y una fracción enriquecida en β -lactoglobulina (99% de la proteína inicial) con una pureza superior al 85%.

Casal *et al.* (2006) describieron un método para retirar selectivamente β -lactoglobulina de suero dulce por la adición de chitosán. Cuando se adicionó al suero clarificado 1.9-3.0 mg/mL de chitosán, a pH 6.2, se consiguió retirar el 100% de la β -lactoglobulina presente, mientras que el 80% del resto de proteínas permanecieron solubles.

2.2.2. Métodos cromatográficos

La cromatografía puede definirse como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su movilidad entre sí y con respecto a la fase móvil. La base de la separación cromatográfica será, por tanto, la diferencia en la migración de los mismos.

Existen muchos procesos que utilizan métodos cromatográficos para fraccionar las proteínas del lactosuero. A continuación se indican los trabajos realizados en los últimos años en este sentido, clasificados en función del tipo de cromatografía utilizada.

✦ *Cromatografía por afinidad*

La cromatografía por afinidad es un tipo de cromatografía que permite la separación de una o unas pocas proteínas de una mezcla compleja por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. El lactosuero se introduce en la columna donde la proteína que se desea purificar queda adsorbida mediante una unión específica con un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la matriz de la columna. El resto de proteínas son lavadas o eluidas a través de la columna mediante una primera fase móvil que no influye en el acoplamiento. A continuación se introduce una nueva fase móvil que desactiva el acoplamiento por alteración reversible de los sitios activos del inhibidor-ligando, de la proteína o de ambos, eluyéndose así la proteína de interés. Con este método se obtienen dos fracciones a partir del lactosuero inicial. La primera de ellas conteniendo la proteína de interés sola purificada; mientras que la segunda correspondería al lactosuero exento de dicha proteína.

Outinen *et al.* (1996) propusieron dos métodos cromatográficos para fraccionar el lactosuero. Ambos procesos consiguieron la adsorción por afinidad de la β -lactoglobulina, obteniéndose la α -lactoalbúmina en la fracción eluida con agua. Las fases móviles utilizadas para eluir la β -lactoglobulina fueron: ácido clorhídrico en el método 1, en el que la columna estaba empaquetada con gel de sílice; y cloruro sódico en el método 2, que contaba con resinas de poliestireno para la adsorción. Las fracciones finales de ambos

métodos se liofilizaron. La relación α -lactoalbúmina/ β -lactoglobulina en los productos finales fueron: para el método 1, 1.25 y 0.11; para el método 2, 1.67 y 0.17 para la fracción rica en α -lactoalbúmina y para la rica en β -lactoglobulina, respectivamente.

Blomkalns y Gomez (1997) consiguieron el aislamiento de α -lactoalbúmina presente en un concentrado de proteínas de lactosuero bovino mediante cromatografía por afinidad con iones metálicos inmovilizados (Cu(II) unido a agarosa). La proteína fue eluida con acetato sódico (pH 5.5-3.8) y pasada por otra columna de agarosa descargada para eliminar los iones Cu(II) presentes. El producto final contenía el 80% de la α -lactoalbúmina inicial con una pureza del 90%.

Li-Chan *et al.* (1998) aislaron lactoferrina a partir de suero dulce utilizando columnas de inmunoafinidad. Inmovilizaron anticuerpos específicos para lactoferrina sobre un lecho de agarosa mediante enlaces covalentes. Como fase móvil utilizaron HCl a pH 2.8 o un eluyente comercial. Con este proceso consiguieron recuperar 6.2 ± 2 mg de LF pura partiendo de 100 mL de lactosuero dulce.

Ulber *et al.* (2001) extrajeron LF y lactoperoxidasa de suero dulce utilizando cromatografía de adsorción con membranas fuertemente ácidas. A escala de laboratorio estudiaron el proceso para obtener las condiciones óptimas: adsorción a pH 6.2 y elución con 1 M de cloruro sódico a pH 7, consiguiendo separar las dos proteínas adsorbidas mediante la utilización de un gradiente de cloruro sódico en tres pasos: el primero y segundo (NaCl 0.1 M y 0.2 M) permitieron obtener la fracción de lactoperoxidasa con 85% de pureza; la tercera elución (NaCl 1 M) dio lugar a la fracción de lactoferrina con 95% de pureza. Posteriormente, Plate *et al.* (2006) realizaron el escalado, obteniendo los mismos resultados.

Gurgel *et al.* (2001) investigaron el fraccionamiento de las proteínas de lactosuero con un ligando hexapeptídico enlazado a una resina. Se inyectó un aislado de proteínas de lactosuero en la columna empaquetada con la resina y el ligando peptídico. La primera fracción, eluida con NaCl 0.1 M estaba formada por un 90.6% de α -lactoalbúmina, 5.5% de β -lactoglobulina y 2.5% de LF. Esta fracción enriquecida en α -lactoalbúmina contenía el 47.9% de la α -lactoalbúmina inicial. La segunda fracción, eluida con NaCl 0.25 M contenía un 80.8% de β -lactoglobulina, 17.8% de α -lactoalbúmina y 2.1% de LF. La tercera

fracción, eluida con NaCl 0.5 M estaba compuesta por 92.4% de β -lactoglobulina, 7.3% de α -lactoalbúmina y 0.3% de LF. La última fracción, eluida con ácido acético al 2% era una mezcla de todas las proteínas (62.7% β -lactoglobulina, 2.5% α -lactoalbúmina y 28.3% BSA). Estos autores propusieron un proceso en dos etapas, combinando esta resina peptídica con una amino resina, mediante el que se obtuvo una fracción enriquecida en α -lactoalbúmina con mayor pureza (100%) aunque con una recuperación de la misma menor (35.2%).

Schlatterer *et al.* (2004) estudiaron la separación de β -lactoglobulina de suero ácido mediante cromatografía con hidroxapatita cerámica, utilizando como agente desplazante una fase móvil de fosfato con gradiente iónico de fluoruro. Como resultado del proceso obtuvieron una fracción rica en β -lactoglobulina, con una pureza de, al menos, el 96%. Con el fin de eliminar las trazas presentes (inmunoglobulinas G, BSA y LF), se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño, obteniéndose una pureza final para la β -lactoglobulina de, aproximadamente, el 99%.

Conrado *et al.* (2005) utilizaron una resina hidrofóbica de alta densidad para recuperar α -lactoalbúmina de lactosuero bovino. El proceso se llevó a cabo en un lecho expandido, utilizando Tris-EDTA durante la fase de adsorción, con el fin de eliminar iones calcio para hacer la α -lactoalbúmina más hidrofóbica y, así, favorecer la unión de ésta con la resina. Para eluir la proteína adsorbida se utilizó Tris y cloruro cálcico. El producto obtenido tenía una riqueza del 79%.

Pessela *et al.* (2006) propusieron un proceso en dos etapas para purificar inmunoglobulina G a partir de concentrado de proteínas de lactosuero. La primera etapa de dicha estrategia consistió en la eliminación de la BSA mediante una adsorción selectiva sobre un soporte de agarosa. El suero, exento de BSA, se pasó a una segunda etapa en la que se consiguió purificar la inmunoglobulina G por adsorción selectiva sobre un soporte de monoaminoetil-N-aminoetil-agarosa. De este modo se consiguió recuperar el 80% de las inmunoglobulinas, prácticamente puras.

Wolman *et al.* (2007) estudiaron la obtención de LF a partir de suero de calostro bovino empleando una membrana de fibras huecas de glicidil metacrilato/dimetil acrilamida copolimerizados con membranas de polisulfona con un ligando de afinidad enlazado. La

mejor desorción (99%) se consiguió con 2 M NaCl en 25% de etilenglicol. Con este proceso se consiguió un producto final con 94% de pureza de LF, con caseínas e inmunoglobulinas como impurezas.

Chen *et al.* (2007) aislaron LF pura de suero bovino mediante adsorción en micropartículas superparamagnéticas de poliglicil metacrilato acopladas con heparina. Estas partículas magnéticas mostraron alta efectividad, ya que retuvieron LF directamente de lactosuero ácido en un solo paso, consiguiéndose una pureza superior al 96%, utilizando soluciones de cloruro sódico para eluir.

➤ *Cromatografía de intercambio iónico*

Este tipo de cromatografía se utiliza para separar moléculas en base a su carga eléctrica. Se utilizan resinas que contienen grupos cargados, teniendo la propiedad de separar especies ionizadas (cationes o aniones). 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, más fuertemente cuanto mayor sea la carga. En el caso de mezclas proteicas, la cromatografía de intercambio iónico se basa en las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado. La afinidad de cada proteína por los grupos cargados de la columna está influenciada por el pH y por la concentración de iones en solución que compiten con la proteína en la interacción con la matriz. La separación de la proteína de la matriz cargada puede obtenerse gradualmente cambiando el pH y/o la concentración salina de la fase móvil, de tal forma que se genere un gradiente de concentración.

Hahn *et al.* (1998) realizaron un estudio sobre la separación de inmunoglobulina G, LF y lactoperoxidasa del resto de proteínas presentes en el lactosuero. Utilizaron cuatro intercambiadores catiónicos de forma que, en todos ellos, la α -lactoalbúmina pasaba libremente a través de la columna, mientras que las tres proteínas anteriormente indicadas quedaban retenidas. Para eluir las proteínas adsorbidas se utilizaron gradientes de concentración de cloruro sódico, obteniéndose diferentes fracciones en función del intercambiador utilizado.

Ye *et al.* (2000) describieron un proceso para fraccionar las proteínas de lactosuero consistente en dos etapas de cromatografía de intercambio iónico. En la primera etapa, el lactosuero se hizo pasar por un intercambiador catiónico fuerte, sulfopropilo, para separar LF y lactoperoxidasa. La lactoperoxidasa fue eluida utilizando cloruro sódico de 0.16 a 0.19 M a pH 6.5, y posteriormente, aumentando la concentración (entre 0.42 y 0.55 M) se eluyó la LF. El lactosuero exento de estas dos proteínas se introdujo en un intercambiador aniónico fuerte, aminoetil cuaternario, donde quedaron retenidas α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. La α -lactoalbúmina se eluyó utilizando como fase móvil HCl-Tris a pH 8.5 con 0.13 M de NaCl. La β -lactoglobulina B y A se eluyeron con la misma fase móvil a pH 6.8 conteniendo 0.17 M y 0.20 M de NaCl, respectivamente. Las fracciones obtenidas fueron prácticamente puras, pero en este proceso se perdieron las inmunoglobulinas y la BSA.

Xu *et al.* (2000) consiguieron obtener suero enriquecido en inmunoglobulina G reteniendo α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA en un intercambiador aniónico de poliestireno. El suero inicial se puso en contacto con la resina durante 30 min a pH 7-8. El suero ya enriquecido se ultrafiltró para concentrarlo 10 veces y se diafiltró una vez a través de una membrana de 100 kDa. El contenido de inmunoglobulina G en el producto final fue 43.3% cuando se utilizó suero ácido como alimentación a la resina, y 93% cuando se utilizó suero de calostro.

Zhang *et al.* (2002) obtuvieron lactoferrina con alto grado de pureza haciendo pasar suero de calostro bovino por una columna de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (agarosa). La lactoferrina se enlazó más estrechamente al intercambiador catiónico que el resto de proteínas del lactosuero, lo que permitió, tras su elución, obtener una fracción de lactoferrina muy pura.

Etzel (2004) utilizó una columna de intercambio iónico, gel de agarosa, para separar α -lactoalbúmina del resto de proteínas presentes en suero dulce de Mozzarella. Este suero, a pH 4, se hizo pasar por la columna, de 15 cm de longitud y empaquetada con 80 mL de gel, que retuvo el 95% de las proteínas del suero. La separación se produjo mediante elución selectiva. En primer lugar, se hizo pasar una fase móvil de acetato sódico a pH 4.9 para recuperar, selectivamente, la α -lactoalbúmina enlazada. Como segundo eluyente se utilizó hidróxido sódico para recuperar el resto de proteínas. Por tanto, se obtuvieron dos

fracciones: la primera conteniendo el 92% de la α -lactoalbúmina presente en el suero inicial y la segunda, exenta de α -lactoalbúmina, conteniendo el resto de proteínas. Doultani *et al.* (2004) propusieron, además de este proceso, la utilización de 4 fases móviles para obtener 4 fracciones: la primera con el 96% de la α -lactoalbúmina inicial y exenta del resto de proteínas; la segunda con la mayoría de la β -lactoglobulina, BSA e IgG; la tercera con toda la lactoperoxidasa y exenta de LF; y la cuarta solamente con LF.

Heeboll-Nielsen *et al.* (2004) fraccionaron las proteínas del lactosuero con intercambiadores iónicos superparamagnéticos. El lactosuero fue tratado con intercambiadores catiónicos para adsorber las proteínas básicas, y el sobrenadante resultante se puso en contacto con intercambiadores aniónicos. En la primera etapa se adsorbieron LF, lactoperoxidasa y parte de las inmunoglobulinas. Éstas últimas fueron separadas de las otras dos proteínas eluyéndolas con cloruro sódico poco concentrado. La LF y lactoperoxidasa fueron co-eluidas con cloruro sódico más concentrado, consiguiéndose una pureza 28 veces superior a la del lactosuero inicial. En la segunda etapa la β -lactoglobulina fue separada del resto de proteínas mediante la adsorción selectiva en un intercambiador aniónico. La ventaja de estos adsorbentes magnéticos frente a la cromatografía de afinidad es la rapidez del proceso, debido tanto a que la adsorción/desorción de las proteínas se produce más rápidamente como a la utilización de flujos mayores.

Bazinet *et al.* (2004) fraccionaron las proteínas de un aislado de proteínas de lactosuero mediante el uso de electroacidificación con membrana bipolar. Esta tecnología ofrece el efecto acoplado de desmineralización y acidificación, utilizando las propiedades de las membranas bipolares para disociar las moléculas de agua en su interfase y las propiedades de las membranas de intercambio catiónico para desmineralizar por migración de las especies catiónicas de bajo peso molecular. Los resultados mostraron que, según la concentración inicial del aislado de proteínas de lactosuero, los valores de pureza y recuperación obtenidos eran diferentes. Así, con un 5% de concentración inicial se separó una fracción de β -lactoglobulina con 98% de pureza y 44% de recuperación; mientras que cuando la concentración inicial fue 10%, la fracción enriquecida en β -lactoglobulina tenía una pureza del 95.3% y recuperación del 53.4%. No se pudo aumentar más la concentración inicial ya que la conductividad de la solución fue un factor limitante.

➤ *Filtración en gel*

La cromatografía de exclusión molecular, también llamada de filtración en gel, se basa en el tamaño molecular para realizar la separación. La matriz de la columna está formada por un polímero entrecruzado con poros de tamaños determinados. Las proteínas de mayor tamaño atraviesan la columna más deprisa que las más pequeñas, ya que son demasiado grandes para introducirse en los poros de las bolas de polímero y, por tanto, siguen una ruta más corta y directa a lo largo de la longitud de la columna. Las proteínas de menor tamaño entran en los poros y su marcha a lo largo de la columna es más lenta. Una elección adecuada del tamaño de poro del lecho permite separar una mezcla en diferentes rangos de tamaño.

Al-Mashikhi y Nakai (1987) aislaron inmunoglobulinas a partir de suero de calostro, suero ácido y suero dulce utilizando una filtración en gel. La actividad biológica de las fracciones obtenidas fueron 99, 83.3 y 92% para el suero de calostro, ácido y dulce, respectivamente. También aislaron lactoferrina presente en lactosuero dulce mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular en una columna de agarosa-heparina. La lactoferrina fue eluida con Veronal-HCl y NaCl a pH 7.4.

Felipe y Law (1997) estudiaron el fraccionamiento de proteínas de lactosuero de vaca, cabra y oveja utilizando una columna de exclusión en gel. Como resultado del proceso se obtuvieron cuatro fracciones: 1, inmunoglobulinas; 2, BSA y LF; 3, β -lactoglobulina; y 4, α -lactoalbúmina. La BSA y LF no se pudieron separar debido a la similitud de tamaño.

Neyestani *et al.* (2003) separaron α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA a partir de lactosuero bovino ácido. En primer lugar precipitaron globulinas adicionando sulfato amónico. Estas proteínas precipitadas se resolubilizaron y se separaron utilizando filtración en gel o cromatografía con dietilaminoetil celulosa, obteniendo β -lactoglobulina pura, con mayor recuperación en el caso del intercambiador iónico. Las proteínas en el sobrenadante fueron fraccionadas en el intercambiador iónico, del que se obtuvieron dos fracciones: β -lactoglobulina pura, y BSA y α -lactoalbúmina co-eluidas, que fueron separadas posteriormente mediante filtración en gel. A partir de 50 mL de leche bovina, se recuperó 166 mg de β -lactoglobulina con la filtración en gel o 178 mg con el intercambiador iónico, 54.5 mg de α -lactoalbúmina y 11.5 mg de BSA.

Liang *et al.* (2006) propusieron un método cromatográfico de filtración en gel para separar las proteínas del lactosuero. El suero ácido fue introducido en una columna conteniendo gel de dextrina, eluyéndolo con Tris-HCl a pH 7.2. De este modo se consiguieron obtener 5 fracciones: 1, inmunoglobulinas; 2, BSA; 3, β -lactoglobulina; 4, α -lactoalbúmina; y 5, pequeñas moléculas no proteicas. Como los picos 3 y 4 no estaban suficientemente separados como para poder recoger aisladamente las proteínas, sería necesaria una segunda etapa para purificar α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina.

2.2.3. Filtración con membranas

La tecnología de membranas se basa en la acción separadora que ejerce una membrana sobre una mezcla líquida de composición compleja. Se realiza una filtración tangencial, mediante la cual el fluido circula paralelamente a la membrana, con objeto de evitar la colmatación de dichas membranas y prolongar su vida media. Mediante una fuerza impulsora (normalmente presión) se provoca el paso de aquellas moléculas capaces de atravesar los poros presentes en la membrana, que actúa, por tanto, de barrera selectiva. Al final del proceso se obtienen dos corrientes líquidas (Figura 2.20): el filtrado, que contiene las moléculas que han pasado a través de la membrana; y el retenido, que contiene todas aquellas moléculas que han sido rechazadas.

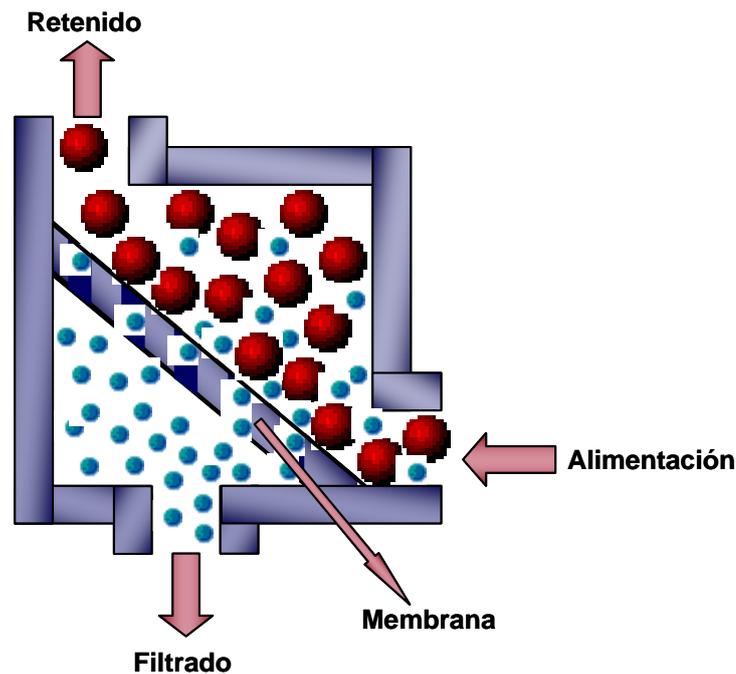


Figura 2.20. Proceso genérico de filtración con membranas.

Las técnicas de purificación de proteínas basadas en métodos cromatográficos son excelentes para producir pequeñas cantidades de proteína con alta pureza. Sin embargo, estos procesos son difícilmente escalables, ya que limita tanto la cantidad de proteína obtenida como el extremadamente alto coste de la compleja instrumentación que se utiliza en dichas técnicas (Ghosh y Cui, 2000a). Por otro lado, la precipitación selectiva presenta un coste bajo pero no se consiguen rendimientos adecuados. Por tanto, los métodos cromatográficos y la precipitación selectiva empleados para el fraccionamiento de lactosuero no han podido ser implantados a escala comercial debido a su inadecuada relación rendimiento/pureza y/o el coste económico de estos procesos (Cheang y Zydney, 2003). Sin embargo, la filtración con membranas es una alternativa atractiva ya que presenta las siguientes ventajas (Ghosh y Cui, 2000a; Prádanos et al., 1996):

- Permite purificar de manera eficiente a bajas temperaturas, por lo que es muy adecuado para las sustancias termolábiles.
- El producto está libre de sustancias contaminantes, introducidas durante el proceso de separación.
- Son procesos con alto rendimiento de producto.

- Es una tecnología fácilmente escalable.

Estas ventajas de la filtración con membranas frente a los otros procesos de separación han provocado que, en los últimos años, se hayan realizado numerosos estudios encaminados a la separación de proteínas utilizando esta técnica. Estos trabajos han mostrado resultados alentadores, presentándose este proceso como la alternativa más potente técnicamente y más viable desde el punto de vista económico para ser implantada satisfactoriamente a escala industrial. Dada la importancia de la tecnología de membranas para el fraccionamiento de las proteínas del lactosuero, en el próximo apartado se profundizará sobre las posibilidades que ofrece esta técnica para tal fin.

2.3. FRACCIONAMIENTO POR TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS

Las operaciones con membranas han sido tradicionalmente utilizadas para separaciones basadas en diferencias en tamaño molecular. Se pensaba que estos procesos únicamente podían conseguir la separación efectiva de proteínas que difirieran en tamaño, al menos, en un factor de 10. Sin embargo, Van Reis *et al.* (1997, 1999) acuñaron el nombre de filtración tangencial de alta resolución (HPTFF) para describir procesos con membranas de muy alta selectividad, que permiten la separación de proteínas con tamaño molecular muy similar. Esta nueva técnica de filtración tangencial explota un gran número de estrategias para conseguir esta alta resolución en el fraccionamiento de proteínas. Entre estas estrategias cabe destacar (Cheang y Zydney, 2004):

- El uso de membranas cargadas eléctricamente para mejorar la retención de las proteínas cargadas con igual signo que la membrana.
- Operar con valores de presión transmembrana en el régimen dependiente de la presión para maximizar la selectividad.
- Utilizar el modo de diafiltración para favorecer el paso de producto a través de la membrana.
- Elección del pH y fuerza iónica adecuados para maximizar las diferencias en el volumen hidrodinámico efectivo de las distintas proteínas.

Por tanto, 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). En este sentido, en los últimos años se están realizando numerosos estudios sobre la utilización de esta técnica para el fraccionamiento de mezclas proteicas complejas, como es el caso del lactosuero. Debido a la necesidad del entendimiento de los distintos fenómenos involucrados en el proceso, la mayoría de estos trabajos se han centrado en el estudio de la filtración de proteínas modelo: individuales (para profundizar en las interacciones proteína-membrana) y mezclas binarias (para estudiar las interacciones proteína-proteína). A continuación se indicarán los estudios más relevantes sobre el fraccionamiento de proteínas del lactosuero mediante filtración

tangencial, diferenciando entre aquellos que utilizan mezclas modelo y los que utilizan mezclas reales.

En este apartado no se incluirán aquellos trabajos en los que se utilizan membranas como etapa previa o posterior a algún otro proceso de separación, es decir, sólo se indicarán los estudios en los que el proceso de fraccionamiento de proteínas en disolución se lleva a cabo mediante membranas.

2.3.1. Mezclas modelo

➤ *Proteínas individuales*

La gran mayoría de los trabajos realizados sobre la filtración de una proteína modelo tienen por objeto investigar las interacciones electrostáticas proteína-membrana, mediante el estudio del efecto que tienen sobre el flujo y la transmisión de proteína los principales parámetros involucrados en el proceso, fundamentalmente pH y fuerza iónica. A continuación se detallan los principales estudios sobre la filtración de alguna proteína presente en el lactosuero.

Fane *et al.* (1983) estudiaron el efecto del pH y la fuerza iónica sobre la ultrafiltración de BSA con membranas orgánicas de 20 y 30 kDa. En el rango de pH estudiado (2-10), en ausencia de sal, se encontró un flujo mínimo en el punto isoeléctrico de dicha proteína (pH 5), coincidente con el valor de pH donde se produjo la mayor adsorción de proteína en la membrana. La adición de sal provocó un aumento de flujo a pH 5 y disminución en los valores de pH más alejados, desplazándose el mínimo flujo a pH 2 cuando se adicionó NaCl 0.2 M. Estos autores concluyeron que el valor del pH y el contenido en sal de la disolución provocaban cambios conformacionales y de carga en la BSA, variando la permeabilidad de la proteína a través de la membrana.

Clark *et al.* (1991) investigaron los factores que afectaron al flujo de filtrado, adsorción y colmatación durante la ultrafiltración de BSA con membranas cerámicas de 40, 350 y 1000 Å de diámetro de poro. Se observó que el flujo de filtrado, que dependía de la concentración, presión transmembrana y velocidad tangencial, era mínimo y la adsorción de proteína sobre la membrana máxima cuando se trabajó a pH cercano al punto isoeléctrico, dejándose de observar estos efectos cuando se adicionó sal. Por otro lado, los estudios del

flujo y retención de proteína en función del pH, concentración de proteína, fuerza iónica, tamaño de poro de la membrana y procedimiento de limpieza, junto con los estudios de adsorción, indicaron que en las membranas de mayor tamaño de poro era muy importante el bloqueo de poros debido a la adsorción de proteína.

Grund *et al.* (1992) evaluaron el efecto de la concentración de proteína, la presión transmembrana, el ambiente iónico y el tamaño de poro de la membrana (30 y 100 kDa) sobre la transmisión y el flujo de filtrado en estado estacionario para la filtración con membranas orgánicas de BSA y BSA-FAP (BSA pobre en ácidos grasos). Se observó que: un aumento de la concentración de proteína provocó una reducción en el flujo de filtrado; el aumento de la presión transmembrana se trasladó en un aumento no lineal del flujo de filtrado; la agregación de proteína dependió del tamaño de poro de la membrana así como de la fuerza iónica; y la presencia de ácidos grasos hizo que las interacciones proteína-proteína fuesen las causantes principales de la deposición de proteína en la superficie e interior de los poros de la membrana, mientras que con insuficientes cantidades de ácidos grasos, fueron más importantes las interacciones proteína-membrana.

Ko *et al.* (1993) filtraron BSA y β -lactoglobulina con distintas membranas orgánicas para estudiar los mecanismos de colmatación de la membrana y los efectos de las propiedades y estructura de la capa de proteína adsorbida en la membrana. Los experimentos de ultrafiltración se ajustaron al modelo de resistencia de 3 parámetros que separa las resistencias debidas a la presión osmótica y a la adsorción. Cuando se utilizó la membrana de policarbonato, se produjo repulsión por impedimento estérico debido al recubrimiento con polivinil pirrolidona (PVP); mientras que la matriz hidrofílica de las membranas de celulosa regenerada mantuvo hidratada la capa adsorbida, lo que provocó una resistencia de colmatación inferior. Por último, el tamaño relativo de los poros y de la molécula de proteína tuvo un efecto muy importante en las propiedades y estructura de la capa adsorbida y su resistencia de colmatación.

Millesime *et al.* (1994) investigaron las interacciones iónicas en la ultrafiltración de BSA. Para ello utilizaron membranas de polisulfona sulfonada (40 y 100 kDa) y polietersulfona (40 kDa) recubiertas con un espesor entre 10 y 40 nm de polivinilimidazol (grupo de intercambio aniónico fuerte). Los experimentos se realizaron a pH 7 y fuerza iónica entre 15 mM y 1 M de KCl. Para valores pequeños de fuerza iónica, se apreció una diferencia

significativa en el rechazo experimentado por las proteínas en función de si la membrana estaba modificada o no, ya que proteína y membrana estaban cargadas con distinto signo. Sin embargo, para fuerzas iónicas altas, tanto el rechazo de proteína como el flujo de filtrado fueron similares para las membranas modificadas y no modificadas ya que todos los puntos de interacción de la membrana modificada se encontraban protegidos. Estos mismos autores estudiaron en 1995 (Millesime *et al.*, 1995) la influencia de la fuerza iónica en la transmisión de BSA cuando se filtraba, a pH 7, utilizando membranas de zirconio de 150 kDa sin modificar y modificadas con polivinilimidazol. La retención de BSA se ajustó a un modelo controlado por la fuerza iónica ($I^{-1/2}$). Se observó que, a baja fuerza iónica, la retención de BSA fue mayor que la debida a la retención por tamaño en el caso de la membrana no modificada, y similar o incluso menor cuando se utilizó la membrana modificada. El aumento de la fuerza iónica supuso el acercamiento de la retención a la retención por tamaño. Por último se observó que, cuando se ultrafiltró con la membrana modificada la retención tenía forma de U, con un mínimo debido a las interacciones, promovidas por la presencia de sales, entre la proteína y el polímero que recubría la superficie de la membrana.

Pujar y Zydney (1994) estudiaron el efecto de la fuerza iónica (1.5 mM a 150 mM NaCl) en la filtración de BSA con membranas de polietersulfona de 100 kDa. Se apreció que un incremento de la fuerza iónica producía un importante aumento de la transmisión. Se evaluó la contribución relativa de la difusión, convección y transporte electroforético sobre el flujo global de proteína utilizando un modelo teórico para el transporte a través de poros cilíndricos cargados, observando que el efecto dominante fue el debido a las interacciones eléctricas. En este mismo sentido, estos autores (Pujar y Zydney, 1998) filtraron BSA (proteína cargada) y dextranos (esferas no cargadas) para determinar el radio efectivo de una proteína cargada a partir del radio de dextrano con igual coeficiente de partición que la proteína. Para ello emplearon una membrana de polietersulfona de 100 kDa. Los resultados indicaron que el radio efectivo de una proteína cargada depende, inversamente, de la raíz cuadrada de la fuerza iónica de la disolución; y, directamente, del radio de la proteína y de su relación con el radio de poro, y de la densidad de carga superficial de la proteína.

Oppenheim *et al.* (1996) realizaron un estudio sobre la colmatación de la membrana durante la ultrafiltración de BSA con membranas de polisulfona de 100 kDa a pH 5 y 7 y fuerza iónica 0.05 y 0.15 M NaCl. Se encontró que, aunque la cantidad de proteína

depositada era la misma para pH 5 y pH 7, la masa depositada a pH 5 oponía mayor resistencia al paso de solvente y soluto. Esto se debió probablemente a que la adsorción a pH 5 tuvo lugar en el interior de los poros, mientras que a pH 7, la proteína se depositó en la superficie de la membrana.

Burns y Zydney (1999) analizaron el efecto del pH en la filtración de BSA monómero y BSA dímero. Los experimentos fueron realizados con una membrana de polietersulfona de 100 kDa y una fuerza iónica baja (0.01 M KCl). Las transmisiones de BSA monómero fueron en todos los casos uniformemente superiores a las de la forma dímera. La máxima transmisión se produjo en torno al punto isoeléctrico de la proteína (4.5-5.0). Para valores de pH inferiores al punto isoeléctrico se produjo un descenso brusco de la transmisión (casi dos órdenes de magnitud menos para pH 3.5), mientras que el descenso para pH superiores no fue tan acusado (un orden de magnitud menos para pH 7).

Howell *et al.* (1999) investigaron la transmisión de BSA a distinto pH (3.5, 4.9 y 8) utilizando tres membranas diferentes: 2 de polietersulfona (50 y 100 kDa) y una de polisulfona (0.2 μm). Durante las filtraciones se utilizaron presiones transmembrana bajas y se controló el flujo, partiendo de valores bajos y aumentándolo poco a poco. Con la membrana de 50 kDa se obtuvieron bajas transmisiones desde valores de flujo bajos hasta 50 L/m²h, donde se produjo un aumento brusco de la transmisión. Sin embargo, la concentración de BSA en la superficie de la membrana no aumentó tanto, por lo que sugirieron que el aumento del esfuerzo cortante debido al flujo elevado pudo provocar cambios en la conformación de las moléculas de BSA. Estos cambios no fueron observados cuando se utilizó la membrana de 0.2 μm . También se observó que las transmisiones en el punto isoeléctrico fueron muy superiores a las obtenidas en los otros valores de pH ensayados.

Menon y Zydney (1999) estudiaron la transmisión de BSA a través de membranas de polietersulfona a diferentes valores de pH y fuerzas iónicas, con diferentes sales. Los resultados mostraron que la composición iónica específica, además del pH y fuerza iónica de la disolución, afectó significativamente al transporte de proteína a través de la membrana. La adición de una sal u otra provocó efectos distintos sobre la transmisión de BSA, debido a la diferente unión de unos iones u otros con la proteína, que se traduce en cargas netas de la proteína diferentes a un mismo pH y fuerza iónica.

Ricq *et al.* (1999) estudiaron las características eléctricas de la β -lactoglobulina durante la ultrafiltración como función del pH, fuerza iónica y naturaleza de la sal (NaCl o CaCl₂). La filtración se realizó con una membrana inorgánica de 150 kDa, velocidad tangencial de 3 m/s, 1 bar de presión transmembrana, 50 °C y una concentración de proteína inicial de 0.5 g/L. Se observó que el menor flujo y máxima transmisión correspondió al punto isoeléctrico (5), donde la adsorción de proteína en la membrana era mayor. La unión de β -lactoglobulina con iones calcio a pH superior al punto isoeléctrico, provocó la adsorción de estos complejos sobre la membrana, obteniéndose flujos menores cuando se utilizó CaCl₂ que NaCl. En cuanto a las transmisiones, a pH superior a 5, fueron mayores con CaCl₂ que con NaCl porque la carga neta de la membrana con CaCl₂ fue inferior, disminuyendo, por tanto, las repulsiones electrostáticas. Para estudiar el efecto de la fuerza iónica, realizaron experimentos a pH 7. El aumento de la fuerza iónica provocó una disminución de las fuerzas de repulsión proteína-membrana y, por tanto, un aumento de la colmatación de la membrana y, consiguientemente, disminución del flujo. En el caso de la transmisión, el aumento de fuerza iónica dio lugar a un aumento de la transmisión hasta un valor asintótico en el caso de NaCl y hasta un valor máximo, superior al anterior, en el caso de CaCl₂, a partir del cual la adición de más sal provocó una disminución de la transmisión.

Huisman *et al.* (2000) analizaron la influencia de las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana durante la ultrafiltración de BSA con membranas de polisulfona con tres tamaños de corte: 30, 100 y 300 kDa, mediante la medida de flujo, potencial de corriente y transmisión de BSA a distintos valores de pH. Los resultados indicaron que en la membrana de 30 kDa, la colmatación en los momentos iniciales de la filtración se debió a las interacciones proteína-membrana, pasando, posteriormente, a predominar las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, las interacciones proteína-membrana y proteína-proteína no tuvieron tanta importancia en las membranas de mayor tamaño de poro. Por otro lado, las imágenes obtenidas por AFM indicaron que, en todos los experimentos, se había formado una capa de proteína que recubría totalmente la superficie de la membrana, cuya estructura dependía enormemente del pH del proceso.

Jones y O'Melia (2000) estudiaron el efecto del pH (3, 4.7, 6.3, 8 y 10) y fuerza iónica (1 mM, 10 mM y 0.2 M) en la adsorción de BSA en membranas de celulosa regenerada con tamaño de corte de 30 kDa durante experimentos de ultrafiltración. Los resultados mostraron que la máxima adsorción se produjo para los valores de pH bajo, disminuyendo a

medida que aumenta el pH. Al aumentar la fuerza iónica, se redujo la repulsión electrostática entre partículas de igual carga (aumentando la adsorción) y se disminuyó la atracción entre materiales con carga contraria (disminuyendo la adsorción). Mediante la aplicación de un modelo bimecanístico, confirmaron que, en la adsorción, controlaban las reacciones en la superficie de la membrana frente al transporte de la proteína hacia la superficie. Por tanto, controlando las interacciones electrostáticas se pudo reducir la adsorción de la proteína sobre la membrana y, consecuentemente, la colmatación de la misma. En un trabajo posterior, estos autores (Jones y O'Melia, 2001) realizaron ensayos similares para determinar las resistencias debida a la colmatación reversible y a la irreversible. Para ello, compararon resistencias en ensayos estáticos y dinámicos con el fin de determinar el efecto del flujo convectivo y las interacciones electrostáticas en la colmatación. Los resultados mostraron que las fuerzas convectivas aumentaban la cantidad de proteína acumulada cerca de la membrana; mientras que las interacciones electrostáticas afectaban tanto a la resistencia reversible como a la irreversible, que fueron mayores en el punto isoeléctrico y disminuían al aumentar el pH.

Mignard y Glass (2001) propusieron un modelo para predecir el efecto del pH y fuerza iónica sobre la colmatación en los procesos de ultrafiltración de proteínas. Para comprobar dicho modelo filtraron BSA con módulos de fibra hueca de polisulfona de 30 kDa (rechazo completo de la proteína). Los experimentos se realizaron variando el pH (5, 7 y 9), fuerza iónica (0.01, 0.1 y 1 M) y presión transmembrana (7.6-100 kPa). El modelo predijo la resistencia total al flujo bastante bien en todos los casos, sin embargo no predijo bien las resistencias depositadas así como el comienzo de las curvas de colmatación a valores bajos de presión transmembrana.

Rabiller-Baudry *et al.* (2001) realizaron un estudio de la filtración de lactoferrina a pH 7 a diferentes valores de fuerza iónica (0-1000 mM NaCl), empleando membranas inorgánicas de 300 kDa y químicamente modificadas con grupos de pirofosfato (aniónico) o etilendiamina (catiónico). La tendencia fue similar en las tres membranas, aunque con valores diferentes. Los resultados mostraron que el flujo de filtrado permaneció constante entre 5 y 20 mM, mientras que por encima de 20 mM, el flujo de filtrado aumentó al aumentar la fuerza iónica. En cuanto a la transmisión, aumentó al aumentar la fuerza iónica, aunque fue prácticamente nula para valores inferiores a 100 mM.

Noordman *et al.* (2002) estudiaron el efecto del pH y la fuerza iónica en la ultrafiltración de BSA con membranas orgánicas de polietersulfona de 30 kDa. El pH se varió en el rango 3-8 y la fuerza iónica con NaCl desde 5 a 150 mM. El valor de flujo mínimo obtenido fue en el punto isoeléctrico de la proteína. La adición de fuerza iónica provocó una disminución del flujo. A valores de pH superiores al punto isoeléctrico se observó un rechazo negativo de los iones cloruro debido a la repulsión entre éstos y las moléculas de proteína cargadas negativamente. Por debajo del punto isoeléctrico, como la proteína se encontraba cargada positivamente, el rechazo fue positivo. Las tendencias tanto del rechazo como del flujo fueron bien descritas por la teoría de Maxwell-Stefan.

Marshall *et al.* (2003) comprobaron el efecto que tenía tanto la fuerza iónica como la presencia de iones calcio en la filtración de β -lactoglobulina a través de una membrana de óxido de zirconio de 50 o 100 nm. Los resultados mostraron que un aumento de la fuerza iónica disminuyó la resistencia de colmatación y aumentó la transmisión de proteína. Se observó que el comportamiento del sistema dependió principalmente del flujo de filtrado y de la concentración de calcio. A 200 L/m²h con la membrana de 50 nm, la presencia de 8 mM de iones calcio aumentó la resistencia de colmatación drásticamente e hizo disminuir la transmisión de proteína desde valores cercanos a 90% a valores del 10%. Sin embargo, cuando se empezó a 8 mM de iones calcio, cambiando a una alimentación libre de calcio tras una hora de experimento se disminuyó la resistencia de colmatación y aumentó la transmisión de proteína. Parece ser que el calcio fue lavado de la capa de colmatación causando su “disolución”. Las dos principales reacciones responsables de estos efectos del flujo de filtrado y los iones calcio sobre la colmatación por soluciones de β -lactoglobulina podrían ser el desdoblamiento molecular por efecto de cizalladura y el entrecruzamiento del calcio.

Rao y Zydney (2005) evaluaron la posibilidad de controlar la transmisión de BSA usando un pequeño y altamente cargado ligando, azul cibacron, que se unía selectivamente a la proteína de interés. Para ello utilizaron membranas de celulosa regeneradas de 30 y 100 kDa, y otra cargada negativamente de 100 kDa. La adición de 1 g/L de ligando a 8 g/L de solución redujo la transmisión de BSA en dos órdenes de magnitud cuando se utilizó la membrana cargada negativamente, efecto que se vio eliminado a alta fuerza iónica o al usar la membrana neutra. Los datos de transmisión se ajustaron bien al modelo basado en el coeficiente de partición de esferas cargadas en el interior de un poro cargado, teniendo en

cuenta el cambio en la carga neta de la proteína debido a la unión con el ligando así como el aumento de la fuerza iónica de la disolución por la presencia de ligando libre.

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. Realizaron 20 experimentos determinados por la aplicación de un diseño experimental con superficies de respuesta. Se observó que los flujos eran mayores para las fuerzas iónicas menores y el pH 8, debido al apantallamiento de cargas y a la repulsión electrostática de proteínas con similar carga. Al aumentar la presión se redujo el flujo, por el aumento de la concentración de polarización y, además, favoreció el rechazo.

De la Casa *et al.* (2007) estudiaron la influencia del pH (4-8) y de la fuerza iónica (0-25 mM NaCl) sobre la filtración tangencial de BSA. Se empleó una membrana cerámica tubular de 0.14 μm , 3.5 m/s de velocidad tangencial, 100 kPa de presión transmembrana y 45 °C. La evolución temporal del filtrado se explicó con el modelo de resistencias en serie, observándose el máximo valor a pH 7 y el mínimo en el punto isoeléctrico. El valor máximo de la transmisión de BSA se obtuvo en el punto isoeléctrico, obteniéndose una transmisión significativa para el punto de carga cero de la membrana, y transmisiones nulas para pH 4 y 8. En cuanto a la adición de sal, ésta dio lugar a una mejora tanto en la transmisión como en el caudal de filtrado.

Ibáñez *et al.* (2007) estudiaron las interacciones electrostáticas proteína-membrana durante la ultrafiltración de dos proteínas modelo: β -lactoglobulina y lisozima, con puntos isoeléctricos ácido (5.2) y básico (10.7), respectivamente. Para ello emplearon una membrana cerámica tubular de 300 kDa, recirculación total, velocidad tangencial de 3.5 m/s, 30 °C de temperatura y 100 kPa de presión transmembrana. Se analizó la influencia del pH (3-9) y la fuerza iónica (0-15 mM) sobre el flujo de filtrado y la transmisión de proteína. Con respecto al pH, los menores flujos de filtrado se obtuvieron en los puntos isoeléctricos de cada proteína. Para β -lactoglobulina, la mayor colmatación de la membrana se observó a pH 4, y para la lisozima a su punto isoeléctrico. Las transmisiones iniciales máximas ocurrieron a los respectivos puntos isoeléctricos. Sin embargo, mientras que para β -lactoglobulina se obtuvo una disminución a lo largo del tiempo de operación, la transmisión

de lisozima se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el experimento. La adición de sal mejoró el flujo inicial de ambas proteínas. Se observó mayor colmatación de la membrana al aumentar la fuerza iónica para la β -lactoglobulina. Por el contrario, el comportamiento fue inverso para la lisozima. El valor de la transmisión a los 15 minutos aumentó con la adición de sal para β -lactoglobulina, mientras que disminuyó para la lisozima. Para los restantes tiempos analizados, la transmisión de β -lactoglobulina disminuyó con el tiempo y aumentó con la adición de sal hasta 10 mM, permaneciendo constante al aumentar más la fuerza iónica. Sin embargo, para la lisozima, la transmisión disminuyó con la fuerza iónica en todo el rango estudiado y permaneció casi constante con el tiempo.

➤ *Fraccionamiento de proteínas modelo*

Los estudios de separación de proteínas presentes en una mezcla modelo mediante tecnología de membranas suelen tener por finalidad el análisis de las interacciones proteína-proteína durante el proceso. Estos trabajos buscan la optimización de los factores que influyen en el fraccionamiento (como pH, fuerza iónica, tamaño de corte de la membrana, presión transmembrana, velocidad tangencial, modo de operación o temperatura) para conseguir una buena relación pureza/recuperación. Dado el interés de conocer estas condiciones de operación óptimas para su posterior aplicación en mezclas reales, se resumirán los trabajos que estudian el fraccionamiento de mezclas de proteínas presentes en el lactosuero (no se incluirán las mezclas en las que sólo una proteína sea del lactosuero).

Nel *et al.* (1994) investigaron la filtración de la mezcla binaria BSA-IgG empleando una membrana de celulosa de 100 kDa. Se había observado que a pH 7.4, 0.15 M NaCl y en presencia de pequeñas cantidades de IgG, se había producido una retención de BSA muy elevada. Estos autores estudiaron cómo afectaba al flujo de filtrado y a la transmisión de BSA el pH (5.8 y 8.5), la fuerza iónica (0.01 y 0.15 M NaCl) y el % en peso de IgG (0, 0.07 y 0.15%), manteniendo siempre constante la cantidad de BSA (1% en peso). Los resultados mostraron que, en determinadas condiciones de las estudiadas, la presencia de IgG favorecía la transmisión de BSA.

Saksena y Zydney (1994) analizaron el fraccionamiento mediante filtración con membranas de una mezcla BSA-IgG. Para ello realizaron experimentos con membranas de polietersulfona (100 y 300 kDa) a distintos valores de pH y fuerza iónica. A pH 7 y 0.15 M

NaCl (condiciones fisiológicas) la selectividad para la separación BSA-IgG fue sólo 2.0, debido a la adsorción inicial de proteína. Sin embargo, se consiguió una selectividad BSA-IgG de 50 cuando se filtró a pH 4.8 y 0.0015 M NaCl, debido a la contribución electrostática. La selectividad se invirtió, pasando IgG en lugar de BSA, al utilizar la membrana de 300 kDa, pH 7.4 y fuerza iónica 0.0015 M NaCl. Por tanto, se comprobó que la efectividad de una filtración de una mezcla de proteínas puede ser alterada mediante el control apropiado de las interacciones electrostáticas a través de cambios de pH y/o fuerza iónica. Posteriormente, estos autores (Saksena y Zydney, 1997) desarrollaron un modelo general para el transporte másico en los procesos de ultrafiltración de más de una proteína y lo aplicaron a la filtración de BSA-IgG a través de membranas de polietersulfona de 30 y 100 kDa a pH 7.4. Este modelo describió el flujo y la transmisión, teniendo en cuenta las interacciones proteína-proteína e incluyendo las contribuciones hidrodinámicas y termodinámicas.

Van Reis *et al.* (1997) fraccionaron, utilizando la técnica de filtración tangencial de alta resolución, una mezcla BSA-IgG. En primer lugar, analizaron las condiciones de pH y fuerza iónica óptimas para el fraccionamiento, resultando pH 4 y 10 mM. La filtración se realizó en el modo de diafiltración continua, con una membrana de polietersulfona modificada de 300 kDa y utilizando como alimentación: 0.30 L de disolución con 5 g/L de IgG y 2 g/L de BSA en un buffer de acetato sódico, pH 4 y 10 mM. Tras 80 diavolumenes, se obtuvo una fracción de IgG con un factor de purificación de 30 y una recuperación del 84%.

Nyström *et al.* (1998) estudiaron el fraccionamiento de BSA-lactoferrina utilizando membranas de celulosa regenerada de 100 kDa. La filtración se realizó a pH 9, punto isoeléctrico de la lactoferrina, donde la BSA y la membrana se encontraban muy cargadas negativamente, dificultándose la transmisión de BSA. Cuando se aumentó la concentración total de proteína, manteniendo 50% de cada una, se obtuvieron mayores valores de retención de ambas proteínas, pero también mayores valores de selectividad para LF. Al mezclar más LF que BSA se favoreció la selectividad para BSA. La adición de sales favoreció la transmisión de ambas proteínas. También realizaron experimentos para verificar las interacciones entre las proteínas y entre proteína-membrana. Para ello, realizaron un experimento en el que la alimentación inicial contenía toda la BSA, mientras que la LF se fue añadiendo poco a poco a lo largo del experimento. El flujo fue bien desde

el principio debido a la repulsión entre las moléculas de BSA y la membrana y a la formación de complejos BSA-LF conforme se adicionó LF. El otro experimento partió del global de la LF y se añadía BSA. En este caso, la LF bloqueó los poros por formación de concentración de polarización cuando estaba sola, produciéndose una mejora del flujo a medida que se adicionó BSA, acercándose a los valores alcanzados en el experimento anterior. En ambos casos no se consiguieron ni flujos ni transmisiones tan elevados como cuando se utilizó igual cantidad de ambas proteínas desde el principio. Por último, investigaron el efecto de la presión (0.2-0.9 bar) y el pH (7.5-8.5) en el fraccionamiento. Los mejores resultados se obtuvieron a pH 8.5 y 0.2 bar, con lo que se consiguió retener el 100% de la BSA y que una pequeña cantidad de LF pasara a través de la membrana, por lo que la selectividad fue buena.

Ghosh y Cui (2000b) realizaron un estudio teórico sobre el efecto de la velocidad tangencial y el flujo de filtrado en la selectividad del fraccionamiento de una mezcla binaria de proteínas mediante ultrafiltración tangencial. Los resultados mostraron que para una velocidad tangencial constante, la selectividad aumentaba si el flujo de filtrado aumentaba desde 1 hasta un valor máximo (correspondiente al flujo óptimo). A partir de ese valor óptimo, un aumento del flujo se traduciría en una disminución de la selectividad, hasta llegar nuevamente a 1 para valores muy altos de flujo. El flujo de filtrado óptimo dependió directamente de la velocidad tangencial. También se observó que a valores muy bajos o muy altos del flujo de filtrado, la velocidad tangencial no influía en la selectividad. Pero en el rango de flujos intermedios, al aumentar la velocidad, aumentaba la selectividad, aunque de forma distinta según se tratase de flujo laminar o turbulento. En los flujos correspondientes a la transición de laminar a turbulento ($1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ m/s) la selectividad aumentó de forma significativa. Por último, estos autores indicaron que sería necesario optimizar la velocidad tangencial y el flujo de filtrado para un sistema determinado.

Cheang y Zydney (2003) analizaron la separación de una mezcla α -lactoalbúmina/ β -lactoglobulina mediante ultrafiltración. Los experimentos fueron realizados a distintos valores de pH, fuerza iónica (5-150 mM), velocidad a través de los poros (2-7 μ m/s) y membrana (membrana de celulosa regenerada de 30 kDa y membrana de polietersulfona de 50 kDa). Se estudió el pH 5.5 y el 7.2, ya que por debajo de pH 5 la α -lactoalbúmina se insolubiliza y por encima de pH 8 la β -lactoglobulina se desnaturaliza irreversiblemente. En primer lugar estudiaron las condiciones óptimas para el fraccionamiento. Así, para la

membrana de celulosa se encontró la máxima selectividad (58) a pH 5.5 y 50 mM, valor que disminuyó al aumentar la velocidad a través de los poros por encima de 4 $\mu\text{m/s}$. Para la membrana de polietersulfona, la mejor selectividad (sólo 10.5) se consiguió a pH 5.5 y 150 mM. Con todo esto, se diseñó un proceso de diafiltración para el fraccionamiento de una mezcla de 1.5 g de α -lactoalbúmina y 3.0 g de β -lactoglobulina, empleando la membrana de celulosa regenerada, pH 5.5, fuerza iónica 50 mM y velocidad a través de los poros de 2.8 $\mu\text{m/s}$. Tras 16 diavolúmenes, se consiguió un factor de purificación para la β -lactoglobulina superior a 100 veces con más del 90% de recuperación de la proteína. En el filtrado se recuperó más del 95% de la α -lactoalbúmina, con un factor de purificación de más de 10 veces. A pesar de esto, los autores indicaron que antes de implantar este proceso a escala industrial habría que estudiarlo desde un punto de vista económico así como ver el efecto de otras proteínas sobre la purificación de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina utilizando directamente el lactosuero o concentrado de proteínas del lactosuero.

Chan *et al.* (2004) fraccionaron, mediante ultrafiltración, mezclas binarias de BSA y β -lactoglobulina para identificar el flujo crítico aparente (flujo por debajo del cual la presión transmembrana es estable) y estudiar los mecanismos y factores que influyen en la colmatación de la membrana. Se emplearon membranas de celulosa regenerada (hidrofílica) y de polisulfona (hidrofóbica), ambas con un tamaño de corte de 30 kDa y se estudió la ultrafiltración a pH 4 y 6.9. Para la membrana hidrofílica se comprobó que la deposición dependió de fuerzas electrotáticas, produciéndose poca o ninguna colmatación cuando ambas proteínas tenían carga de igual signo que la membrana. En el caso de la membrana hidrofóbica, las fuerzas atractivas entre proteína y membrana fueron suficientemente fuertes como para causar la deposición de β -lactoglobulina incluso en presencia de fuerzas electrostáticas repulsivas. En el caso de esta membrana, la deposición sobrepasó la monocapa para todos los valores de flujo, mientras que para la membrana hidrofílica, esto únicamente ocurrió cuando se trabajó por encima del flujo crítico aparente.

Brisson *et al.* (2007) aplicaron un campo eléctrico externo durante la microfiltración de soluciones de LF y concentrado de proteínas de lactosuero. Utilizaron una membrana de PVDF de 0.5 μm con dos electrodos: el cátodo en el lado del retenido y el ánodo en lado del filtrado. Fraccionaron una mezcla LF-WPI (1:1) a pH 7. Se estudió el efecto de la fuerza del campo eléctrico (0-3333 V/m) y polaridad sobre el flujo de filtrado y la

transmisión de proteína. Se observó que la filtración de la mezcla empeoró la transmisión de LF y α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina respecto a los valores obtenidos cuando se filtraron solas. Esto se debió a que a pH 7, la LF (cargada positivamente) interaccionó con la β -lactoglobulina (en forma aniónica). Los mejores resultados se obtuvieron a 3333 V/m, donde los factores de separación entre LF y las dos proteínas lácteas mayoritarias, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, fueron 3.0 y 9.1, respectivamente. El aumento del voltaje provocó un aumento del flujo de filtrado por un factor 3, sugiriendo una disminución de la colmatación de la membrana. Finalmente, se realizó la separación entre LF saturada en hierro y β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, consiguiéndose factores de separación de 6.7 y 62.4, respectivamente a 1667 V/m.

2.3.2. Mezclas reales

Como se ha visto en el apartado anterior, existen estudios que demuestran la viabilidad de utilizar filtración tangencial de alta resolución para la separación de proteínas del lactosuero, pero en todos ellos los datos fueron obtenidos con sistemas modelo consistentes en una mezcla artificial de proteínas purificadas previamente. Sin embargo, los estudios experimentales que utilizan como alimento una mezcla multicomponente real (lactosuero dulce o ácido o concentrado de proteínas de lactosuero) están mucho más limitados y, sobre todo, los resultados no son tan impresionantes. Los trabajos más importantes en este campo se resumen a continuación.

Cordel *et al.* (1990) patentaron procesos para enriquecer y concentrar proteínas por ultrafiltración. En el caso de lactosuero, este fue tratado utilizando una serie de membranas de óxido metálico formado in situ. El primer fraccionamiento se realizó a pH 5, consiguiendo retener preferentemente BSA e inmunoglobulinas, ya que α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, prácticamente descargadas, fueron recogidas en el filtrado. Después, el pH fue ajustado a 7, siendo en este caso las inmunoglobulinas las que atravesaron la membrana. El filtrado final contenía un 14% de inmunoglobulinas, frente al 7.5% presentes en el suero inicial.

Bottomley (1991) patentó un proceso para obtener una fracción rica en α -lactoalbúmina, mediante su separación de β -lactoglobulina a partir de lactosuero dulce procedente de la

fabricación de queso Cheddar. La estrategia constaba de dos etapas: la primera para separar α -lactoalbúmina de β -lactoglobulina utilizando una membrana orgánica de 100 kDa; la segunda para concentrar el filtrado enriquecido en α -lactoalbúmina de la etapa anterior, usando una membrana orgánica de 10 kDa. El producto final presentó una relación α -lactoalbúmina: β -lactoglobulina de 3:1.

Lucas *et al.* (1998) investigaron la extracción selectiva de α -lactoalbúmina a partir de concentrado de proteínas de lactosuero mediante el empleo de membranas inorgánicas modificadas con polietilenimina, cargadas positivamente. Se estudió la transmisión a pH 7 en función de la fuerza iónica añadida en forma de NaCl. Los mejores resultados se obtuvieron a baja fuerza iónica (<0.02 M) consiguiéndose una baja transmisión de β -lactoglobulina y transmisiones del 10% para la α -lactoalbúmina, que supuso selectividades cercanas a 10 (con la membrana sin modificar se obtuvo 3).

Muller *et al.* (1999) realizaron un estudio de la influencia que los distintos modos de operación tenían sobre la pureza y recuperación de α -lactoalbúmina por ultrafiltración de suero ácido. Para ello, realizaron los experimentos con una membrana cerámica de 300 kDa, pH 7 y fuerza iónica 0.2 M NaCl, con un tiempo total de filtración de 4 h. Los modos de operación ensayados fueron: concentración discontinua (CD), concentración continua (CC), diafiltración continua (DC) y un modo de operación combinado (CC-DC). Cuando se utilizaron los modos de concentración se obtuvieron: para la α -lactoalbúmina, transmisiones de 0.30 (CC) y 0.25 (CD), con purezas de 0.45 en ambos casos y recuperaciones de 0.45 (CC) y 0.30 (CD); y para la β -lactoglobulina, transmisiones de 0.10 (CC) y 0.06 (CD). Cuando se combinaron los modos de concentración continua y diafiltración continua se consiguió mejorar la recuperación de α -lactoalbúmina de 0.3 a 0.8 (con 12.6 diavolúmenes), manteniendo la pureza alrededor de 0.45. Por tanto, esta combinación de modos permitió un buen compromiso entre pureza y recuperación de α -lactoalbúmina en el filtrado.

Muller *et al.* (2003a y 2003b) propusieron un proceso de dos etapas para la purificación de α -lactoalbúmina a partir de un concentrado de proteínas de suero ácido. En su primer trabajo, estudiaron la primera etapa, consistente en una prepurificación mediante ultrafiltración del suero con membranas cerámicas. Se pretendía aumentar la pureza de α -

lactoalbúmina en el filtrado mediante la retención total de BSA e inmunoglobulinas con una transmisión limitada de β -lactoglobulina. Tras una optimización de las condiciones de operación se escogieron para esta primera etapa: una membrana cerámica de 300 kDa, un concentrado de proteínas de lactosuero líquido como alimentación, concentración de 7 g/L, pH 7.0, fuerza iónica 0.2 M, modo de operación concentración continua, presión transmembrana 1 bar, velocidad tangencial 6 m/s y temperatura 50 °C. Con esto se consiguió aumentar la pureza de α -lactoalbúmina en el filtrado de 0.25 en la alimentación inicial a 0.44, con una recuperación de 0.53. En su segundo trabajo, valoraron la utilización de una segunda etapa de ultrafiltración o de precipitación para purificar α -lactoalbúmina a partir del suero prepurificado de la etapa anterior. Con la etapa de ultrafiltración (concentración continua hasta reducción del volumen 7 veces, pH 7, membrana cerámica de 50 kDa, 3.4 m/s de velocidad tangencial, 50 °C, 1 bar de presión transmembrana) se obtuvo un filtrado enriquecido en α -lactoalbúmina con una pureza de 0.66, pero una recuperación de sólo 0.28. Con la etapa de precipitación (acidificación con ácido cítrico 2.5 N, seguida de un tratamiento térmico a 55°C durante 120 min, después una centrifugación y, por último, dos lavados del sedimento obtenido con agua de ósmosis) se consiguieron purezas en el rango 0.77-0.99 con recuperaciones del 0.46 al 0.83. Estos resultados variaban en función del concentrado de proteínas utilizado y la forma de prepurificar de la primera etapa, el número de etapas de enjuagado utilizadas en la segunda etapa, así como el agente empleado para la solubilización del precipitado obtenido.

Cheang y Zydney (2004) diseñaron una estrategia en dos etapas para la purificación de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina a partir de un aislado de proteínas de lactosuero. Analizaron las condiciones óptimas de pH y conductividad del buffer para el fraccionamiento de estas proteínas mediante el empleo de dos membranas de celulosa regeneradas con tamaño de corte de 30 y 100 kDa. Se estudiaron dos estrategias diferentes: una usando la membrana de 100 kDa para obtener en el retenido BSA y en filtrado α -lactoalbúmina+ β -lactoglobulina, seguida por una segunda filtración a través de la membrana de 30 kDa, obteniendo la α -lactoalbúmina en filtrado y la β -lactoglobulina en retenido; la otra estrategia fue a la inversa, la primera filtración por 30 kDa, separó α -lactoalbúmina en filtrado de BSA+ β -lactoglobulina en retenido, la segunda filtración, por 100 kDa fraccionó el retenido de la etapa anterior obteniéndose la β -lactoglobulina en filtrado y la BSA en retenido. En ambos casos se utilizó el modo de diafiltración continua

para llevar a cabo el proceso. Las condiciones óptimas para la separación con la membrana de 30 kDa fueron pH 7 y conductividad 1.7 mS/cm, con la que se consiguió una selectividad para la separación de 21, valor muy inferior a la selectividad de 60 veces obtenida para la mezcla binaria en el estudio previo de estos mismos autores. Esta alta selectividad en la mezcla ideal se consiguió a pH 5.5, sin embargo en el caso de la mezcla real no fue posible utilizar este pH porque se producían grandes agregados, probablemente debido a la presencia de trazas de otras proteínas. Los resultados mostraron una purificación de α -lactoalbúmina superior a 10 veces en ambas estrategias con una recuperación del 95% para la estrategia I y 85% para la II. La recuperación de β -lactoglobulina fue alrededor de un 70% para ambas estrategias, con un factor de purificación de 8 para la estrategia I y 4 para la II.

Mehra y Kelly (2004) propusieron un sistema de 3 etapas de filtración para el fraccionamiento secuencial de las proteínas de lactosuero. Esta estrategia se basó en la modificación del pH y fuerza iónica para influir en la carga molecular de las proteínas y así, modificar su volumen hidrodinámico. La primera etapa consistió en la ultrafiltración de lactosuero a pH 5-5.5 con una membrana de 0.1 μ m. Como consecuencia de esta etapa se obtuvo un filtrado enriquecido en α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina y un retenido que contenía IgG, LF, lactoperoxidasa y BSA. La segunda etapa suponía el fraccionamiento del filtrado anterior a pH 5.0-7.7 y membrana de 30-50 kDa, obteniéndose la α -lactoalbúmina preferentemente en el filtrado y la β -lactoglobulina en el retenido. En la tercera y última etapa, la utilización de una membrana de 100 kDa permitía la obtención de un filtrado enriquecido en IgG (filtración a pH 7) o en LF y lactoperoxidasa (pH 9). Los autores indicaron que la primera etapa había sido estudiada pero que las siguientes etapas estaban en fase de estudio. Sin embargo, no se han encontrado trabajos posteriores sobre esta estrategia que confirmen o no el éxito de la misma.

Bhattacharjee *et al.* (2006) propusieron el fraccionamiento de un concentrado de proteínas de lactosuero ácido mediante dos etapas de ultrafiltración seguidas de una cromatografía de intercambio iónico. Obtuvieron un concentrado de proteínas a partir de suero ácido mediante una centrifugación, para eliminar partículas de caseína y materia coloidal, seguida por una microfiltración con una membrana orgánica de 0.45 μ m y 4 etapas de diafiltración discontinua con membrana orgánica de 5 kDa para eliminar lactosa y minerales. En los

experimentos de ultrafiltración utilizaron membranas orgánicas de disco rotatorias, de 30 y 10 kDa, respectivamente. Con la membrana de 30 kDa se consiguió separar α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina de BSA, LF e inmunoglobulinas que quedaron retenidas, mientras que en la segunda etapa, con la membrana de 10 kDa, se consiguió concentrar la mezcla α -lactoalbúmina- β -lactoglobulina procedente del filtrado de la etapa anterior. En ambas etapas, analizaron variables independientes como el pH (2.8 y 5.6), velocidad del agitador (0, 500 y 1000 rpm) y velocidad de rotación de la membrana (0, 300 y 600 rpm). Los mejores resultados se obtuvieron a velocidades altas del agitador y de rotación de la membrana y a pH 2.8, donde la β -lactoglobulina se encuentra en forma monomérica. El retenido procedente de la membrana de 10 kDa fue introducido en un intercambiador aniónico básico fuerte. Se estudió el pH de carga en el rango 4.6-5.0, ya que a ese pH la α -lactoalbúmina se encontraba cargada negativamente por lo que era retenida en el intercambiador, y la β -lactoglobulina, cargada positivamente, pasaba a través de la membrana. El valor óptimo de pH fue 5.0, consiguiéndose una fracción rica en β -lactoglobulina con 87.6% de pureza en base a la proteína total, aunque esta pureza fue relativamente baja (26%) en base a los sólidos totales, por lo que las 4 etapas de diafiltración discontinua no fueron suficientes para eliminar toda la lactosa y sales minerales.

Lu *et al.* (2007) estudiaron la obtención de lactoferrina a partir de lactosuero de calostro mediante el acople de un proceso de ultrafiltración y otro de cromatografía de intercambio catiónico. Utilizaron suero de calostro porque la concentración de LF es 20 veces superior a la del lactosuero normal. El proceso de ultrafiltración con membranas de celulosa regeneradas constó de 2 etapas: la primera de ellas con un tamaño de corte de 100 kDa y la segunda, de 10 kDa. Se optimizaron presión transmembrana, velocidad tangencial y temperatura de operación. Los valores óptimos para la etapa 1 fueron: 200 kPa, 5 m/s y 25°C; mientras que para la etapa 2 fueron: 150 kPa, 4 m/s y 50°C. Con este proceso se consiguió un producto enriquecido en LF con 30.88% de pureza y 94.04% de recuperación. Para conseguir aumentar la pureza de la LF, el retenido de la membrana de 10 kDa se pasó a través de un intercambiador catiónico fuerte, obteniéndose un producto final con 94.20% de pureza y 82.46% de recuperación.

2.4. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Con los antecedentes descritos, se hace patente la necesidad de fraccionar el lactosuero para aislar las proteínas que contiene. De todos los métodos de separación que se pueden emplear para tal fin, se puede concluir que la tecnología de membranas se perfila como la opción más factible, económica y técnicamente, para poder ser implantada satisfactoriamente a escala industrial.

En bibliografía no existen muchos trabajos con mezclas reales sobre la separación de proteínas del lactosuero mediante membranas. Además, la mayoría de los trabajos existentes se centran en el estudio de las proteínas mayoritarias, principalmente, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Sin embargo, la obtención de otras proteínas presentes en el lactosuero en mucha menor concentración también tiene interés científico e industrial. Este es el caso de la lactoferrina que, como se ha descrito, presenta importantes propiedades funcionales, entre las que caben destacar las antivíricas y antibacterianas, así como su acción inhibidora de carcinogénesis. De este modo, su aislamiento sería de gran importancia para su uso en fórmulas infantiles, alimentos funcionales y nutracéuticos.

Así, el objetivo de la investigación propuesta es el desarrollo del proceso para la obtención de lactoferrina bovina a partir de lactosuero mediante la técnica de filtración tangencial de alta resolución. Para ello se diseñará, en primer lugar, la estrategia de fraccionamiento del suero para la recuperación de lactoferrina. Seguidamente, se llevará a cabo el estudio teórico de la recuperación de lactoferrina bovina por ultrafiltración empleando dicha estrategia. Por último, se realizará el estudio experimental del fraccionamiento de lactosuero para comprobar la viabilidad del proceso propuesto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PREPARACIÓN DEL LACTOSUERO ÁCIDO BOVINO

El lactosuero ácido bovino fue preparado a partir de leche entera pasteurizada comercial, para asegurar la mayor homogeneidad posible en la composición de la misma. En primer lugar, la leche fue centrifugada a 4500 rpm y 4°C durante 30 min para eliminar la grasa. Después, se ajustó el pH de la leche desnatada a 4.2 mediante la adición de HCl 2N, para provocar la coagulación de las caseínas, cuyo punto isoelectrico es 4.6. Por último, mediante una nueva centrifugación a 4500 rpm y 4°C durante 30 min, se separó la fracción de caseínas del lactosuero, obtenido como sobrenadante.

3.2. MEMBRANA

En esta investigación se han utilizado membranas cerámicas tubulares, modelo Inside Céram 120, alojadas en un módulo de acero inoxidable 316L, ambos suministrados por la casa TAMI (Nyons, Francia) (Figura 3.1). Los tamaños de corte empleados han sido 50 kDa, 300 kDa y 0.14 μm . Estas 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 1.2 m y un área superficial de 0.045 m². El soporte está formado por óxidos de aluminio, titanio y zirconio, mientras que el material de la capa activa es óxido de titanio. Este tipo de membranas pueden operar en condiciones extremas: 10 bar de presión, temperaturas de hasta 350 °C y pH en el intervalo 0-14.



Figura 3.1. Módulo y membranas empleadas.

Aunque en los sistemas de ultrafiltración tradicionalmente se han empleado membranas poliméricas, para esta investigación se utilizaron membranas cerámicas debido a las ventajas que presentan: son más resistentes a productos químicos, se pueden utilizar en un rango amplio de temperaturas y pH, soportan altos límites de presión, tienen una vida de operación más larga y se pueden esterilizar con vapor (Shah *et al.*, 2007). Por otro lado, en cuanto a la configuración, se eligió el módulo tubular porque permite 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 (Grangeon y Lescoche, 2000).

3.2.1. Determinación del punto de carga cero

Las membranas inorgánicas presentan un comportamiento anfótero debido a que poseen puntos en su superficie que pueden ionizarse en disolución acuosa. Por tanto, la membrana tendrá una carga neta que puede ser de distinto signo en función del pH. Esto es muy importante en la filtración de proteínas, ya que las interacciones electrostáticas proteína-membrana serán diferentes en función de la carga neta que presente cada una de ellas, es decir, será función del pH. Estas interacciones, de naturaleza atractiva o repulsiva, afectan a la colmatación de la membrana y a la forma en la que se aproxima la proteína a la misma y, por consiguiente, a la transmisión o rechazo de esa proteína. 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.

De acuerdo con los resultados obtenidos por De la Casa (2006), el punto de carga cero de membranas cerámicas Inside Céram es independiente de la configuración y del tamaño de poro, dependiendo únicamente del material de la membrana. Por tanto, todas las membranas empleadas en esta investigación, Inside Céram, presentan un mismo valor de pcz, cercano a 7 (Figura 3.2).

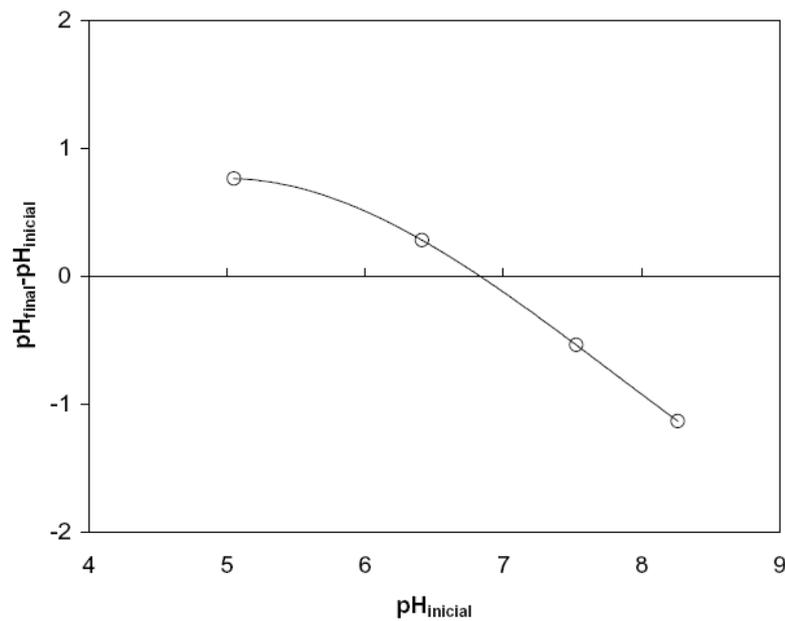


Figura 3.2. Determinación del punto de carga cero de las membranas cerámicas Inside Céram.

3.2.2. Determinación de la permeabilidad de la membrana

El modelo de resistencias en serie describe el comportamiento observado en el caudal de filtrado en función de la presión de trabajo. En los procesos de filtración se distingue una zona controlada por la presión para valores bajos de la misma y una zona independiente de la presión para valores altos. Una aproximación a este fenómeno consistiría en la utilización de resistencias en serie, por analogía con la transferencia de calor (Cheryan, 1998). Según este modelo, la ecuación que relaciona el flujo de filtrado con la presión es:

$$J_F = \frac{\Delta P}{R_M + R_F + R_P} \quad [3.1]$$

donde J_F es el flujo de filtrado, ΔP es la presión transmembrana, R_M es la resistencia intrínseca de la membrana, R_F es la resistencia de colmatación y R_P es la resistencia de la capa de polarización.

La resistencia intrínseca de la membrana, R_M , se determina utilizando agua pura como alimentación, ya que en este caso R_F y R_P son nulas:

$$(J_F)_{agua} = \frac{\Delta P}{R_M} \quad [3.2]$$

La permeabilidad de la membrana, L , se define como la relación entre el flujo de filtrado y la presión transmembrana, es decir, es la inversa de R_M .

$$(J_F)_{agua} = \frac{\Delta P}{R_M} = L \cdot \Delta P \quad [3.3]$$

Para determinar la permeabilidad inicial de cada una de las membranas, se hizo pasar agua a 30°C y 400 L/h a través de las membranas vírgenes, midiendo el flujo de filtrado en función de la presión transmembrana. A partir de estos valores se determinó L como la pendiente de la recta resultante de la representación del flujo frente a la presión transmembrana (ecuación [3.3]).

◆ Membrana de 50 kDa

En la Figura 3.3 se muestran los datos experimentales del flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana para la membrana de 50 kDa. Como consecuencia, la permeabilidad de referencia de esta membrana es: $L_{50 \text{ kDa}} = 293.88 \text{ L}/(\text{bar} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{h})$.

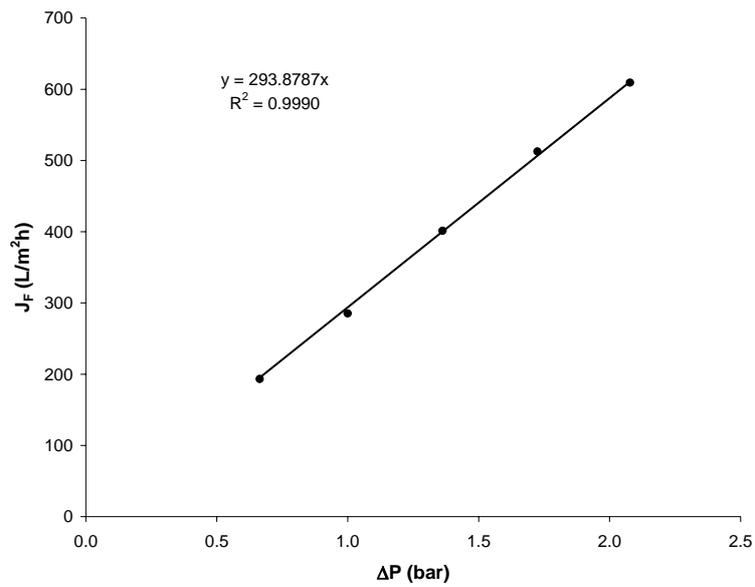


Figura 3.3. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana para la membrana de 50 kDa.

➤ *Membrana de 300 kDa*

La permeabilidad de la membrana virgen de 300 kDa es: $L_{300 \text{ kDa}} = 780.90 \text{ L}/(\text{bar}\cdot\text{m}^2\text{h})$. La representación del flujo de filtrado en función de la presión transmembrana para esta membrana se muestra en la Figura 3.4.

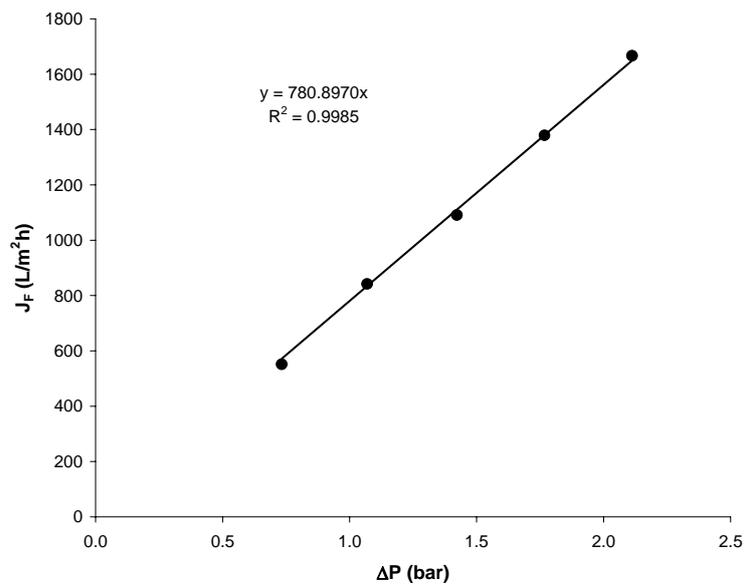


Figura 3.4. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana para la membrana de 300 kDa.

➤ *Membrana de 0.14 μm*

En la Figura 3.5 se representan los datos experimentales para el cálculo de la permeabilidad inicial de la membrana de 0.14 μm . El valor resultante es: $L_{0.14 \mu\text{m}} = 1817.68 \text{ L}/(\text{bar}\cdot\text{m}^2\text{h})$.

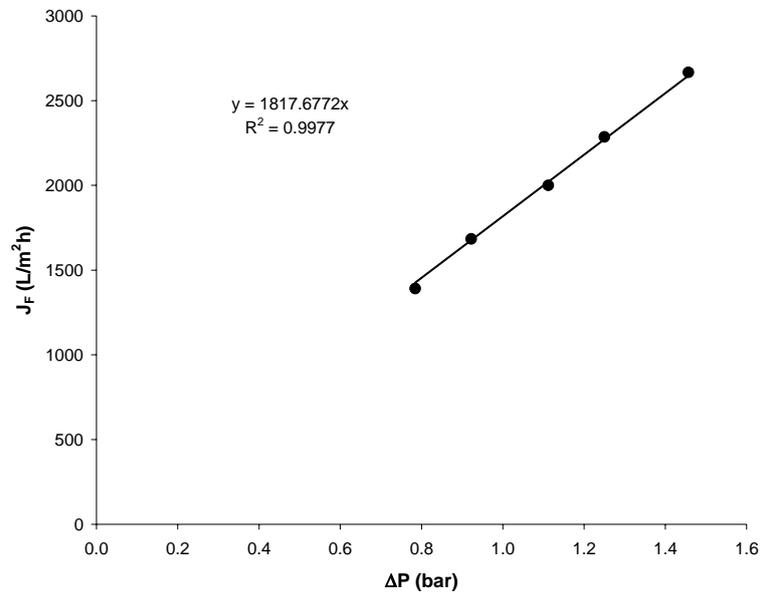


Figura 3.5. Flujo de filtrado de agua en función de la presión transmembrana para la membrana de 0.14 μm .

3.3. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

3.3.1. Modo de operación: diafiltración continua

Cuando se opera en el modo de diafiltración continua, una solución con pH y temperatura iguales a los de trabajo es adicionada al tanque de alimentación con igual caudal que el caudal de filtrado, de modo que el volumen de retenido permanece constante a lo largo de todo el proceso. Con este modo de operación se consigue favorecer el paso de las moléculas de menor tamaño al filtrado, quedando en el retenido las de mayor tamaño. En la Figura 3.6 se esquematiza esta forma de operar y en la Figura 3.7 se muestra la fotografía de dicho dispositivo.

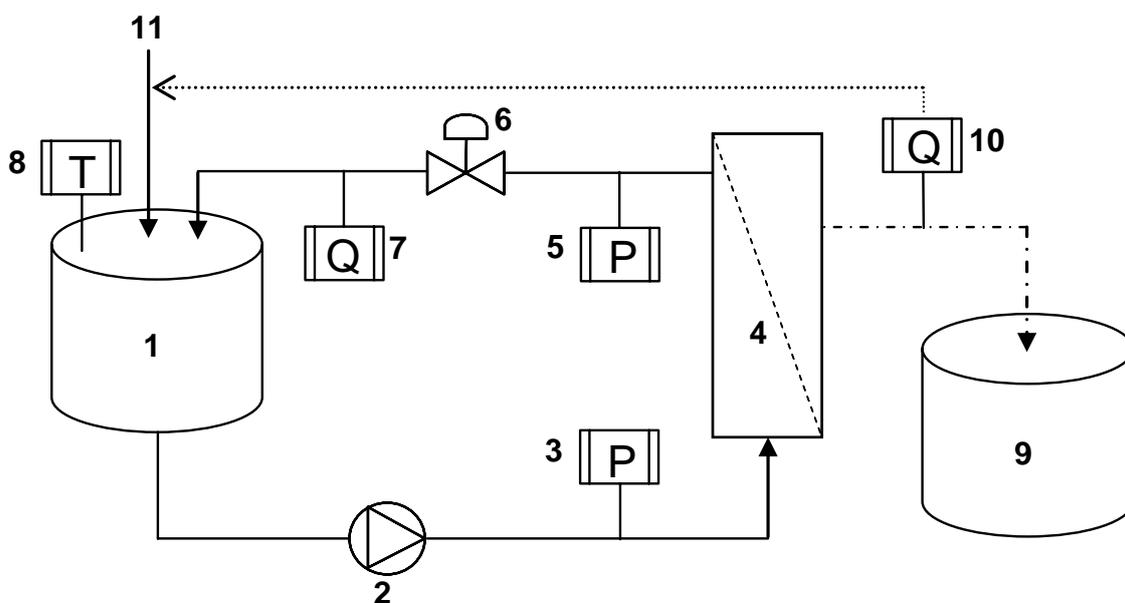


Figura 3.6. Dispositivo experimental para el modo de diafiltración continua.

La alimentación se introduce en un tanque de acero inoxidable de 2 L (1) que dispone de un termómetro digital (8) (Hanna Instrument HI 98509, USA), que permite controlar la temperatura de trabajo mediante la actuación sobre el termostato de un baño (Selecta, Abrera, España), donde se encuentra sumergido el tanque. La alimentación es impulsada mediante 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), al módulo de membrana (4), del que se obtienen dos corrientes: la corriente de retenido (línea continua) y la de filtrado (línea discontinua). La corriente de alimentación a la membrana dispone de un manómetro (3) (Wika, 1-60 psi, USA) para medir la presión a la entrada del módulo. En la corriente de retenido se coloca un manómetro (5) (Wika, 1-60 psi, USA) para medir la presión a la salida del módulo de membrana, una válvula de membrana (6) para regular la presión y un caudalímetro magnético (7) (Badger-Meter Type Food Primo V11, Alemania). La corriente de filtrado se recoge en el tanque de filtrado acumulado (9) y se adiciona al tanque de alimentación una solución al pH y temperatura de trabajo (11), con caudal coincidente con el caudal de filtrado (10). El valor de caudal de filtrado se determina mediante medida en una balanza electrónica (Mettler Toledo PB 1502-S, Suiza) de la masa recogida en un tiempo determinado.

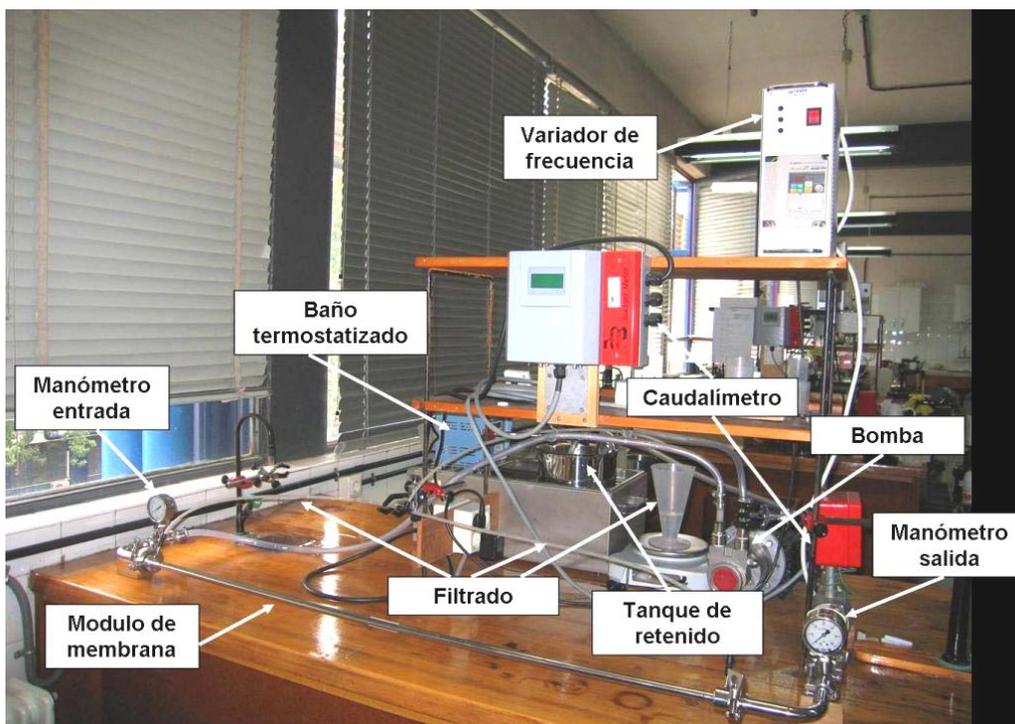


Figura 3.7. Fotografía del dispositivo experimental.

3.3.2. Modo de operación: recirculación total

En este caso, (Figura 3.8), el filtrado es recirculado al tanque de alimentación junto con la corriente de retenido. La corriente de filtrado se encuentra abierta y el valor de su caudal se determina, al igual que en el modo de diafiltración continua, por medida de masa en una balanza electrónica. Este modo de operación permite mantener unas condiciones homogéneas en el retenido a lo largo de todo el experimento.

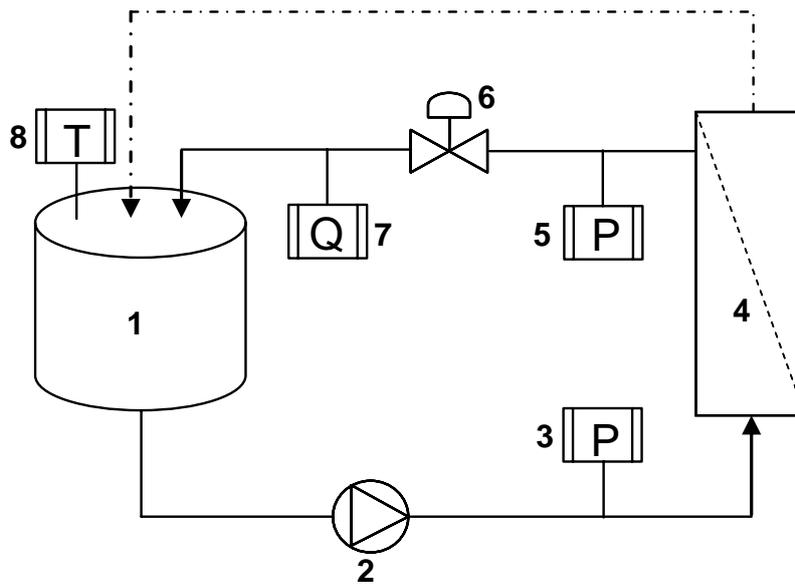


Figura 3.8. Dispositivo experimental para el modo de recirculación total.

3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En cada experimento se diferenciaron tres etapas:

➤ *Acondicionamiento de la membrana*

Se recirculaba agua Milli-Q en las condiciones de pH y temperatura de trabajo durante 15 minutos.

➤ *Filtración*

En primer lugar, se ajustaba el pH de la alimentación al pH de trabajo mediante la adición de HCl o NaOH, según el caso. Seguidamente, se filtraba a vacío para retirar posibles agregados. A continuación, se colocaban 2 L de alimentación en el tanque correspondiente y se iniciaba el proceso. La filtración se llevaba a cabo en las siguientes condiciones de operación: temperatura de 30°C para evitar fenómenos de desnaturalización, presión transmembrana de 1 bar para trabajar dentro de la zona de operación controlada por la presión y 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.

En el modo de *diafiltración continua*, el caudal de filtrado se recogía en el tanque de filtrado acumulado, monitorizando la evolución de su caudal con el tiempo. Con caudal igual al de filtrado, se añadía agua de diafiltración (pH y temperatura de trabajo) al tanque de retenido. El proceso de diafiltración concluía cuando se llegaba a 4 diavolúmenes, es decir, cuando se habían recogido 8 L de filtrado. A cada diavolumen (cada 2 L) se tomaban muestras de 1 mL de retenido y filtrado acumulado para la cuantificación de la cantidad de cada una de las proteínas individuales.

En el modo de *recirculación total*, la corriente de filtrado se recirculaba al tanque de alimentación. El proceso de filtración concluía cuando se alcanzaba 1 hora de operación. Se monitorizaba el caudal de filtrado con el tiempo y se cogían muestras de 1 mL, tanto de retenido como de filtrado, a los 3, 7, 15, 30 y 60 minutos para cuantificar la concentración de proteínas individuales.

➤ *Limpieza*

Para regenerar la membrana cerámica tras la ultrafiltración, se aplicaba el siguiente protocolo de limpieza:

1. Enjuagado con agua destilada para eliminar los restos de la solución de trabajo.
2. Limpieza básica: recirculación total de una disolución de 20 g/L de NaOH (Panreac, España) y 2 g/L de un agente surfactante, sodio dodecil sulfato (SDS) (Panreac, España) a 50 °C, 350 L/h, 1 bar de presión transmembrana y 60 minutos. Con la limpieza básica se elimina la suciedad de origen orgánico y biológico.
3. Enjuagado con agua destilada hasta la neutralidad, tanto del retenido como del filtrado.
4. Repetición de las etapas 2-3 hasta recuperar las condiciones filtrantes iniciales de la membrana (máximo 3 veces).
5. Limpieza ácida: sólo en aquellos casos en los que, tras repetir la limpieza básica tres veces, no se conseguía recuperar la resistencia inicial de la membrana, se realizaba una limpieza ácida con el fin de eliminar suciedad de origen inorgánico, consistente en recirculación total de una disolución de 2.5 mL/L de ácido nítrico al 60% a 350 L/h, 50 °C, 1 bar y 15 minutos.
6. Enjuagado con agua hasta neutralidad tanto del retenido como del filtrado.
7. Repetición de las etapas 2-6 hasta recuperar las condiciones filtrantes iniciales, es decir, el valor de permeabilidad de la membrana virgen (según apartado 3.2.2)

3.5. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN PROTEÍNAS INDIVIDUALES

Las concentraciones de las proteínas individuales presentes en el lactosuero (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG) fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), utilizando el método descrito por Elgar et al. (2000), extendido a la detección de LF por Palmano y Elgar (2002). El sistema de HPLC (Waters, Milford MA, USA) estaba formado por un módulo de separación Alliance 2690 conectado a un detector por absorbancia M-474 y a un sistema de adquisición y procesado de datos Millennium. Se utilizaba una columna de 1 mL Resource RPC (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) que operaba a temperatura ambiente y con un flujo de 1 mL/min. Se trabajaba con gradiente de fases móviles, por lo que era necesario la utilización de dos solventes: el solvente A era una disolución de 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético en agua Milli-Q; mientras que el solvente B era una disolución de 0.09% (v/v) de ácido trifluoroacético y 90% (v/v) de acetonitrilo en agua Milli-Q. La columna se equilibraba en 80% de solvente A. En la Tabla 3.1 se recoge el gradiente que se utilizaba para separar y cuantificar las proteínas. La detección por absorbancia se realizaba a una longitud de onda de 214 nm.

Tabla 3.1. Gradiente utilizado en RP-HPLC para cuantificar las proteínas individuales.

t (min)	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

Antes de realizar el análisis por RP-HPLC, todas las muestras se filtraban con un filtro de jeringa de nylon de 0.22 μm y los solventes eran filtrados a través de filtros de membrana Durapore de 0.45 μm (Millipore, Bedford MA, USA) y desgasificados. Los volúmenes inyectados eran: 50 μL para el lactosuero inicial y las muestras de retenido, y 100 μL para las muestras de filtrado y todas las muestras de proteínas modelo.

El acetonitrilo y el ácido trifluoroacético, ambos grado HPLC, fueron comprados a Scharlau Chemie (Barcelona, Spain), mientras que los patrones de proteínas (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG) fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Previo al análisis de las muestras se realizaron curvas de calibrado. Para ello se preparó una mezcla de patrones con las concentraciones indicadas en la Tabla 3.2, correspondientes a las concentraciones proporcionales de cada proteína en el lactosuero.

Tabla 3.2. Concentración de cada una de las proteínas en la mezcla de patrones empleada para las curvas de calibrado.

Proteína	Concentración (g/L)
α -lactoalbúmina	0.80
β -lactoglobulina A + β -lactoglobulina B	1.00 + 1.00
BSA	0.08
Inmunoglobulinas G	0.30
Lactoferrina	0.03

Para la obtención de las curvas de calibrado se inyectaron volúmenes desde 10 hasta 100 μL de la mezcla de patrones anteriormente indicada. De este modo, se realizaron las rectas de calibrado de cada proteína, con 10 puntos cada una, mediante representación del área obtenida en función de la cantidad de proteína inyectada, pasando por el origen de coordenadas. Las pendientes y coeficientes de correlación resultantes de la recta de calibrado para cada proteína se recogen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Pendientes y coeficientes de correlación de las rectas de calibrado de las proteínas individuales.

Proteína	Pendiente (μg^{-1})	R²
α -lactoalbúmina	1083013	0.9998
β -lactoglobulina A + β -lactoglobulina B	753583	0.9998
BSA	639400	0.9947
Inmunoglobulinas G	463143	0.9946
Lactoferrina	949023	0.9976

4. SIMULACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LACTOFERRINA POR ULTRAFILTRACIÓN

4.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado en el capítulo de antecedentes, la filtración con membranas es una de las técnicas utilizadas para el fraccionamiento de las proteínas del lactosuero. En particular, la filtración tangencial de alta resolución (HPTFF) se presenta como la alternativa más potente técnicamente y más viable desde el punto de vista económico. Fue Zydney, en 1998, el primero que indicó la posibilidad de utilizar la HPTFF para el fraccionamiento de las proteínas del suero lácteo. Este autor sugirió la utilización de dos etapas en cascada. En la primera etapa se deberían retener inmunoglobulinas y lactoferrina; pasando a filtrado, preferentemente, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA. En la segunda etapa, el retenido de la etapa anterior se haría pasar por otra membrana, seleccionada de forma que la lactoferrina fuese recogida en el filtrado, quedando retenidas las inmunoglobulinas. Para llevar a cabo con éxito dicha estrategia, indicó la necesidad de utilizar las interacciones electrostáticas proteína-proteína y proteína-membrana mediante el control de las condiciones de operación, fundamentalmente pH y fuerza iónica. Sin embargo, no existe en la literatura ni la simulación de esta estrategia ni su implementación en el laboratorio.

En este capítulo se pretende analizar, desde un punto de vista teórico, la viabilidad de la aplicación de la técnica de filtración tangencial de alta resolución para la recuperación de lactoferrina a partir de lactosuero. Para ello se va a modelar y simular un proceso de ultrafiltración en dos etapas, utilizando como modo de operación la diafiltración continua (Figura 4.1).

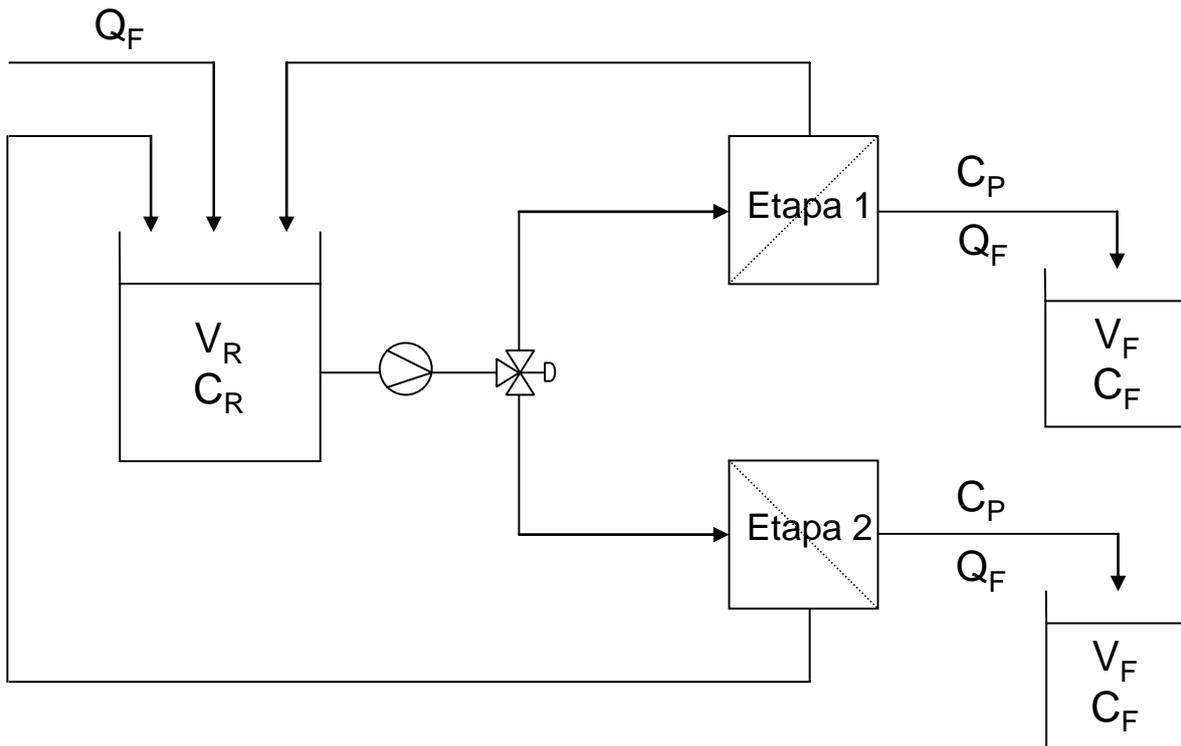


Figura 4.1. Esquema del proceso de diafiltración continua. Dos etapas teóricas.

4.2. ASPECTOS TEÓRICOS

4.2.1. Modelo del proceso

Como premisas básicas del modelo se asumirá que:

- El modo de operación es diafiltración continua, es decir, el volumen de retenido se mantiene constante mediante adición de una solución de agua (a pH y fuerza iónica apropiadas) de igual caudal que el de filtrado. Esta configuración permite la retención de las proteínas de mayor radio efectivo y el lavado de las de menor.
- La transmisión de cada proteína es constante durante la filtración. Es decir, los cambios en las propiedades filtrantes de la membrana debidos al fenómeno de la colmatación se consideran despreciables.
- Las moléculas de proteína no interactúan entre sí, es decir, no se consideran fenómenos de agregación.
- La transmisión observada de cada proteína se aproxima a la transmisión asintótica.

Para justificar esta última premisa hay que tener en cuenta que la transmisión real se define como la razón, en la capa límite, entre la concentración de soluto a la salida (C_p) y a la entrada del poro (C_w). A partir de modelos hidrodinámicos se puede calcular la transmisión real mediante la siguiente ecuación (Zeman y Zydney, 1996; de la Casa et al., 2006):

$$S_a = \frac{C_p}{C_w} = \frac{S_\infty \cdot \exp(Pe_m)}{S_\infty + \exp(Pe_m) - 1} \quad [4.1]$$

donde Pe_m es el número de Peclet de la membrana y es una medida de la contribución relativa de la convección y la difusión del soluto al transporte del mismo a través de la membrana. Se calcula como:

$$Pe_m = \left(\frac{V \cdot \delta_m}{D_\infty} \right) \left(\frac{\phi \cdot K_c}{\phi \cdot K_d} \right) = \left(\frac{J_F \cdot \delta_m}{D_\infty} \right) \left(\frac{\phi \cdot K_c}{\varepsilon \cdot \phi \cdot K_d} \right) \quad [4.2]$$

Para valores muy elevados de Pe_m , es decir, cuando el transporte del soluto a través de la membrana se debe principalmente a la convección, la transmisión real se hace igual a la transmisión asintótica. Esta aproximación es razonable para la mayoría de los sistemas de ultrafiltración (Mehta y Zydney, 2005).

Como en la práctica se suele conocer el dato de la concentración en el retenido C_R en lugar de C_W , normalmente se utiliza la denominada transmisión observada. Ésta se relaciona con la transmisión real a partir del modelo de la capa de polarización (de la Casa, 2006):

$$S_0 = \frac{C_P}{C_R} = \frac{S_a \cdot \exp(J_F / k)}{1 - S_a + S_a \cdot \exp(J_F / k)} \quad [4.3]$$

Para valores pequeños de caudal de filtrado, la transmisión observada es igual a la transmisión real, ya que $C_W \approx C_R$.

Ambas aproximaciones son válidas en la mayoría de los procesos de ultrafiltración, por lo que algunos autores, como Zeman y Wales (1981), utilizan directamente para el cálculo de la transmisión observada la ecuación correspondiente al cálculo de la transmisión asintótica.

Teniendo en cuenta todas las premisas anteriormente indicadas, el proceso se puede modelar con el sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas que a continuación se detalla.

La ecuación correspondiente al balance de materia a cada soluto (s) en el tanque de retenido queda de la siguiente manera:

$$0 = Q_F \cdot (C_P)_s + \frac{d(V_R \cdot (C_R)_s)}{dt} \quad [4.4]$$

El balance de materia total y el balance de materia a cada soluto (s) en el tanque de filtrado acumulado da lugar a las siguientes ecuaciones:

$$Q_F = \frac{dV_F}{dt} \quad [4.5]$$

$$Q_F \cdot (C_P)_s = \frac{d(V_F \cdot (C_F)_s)}{dt} \quad [4.6]$$

El número de diavolumenes, N, se define como:

$$N = \frac{V_F}{V_R} \quad [4.7]$$

La transmisión observada, S_0 , para cada proteína (s) se calcula con la siguiente ecuación (Zeman y Zydney, 1996):

$$(S_0)_s = \begin{cases} (1 - (\lambda_{EFF})_s)^2 \cdot [2 - (1 - (\lambda_{EFF})_s)^2] \cdot \exp(-0.7146 \cdot (\lambda_{EFF})_s^2); & (\lambda_{EFF})_s < 1 \\ 0 & ; (\lambda_{EFF})_s \geq 1 \end{cases} \quad [4.8]$$

donde λ_{EFF} para cada soluto se define como:

$$(\lambda_{EFF})_s = \frac{(r_{EFF})_s}{r_p} \quad [4.9]$$

Considerando el modelo propuesto, es necesario calcular el radio efectivo de cada proteína, que se evalúa teniendo en cuenta el radio de Stokes, la carga neta de la proteína, el radio de poro y la fuerza iónica del entorno. El radio de Stokes se puede calcular conocido el peso molecular. La carga neta de la proteína se determina a partir de su estructura primaria y en función del pH. En cuanto a la fuerza iónica del entorno, no podrá ser inferior a la mínima posible, que viene determinada por la fuerza iónica debida a la presencia de las propias proteínas en el lactosuero y a la que aporta el ácido o base añadida para ajustar el pH del mismo. Por tanto, es necesario calcular cómo varía esta fuerza iónica mínima en función del pH del lactosuero. A continuación se detallan estos cálculos.

4.2.2. Estructura primaria

De acuerdo con el código recogido en la Tabla 4.1, la secuencia de aminoácidos de las proteínas del lactosuero se muestra en la Tabla 4.2, Tabla 4.3, Tabla 4.4, Tabla 4.5 y Tabla 4.6. Dichas secuencias han sido obtenidas del servidor de proteómica del Swiss Institute of Bioinformatics. Es importante destacar que la β -lactoglobulina se presenta en forma de dímero y que la inmunoglobulina G tiene una estructura de 4 cadenas, comprendiendo dos cadenas largas y dos cadenas cortas, unidas mediante puentes disulfuro.

Tabla 4.1. Código de aminoácidos de 1 letra.

Letra	Aminoácido	Letra	Aminoácido
G	Glicina	W	Triptófano
P	Prolina	H	Histidina
A	Alanina	K	Lisina
V	Valina	R	Arginina
L	Leucina	Q	Glutamina
I	Isoleucina	N	Asparagina
M	Metionina	E	Ácido glutámico
C	Cisteína	D	Ácido aspártico
F	Fenilalanina	S	Serina
Y	Tirosina	T	Treonina

Tabla 4.2. Secuencia de aminoácidos de α -lactoalbúmina.

EQLTKCEVFRELKDLKGYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAI VQNNDSTEYGLF
 QINNKIWCKDDQNP HSSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVKKILDKVGINYWLAH
 KALCSEKLDQWLCEKL

Tabla 4.3. Secuencia de aminoácidos de β -lactoglobulina.

LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDL
EILLQKWENGECAQKKIIAEKTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKYLLFCME
NSAEPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI

Tabla 4.4. Secuencia de aminoácidos de seroalbúmina bovina.

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIASFQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCV
ADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKD
DSPDLPKLKPDNTLCDEFKADEKKFWGKYL YEIARRHPYFYAPELLYYANKY
NGVFQECQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAW
SVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDN
QDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEA
KDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCA KDDPHACYSTVFDK
LKHLVDEPQNLIKQNC DQFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSL
GKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVT KCCTESLVNR
RPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKA
TEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGP KLVVSTQTALA

Tabla 4.5. Secuencia de aminoácidos de lactoferrina.

APRKNVRWCTISQPEWFKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRFALECI R A I A E K K
ADAVTL D G G M V F E A G R D P Y K L R P V A A E I Y G T K E S P Q T H Y Y A V A V V K K G S N F Q L
D Q L Q G R K S C H T G L G R S A G W I I P M G I L R P Y L S W T E S L E P L Q G A V A K F F S A S C V P C I
D R Q A Y P N L C Q L C K G E G E N Q C A C S S R E P Y F G Y S G A F K C L Q D G A G D V A F V K E T T V
F E N L P E K A D R D Q Y E L L C L N N S R A P V D A F K E C H L A Q V P S H A V V A R S V D G K E D L I
W K L L S K A Q E K F G K N K S R S F Q L F G S P P G Q R D L L F K D S A L G F L R I P S K V D S A L Y L G S
R Y L T T L K N L R E T A E E V K A R Y T R V V W C A V G P E E Q K K C Q Q W S Q Q S G Q N V T C A T A
S T T D D C I V L V L K G E A D A L N L D G G Y I Y T A G K C G L V P V L A E N R K S S K H S S L D C V L R
P T E G Y L A V A V V K K A N E G L T W N S L K D K K S C H T A V D R T A G W N I P M G L I V N Q T G S
C A F D E F F S Q S C A P G A D P K S R L C A L C A G D D Q G L D K C V P N S K E K Y Y G Y T G A F R C L
A E D V G D V A F V K N D T V W E N T N G E S T A D W A K N L N R E D F R L L C L D G T R K P V T E A Q
S C H L A V A P N H A V V S R S D R A A H V K Q V L L H Q Q A L F G K N G K N C P D K F C L F K S E T K N
L L F N D N T E C L A K L G G R P T Y E E Y L G T E Y V T A I A N L K K C S T S P L L E A C A F L T R

Tabla 4.6. Secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina-G.

<p>Cadena larga</p> <p>EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCSSSGFIFSSYAMYWVRQAPGKGLEWVAIIWD DGSDQHYADSVKGRFTISRNDKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARDGGHGFCS SASCFGPDYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP QPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPQVKFNWYVDGIVQVHNAKTKPREQQYNSTYRVVSVLTVLHQ NWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> <p>Cadena corta</p> <p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGTSSNIGSSTVNWYQQLPGMAPKLLIYRDAMR PSGVPDRFSGSKSGASASLAIGGLQSEDETDYYCAAWDVSLNAYVFGTGTKVT VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG VETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>

4.2.3. Cálculo de la carga neta

Los aminoácidos que contribuyen, junto con el grupo amino terminal, a la carga positiva de la proteína son: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); mientras que los que contribuyen, junto con el grupo carboxilo terminal, a la carga negativa de la proteína son: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), cisteína (C) y tirosina (Y). En la Tabla 4.7 se muestra el recuento, para cada proteína, del amino terminal y los aminoácidos que contribuyen a la carga positiva de la misma, así como los pK_a correspondientes (Mathews *et al.*, 2000); mientras que en la Tabla 4.8 se muestra el recuento de aminoácidos que contribuyen a la carga

negativa de la proteína, el grupo carboxilo y los pK_a correspondientes (Mathews *et al.*, 2000). El pK_a del grupo amino terminal de cada proteína es el correspondiente al grupo amino terminal del primer aminoácido de la cadena de la proteína. Del mismo modo, el pK_a del grupo carboxilo terminal es el debido al último aminoácido de la cadena.

Tabla 4.7. Número de aminoácidos que contribuyen a la carga positiva en α -lactoalbúmina (ALA), β -lactoglobulina (BLG), seroalbúmina bovina (BSA), lactoferrina (LF) e inmunoglobulinas G (IgG) y pK_a de cada uno de ellos.

Aminoácido		ALA	BLG	BSA	LF	IgG	pK_a
Amino terminal ALA	E	1	0	0	0	0	9.70
Amino terminal BLG	L	0	2	0	0	0	9.60
Amino terminal BSA	D	0	0	1	0	0	9.80
Amino terminal LF	A	0	0	0	1	0	9.70
Amino terminal IGG	E	0	0	0	0	2	9.10
Cadena Larga							
Amino terminal IGG	Q	0	0	0	0	2	9.70
Cadena Corta							
Lisina	K	12	30	59	54	82	10.00
Arginina	R	1	6	23	37	38	12.50
Histidina	H	3	4	17	10	26	6.00

Tabla 4.8. Número de aminoácidos que contribuyen a la carga negativa en α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina bovina, lactoferrina e inmunoglobulinas G y pK_a de cada uno de ellos.

Aminoácido		ALA	BLG	BSA	LF	IgG	pK_a
Carboxilo terminal ALA	L	1	0	0	0	0	2.40
Carboxilo terminal BLG	I	0	2	0	0	0	2.40
Carboxilo terminal BSA	A	0	0	1	0	0	2.30
Carboxilo terminal LF	R	0	0	0	1	0	2.20
Carboxilo terminal IGG	G	0	0	0	0	2	2.30
Cadena Larga							
Carboxilo terminal IGG	S	0	0	0	0	2	2.20
Cadena Corta							
Ácido aspártico	D	13	20	40	36	56	3.90
Ácido glutámico	E	7	32	59	40	52	4.20
Cisteína	C	8	10	35	34	36	8.30
Tirosina	Y	4	8	20	21	52	10.10

Con estos valores, es posible calcular la carga neta, z , de cada proteína en función del pH (Skoog y Wichman, 1986) mediante la expresión:

$$z = \sum_i N_i \cdot \frac{10^{(pK_i - pH)}}{1 + 10^{(pK_i - pH)}} - \sum_j N_j \cdot \frac{10^{(pH - pK_j)}}{1 + 10^{(pH - pK_j)}} \quad [4.10]$$

Donde el índice i se refiere a los aminoácidos potencialmente cargados positivamente (y al grupo amino) y el índice j a los negativamente cargados (y al grupo carboxilo).

En la Figura 4.2 se representa la carga neta de las proteínas del lactosuero en función del pH. El pH para el cual la carga neta de la proteína es 0, es conocido como punto isoeléctrico de esa proteína. Se observa que para valores de pH superiores al punto isoeléctrico la proteína se encuentra cargada negativamente; mientras que para valores de pH inferiores al punto isoeléctrico, se encuentra cargada positivamente. En la Tabla 4.9 se recoge el punto isoeléctrico de las proteínas del lactosuero.

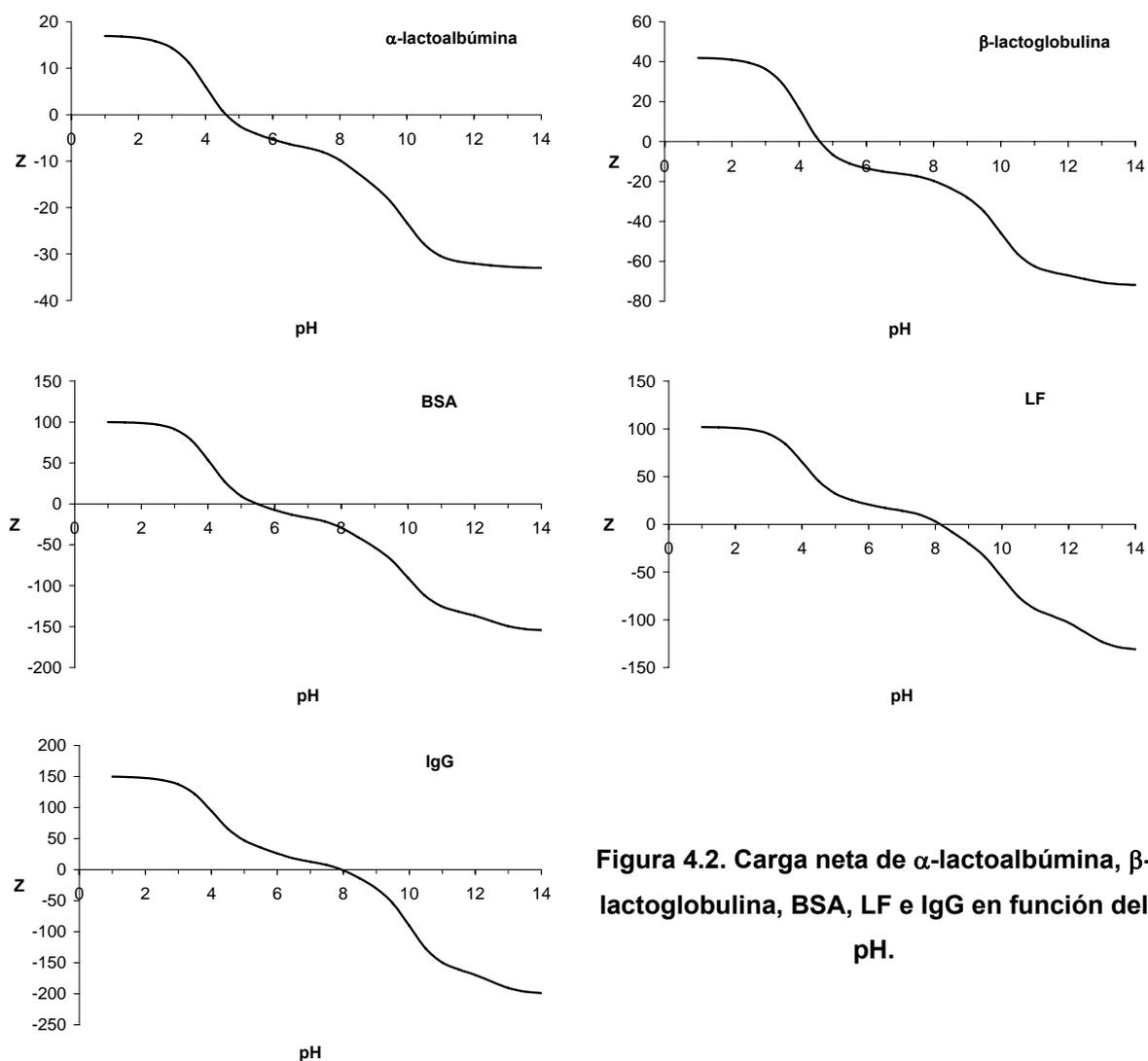


Figura 4.2. Carga neta de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG en función del pH.

Tabla 4.9. Punto isoelectrico de las proteínas del lactosuero.

Proteína	Punto isoelectrico
ALA	4.61
BLG	4.61
BSA	5.48
LF	8.15
IgG	7.95

4.2.4. Cálculo del peso molecular

El cálculo del peso molecular de cada proteína se realiza teniendo en cuenta su secuencia de aminoácidos, utilizando la herramienta informática Peptide Mass (Wilkins et al., 1997). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Peso molecular de las proteínas del lactosuero.

Proteína	Peso Molecular (g/mol)
ALA	14186
BLG	36562
BSA	66433
LF	76144
IgG	145065

4.2.5. Cálculo del radio de Stokes

El cálculo del radio de Stokes, r_S , (también conocido como radio de esfera sólida o radio a carga nula) se efectúa a partir del peso molecular empleando un calibrado (Pharmacia Biotech, 1999) con proteínas modelo (Tabla 4.11). En la Figura 4.3 se muestra el ajuste lineal que permite determinar el radio buscado para las proteínas del lactosuero, radios que se recogen en la Tabla 4.12.

Tabla 4.11. Proteínas modelo para el calibrado del radio de Stokes.

Proteína	Peso Molecular	r_S (nm)
Ribonucleasa A	13700	1.64
Quimotripsinógeno A	25000	2.09
Ovoalbúmina	43000	3.05
Albúmina	67000	3.55
Aldolasa	158000	4.81
Catalasa	232000	5.22
Ferritina	440000	6.10

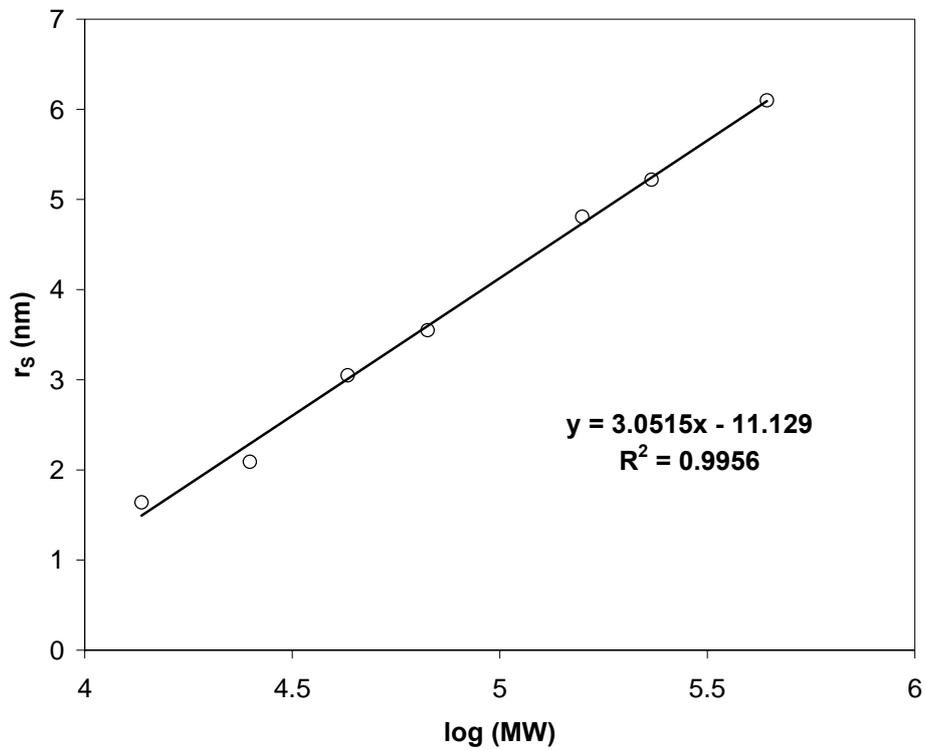


Figura 4.3. Recta de calibrado del radio de Stokes en función del peso molecular.

Tabla 4.12. Radio de Stokes de las proteínas del lactosuero.

Proteína	rs (nm)
ALA	1.54
BLG	2.80
BSA	3.59
LF	3.77
IgG	4.62

4.2.6. Cálculo del radio efectivo

Para el cálculo del radio efectivo (r_{EFF} , nm) de cada proteína (s), se utilizará la expresión desarrollada por Pujar y Zydney (1998):

$$(r_{EFF})_s = (r_s)_s + \frac{4 \cdot (r_s)_s^3 \cdot (\sigma_s)_s^2}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot k \cdot T} \cdot \lambda_s \cdot (1 - \lambda_s) \cdot \kappa^{-1} \quad [4.11]$$

donde:

- $(r_s)_s$: radio de Stokes de la proteína (nm)
- $(\sigma_s)_s$: densidad de carga superficial de la proteína (C/nm²)
- ε_0 : permitividad del vacío (8.854·10⁻³⁹ C²·s²/nm³·Kg)
- ε : permitividad relativa del agua a 30 °C (76.60)
- k : constante de Boltzman (1.381·10⁻⁵ nm²·Kg/s²·K)
- T : temperatura (K)
- $\lambda_s = (r_s)_s / r_p$ (r_p : radio de poro, nm)
- κ^{-1} : longitud de Debye (nm)

La densidad de carga superficial de la proteína se puede calcular a partir de su carga superficial, z , asumiendo que la carga se distribuye uniformemente sobre la superficie de una esfera con radio igual al de Stokes (Pujar y Zydney, 1997):

$$(\sigma_s)_s = \frac{e \cdot z_s}{4 \cdot \pi \cdot (r_s)_s^2} \quad [4.12]$$

donde $e = 1.602 \cdot 10^{-19}$ C/carga.

La longitud de Debye (nm), en disolución acuosa, viene dada por (Zydney, 1998):

$$\kappa^{-1} = 0.304 \cdot I^{-1/2} \quad [4.13]$$

donde I es la fuerza iónica, en mol/L.

Por tanto, el radio efectivo de una proteína depende de las condiciones de fuerza iónica y pH (ya que influye sobre la carga de la proteína), así como de la relación entre el radio de la proteína no cargada y el radio de poro de la membrana. A continuación se analiza cómo influyen estos factores en el radio efectivo.

En la Figura 4.4 se representa el radio efectivo de las proteínas del lactosuero frente al pH para diferentes valores de la fuerza iónica, con $r_p=20$ nm. Se puede observar que el menor radio que presenta cada proteína coincide con su radio de Stokes, valor que se obtiene en su punto isoeléctrico, donde su carga neta es 0. En cualquier otro valor de pH, el radio efectivo de la proteína es menor cuanto mayor es la fuerza iónica.

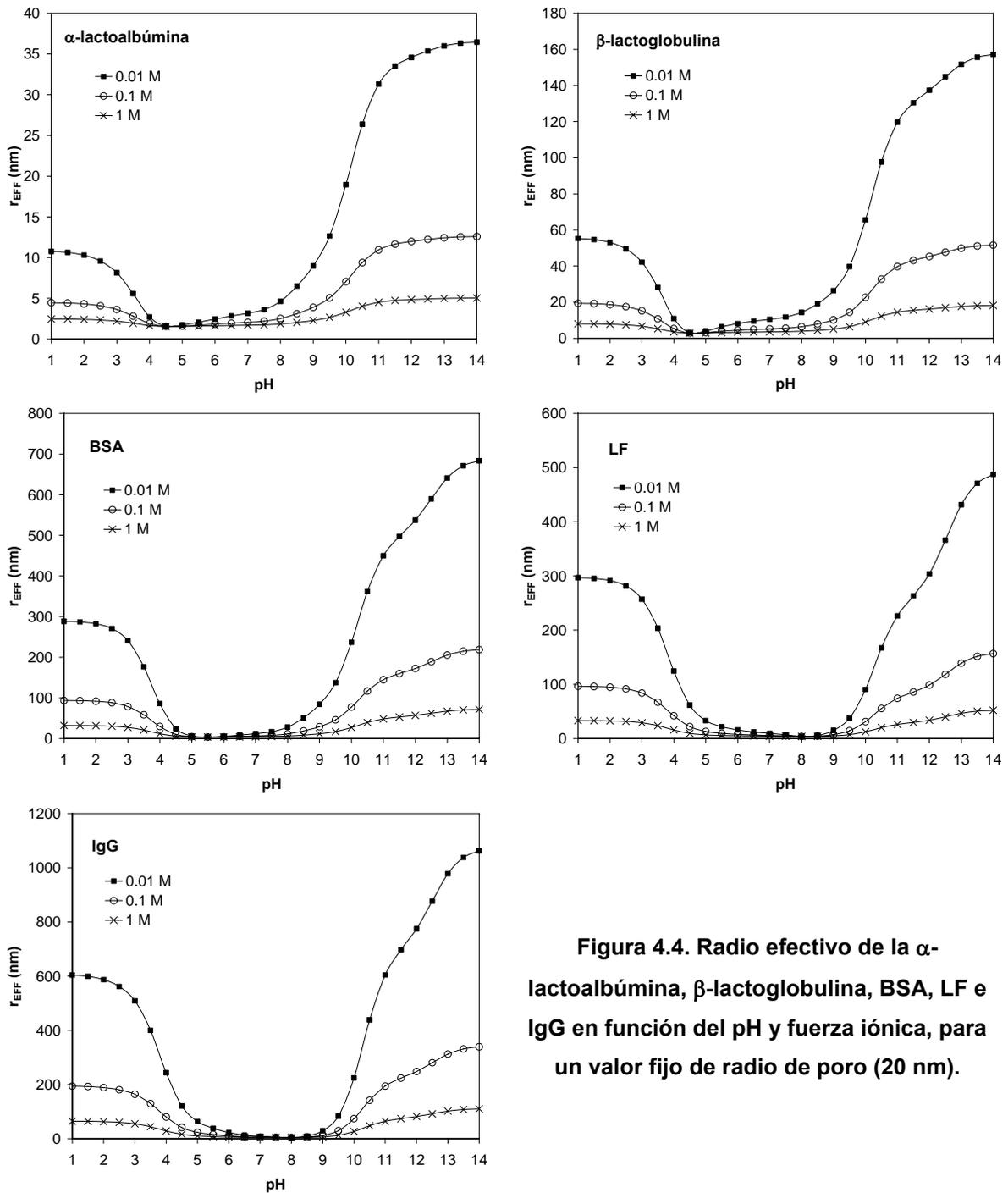


Figura 4.4. Radio efectivo de la α -lactalbumina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG en función del pH y fuerza iónica, para un valor fijo de radio de poro (20 nm).

En la Figura 4.5 se analiza la influencia de λ en el radio efectivo, para varios valores de pH y manteniendo fija la fuerza iónica (0.1 M). Si la ecuación [4.11] se deriva respecto a λ , se obtiene que esta derivada es 0 para $\lambda = 0.5$ ($r_p = 2 \cdot r_s$), y este punto de inflexión es un máximo. Este máximo se puede apreciar en todas las curvas, siendo su valor más o menos elevado en función del pH (de acuerdo con la Figura 4.4). Las curvas casi planas son las

correspondientes a pH cercanos al punto isoeléctrico de la proteína, donde el r_{EFF} coincide con el r_S , independientemente del valor de la fuerza iónica y de λ . En el resto de los casos, para $r_p > 2 \cdot r_S$, al aumentar r_p aumenta r_{EFF} . Por el contrario, para $r_p < 2 \cdot r_S$, al aumentar r_p disminuye r_{EFF} .

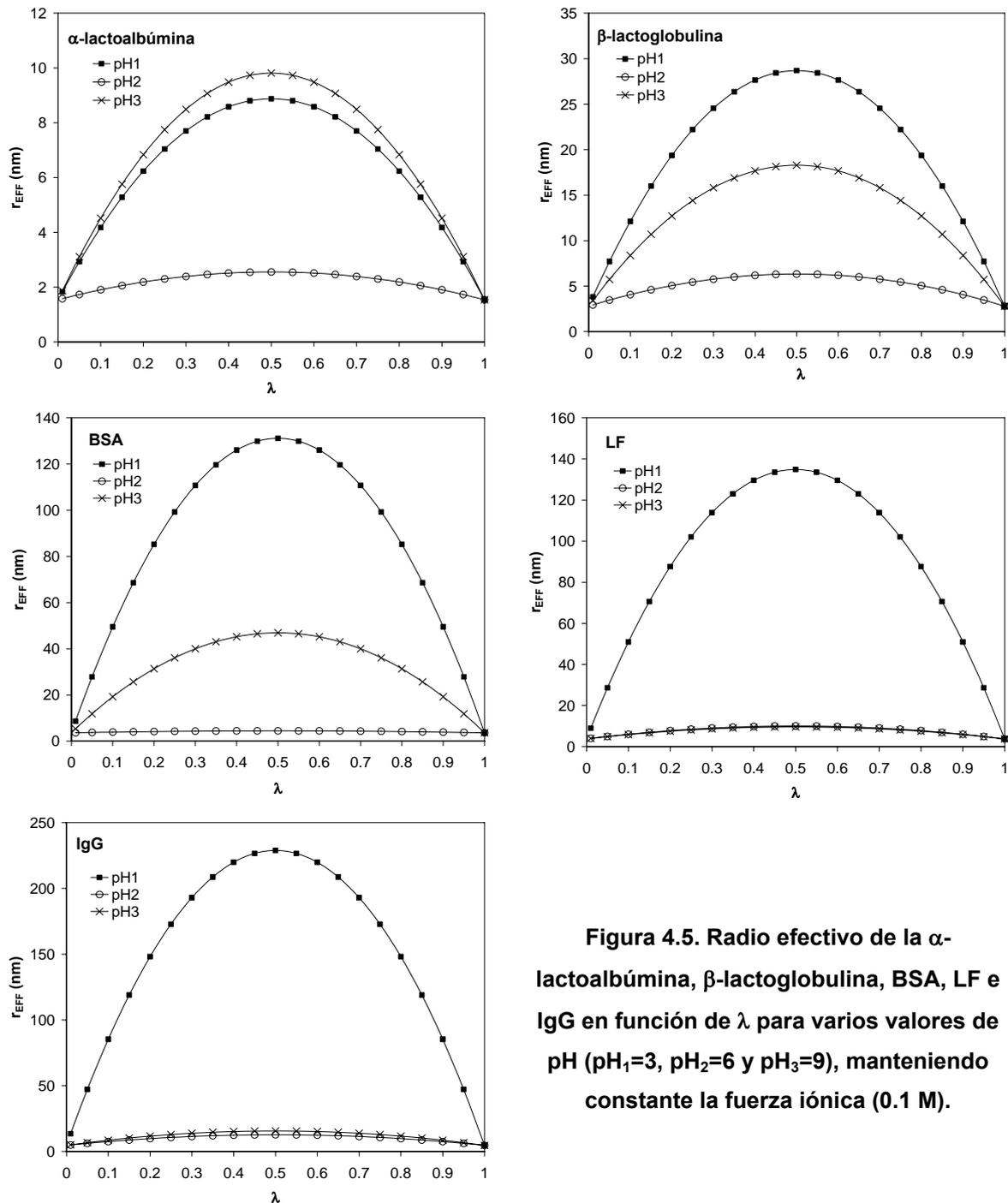


Figura 4.5. Radio efectivo de la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, LF e IgG en función de λ para varios valores de pH ($pH_1=3$, $pH_2=6$ y $pH_3=9$), manteniendo constante la fuerza iónica (0.1 M).

4.2.7. Cálculo de la fuerza iónica mínima

Si se considera que es posible diafiltrar o utilizar otro método para eliminar todas las sales presentes en el lactosuero inicial, la fuerza iónica mínima será la correspondiente a las proteínas y a la adición de HCl (ecuación [4.14]) o NaOH (ecuación [4.15]) para ajustar el pH al de trabajo. Sin embargo, ninguna de las aportaciones a la fuerza iónica son constantes, sino que dependen del pH: en el caso de las proteínas, por la influencia que éste tiene sobre las reacciones de los grupos ionizables de las mismas; y en el caso del ácido o base, porque su volumen añadido dependerá de la diferencia entre el pH inicial y el de trabajo.

$$I_{\min} = \sum \frac{1}{2} \cdot c_s \cdot z_s^2 + [Cl^-] \quad [4.14]$$

$$I_{\min} = \sum \frac{1}{2} \cdot c_s \cdot z_s^2 + [Na^+] \quad [4.15]$$

donde c_s es la concentración de cada una de las proteínas y z_s su carga correspondiente. La concentración corresponde a la concentración inicial en cada etapa, modificada por el volumen de ácido o base añadido (se indicará más adelante); mientras que la carga se calcula según se vio anteriormente, mediante la ecuación [4.10].

Para calcular la concentración de Na^+ o Cl^- añadido es necesario conocer cómo varía el pH del lactosuero en función de la cantidad de NaOH o HCl añadido, es decir, la curva de titración del lactosuero. Para ello hay que considerar:

- Producto iónico del agua
- Principio de electroneutralidad
- Reacciones de los grupos ionizables de las proteínas
- Dilución debida a la adición de ácido o base
- Balance de materia

A continuación se detallan cada uno de estos puntos.

➤ *Producto iónico del agua*

$$K_w = [H^+] \cdot [OH^-] \quad [4.16]$$

➤ *Principio de electroneutralidad*

La suma de las concentraciones de las especies iónicas cargadas positivamente (i) es igual a la suma de las concentraciones de las especies iónicas cargadas negativamente (j):

$$\sum [A^+]_i = \sum [B^-]_j \quad [4.17]$$

Además de los cationes e iones procedentes de las proteínas, en la ecuación [4.17] hay que incluir la concentración de Na^+ si se añade base, o la concentración de Cl^- si se añade ácido.

➤ *Reacciones de los grupos ionizables de las proteínas*

Las especies catiónicas de las proteínas presentes en el lactosuero son: el amino terminal de cada proteína, la lisina, la arginina y la histidina. Para cada una de ellas tiene lugar la siguiente reacción:



En el caso de las especies aniónicas (carboxilo terminal de cada proteína, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína y tirosina) la reacción que tiene lugar es:



Los pKa de los aminoácidos que contribuyen a la carga positiva y negativa de las proteínas se recogen en la Tabla 4.7 y Tabla 4.8, respectivamente.

➤ *Dilución por la adición de NaOH o HCl*

El volumen de ácido o base añadido se calcula a partir de su molaridad (M):

$$V_{\text{añadido}} = \frac{[\text{ion}]}{M} \cdot V_T \quad [4.20]$$

Teniendo en cuenta que el volumen total (V_T) es la suma del volumen inicial (V_0) y el volumen añadido ($V_{\text{añadido}}$), el volumen total se calcula con la siguiente ecuación:

$$V_T = \frac{V_0}{1 - [\text{ion}] / M} \quad [4.21]$$

➤ *Balance de materia*

La concentración inicial de una especie iónica tiene que coincidir con la suma de las concentraciones de la especie ionizada y neutra:

$$\frac{V_0}{V_T} \cdot (c_0)_i = [A^+]_i + [A]_i \quad [4.22]$$

$$\frac{V_0}{V_T} \cdot (c_0)_j = [B^-]_j + [B]_j \quad [4.23]$$

El cálculo de la concentración inicial de cada especie involucrada se hizo a partir de la concentración inicial de cada proteína y del número de aminoácidos ionizables que tenía de cada tipo. Estos datos son los mismos que se utilizaron para el cálculo de la carga neta de la proteína (Tabla 4.7 y Tabla 4.8). Por ejemplo, la concentración inicial de histidina sería:

$$(c_0)_{\text{histidina}} = (c_0)_{\text{ALA}} \cdot (3) + (c_0)_{\text{BLG}} \cdot (4) + (c_0)_{\text{BSA}} \cdot (17) + (c_0)_{\text{LF}} \cdot (10) + (c_0)_{\text{IgG}} \cdot (26) \quad [4.24]$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones planteado (de la ecuación [4.16] a la [4.23]), se obtiene que las concentraciones de base o ácido añadidos se calculan con las siguientes ecuaciones:

$$[Na^+] = \frac{\frac{K_w}{[H^+]} - [H^+] + C_{ji}}{1 + \frac{1}{M} \cdot C_{ji}} \quad [4.25]$$

$$[Cl^-] = \frac{-\left(\frac{K_w}{[H^+]} - [H^+] + C_{ji}\right)}{1 - \frac{1}{M} \cdot C_{ji}} \quad [4.26]$$

donde C_{ji} se calcula como:

$$C_{ji} = \sum_j \left[c_{0j} \cdot \left(1 - \frac{[H^+]}{K_{aj} + [H^+]} \right) \right] - \sum_i \left[c_{0i} \cdot \frac{[H^+]}{K_{ai} + [H^+]} \right] \quad [4.27]$$

siendo i los aminoácidos cargados positivamente (y el grupo amino) y j los cargados negativamente (y el grupo carboxilo).

4.3. OPTIMIZACIÓN

4.3.1. Planteamiento

La recuperación de lactoferrina por ultrafiltración de lactosuero se plantea como un problema de optimización en dos etapas de diafiltración continua. En la primera etapa, se requerirá que las proteínas α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA pasen preferentemente al filtrado, mientras lactoferrina e IgG permanecen en el retenido. En la segunda etapa, IgG quedará retenida por la membrana, siendo finalmente la lactoferrina obtenida en el filtrado.

La optimización, en términos matemáticos, se formula de la siguiente manera:

- Dado: las concentraciones iniciales de proteínas en el lactosuero (Zydney, 1998) (Tabla 4.13).
- Determinar: pH_1 , pH_2 , I_1 , I_2 , r_{p1} y r_{p2} .
- Para minimizar: $N = N_1 + N_2$
- Sujeto a restricciones: C_{R1} y C_{R2} , dadas en la Tabla 4.13, $I_1 \geq I_{1min}$ e $I_2 \geq I_{2min}$
Es preciso indicar que los valores de las concentraciones en retenido requeridas corresponden:
 - Primera etapa: concentración final en retenido superior al 90 % de la inicial para IgG y LF; e inferior al 10 % para ALA, BLG y BSA.
 - Segunda etapa: concentración final en retenido igual a la inicial para ALA, BLG y BSA; superior al 90 % para IgG; e inferior al 10 % para LF.

Tabla 4.13. Planteamiento del problema de optimización.

Proteína	C_{R0} (g/L)	C_{R1} (g/L)	C_{R2} (g/L)
ALA	1.20	< 0.120	= C_{R1}
BLG	2.70	< 0.270	= C_{R1}
BSA	0.40	< 0.040	= C_{R1}
LF	0.10	> 0.090	< 0.010
IgG	0.65	> 0.585	> 0.585

4.3.2. Resultado

Para resolver este problema de optimización, con funciones no lineales, se utiliza la herramienta Solver incorporada en MS Excel. Para este tipo de problemas (NLP, Non-linear Programming), Solver utiliza el algoritmo Generalized Reduced Gradient (GRG); siempre y cuando la función objetivo o alguna de las restricciones sean funciones continuas y también sus derivadas sean funciones continuas.

Los pasos de los que consta el algoritmo son:

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

La solución a este problema de optimización, planteado en el apartado anterior, se muestra en la Tabla 4.14. En esta misma tabla se muestran los valores iniciales que conducen a los valores óptimos.

Tabla 4.14. Solución del problema de optimización.

	pH₁	r_{p1} (nm)	I₁ (M)	pH₂	r_{p2} (nm)	I₂ (M)	N₁	N₂	N
Valores iniciales	5.10	30.0	0.0010	8.40	15.00	0.0010	2.85	6.00	8.85
Valores óptimos	5.04	31.0	0.0082	8.35	12.70	0.0030	2.59	4.28	6.87

En la etapa 1, teniendo en cuenta la concentración de cada proteína, el pH inicial del lactosuero sería 4.81. Si se partiese de 2 L de lactosuero, para ajustarlo a 5.04 sería necesario añadir 853 μL de NaOH 1 M. La fuerza iónica mínima en esta primera etapa en las condiciones óptimas sería 0.0081 M. En la etapa 2, el pH inicial de la alimentación (retenido de la etapa anterior) sería 6.10. Para ajustarlo a 8.35 se añadiría 594 μL de NaOH 1 M. La fuerza iónica mínima en la segunda etapa coincide con el valor óptimo de fuerza iónica obtenido.

En la Figura 4.6 se observa cómo van variando, con cada iteración, el valor de r_{p1} y pH_1 , r_{p2} y pH_2 , I_1 e I_2 , N_1 , N_2 y N desde los valores iniciales hasta los valores óptimos (Tabla 4.14). Se observa que son necesarias 23 iteraciones para llegar al óptimo.

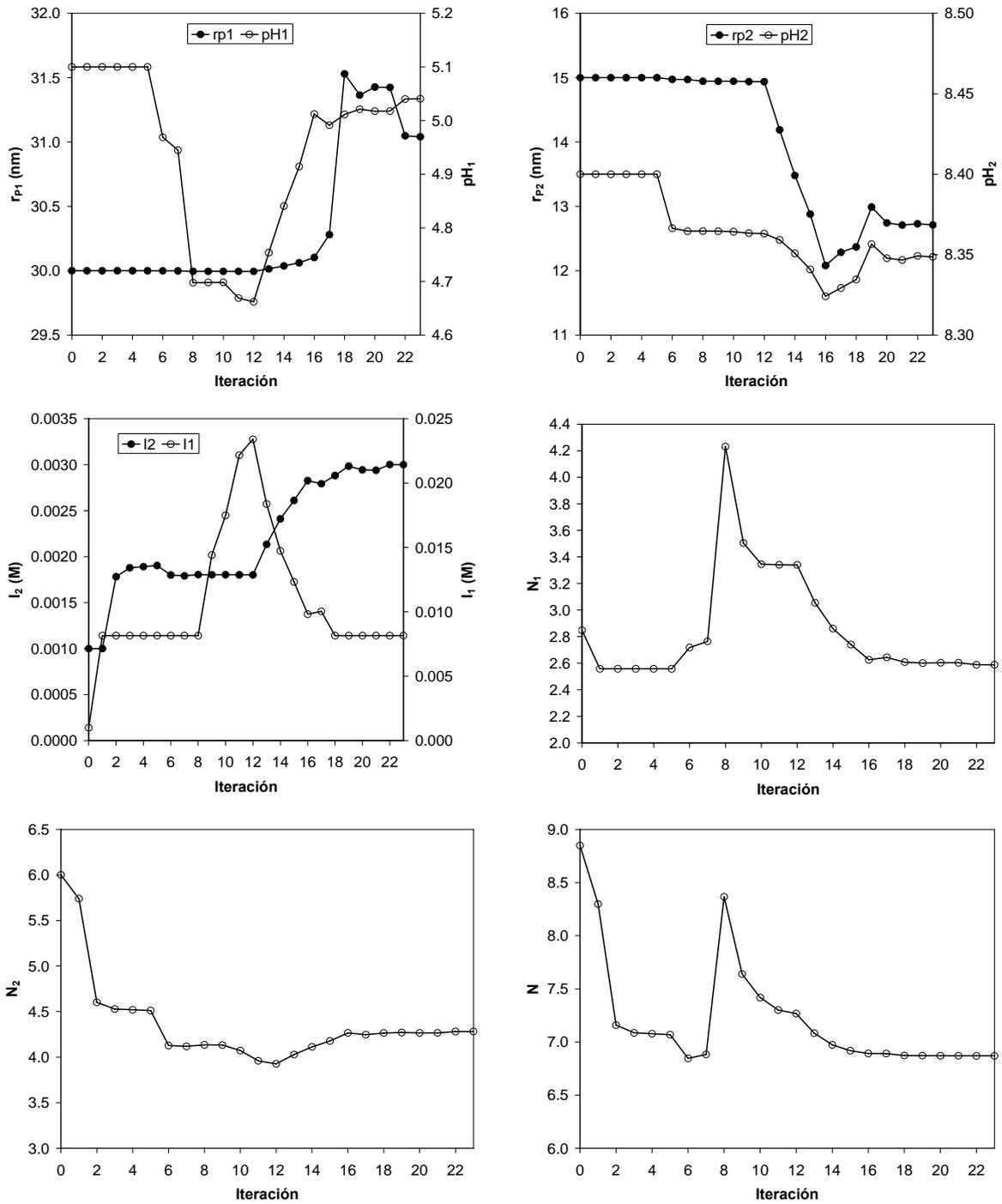


Figura 4.6. Evolución con cada iteración de r_{P1} , pH_1 , r_{P2} , pH_2 , I_1 , I_2 , N_1 , N_2 y N desde el valor inicial hasta el valor óptimo.

Los radios efectivos de las proteínas del lactosuero en estas condiciones óptimas de operación se indican: numéricamente en la Tabla 4.15 y, gráficamente, en la Figura 4.7.

Tabla 4.15. Radios efectivos de las proteínas del lactosuero en las condiciones de operación óptimas.

Proteína	r_{EFF1} (nm)	r_{EFF2} (nm)
	$r_{P1}= 31.0$ nm	$r_{P2}= 12.7$ nm
ALA	1.69	13.33
BLG	3.91	41.09
BSA	5.15	102.21
LF	25.37	5.19
IgG	48.86	10.87

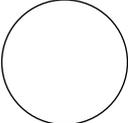
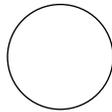
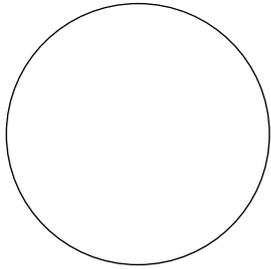
	ALA	BLG	BSA	LF	IgG	r_p
Etapa 1						
Etapa 2						

Figura 4.7. Tamaños relativos de las proteínas del lactosuero y radios de poro en las condiciones óptimas.

Puede observarse que, en la primera etapa, el valor del $\text{pH}_{\text{óptimo}}$ es cercano al punto isoeléctrico de las proteínas que se desean recoger en filtrado. Este pH permite su elución debido al menor radio efectivo que presentan, como se aprecia en la Figura 4.7, y, restringe el paso (parcial o totalmente) de las proteínas que se desean retener. El valor óptimo de la fuerza iónica es, prácticamente, el mínimo permitido. Esto es así porque un aumento de fuerza iónica disminuiría, en gran medida, el radio efectivo de las proteínas que se desean retener; mientras que no afectaría significativamente al radio efectivo, cercano a su valor mínimo, de aquellas proteínas que se eluyen. Así, se observa como en esta etapa los radios efectivos de ALA, BLG y BSA son bastante más pequeños que el radio de poro, permitiendo que la concentración final en retenido sea menor del 10%. Debido a que el radio efectivo de IgG es mucho mayor que el radio de poro, no pasa nada de esta proteína al filtrado. Sin embargo, el radio efectivo de LF es similar al radio de poro, un poco menor, lo que permite el paso de una pequeña cantidad a través de la membrana.

En la segunda etapa ocurre algo similar a la primera. En este caso, el $\text{pH}_{\text{óptimo}}$ es cercano al punto isoeléctrico de la lactoferrina, ya que es esta proteína la que se quiere recoger en filtrado. La fuerza iónica óptima en esta etapa coincide con el valor mínimo permitido para no favorecer el paso de las proteínas que se quieren retener. En esta etapa, el radio de poro es mucho mayor que el de LF, por lo que pasa fácilmente a través de la membrana. El radio efectivo de IgG es similar, aunque algo inferior, al radio de poro, así que se recoge una pequeña cantidad en filtrado. Los radios efectivos de ALA, BLG y BSA son superiores al radio de poro, quedándose en su totalidad en el retenido.

A continuación se cuantifica el paso o no a través de la membrana mediante el valor de las concentraciones a lo largo del proceso. En la Figura 4.8 y Figura 4.9 se representa cómo varía la concentración de retenido y filtrado, para cada proteína, a lo largo de la primera y segunda etapa, respectivamente.

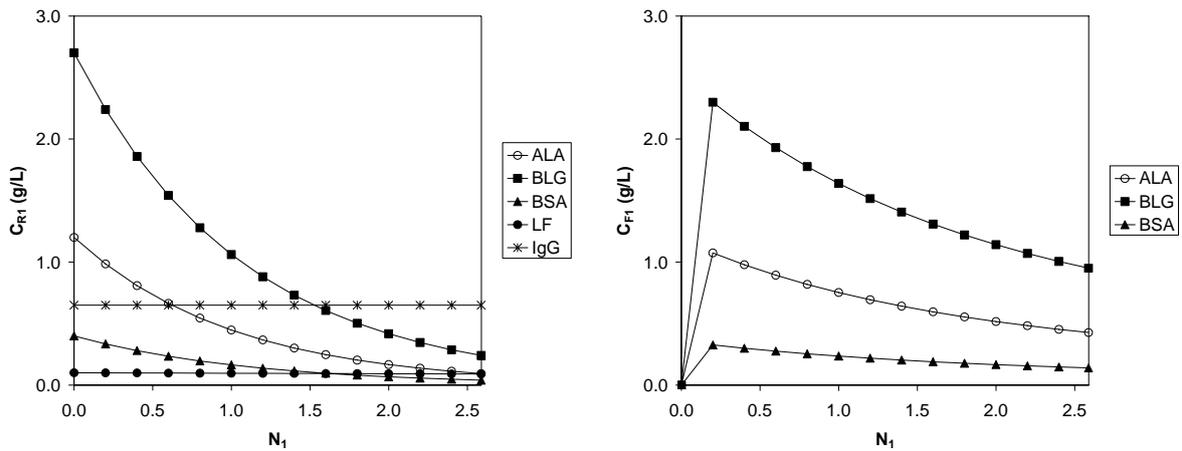


Figura 4.8. Evolución con el número de diavolumenes de C_R y C_F , para cada proteína, en la primera etapa.

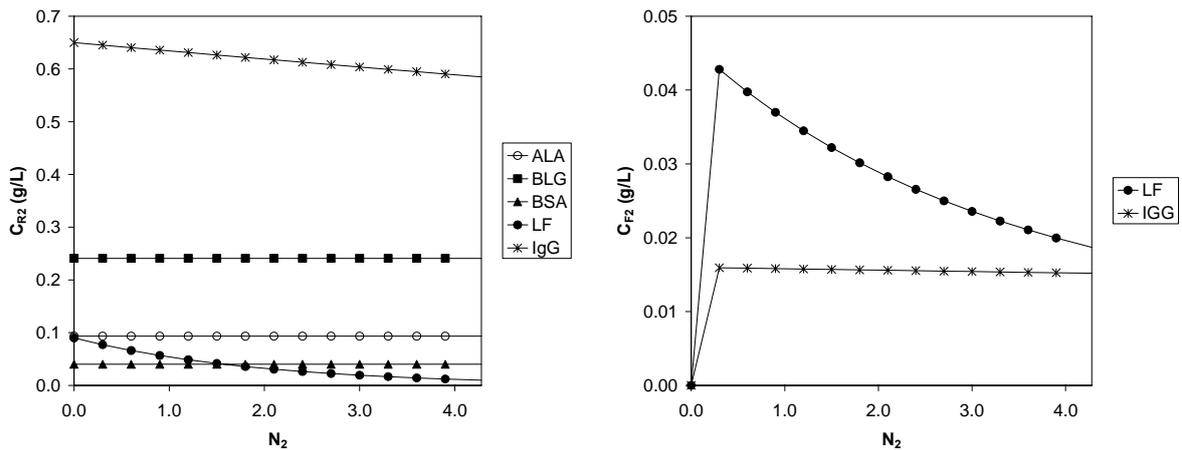


Figura 4.9. Evolución con el número de diavolumenes de C_R y C_F , para cada proteína, en la segunda etapa.

En la Figura 4.10 se representa el valor de la concentración de retenido respecto al valor inicial, para cada proteína, a lo largo del proceso. En la primera etapa, para ALA, BLG y BSA este cociente pasa de valer la unidad a valer ≤ 0.1 ; para LF, el cociente final es 0.9; y para IgG es constante. En la segunda etapa, para ALA, BLG y BSA este cociente es constante; para LF el cociente final es 0.1; y para IgG el valor final es 0.9. Con esto se confirma que se cumplen las restricciones impuestas al proceso.

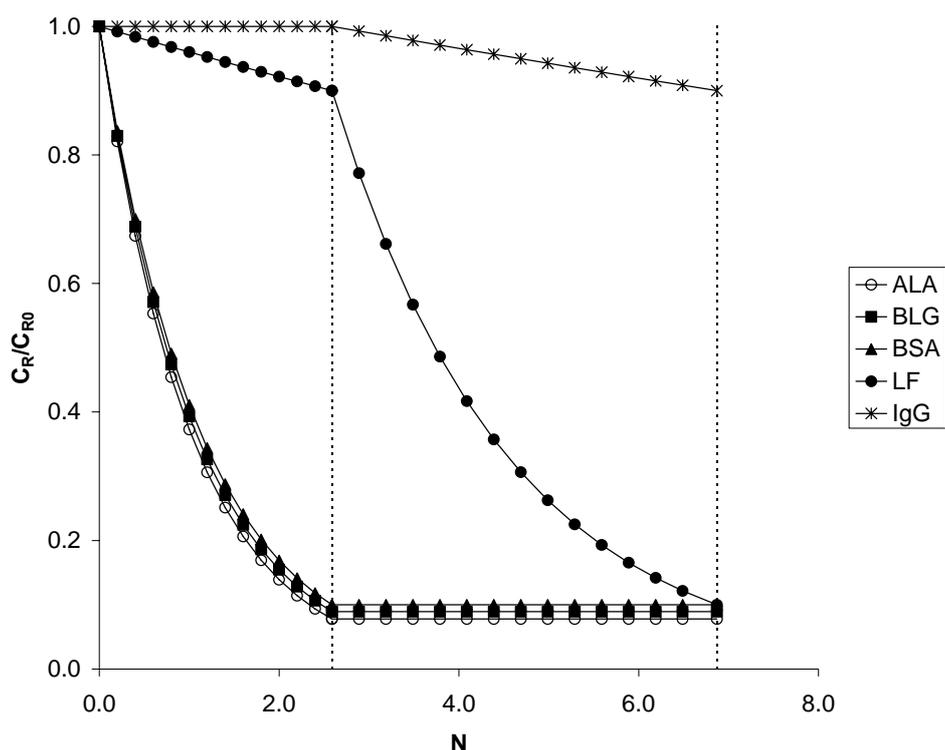


Figura 4.10. Evolución con el número de diavolumenes de C_R/C_{R0} , para cada proteína, a lo largo de todo el proceso.

4.3.3. Curvas de titración. Fuerza iónica mínima.

Conociendo las concentraciones iniciales de cada etapa se puede calcular la curva de titración del lactosuero inicial y del retenido de la primera etapa (alimentación de la segunda) para conocer cómo varía el pH con el volumen adicionado de ácido o base.

Para realizar las curvas de titración se ha supuesto un volumen de alimentación de 2 L, y la adición de NaOH o HCl 1 M.

En la Figura 4.11 se muestra la curva ácida y básica de titración del lactosuero inicial. Se observa cómo el pH inicial (punto de partida de ambas curvas) es 4.81. Este valor es muy cercano al punto isoeléctrico de las proteínas mayoritarias del lactosuero (ALA y BLG), cuyo valor, calculado en el apartado 4.2.3., es 4.61. Tanto en la titración ácida como en la básica, la primera parte de la curva es más pronunciada que la parte final. Esto indica que con poca cantidad de ácido o base se puede modificar el pH del lactosuero inicial. Sin

embargo, para conseguir valores de pH superiores a 12 o inferiores a 2, es necesario añadir gran cantidad de base o ácido, respectivamente, por lo que se aumentaría mucho la fuerza iónica.

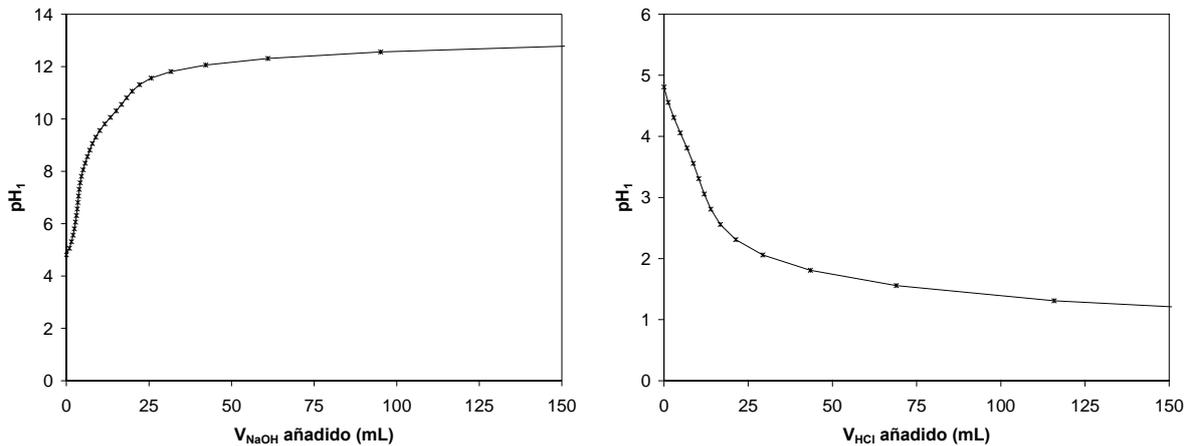


Figura 4.11. Titración ácida y básica de la primera etapa.

En la Figura 4.12 se muestra la titración ácida y básica para la segunda etapa. El pH inicial en este caso es 6.10. Este aumento de pH se debe a que la concentración de las proteínas ácidas (ALA, BLG y BSA) es el 10% de la inicial o incluso menor. A pesar de esto, como estas proteínas son las mayoritarias en el lactosuero, este 10% supone una concentración aun superior a la de LF e IgG aunque del mismo orden. Por eso, el pH es intermedio entre el punto isoeléctrico de las proteínas ácidas y el de las proteínas básicas. En este caso, se aprecia la necesidad de añadir menos volumen aún de ácido o base que en la primera etapa para alcanzar valores de pH entre 2 y 12, siendo necesario la adición de un volumen elevado de ácido o base para bajar de pH 2 o subir de pH 12.

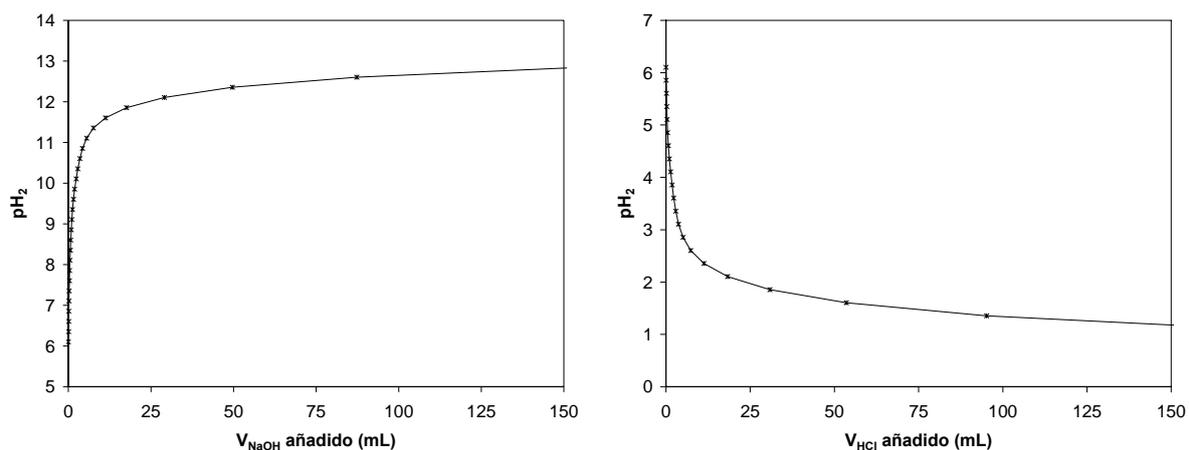


Figura 4.12. Titración ácida y básica de la segunda etapa.

Conociendo esta relación entre volumen añadido de ácido o base y pH de la alimentación, se puede calcular la $[Na^+]$ o $[Cl^-]$ y, utilizando la ecuación [4.14], se puede calcular la fuerza iónica mínima en cada etapa. Esta fuerza iónica tiene dos componentes: la fuerza iónica debida a las proteínas presentes en la solución y la fuerza iónica debida a la adición del ácido o la base. En la Figura 4.13 y Figura 4.14 se muestra la dependencia de la fuerza iónica mínima con el pH para la etapa 1 y etapa 2, respectivamente. Esta curva de fuerza iónica mínima se desglosa en la aportación correspondiente a las proteínas y la correspondiente al ácido o base. Se observa, en las dos etapas, que la fuerza iónica debida a las proteínas influye más sobre la fuerza iónica mínima, ya que, como se vio en las curvas de titración, la cantidad de ácido o base añadido es muy pequeña para casi todos los valores de pH, salvo en los extremos (por debajo de pH 2 y por encima de pH 12). Es en estos valores extremos donde la fuerza iónica mínima es significativamente superior a la fuerza iónica debida a las proteínas.

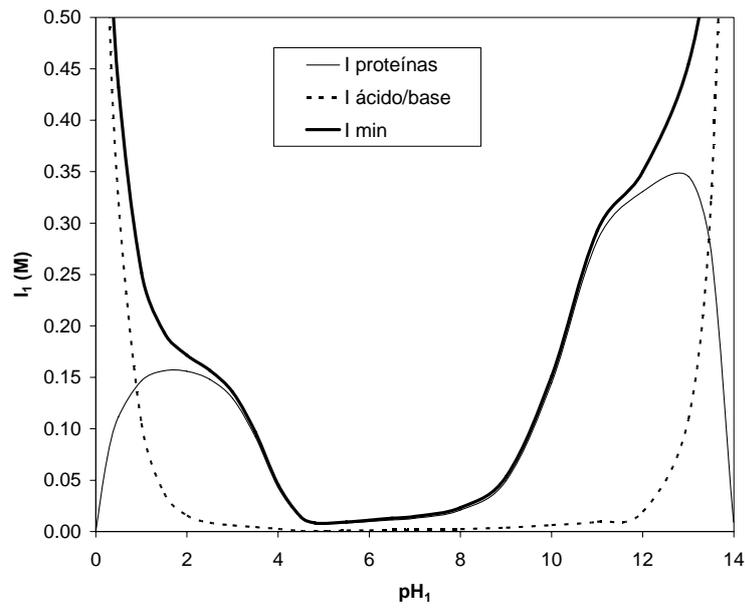


Figura 4.13. Fuerza iónica mínima en función del pH para la primera etapa.

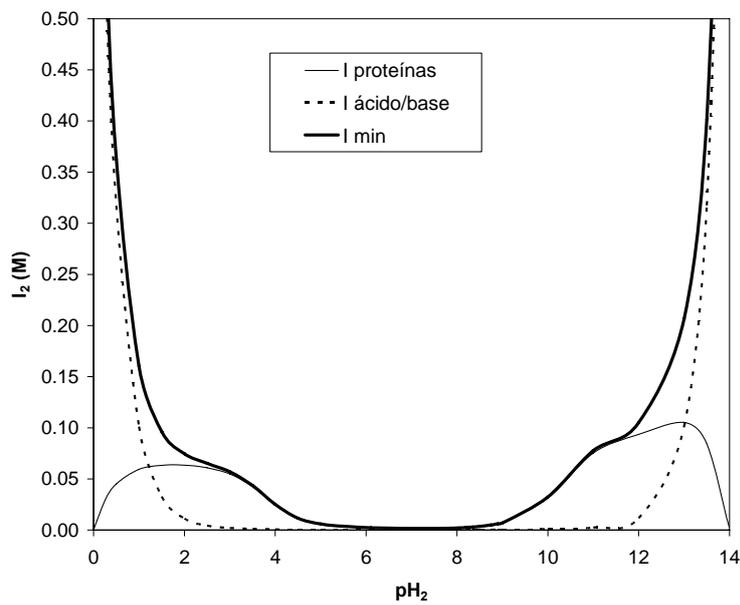


Figura 4.14. Fuerza iónica mínima en función del pH para la segunda etapa.

4.3.4. Evaluación de la función objetivo alrededor del óptimo

✦ *Límites de optimización de N con el radio de poro (I y pH óptimos)*

En la Figura 4.15 se representa el valor de N_1 en función del radio de poro de la primera etapa, para los valores de fuerza iónica y pH óptimos. Las líneas discontinuas representan límites de optimización:

- Por debajo del límite inferior: el radio efectivo de BSA es mayor que el radio de poro, por lo que no pasaría nada de esta proteína. Por tanto no se cumple la restricción de concentración de retenido final de BSA inferior al 10%.
- Por encima del límite superior: pasa demasiada LF, no cumpliéndose la restricción de concentración final de LF superior al 90%.

El valor del radio de poro que minimiza N_1 es 31.0, como se vio anteriormente, valor que se encuentra en el límite superior de optimización.

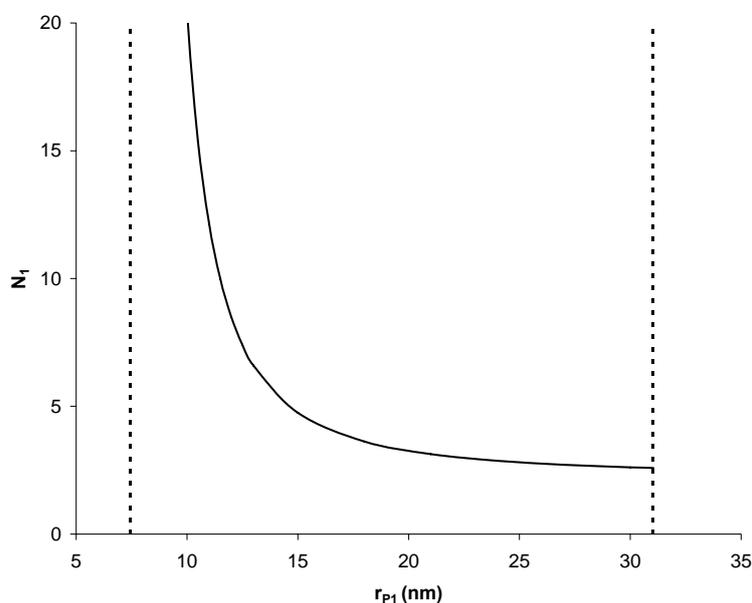


Figura 4.15. Límites de optimización para el radio de poro en la primera etapa, para valores de fuerza iónica y pH óptimos.

En la Figura 4.16 se representa el valor de N_2 en función del radio de poro de la segunda etapa, para los valores de pH y fuerza iónica óptimos. Las líneas discontinuas representan límites de optimización:

- Por debajo del límite inferior: el radio de la LF es superior al radio de poro, por lo que no pasa a través de la membrana.
- Por encima del límite superior: pasa demasiada IgG, no cumpliéndose la restricción de concentración final de IgG superior al 90%.

El valor del radio de poro que minimiza N_2 es 12.7, como se vio anteriormente, valor que se encuentra en el límite superior de optimización.

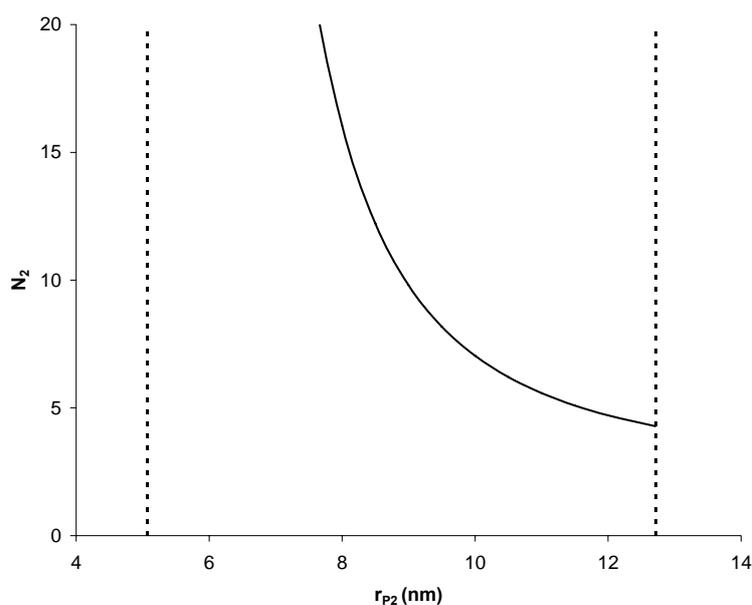


Figura 4.16. Límites de optimización para el radio de poro en la segunda etapa, para valores de fuerza iónica y pH óptimos.

➤ *Límites de optimización de N con pH y fuerza iónica (radio de poro óptimo)*

Para analizar las regiones válidas para optimizar N en función del pH y la fuerza iónica, es necesario realizar un análisis conjunto de ambos parámetros, ya que la modificación de uno de ellos trae consigo la modificación del otro. Por tanto, se realizará un mapa de dos variables en el que los límites de optimización vendrán impuestos por las restricciones exigidas para el proceso.

En la Figura 4.17 se representa la fuerza iónica frente al pH en la primera etapa, para el valor de radio de poro óptimo. Las líneas discontinuas representan las restricciones y, por tanto, los límites de optimización para estas dos variables. Todas estas restricciones dan lugar a 22 regiones. En la Tabla 4.16 se indican con una X las condiciones que se dan en cada una de las regiones. Estas condiciones indicadas en la primera fila de la tabla dan lugar al incumplimiento de alguna de las restricciones. Así, en las regiones en las que aparece una X en la primera columna ($I < I_{\min}$) se incumple la restricción de fuerza iónica mínima. En el caso de que los radios efectivos de BSA, BLG o ALA sean inferiores al radio de poro, indica que esa proteína no puede pasar a filtrado, por lo que no se cumple la restricción de que quede en retenido sólo el 10% de la concentración inicial. Por último, si las concentraciones de LF o IgG en retenido son inferiores al 90%, ha pasado a filtrado más cantidad de proteína que la fijada como restricción. Como se observa, la única región en la que se cumplen todas las restricciones es la número 4. El óptimo, situado en la Figura 4.17 con un punto rojo, se encuentra, obviamente, en dicha región y en el límite tanto de fuerza iónica mínima como de paso de más del 10% de LF a filtrado.

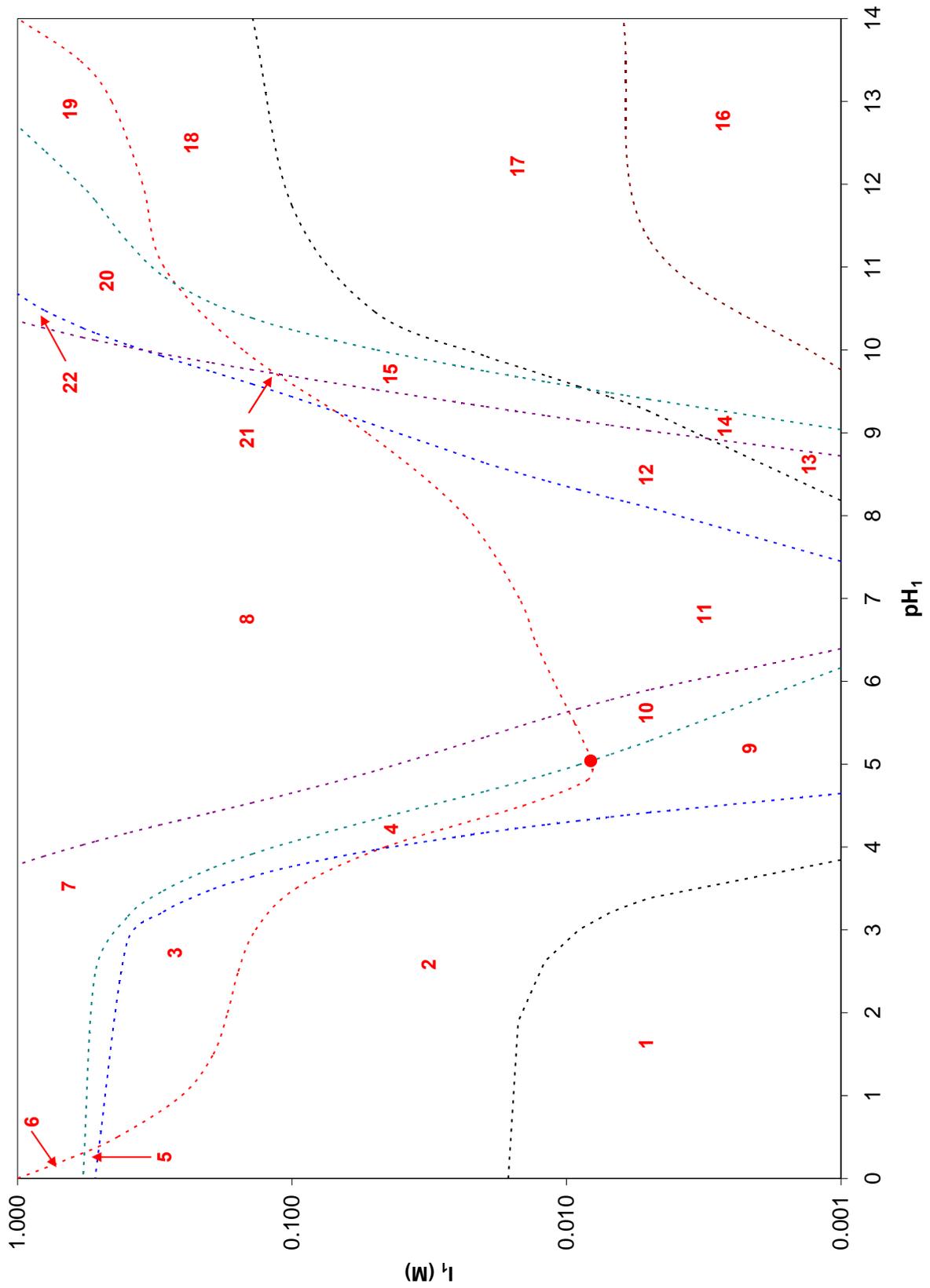


Figura 4.17. Límites de optimización para pH y fuerza iónica en la primera etapa, con el valor del radio de poro óptimo.

Tabla 4.16. Regiones delimitadas por las restricciones para fuerza iónica y pH en la primera etapa. Restricciones que no se cumplen en cada una de ellas.

Región	$I < I_{min}$	$r_{EFF} BSA > r_p$	$r_{EFF} BLG > r_p$	$r_{EFF} ALA > r_p$	$C_{R1} (LF) < 0.9 \cdot C_{R0} (LF)$	$C_{R1} (IgG) < 0.9 \cdot C_{R0} (IgG)$	Válida
1	X	X		X			NO
2	X	X					NO
3		X					NO
4							SI
5	X						NO
6	X				X		NO
7					X		NO
8					X	X	NO
9	X						NO
10	X				X		NO
11	X				X	X	NO
12	X	X			X	X	NO
13	X	X	X		X	X	NO
14	X	X	X		X		NO
15	X	X			X		NO
16	X	X	X	X			NO
17	X	X	X				NO
18	X	X					NO
19		X					NO
20		X			X		NO
21		X			X	X	NO
22					X		NO

En la Figura 4.18 y Figura 4.19 (ampliación de la anterior) y en la Tabla 4.17 se recogen las regiones determinadas por las restricciones en la segunda etapa. En este caso, se originan 33 regiones, siendo válida únicamente la número 26. En esta región se encuentra el óptimo, que se sitúa en el límite de fuerza iónica mínima y en el límite de paso al filtrado de más del 10% de la IgG.

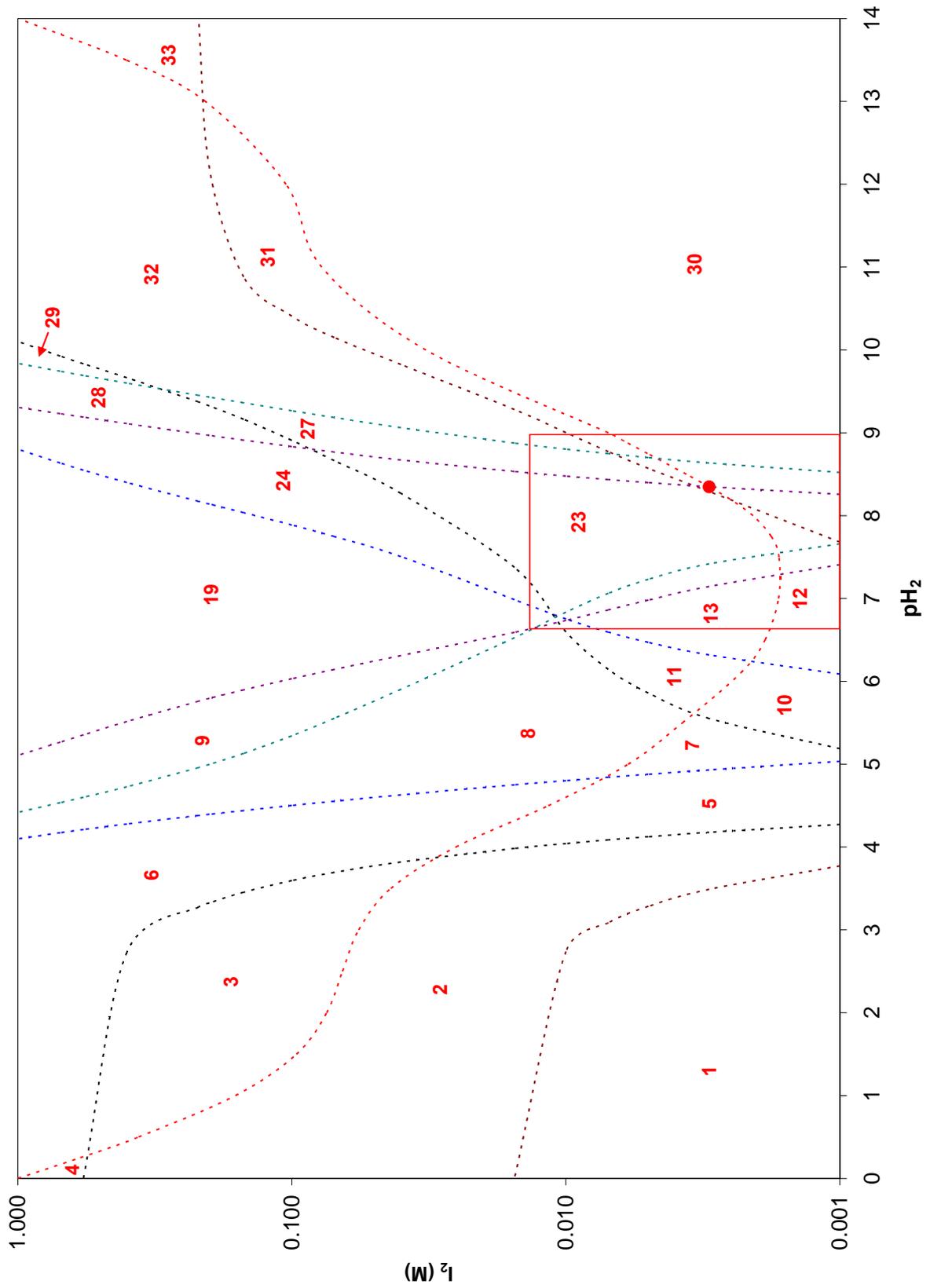


Figura 4.18. Límites de optimización para pH y fuerza iónica en la segunda etapa, con el valor del radio de poro óptimo.

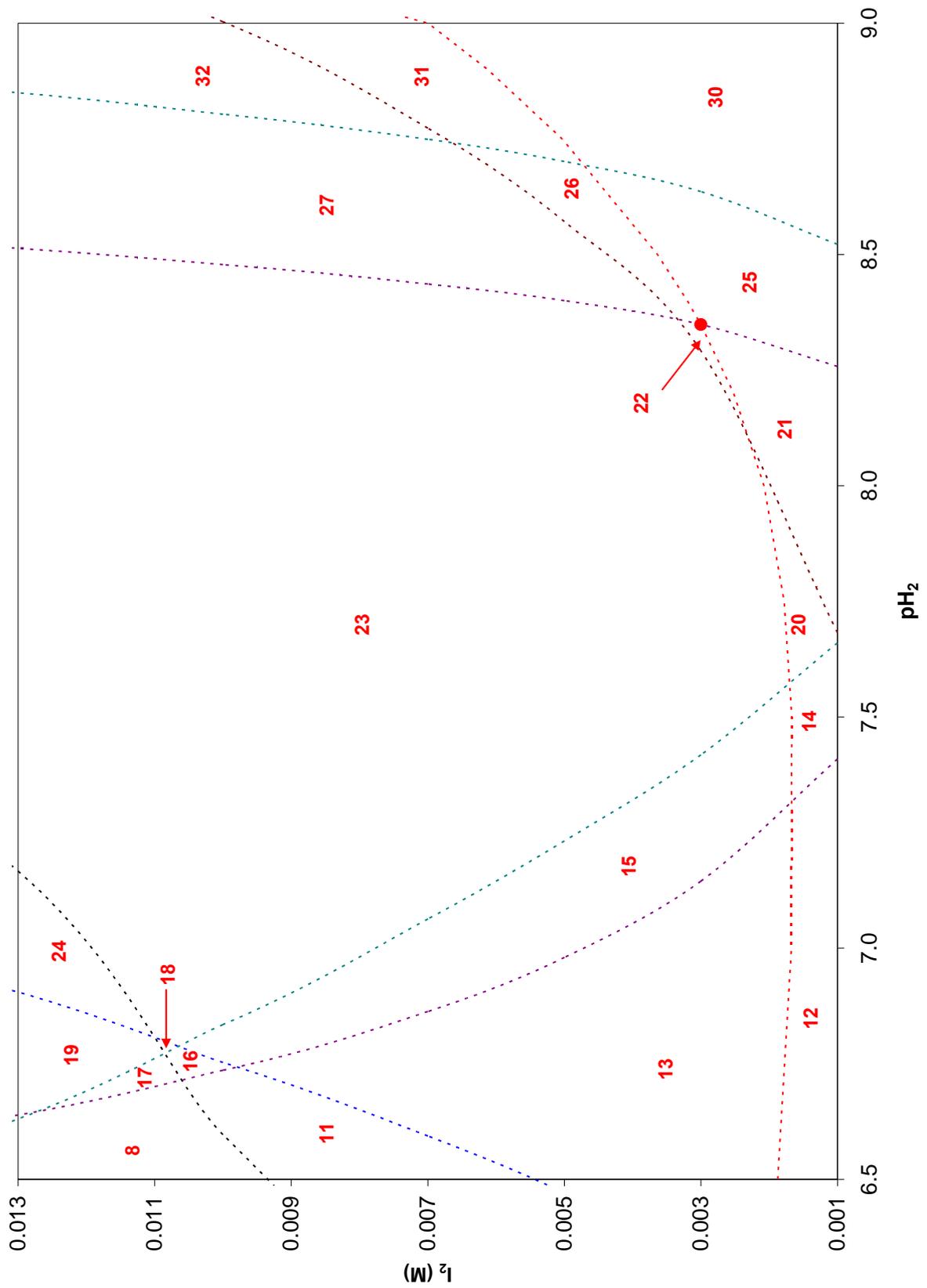


Figura 4.19. Límites de optimización para pH y fuerza iónica en la segunda etapa, con el valor del radio de poro óptimo. Ampliación de la figura 4.14.

Tabla 4.17. Regiones delimitadas por las restricciones para fuerza iónica y pH en la primera etapa. Restricciones que no se cumplen en cada una de ellas.

Región	$I < I_{min}$	$r_{EFF} LF > r_p$	$C_{R2} (ALA) \neq C_{R1}(ALA)$	$C_{R2} (BLG) \neq C_{R1}(BLG)$	$C_{R2} (BSA) \neq C_{R1}(BSA)$	$C_{R2} (IgG) < 0.9 \cdot C_{R0}(IgG)$	Válida
1	X	X					NO
2	X	X	X				NO
3		X	X				NO
4	X	X	X	X			NO
5	X	X	X	X			NO
6		X	X	X			NO
7	X	X	X	X	X		NO
8		X	X	X	X		NO
9			X	X	X		NO
10	X	X	X		X		NO
11		X	X		X		NO
12	X	X	X				NO
13		X	X				NO
14	X	X	X			X	NO
15		X	X			X	NO
16		X	X		X	X	NO
17		X	X	X	X	X	NO
18			X		X	X	NO
19			X	X	X	X	NO
20	X		X			X	NO
21	X					X	NO
22						X	NO
23			X			X	NO
24			X	X		X	NO
25	X						NO
26							SI
27			X				NO
28			X	X			NO
29		X	X	X			NO
30	X	X					NO
31		X					NO
32		X	X				NO
33	X	X	X				NO

4.4. CONCLUSIONES

El análisis teórico realizado pone de manifiesto que la técnica de filtración tangencial de alta resolución permite la recuperación de lactoferrina a partir del lactosuero.

El proceso a seguir constaría de dos etapas de diafiltración continua, con las condiciones de operación siguientes:

- Etapa 1: pH = 5.04, $r_p = 31.0$ nm, I = 0.0082 M, N = 2.59
- Etapa 2: pH = 8.35, $r_p = 12.7$ nm, I = 0.0030 M, N = 4.28

Como resultado, se obtendría como producto final el filtrado acumulado de la segunda etapa, conteniendo 19 mg/L de lactoferrina, 15 mg/L de inmunoglobulinas y exento del resto de proteínas del lactosuero.

5. PRETRATAMIENTO

5.1. INTRODUCCIÓN

Según el estudio teórico realizado en el apartado anterior, la fuerza iónica óptima es próxima a la fuerza iónica mínima, debida únicamente a la presencia de las propias proteínas y al ácido o base añadida para ajustar el pH. Por tanto, la eliminación de las sales presentes en el lactosuero antes de la ultrafiltración, favorecería el proceso de fraccionamiento de las proteínas. Por otro lado, existen varios estudios en los que el calcio y los fosfatos presentes en el lactosuero han sido implicados directamente en la colmatación de la membrana durante la ultrafiltración de lactosuero. Esto parece deberse tanto a la formación de sales de calcio insolubles, como a que calcio y fosfatos pueden servir como catalizadores o agentes de enlace entre la membrana y las proteínas o entre las mismas proteínas (Musale y Kulkarni, 1998; Matzinos y Álvarez, 2002).

El objetivo de este capítulo es analizar la influencia del pretratamiento del lactosuero para la eliminación de sales sobre el proceso de ultrafiltración. Para ello se realizarán diafiltraciones continuas de lactosuero clarificado y lactosuero sin pretratar, analizando la evolución temporal del flujo de filtrado, así como la cantidad de proteína y lactosa presentes en retenidos y filtrados acumulados a lo largo del proceso.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Clarificación del lactosuero ácido bovino

Para clarificar el lactosuero ácido bovino obtenido a partir de leche entera por acidificación según el método indicado en el apartado 3.1., se utilizó el procedimiento propuesto por Rinn et al. (1990) y Gesan et al. (1995). El pretratamiento constó de varias etapas (Figura 5.1):

- 1) Enfriamiento del lactosuero a 2-5 °C.
- 2) Adición de 1.2 g/L de CaCl₂ para ajustar su contenido en calcio.
- 3) Ajuste del pH a 7.3 mediante NaOH 6 N.
- 4) Calentamiento, lo más rápidamente posible, del lactosuero hasta 55 °C.
- 5) Mantenimiento del lactosuero a esta temperatura y pH (reajuste con NaOH 6 N) durante 8 min. Con esto se consigue la agregación de los complejos lipídicos-partículas de fosfato cálcico.
- 6) Enfriamiento a 10 °C.
- 7) Centrifugación a 4500 rpm durante 30 minutos. De este modo se obtiene la fracción precipitada, conteniendo los agregados formados; y el lactosuero ácido clarificado, obtenido como sobrenadante.

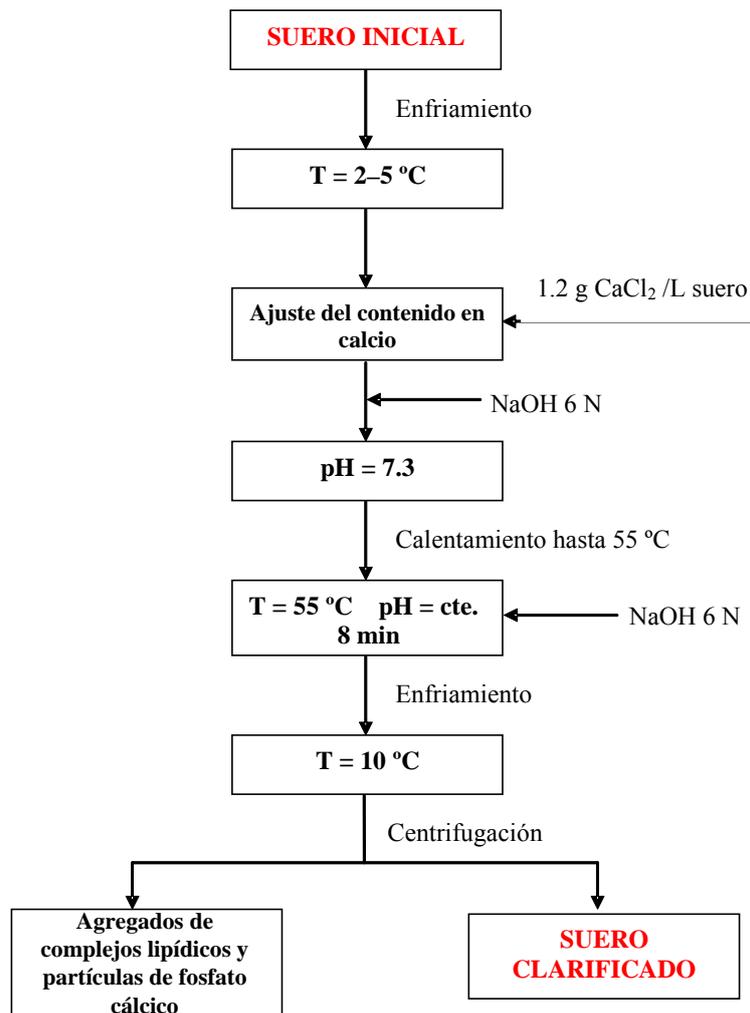


Figura 5.1. Diagrama del pretratamiento del lactosuero ácido.

En la Figura 5.2 se muestra una imagen del lactosuero antes del proceso de clarificación (lactosuero sin pretratar) y del lactosuero obtenido en dicho proceso (lactosuero pretratado). Se observa que el lactosuero clarificado es translúcido y no presenta partículas en suspensión. Por el contrario, el lactosuero ácido antes del pretratamiento presenta un aspecto, aunque también verdoso, más opaco y con algunas partículas blanquecinas en suspensión.



Figura 5.2. Imagen de lactosuero pretratado y lactosuero sin pretratar.

5.2.2. Procedimiento experimental

Se llevó a cabo la ultrafiltración de lactosuero ácido sin pretratar y lactosuero ácido pretratado con membranas cerámicas Inside Céram de 50 kDa. Se operó en el modo de diafiltración continua. Se utilizaron membranas de 50 kDa con el fin de que únicamente pasaran a través de las mismas: sales, lactosa y proteínas de pequeño tamaño molecular. De este modo, la adsorción de proteína en el interior de los poros no enmascararía el efecto de las sales, objetivo de estos ensayos. Las condiciones de operación se fijaron en: caudal de retenido de 400 L/h, 30 °C de temperatura, 1.5 bar de presión transmembrana, para trabajar en la zona controlada por la presión (Figura 5.3) y pH del lactosuero clarificado, 7.3, para no adicionar fuerza iónica. El proceso de ultrafiltración se daba por finalizado cuando la

caída de caudal de filtrado fuese como máximo del 65 al 70% respecto al valor inicial, para evitar colmatación irreversible de la membrana. Se monitorizó el caudal de filtrado cada 50 g recogidos y se tomaron muestras de 20 mL de retenido y 40 mL de filtrado acumulado cada 0.5 diavolumenes para análisis de cantidad de proteína (cada 0.5 diavolumenes) y lactosa (cada diavolumen) presentes en la muestra.

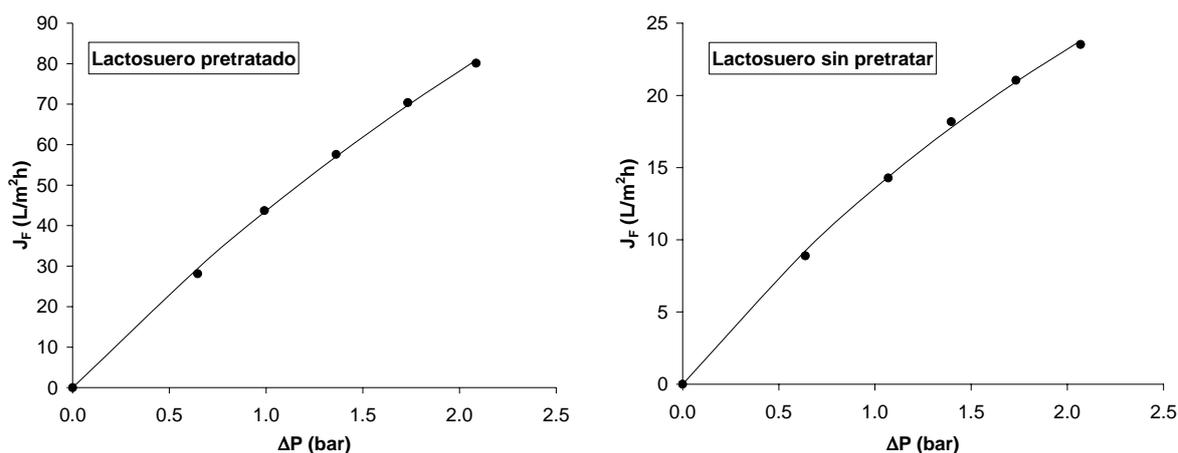


Figura 5.3. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado y lactosuero sin pretratar.

5.2.3. Métodos analíticos

➔ *Determinación del contenido en proteína total*

Para determinar el contenido en proteínas de una muestra se empleó el método Kjeldahl (Norma UNE 64011). Este método se fundamenta en la conversión del nitrógeno total presente en la muestra a sales de amonio, que son posteriormente valoradas por volumetría ácido base. Para ello son necesarias tres etapas:

- 1) **Digestión de la muestra.** En un matraz Kjeldahl se pesaron 3 g de muestra en el caso del lactosuero inicial y de los retenidos y 5 g para los filtrados acumulados y se añadieron 2 g de catalizador (2.6% selenio en polvo, 13.2% sulfato de mercurio y 84.2% sulfato de potasio anhidro) y 4 mL de ácido sulfúrico al 96%. Tras agitación y reposo de 5 min, la mezcla se llevó a ebullición hasta disolución y oxidación de la

muestra. Se dejó enfriar el matraz a temperatura ambiente y se adicionó 6 mL de agua destilada. Con esta etapa se consiguió que todo el nitrógeno de la muestra se convirtiese en sulfato amónico.

- 2) **Destilación con arrastre de vapor.** El matraz se colocó en el aparato de destilación Pro-Nitro S-627 de Selecta (Abrera, España) y se adicionó 25 mL de NaOH 35% para liberar al ion amonio en forma de amoniaco que, mediante arrastre con vapor, se destiló y se recogió sobre un erlenmeyer que contenía una solución de ácido bórico. Esta solución estaba formada por 10 mL de una disolución de ácido bórico al 4%, 10 mL de agua destilada y unas gotas de una disolución de indicador (0.125 g de rojo de metilo y 0.018 g de azul de metileno en 100 mL de etanol al 95%). Se recogieron 200 mL de destilado.
- 3) **Valoración ácido-base.** Por último, el amoniaco recogido en la solución de ácido bórico se valoró con HCl 0.01 N (hasta viraje del indicador de transparente a violeta, aproximadamente a pH 5.1).

Para determinar la cantidad de proteína presente en la muestra a partir del dato de cantidad de nitrógeno total obtenido por este método de análisis, es necesario utilizar un factor de transformación del nitrógeno en proteína, f , que en el caso de las proteínas del lactosuero tiene un valor de 6.38 (g proteína/g de nitrógeno). De este modo, el porcentaje de proteína de la muestra se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{V \cdot N \cdot 14 \cdot f}{G} \cdot 100 \quad [5.1]$$

donde V (L) es el volumen de HCl gastado en la valoración ácido base, N (N) es la normalidad de dicho ácido clorhídrico y G (g) es el peso de muestra introducida en el matraz Kjeldahl.

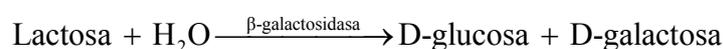
Los datos que se indican en este capítulo para la cantidad de proteína es un valor medio de los dos análisis realizados a cada muestra.

➤ *Determinación del contenido en proteínas individuales*

La cantidad de cada una de las proteínas individuales presentes en el lactosuero se determinó mediante RP-HPLC, según se describió en el apartado 3.5.

➤ *Determinación del contenido en lactosa*

Para determinar la cantidad de lactosa presente en las muestras se utilizó el kit enzimático de Lactosa/D-Galactosa de Boehringer Mannheim, R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemania). La lactosa es hidrolizada a D-glucosa y D-galactosa a pH 6.6 en presencia de la enzima β -galactosidasa y agua:



La D-galactosa es oxidada a pH 8.6 por el nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) a ácido D-galactónico en presencia de la enzima β -galactosa deshidrogenasa (Gal-DH):



El aumento de NADH producido en esta segunda reacción se mide por absorbancia a 340 nm. A partir de este dato se puede calcular la cantidad de lactosa y D-galactosa teniendo en cuenta la estequiometría de las reacciones.

En primer lugar se preparó la disolución que contenía la lactosa a partir de cada una de las muestras. Se pesó aproximadamente 2 g de muestra en un vaso de precipitado de 100 mL. Se diluyó con unos 20 mL de agua destilada y se añadió 1.0 mL de ácido tricloroacético 3 M para precipitar la proteína. Después de 10 min de incubación, se neutralizó con NaOH 1 M hasta pH 6-8. La mezcla se llevó a un matraz aforado donde se enrasó a 100 mL. Se filtró y el sobrenadante se utilizó como muestra que contenía la lactosa.

Una vez preparada la disolución de lactosa se procedió a preparar, en paralelo, las muestras de lactosa y el blanco para su cuantificación. En un tubo de ensayo se añadió 0.200 mL de solución 1 (600 mg de liofilizado conteniendo: buffer de citrato, pH 6.6 aproximadamente; unos 35 mg de NAD y sulfato magnésico; a los que se añadió 7.0 mL de agua destilada), 0.050 mL de suspensión 2 (1.7 mL de suspensión de β -galactosidasa) y en el caso de la muestra de lactosa, también se añadió 0.100 mL de la disolución preparada anteriormente.

Se mezcló y se incubó durante 20 min a 20-25 °C. Después se añadió 1.0 mL de solución 3 (buffer difosfato potásico a pH 8.6 aproximadamente) y 2.0 y 1.9 mL de agua destilada al blanco y a la muestra de lactosa, respectivamente. Se mezcló y después de 2 min, aproximadamente, se realizó la primera lectura de absorbancia (A_1). Para que se produjese la segunda reacción, se adicionó 0.050 mL de suspensión 4 (1.7 mL de suspensión de β -galactosa deshidrogenasa), se mezcló y se dejó 30 min para que finalizase la reacción. Se midió nuevamente el valor de absorbancia (A_2). La absorbancia debida al NADH procedente de la lactosa ($\Delta A_{\text{lactosa}}$) se calculó como:

$$\Delta A_{\text{lactosa}} = (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}} \quad [5.2]$$

La concentración de lactosa presente en la muestra de lactosuero (g lactosa/L de muestra de lactosuero) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$c = \frac{11.3 \cdot 100}{6.3 \text{ Gr}} \cdot \Delta A_{\text{lactosa}} \quad [5.3]$$

donde Gr (g) es el peso de la muestra de lactosuero utilizada para preparar los 100 mL de disolución que contenía la lactosa.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Influencia del pretratamiento en la composición en proteínas individuales

Para analizar la influencia del pretratamiento del lactosuero sobre su composición en cuanto a proteínas individuales se refiere, se preparó lactosuero ácido y se clarificó, tomándose muestras antes y después de pretratar para medir las concentraciones de proteínas individuales. Los resultados se recogen en la Figura 5.4, donde, además del cromatograma correspondiente a cada muestra, se indican las concentraciones de cada una de las proteínas. Se observa que los cromatogramas son prácticamente coincidentes, obteniéndose valores de concentraciones casi idénticos. Los mayores picos se corresponden con las proteínas mayoritarias del lactosuero (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, variantes A y B), que aparecen a tiempos de elución de 11.34-11.43 y 19.52-19.56, respectivamente. El eje de ordenadas está limitado a 0.60 para poder apreciar con mayor claridad los picos del resto de proteínas. Así, entre los dos picos mayoritarios aparecen los picos de lactoferrina y BSA, a tiempos de 15.43-15.44 y 16.87-16.92, respectivamente. El último pico eluido, a 22.80-22.81 min, corresponde a IgG. Teniendo en cuenta las curvas de calibración incluidas en el apartado 3.5., las concentraciones obtenidas para cada proteína, prácticamente iguales para ambos lactosueros, tuvieron los siguientes valores: α -lactoalbúmina, 0.99-1.03 g/L; β -lactoglobulina, 3.07-3.09 g/L; BSA, 0.10-0.12 g/L; IgG, 0.39-0.41 g/L; LF, 0.04 g/L.

Por tanto, según los resultados obtenidos, el pretratamiento realizado al lactosuero no afecta a la composición de las proteínas individuales del mismo.

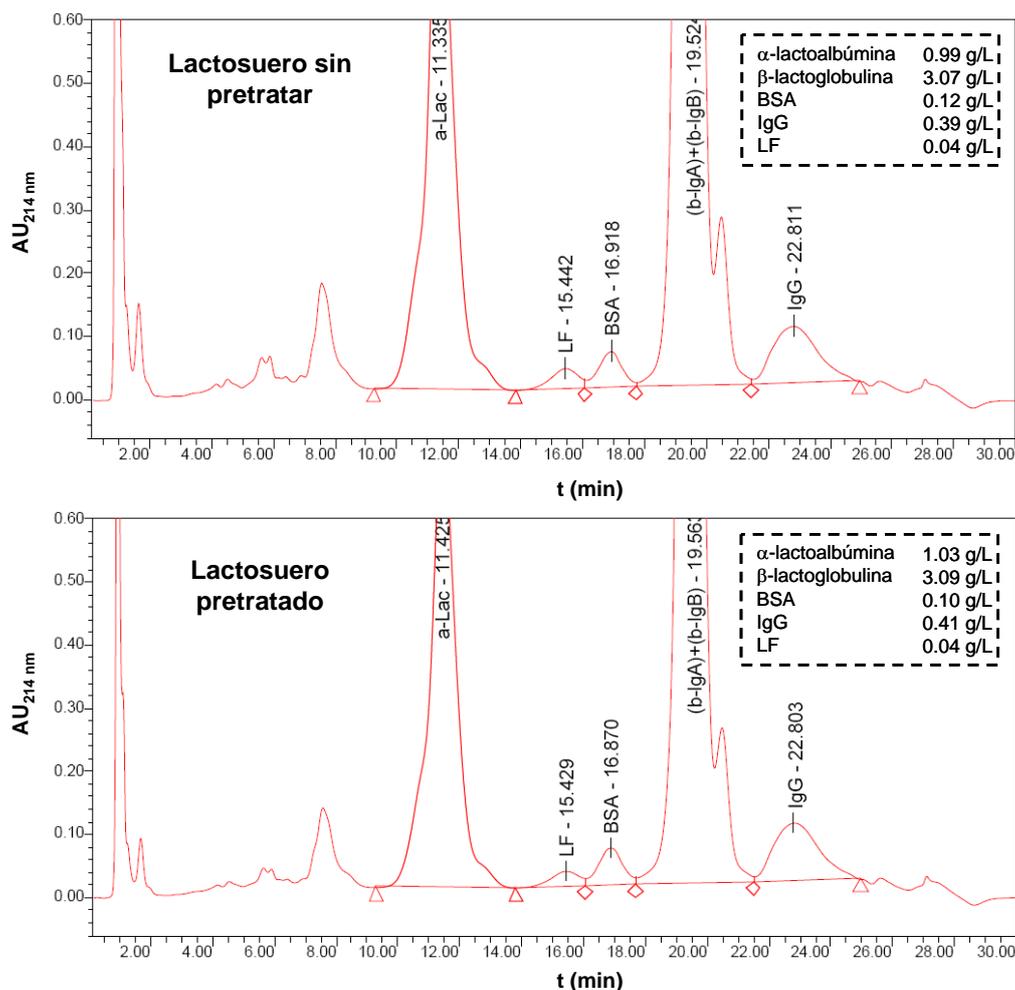


Figura 5.4. Cromatograma de RP-HPLC de lactosuero sin pretratar y lactosuero pretratado. Las concentraciones de las proteínas individuales en cada caso se recogen en el cuadro de texto.

5.3.2. Evolución del flujo de filtrado

En la Figura 5.5 se representa el flujo de filtrado en función del tiempo para la diafiltración continua de lactosuero ácido pretratado y sin pretratar. En el caso de lactosuero pretratado, el proceso se dio por finalizado a los 3 diavolumenes ya que se había producido una caída de flujo de filtrado del 68%. En cuanto al lactosuero sin pretratar, solamente se pudo alcanzar 1 diavolumen puesto que el flujo de filtrado ya había caído un 60%.

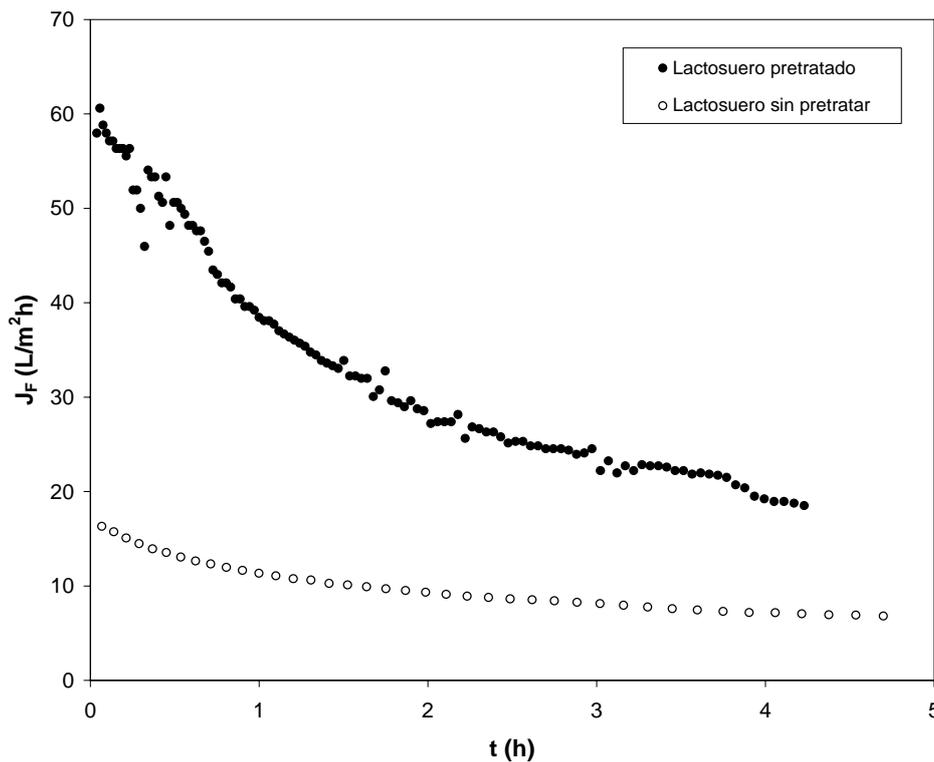


Figura 5.5. Evolución temporal del flujo de filtrado para la diafiltración continua de lactosuero pretratado (3 diavolumenes) y lactosuero sin pretratar (1 diavolumen) con membrana cerámica de 50 kDa.

Se observa que los valores de flujo de filtrado fueron mucho mayores para el lactosuero pretratado. Así, mientras que el flujo inicial para el lactosuero sin pretratar fue $16.5 \text{ L/m}^2\text{h}$, para el lactosuero pretratado fue $58.0 \text{ L/m}^2\text{h}$ (3.5 veces superior). Esta diferencia se hizo mayor conforme avanzó el proceso, llegándose a multiplicar por 5.9 el flujo de filtrado tras el primer diavolumen ($40.4 \text{ L/m}^2\text{h}$ para el lactosuero pretratado frente a $6.8 \text{ L/m}^2\text{h}$ para el lactosuero sin pretratar). En ambos casos se produjo una fuerte caída de flujo, dando lugar a valores finales de $18.5 \text{ L/m}^2\text{h}$ cuando se diafiltraron 3 diavolumenes de lactosuero pretratado y $6.8 \text{ L/m}^2\text{h}$ tras 1 diavolumen diafiltrado de lactosuero sin pretratar.

Para analizar la influencia del pretratamiento sobre la evolución temporal del flujo de filtrado, se ajustaron los datos obtenidos a modelos de colmatación. En trabajos anteriores del grupo (Ibáñez, 2007), se estudió el ajuste de datos de flujo correspondientes a la filtración de proteínas mediante modelos individuales asociados a cada uno de los tipos de bloqueo de poros propuestos por Hermia (1982):

- Bloqueo completo o bloqueo de poro: las partículas individuales bloquean los poros sin superponerse unas sobre otras.
- Bloqueo 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.

Sin embargo, ninguno de los mecanismos aislados ajustaba correctamente los datos experimentales. Por esta razón se propuso la utilización de un modelo combinado: bloqueo completo + bloqueo estándar. De este modo, la caída brusca inicial del flujo de filtrado se atribuye al fenómeno de bloqueo completo, mientras que la disminución menos acusada del flujo durante el resto del proceso se supone debida al bloqueo estándar.

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 las proteínas, esta fracción será la que experimente el mecanismo de bloqueo completo. El resto de los poros $(1-\alpha)$ experimentarán el bloqueo estándar, es decir, se considera que las proteínas en su paso a través de estos poros se unen a sus paredes dando lugar a una reducción del área transversal de los mismos.

Con estas consideraciones, el modelo utilizado para el ajuste de los datos experimentales es (Ibáñez, 2007):

$$\frac{J_F}{J_{F0}} = \alpha \cdot e^{-A \cdot t} + \frac{(1-\alpha)}{(1+B \cdot t)^2} \quad [5.4]$$

En este modelo, los parámetros ajustables son:

- α : fracción de poros de la membrana susceptibles de ser bloqueados.
- A: constante de bloqueo completo. Es un parámetro cinético relacionado con la superficie de membrana bloqueada.
- B: constante de bloqueo estándar. Es un parámetro cinético relacionado con la reducción en el área transversal de los poros debida a la adsorción en las paredes de los mismos.

Para poder calcular el flujo de filtrado relativo (J_F/J_{F0}), es necesario conocer el flujo de filtrado a tiempo cero. Ante esta situación, surgen dos posibilidades, o bien se puede usar el flujo 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 que 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 efecto del pretratamiento en el proceso, es importante interpretar lo que ocurre en los momentos iniciales. Es por esto que se utiliza como flujo de filtrado a tiempo cero el correspondiente al agua pura obtenido en las condiciones de operación (Jones y O'Melia, 2001). De acuerdo con la permeabilidad de la membrana de 50 kDa (indicada en el apartado 3.2.2), $J_{F0}=440.82 \text{ L/m}^2\text{h}$.

En la Figura 5.6 y Figura 5.7 se muestran los datos experimentales y el correspondiente ajuste al modelo combinado para los flujos de filtrado del lactosuero sin pretratar y pretratado, respectivamente.

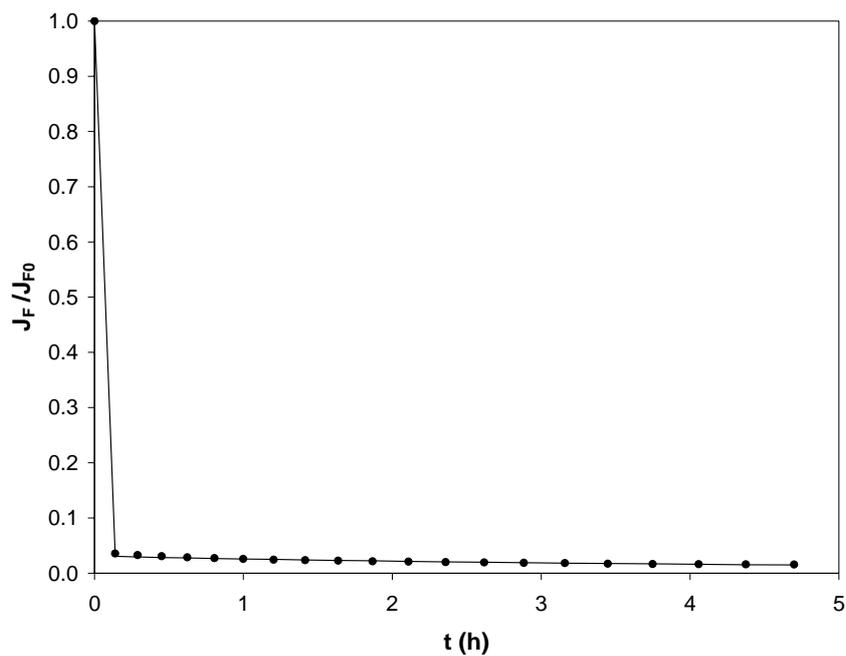


Figura 5.6. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero sin pretratar. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua).

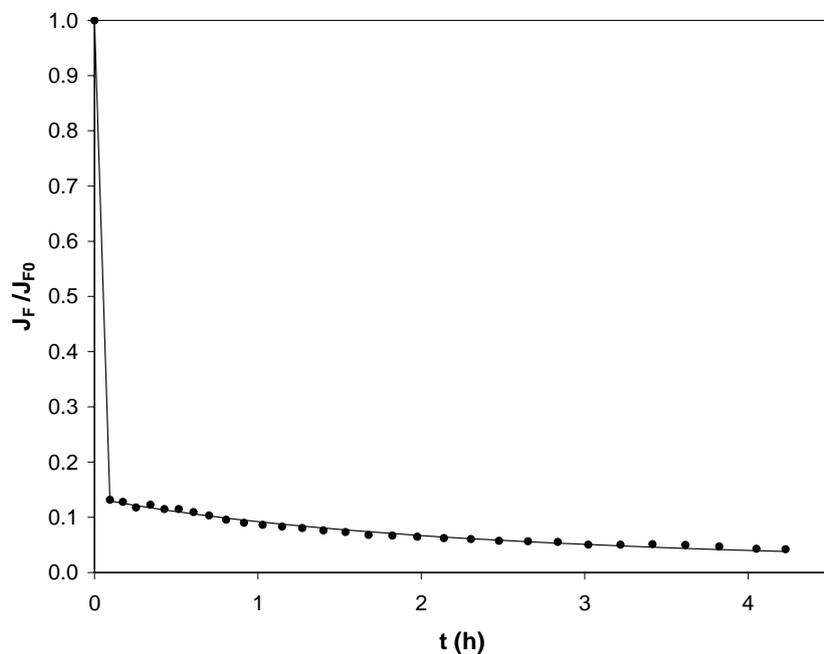


Figura 5.7. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero pretratado. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua).

Los valores de los parámetros de ajuste del modelo se recogen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Parámetros de ajuste del modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar para la evolución temporal del flujo de filtrado durante la filtración de lactosuero sin pretratar y de lactosuero pretratado.

	α	A (h ⁻¹)	B (h ⁻¹)	R ²
Lactosuero sin pretratar	0.9691	52.40	0.0953	0.9994
Lactosuero pretratado	0.8655	142.55	0.2088	0.9980

Los valores del parámetro α indican que en la diafiltración de lactosuero sin pretratar la fracción de poros bloqueables fue mayor que para el lactosuero pretratado. Por tanto, la eliminación de sales de calcio y fosfato dio lugar a que el bloqueo de poros durante la diafiltración disminuyese desde 97%, valor para el lactosuero sin pretratar, hasta 87%, correspondiente al suero clarificado, consiguiéndose un consecuente aumento de flujo de filtrado, incremento que ya había sido observado por otros autores (Mathews *et al.*, 1978; Kim *et al.*, 1989; Rinn *et al.*, 1990; Musale y Kulkarni, 1998; Ansari *et al.*, 2006). Probablemente, como ya indicaron otros investigadores como Matzinos y Álvarez (2002), aunque los principales componentes de la capa de colmatación formada durante la ultrafiltración de suero sean las proteínas, el calcio disuelto en el suero ejerce una importante influencia sobre la estabilidad de dicha capa. Este calcio sirve de enlace de unas proteínas con otras o de las proteínas con la membrana, favoreciendo la persistencia de la colmatación y aumentando la dificultad de su posterior limpieza.

Los valores tan elevados obtenidos para el parámetro A indican que la cinética de bloqueo de poros es elevada. Así, a los dos minutos de proceso ya se habían bloqueado el 83% y 99% de los poros bloqueables para lactosuero sin pretratar y pretratado, respectivamente. El bloqueo de todos los poros bloqueables se produjo a los 11 y 4 minutos, aproximadamente, para suero sin pretratar y pretratado, respectivamente. La cinética de bloqueo para el lactosuero sin pretratar pudo ser más lenta por la formación de una capa de polarización más compacta por la acción del calcio que dificultaría el bloqueo de poros, ralentizando dicho proceso.

En cuanto a los valores del parámetro cinético de reducción del área transversal de los poros, B , indican que el proceso fue más lento en la diafiltración de lactosuero sin pretratar. Esto podría explicarse si se tiene en cuenta que la presencia de iones salinos interfiere en las interacciones electrostáticas entre la membrana y la proteína (Clark *et al.*, 1991). Esta interferencia se puede deber tanto a la competencia por los puntos de adsorción existentes en la superficie de los poros como a la unión de estos iones a las propias moléculas de proteína.

5.3.3. Proteína total en retenido y filtrado acumulado

Para poder comparar el comportamiento de la membrana durante la diafiltración del lactosuero pretratado y sin pretratar, se monitorizó el rendimiento de proteína total en retenido y filtrado acumulado cada 0.5 diavolumenes. El rendimiento de proteína total en retenido ($\eta_{R\text{-proteína total}}$) y filtrado acumulado ($\eta_{F\text{-proteína total}}$) se define como la relación entre la masa de proteína total instantánea en el retenido y filtrado acumulado, respectivamente, y la masa de proteína total en la alimentación (ecuaciones [5.5] y [5.6]).

$$\eta_{R\text{-proteína total}} = \frac{C_{R\text{-proteína total}} \cdot V_R}{C_{R0\text{-proteína total}} \cdot V_{R0}} \quad [5.5]$$

$$\eta_{F\text{-proteína total}} = \frac{C_{F\text{-proteína total}} \cdot V_F}{C_{R0\text{-proteína total}} \cdot V_{R0}} \quad [5.6]$$

Los 2 L de lactosuero inicial contenían una masa inicial de proteína total de 14.1 g. En la Figura 5.8 se muestran los resultados de ambos rendimientos para la diafiltración continua de lactosuero pretratado y sin pretratar. El rendimiento en filtrado acumulado fue mayor cuando se utilizó lactosuero pretratado que cuando se utilizó lactosuero sin pretratar. Así, tras diafiltrar 0.5 y 1 diavolumen, se consiguió recuperar en el filtrado acumulado el 15 y 25% de la proteína total inicial, respectivamente, en el caso de lactosuero pretratado y sólo el 13 y 20%, respectivamente, cuando se empleó lactosuero sin pretratar. En este último caso no se tienen más resultados ya que el proceso se tuvo que interrumpir tras el primer diavolumen por la caída del 60% del flujo. En el proceso en el que se utilizó lactosuero

pretratado, al finalizar el proceso (3 diavolumenes) el rendimiento de proteína total en el retenido fue 0.58 y en el filtrado acumulado, 0.30. Si se tienen en cuenta estos valores, al final de la diafiltración, el 12 % de la proteína inicial no se encontraría ni en filtrado ni en retenido. Sin embargo, hay que contemplar la cantidad de proteína que se ha ido retirando en las muestras para su análisis. De este modo, considerando los 20 mL de retenido y 40 mL de filtrado acumulado tomados en cada muestra, así como la composición de dichas muestras, se puede calcular la cantidad de proteína retirada en las mismas (Tabla 5.2). Teniendo en cuenta esta proteína acumulada en las muestras retiradas, en el ejemplo indicado anteriormente del punto final de la diafiltración de lactosuero pretratado, en lugar del 12% es el 5% de la proteína total inicial la que al no encontrarse en retenido ni en filtrado ni en las muestras tomadas, se encontraría formando parte de la capa de colmatación de la membrana o en el interior de los poros de la misma.

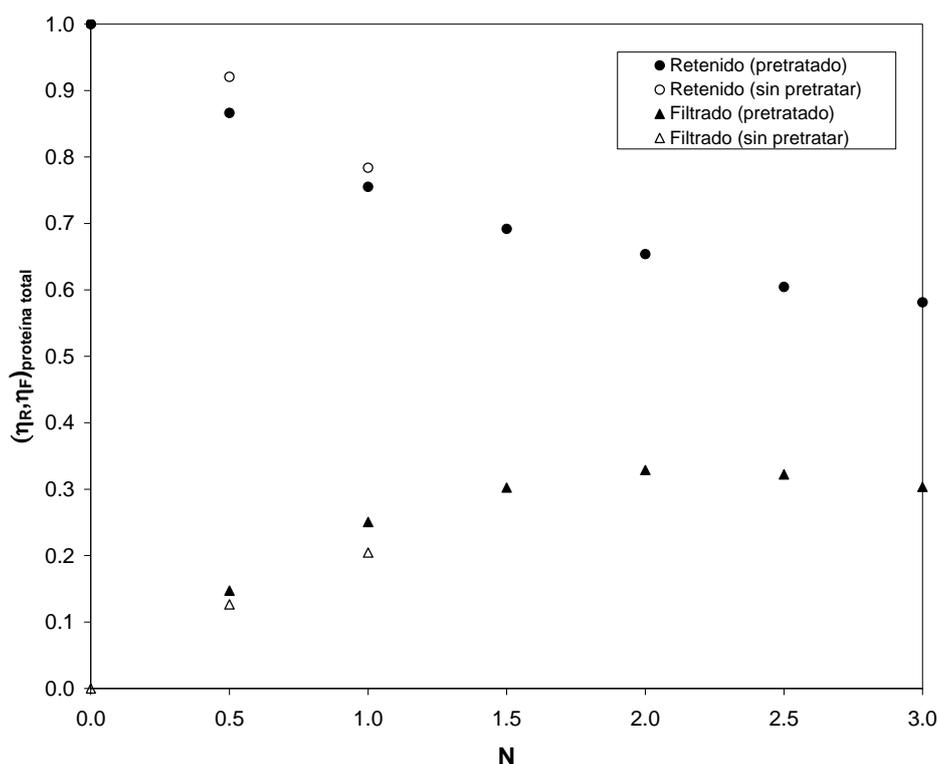


Figura 5.8. Rendimiento de proteína total en retenido y filtrado acumulado en función del número de diavolumenes para la diafiltración de lactosuero pretratado y sin pretratar.

Tabla 5.2. Masa de proteína total retirada en las muestras tomadas respecto a la masa de proteína total inicial, cada 0.5 diavolúmenes, para lactosuero pretratado y sin pretratar.

Diavolumen	Masa proteína muestras/Masa proteína total inicial	
	Lactosuero pretratado	Lactosuero sin pretratar
0.5	0.015	0.014
1.0	0.027	0.026
1.5	0.038	-
2.0	0.049	-
2.5	0.058	-
3.0	0.066	-

En este caso, los resultados obtenidos también se corresponden con los mostrados por otros autores (Musale y Kulkarni, 1998; Ansari *et al.*, 2006) que confirman que el pretratamiento realizado al lactosuero proporciona un aumento en la permeabilidad de proteínas a través de la membrana.

5.3.4. Lactosa en retenido y filtrado acumulado

Al igual que en el caso de la proteína total, para la lactosa se monitorizó el rendimiento en retenido ($\eta_{R-lactosa}$) y en filtrado acumulado ($\eta_{F-lactosa}$), definidos como:

$$\eta_{R-lactosa} = \frac{C_{R-lactosa} \cdot V_R}{C_{R0-lactosa} \cdot V_{R0}} \quad [5.7]$$

$$\eta_{F-lactosa} = \frac{C_{F-lactosa} \cdot V_F}{C_{R0-lactosa} \cdot V_{R0}} \quad [5.8]$$

La concentración de lactosa en el lactosuero inicial fue 47.7 g/L. Los rendimientos de lactosa en retenido y filtrado acumulado a lo largo de los dos procesos se recogen en la Figura 5.9. Se observa que, en este caso, los valores obtenidos en el primer diavolumen, tanto en retenido como en filtrado, son prácticamente coincidentes en ambas diafiltraciones. También cabe resaltar que la permeabilidad de la membrana para la lactosa es muy elevada

ya que tras un diavolumen se consiguió recoger en el filtrado acumulado, aproximadamente, un 60% de la lactosa inicial, y al finalizar el proceso de diafiltración de lactosuero pretratado, esta cantidad se elevó hasta 92%.

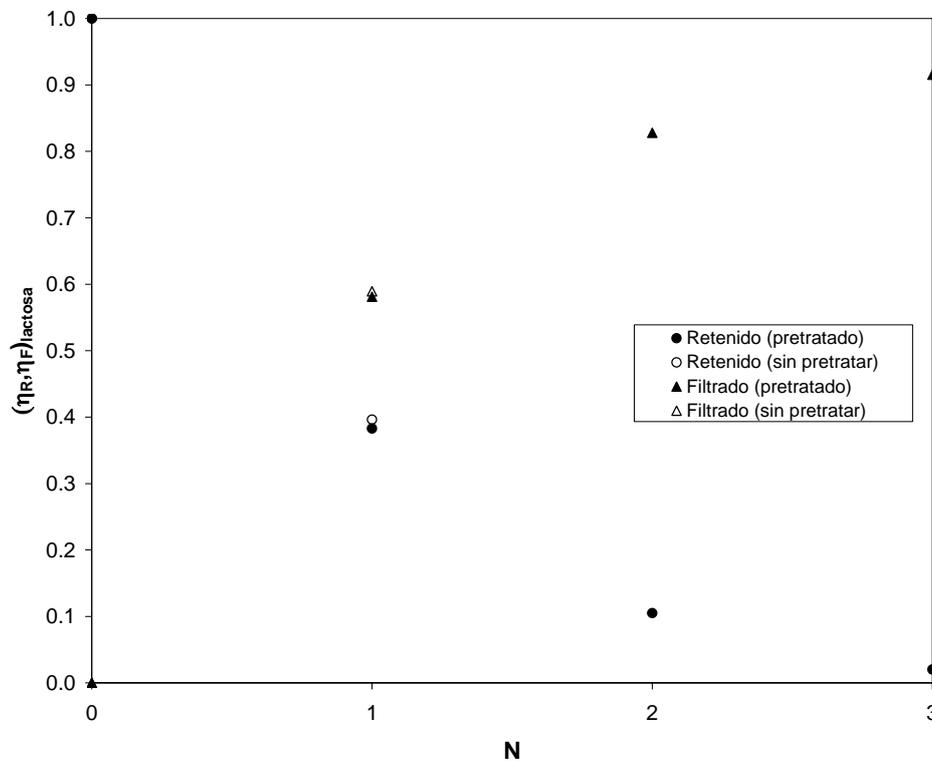


Figura 5.9. Rendimiento de lactosa en retenido y filtrado acumulado en función del número de diavolumenes para la diafiltración de lactosuero pretratado y sin pretratar.

El rendimiento teórico de un soluto en filtrado acumulado ($\eta_{F-teórico}$) en una diafiltración continua (Cheryan, 1998) es:

$$\eta_{F-teórico} = 1 - \exp[-N \cdot (1 - r)] \quad [5.9]$$

donde N es el número de diavolumenes y r la retención del soluto.

Si se tiene en cuenta que la lactosa es un soluto que en una membrana de 50 kDa tiene una retención prácticamente nula, la fracción teórica de lactosa eliminada en función del número de diavolumenes sería la indicada en la Tabla 5.3. En esta misma tabla se han incluido los valores reales obtenidos para lactosuero pretratado y sin pretratar. Se observa

que los rendimientos en filtrado acumulado durante ambos procesos de diafiltración se acercan mucho a los valores teóricos. Esto indica que, en ambos casos, el proceso de diafiltración continua lavó con éxito los solutos de menor tamaño, como es el caso de la lactosa.

Tabla 5.3. Rendimiento de lactosa en filtrado acumulado teórico y real para el lactosuero pretratado y sin pretratar en función del número de diavolumenes.

Diavolumen	$\eta_{F\text{-teórico}}$	$\eta_{F\text{-real}}$	
		Lactosuero pretratado	Lactosuero sin pretratar
1	0.63	0.58	0.59
2	0.86	0.83	-
3.0	0.95	0.92	-

5.4. CONCLUSIONES

El pretratamiento propuesto para clarificar el lactosuero ácido, consistente en un proceso fisico-químico que incluye aumento del calcio iónico y pH, acompañado por calentamiento, provocó la agregación de los complejos lipídicos y partículas de fosfato cálcico.

El análisis de la influencia de este proceso de clarificación sobre la diafiltración continua de lactosuero sin pretratar y lactosuero pretratado muestra que:

- La composición del lactosuero en proteínas individuales (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, IgG y LF) no se vio afectada por el pretratamiento.
- El pretratamiento dio lugar a un aumento del flujo de filtrado, consecuencia de una disminución del número de poros bloqueables de la membrana. Inicialmente, el incremento de flujo fue 3.5 veces respecto al suero sin pretratar. Este incremento aumentó a lo largo del proceso, llegándose a multiplicar por 5.9 tras el primer diavolumen.
- El proceso de clarificación favorece el paso de proteínas a través de la membrana, consiguiéndose tras el primer diavolumen un rendimiento en filtrado acumulado de 20% y 25% para lactosuero sin pretratar y lactosuero pretratado, respectivamente. Pero el principal efecto del pretratamiento es el aumento en la permeabilidad de la membrana, pudiéndose alcanzar 3 diavolumenes en la diafiltración de lactosuero pretratado, cuando sólo se pudo llegar a 1 diavolumen en la diafiltración de lactosuero sin pretratar.

6. SELECCIÓN DEL TAMAÑO DE CORTE DE LA MEMBRANA

6.1. INTRODUCCIÓN

El estudio teórico realizado mostró la posibilidad de fraccionamiento de las proteínas del lactosuero en dos etapas. Para la primera etapa, en la que se pretendía que α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA pasaran preferentemente a filtrado, se obtuvo un tamaño de corte óptimo de la membrana igual a 31.0 nm.

Las membranas cerámicas disponibles comercialmente para el rango de ultrafiltración tienen tamaños de corte desde 1 kDa hasta 300 kDa; mientras que los tamaños disponibles en el rango de microfiltración son de 0.14 μm a 1.4 μm . Si se tiene en cuenta que el tamaño de corte de 300 kDa equivale a un radio de poro medio de 17.5 nm (Palacio, 1999), el radio de poro óptimo de la membrana sería intermedio entre la membrana de 300 kDa y la de 0.14 μm .

De este modo, el objetivo de este capítulo es la selección del tamaño de corte de la membrana. Para ello se realizarán diafiltraciones continuas de lactosuero pretratado empleando membranas de 300 kDa y 0.14 μm . A lo largo del proceso se analizarán la evolución temporal del flujo de filtrado y los rendimientos en retenido y filtrado acumulado de las proteínas individuales. La selección del tamaño de corte óptimo para la primera etapa del fraccionamiento de las proteínas del lactosuero se realizará en base al rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA en filtrado acumulado.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Procedimiento experimental

Se realizaron experimentos en el modo de diafiltración continua, utilizando 2 L de lactosuero ácido pretratado como alimentación. Las condiciones de operación empleadas fueron: caudal de retenido de 400 L/h, 30 °C de temperatura y 1.0 bar de presión transmembrana, para trabajar en la zona controlada por la presión en la membrana de 300 kDa (Figura 6.1). Realmente en la membrana de 0.14 μm no se puede trabajar en la zona controlada por la presión, ya que incluso el valor más pequeño posible para la presión transmembrana ya se encuentra en la zona controlada por la transferencia de materia (Figura 6.1), por lo que también se empleó 1.0 bar de presión. Para seleccionar el tamaño de corte adecuado para realizar el fraccionamiento, se emplearon dos membranas cerámicas con diferente tamaño de poro: 300 kDa y 0.14 μm . Se escogió como pH de trabajo 7.3, para no adicionar sales ya que es el pH del lactosuero pretratado y porque al estar próximo al punto de carga cero de la membrana, las interacciones proteína-membrana se minimizan. El proceso de diafiltración finalizó cuando se alcanzaron 4 diavolumenes, monitorizándose durante el mismo, el caudal de filtrado cada 50 g recogidos. Se tomaron muestras de 1.0 mL de retenido y de filtrado acumulado cada diavolumen para analizar la cantidad de proteína individual (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, IgG y LF) mediante RP-HPLC.

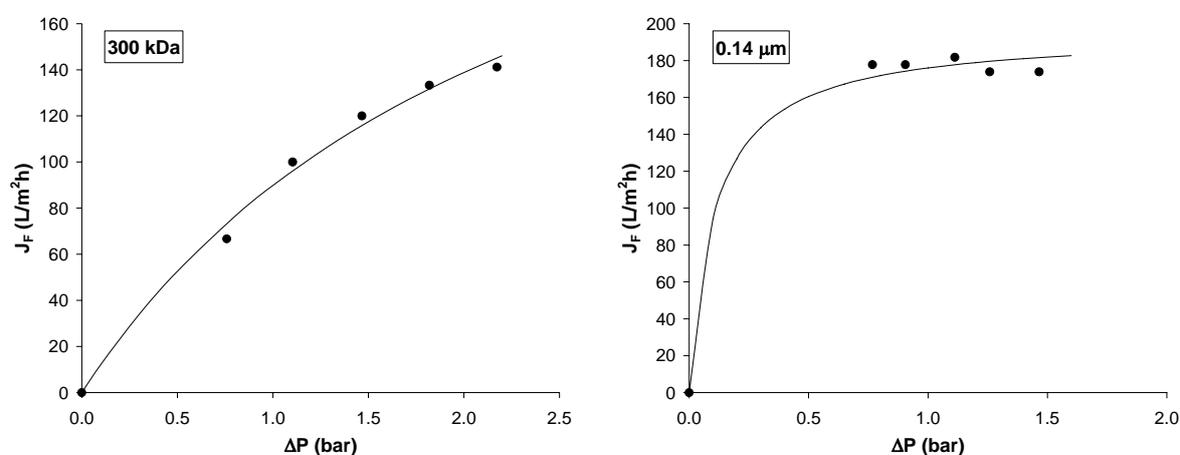


Figura 6.1. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 7.3 a través de la membrana de 300 kDa y 0.14 μm .

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Composición del lactosuero ácido pretratado

La composición media del lactosuero ácido bovino pretratado utilizado en los experimentos se indica en el cuadro de texto de la Figura 6.2, donde también se muestra un cromatograma de dicho lactosuero. Se observa que los picos de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina son los mayoritarios, encontrándose a tiempos de 11.39 y 19.55 min, respectivamente. Los picos de la LF y BSA se sitúan entre los dos anteriores, a tiempos de 15.52 y 16.93 min, respectivamente. El último pico eluido, a 22.81 min, corresponde a la IgG. La concentración media del lactosuero ácido pretratado fue: 1.00 g/L de α -lactoalbúmina, 2.70 g/L de β -lactoglobulina, 0.10 g/L de BSA, 0.40 g/L de IgG y 0.04 g/L de LF.

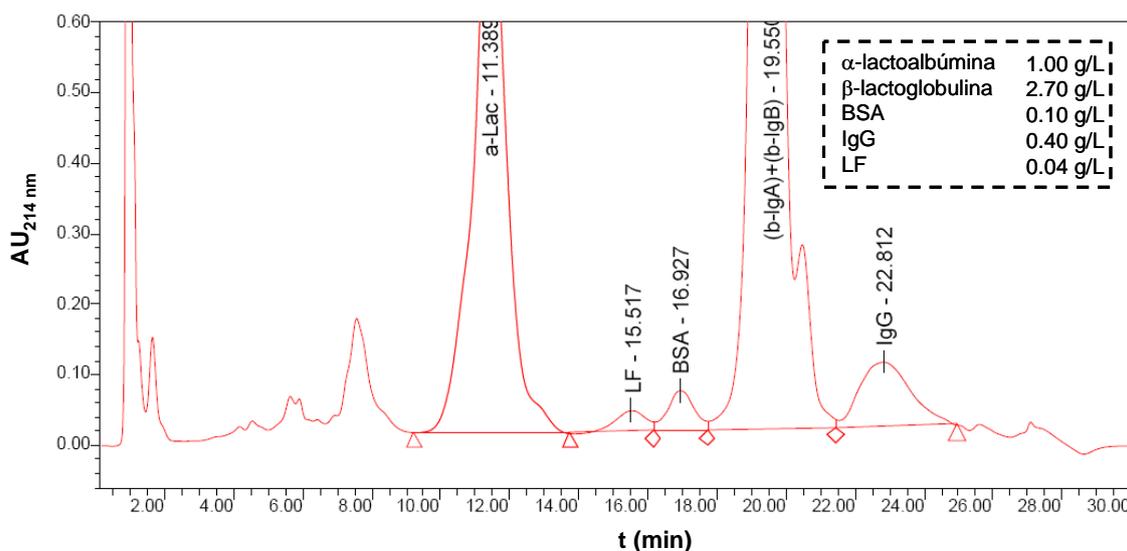


Figura 6.2. Cromatograma de RP-HPLC del lactosuero ácido pretratado. La concentración de las proteínas individuales se indica en el cuadro de texto.

6.3.2. Evolución del flujo de filtrado

En la Figura 6.3 se muestra el flujo de filtrado en función del tiempo para la membrana de 300 kDa y la de 0.14 μ m. En ambos casos se produjo inicialmente una disminución rápida del flujo de filtrado, manteniéndose posteriormente constante e incluso aumentando

ligeramente al final. El flujo inicial para la membrana de 300 kDa fue 93 L/m²h y para la de 0.14 μm fue 154 L/m²h, es decir un 65% mayor. Esta proporción fue aumentando con el transcurso del proceso, llegando a ser el flujo final de la membrana de 0.14 μm (125 L/m²h) 2.5 veces el flujo final de la membrana de 300 kDa (50 L/m²h).

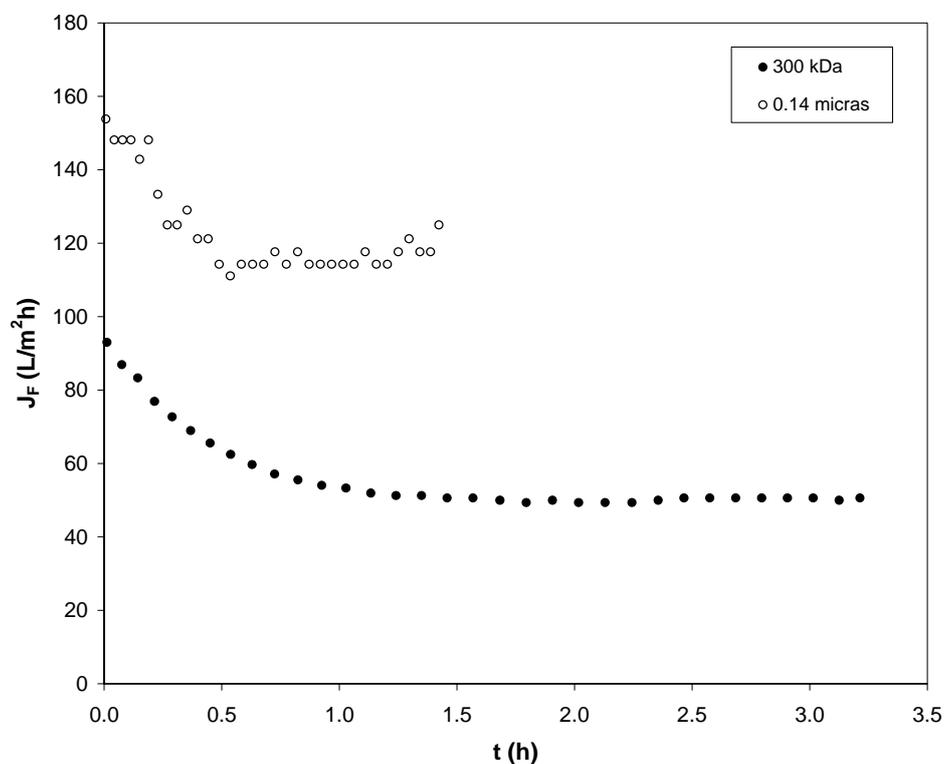


Figura 6.3. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la diafiltración continua de lactosuero ácido pretratado a pH 7.3 con membranas cerámicas de 300 kDa y 0.14 μm.

Para analizar la influencia del tamaño de corte de la membrana sobre la evolución temporal del flujo de filtrado, se ajustaron los datos al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar. En la Figura 6.4 y Figura 6.5 se muestran estos ajustes para la membrana de 300 kDa y 0.14 μm, respectivamente. De acuerdo con las permeabilidades de las membranas de 300 kDa y 0.14 μm (indicadas en el apartado 3.2.2) y teniendo en cuenta que la presión transmembrana es 1.0 bar: $(J_{F0})_{300\text{kDa}}=780.90 \text{ L/m}^2\text{h}$ y $(J_{F0})_{0.14\mu\text{m}}=1817.68 \text{ L/m}^2\text{h}$.

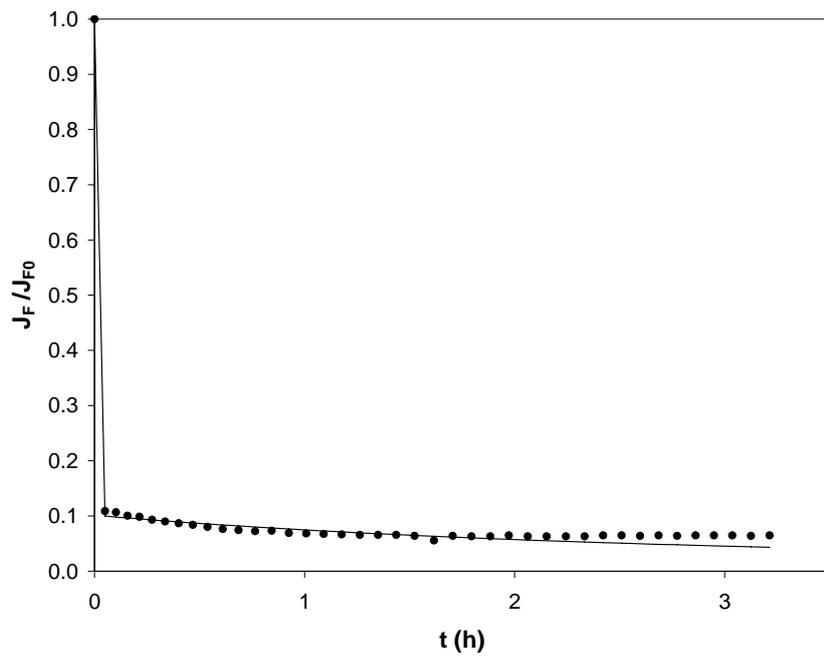


Figura 6.4. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua).

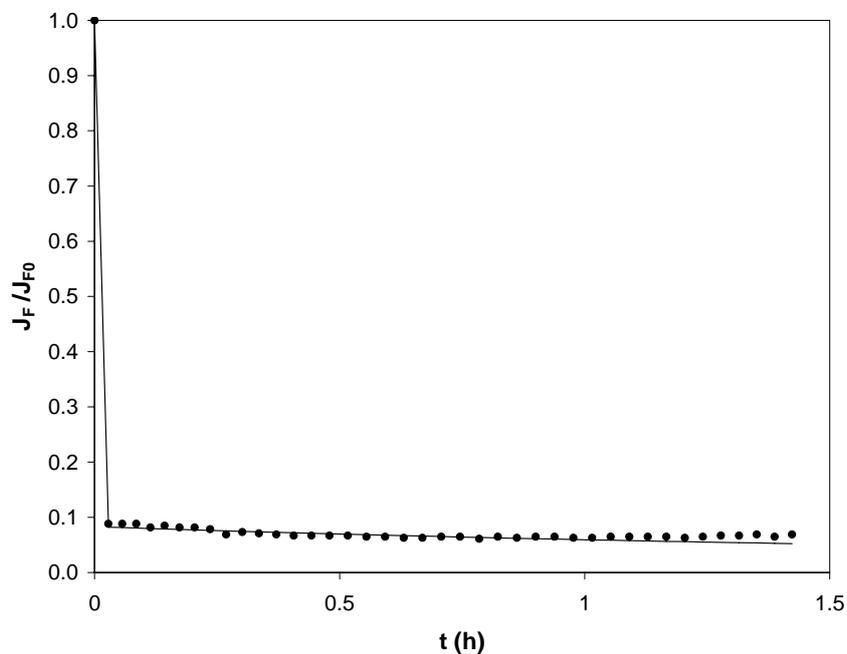


Figura 6.5. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la filtración de lactosuero empleando la membrana de 0.14 μm . Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua).

En la Tabla 6.1 se recogen los valores de los parámetros de ajuste.

Tabla 6.1. Parámetros de ajuste del modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar para la evolución temporal del flujo de filtrado durante la filtración de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa y 0.14 μm .

	α	A (h^{-1})	B (h^{-1})	R ²
300 kDa	0.8986	323.34	0.1650	0.9951
0.14 μm	0.9170	410.76	0.1822	0.9957

Los valores de α indican que se produce un bloqueo completo de poros importante en ambas membranas. La fracción de poros bloqueables es similar, aunque algo superior para la membrana de 0.14 μm . Los parámetros cinéticos de bloqueo completo, A, y bloqueo estándar, B, son superiores para la membrana de 0.14 μm .

Para la discusión de la evolución de los flujos de filtrado hay que tener en cuenta que en un proceso de diafiltración continua tienen lugar dos fenómenos opuestos que afectan a la evolución del flujo de filtrado. Por un lado, si se produce transmisión de proteína a través de la membrana, la concentración de proteína total en retenido va disminuyendo. Esto provocaría un aumento del flujo de filtrado. Por otro lado, la colmatación de la membrana como consecuencia de la adsorción de las proteínas sobre la misma provocaría un descenso del flujo de filtrado. Ambos mecanismos (diafiltración-colmatación) dependen principalmente de las interacciones electrostáticas proteína-proteína y proteína-membrana. Como el pH de trabajo es 7.3, cercano al punto isoelectrico de la membrana y, por tanto, debilitadas las interacciones proteína-membrana, el mecanismo de colmatación es muy importante inicialmente, como indican los valores de α , provocando un descenso brusco del flujo de filtrado. Después de esta colmatación inicial, probablemente se llega a un punto de saturación de la membrana que provoca que el flujo de filtrado no continúe disminuyendo. Los valores de flujo son superiores para la membrana de 0.14 μm por su mayor tamaño de poro. Sin embargo, la colmatación de esta membrana es similar a la de la membrana de 300 kDa. Esto parece indicar que la membrana de 0.14 μm tiene poros de tamaño tal que pueden sufrir bloqueo superficial o interno por parte de las proteínas de mayor radio

efectivo, ya que las proteínas causantes del bloqueo de poros de la membrana de 300 kDa, las proteínas de menor radio efectivo, pasarían sin problema a través de los poros de la membrana de 0.14 μm .

6.3.3. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado

Para poder comparar la capacidad de fraccionamiento de ambas membranas, se analizó el rendimiento en retenido y filtrado de cada una de las proteínas presentes en el lactosuero. El rendimiento de proteína individual en retenido ($\eta_{R\text{-proteína}}$) y filtrado acumulado ($\eta_{F\text{-proteína}}$) se define como la relación entre la masa instantánea de esa proteína en el retenido y filtrado acumulado, respectivamente, y la masa de proteína individual en la alimentación (ecuaciones [6.1] y [6.2]).

$$\eta_{R\text{-proteína}} = \frac{C_{R\text{-proteína}} \cdot V_R}{C_{R0\text{-proteína}} \cdot V_{R0}} \quad [6.1]$$

$$\eta_{F\text{-proteína}} = \frac{C_{F\text{-proteína}} \cdot V_F}{C_{R0\text{-proteína}} \cdot V_{R0}} \quad [6.2]$$

En la Figura 6.6 se muestran los rendimientos en retenido y filtrado acumulado para cada una de las proteínas individuales en función del número de diavolumenes para la membrana de 300 kDa y 0.14 μm .

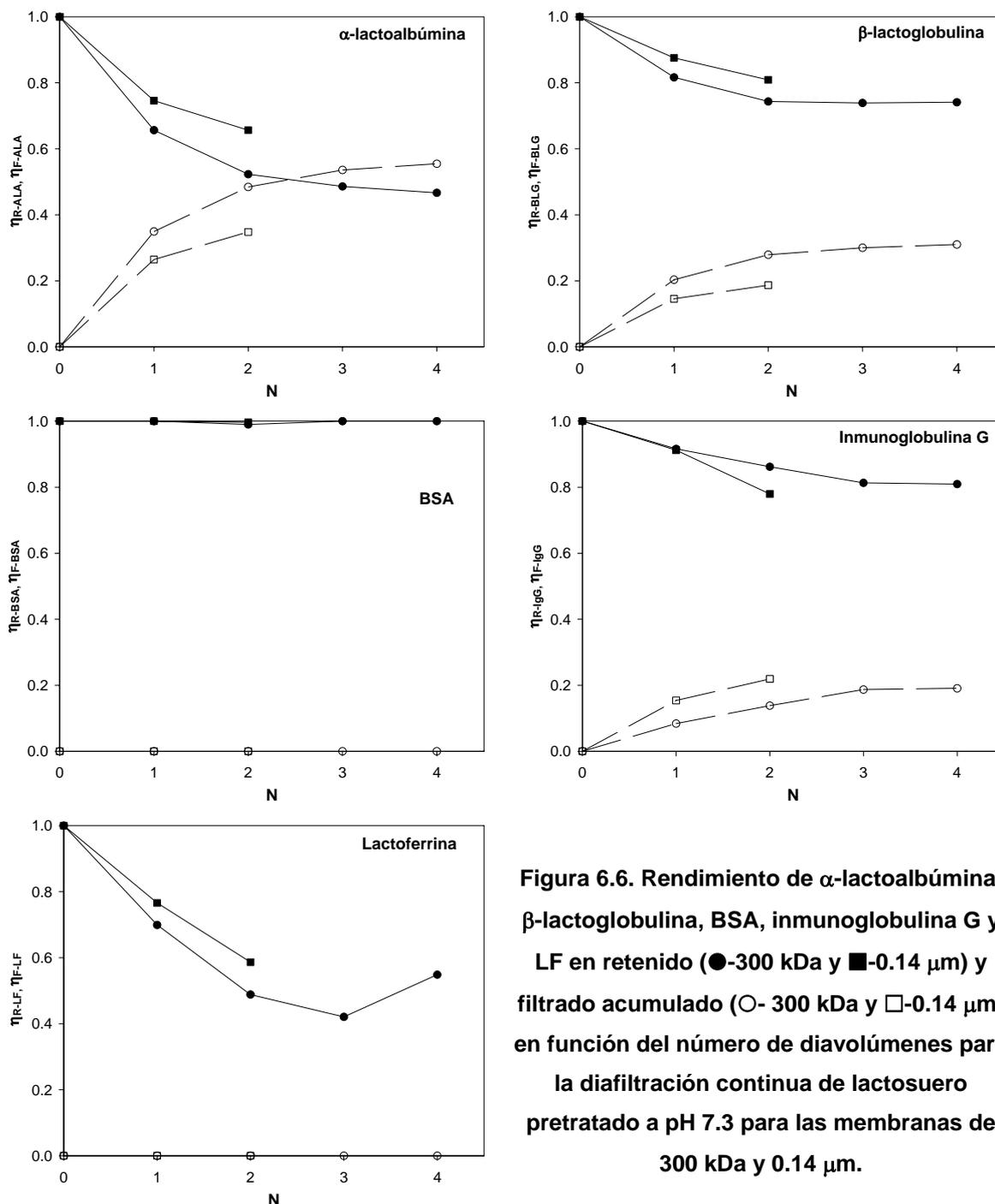


Figura 6.6. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●-300 kDa y ■-0.14 μm) y filtrado acumulado (○- 300 kDa y □-0.14 μm) en función del número de diavolumenes para la diafiltración continua de lactosuero pretratado a pH 7.3 para las membranas de 300 kDa y 0.14 μm .

La α -lactoalbúmina pasó a través de ambas membranas. En los dos casos, la suma del rendimiento en retenido y filtrado acumulado en cada diavolumen fue aproximadamente 100%, por lo que no se produjo pérdida de proteína. Aunque el comportamiento fue similar, el rendimiento en filtrado fue mayor para la membrana de 300 kDa, obteniéndose, tras 2

diavolumenes, el 48% de la proteína en filtrado, frente al 35% recogido en el filtrado de la membrana de 0.14 μm .

La β -lactoglobulina se comportó de forma análoga a la α -lactoalbúmina. No se produjo pérdida de proteína en ningún experimento. También se obtuvieron mayores rendimientos en filtrado acumulado para la membrana de 300 kDa. En el segundo diavolumen, el 28% de la β -lactoglobulina inicial había pasado a través de la membrana de 300 kDa, mientras que en la membrana de 0.14 μm este rendimiento fue del 19%.

La inmunoglobulina G tampoco sufrió pérdidas de proteína a lo largo de los experimentos. En cuanto a los rendimientos en filtrado acumulado, fueron 14% y 22% para la membrana de 300 kDa y 0.14 μm , respectivamente.

Tanto BSA como lactoferrina no pasaron a través de ninguna de las membranas. Sin embargo, se observaron comportamientos diferentes para cada una de ellas. Los rendimientos de BSA en retenido permanecieron cercanos al 100% durante los 4 diavolumenes en ambos procesos. Pero en el caso de la LF, los rendimientos en retenido fueron inferiores al 100%. Tras 2 diavolumenes, sólo se encontraba en retenido el 49% y 59% de la proteína inicial para la membrana de 300 kDa y 0.14 μm , respectivamente.

Para analizar el transporte de proteína a través de la membrana se calcularon los valores teóricos del radio efectivo de cada proteína para cada membrana, así como la carga que presenta a pH 7.3 (Tabla 6.2). Estos cálculos se han realizado de acuerdo a lo descrito en los apartados 4.2.3 y 4.2.6.

Tabla 6.2. Carga y radio efectivo de las proteínas individuales del lactosuero para pH 7.3 para la membrana de 300 kDa (radio de poro 17.5 nm) y 0.14 μm .

	Carga	r_{EFF} (nm)	
		300 kDa	0.14 μm
ALA	-7.61	3.28	1.78
BLG	-16.77	10.56	3.93
BSA	-19.46	13.48	5.10
IgG	9.75	6.92	5.00
LF	12.29	7.66	4.37

Estos radios efectivos ponen de manifiesto que todas las proteínas podrían pasar al filtrado en ambas membranas, con mayor facilidad en el caso de 0.14 μm donde los radios de las proteínas son muy inferiores al radio de poro. Si bien α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina fueron recogidas en los filtrados de los dos procesos, los rendimientos en filtrado acumulado fueron mayores en la membrana de 300 kDa. Esto puede deberse a que proteínas grandes como BSA, IgG o LF, que en la membrana de 300 kDa tienen radios efectivos similares al radio de poro de la membrana, podrían penetrar en el interior de los poros de la membrana de 0.14 μm , dificultando la transmisión de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. Esto confirmaría los resultados obtenidos para los flujos de filtrado, donde la colmatación es similar en ambas membranas. La inmunoglobulina G pasó a través de ambas membranas, aunque con rendimientos en filtrado menores que los obtenidos para α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. En este caso, la diferencia entre el radio de la proteína y el radio de poro de la membrana sí propició que los rendimientos en filtrado acumulado correspondientes a 300 kDa fuesen menores que los correspondientes a 0.14 μm .

Los radios teóricos de la lactoferrina son suficientemente pequeños como para que pudiese atravesar las membranas. Sin embargo, no sólo no se obtuvieron rendimientos en filtrado acumulado, sino que se produjo pérdida de proteína. Esta “desaparición” de proteína pudo deberse a la adsorción de LF sobre la membrana o la asociación de esta proteína con otras proteínas mayoritarias (Lampreave *et al.*, 1990).

En cuanto a la BSA, que por sus radios efectivos teóricos se esperaba que pasara a través de las dos membranas, principalmente por 0.14 μm , no se recogió en el filtrado acumulado de ninguna de ellas. A este pH donde la membrana presenta carga neta nula y la BSA está cargada negativamente no debería producirse agregación ni interacción con la membrana. Para minimizar la carga neta y el radio efectivo de la BSA y así intentar obtenerla en el filtrado, objetivo de la primera etapa de fraccionamiento, se realizó la diafiltración al pH óptimo obtenido en la simulación, pH 5, cercano al punto isoeléctrico de esta proteína.

6.3.4. Diafiltración de lactosuero al pH óptimo de la primera etapa

El proceso de diafiltración de lactosuero ácido pretratado se llevó a cabo en las condiciones indicadas en el apartado de procedimiento experimental. El pH de trabajo fue 5, valor obtenido como óptimo en la simulación para la primera etapa de fraccionamiento. Se empleó la membrana de 300 kDa puesto que los resultados obtenidos en los apartados anteriores indican que la membrana de 0.14 μm tiene un tamaño de poro que podría permitir el paso de las proteínas de mayor radio efectivo, IgG y LF, que en esta primera etapa deben permanecer en el retenido, además de que su inclusión en los poros dificultan la transmisión de las proteínas de menor tamaño.

En la Figura 6.7 se muestra la evolución temporal del flujo de filtrado. La forma de la curva es similar a la obtenida para pH 7.3 con la membrana de 300 kDa, pero con valores más bajos de flujo. En la dos primeras horas se produjo un descenso muy acusado del flujo de filtrado, desde el valor inicial, 51 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$, hasta 25.8 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$, permaneciendo después prácticamente constante hasta el valor final de 23.1 $\text{L}/\text{m}^2\text{h}$. El proceso tuvo una duración total de 6.63 h.

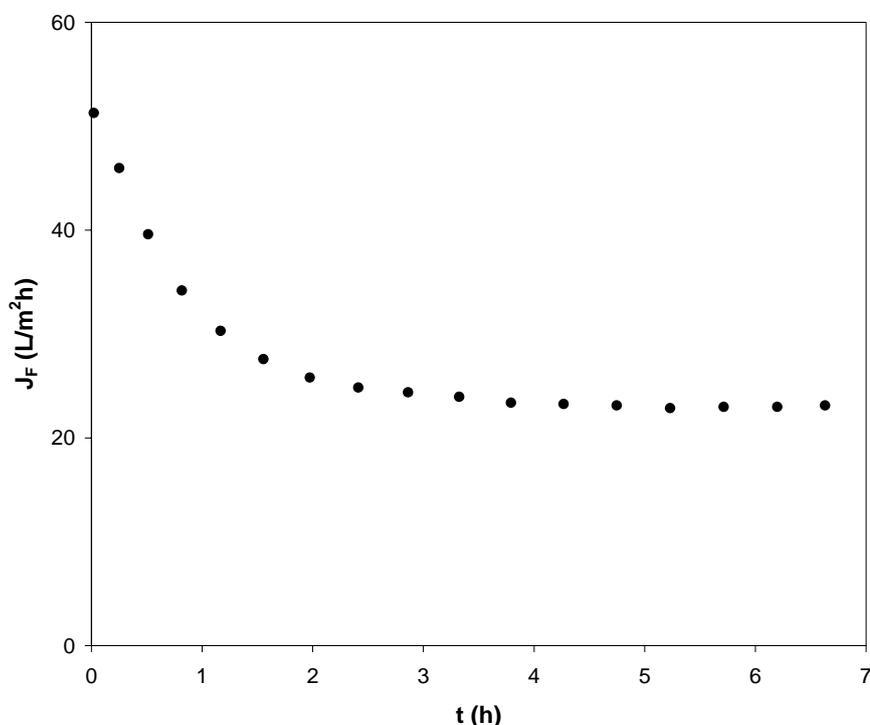


Figura 6.7. Evolución temporal del flujo de filtrado para la diafiltración de lactosuero a pH 5 empleando la membrana de 300 kDa.

Los rendimientos de cada una de las proteínas individuales para cada diavolumen tanto en retenido como en filtrado acumulado se muestran en la Figura 6.8. El rendimiento en el filtrado acumulado final para α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA fue 8%, 2% y 0%, respectivamente. Inmunoglobulinas G y lactoferrina quedaron retenidas, pero se observó pérdida de ambas proteínas. En concreto, al final del proceso sólo permaneció en el retenido el 53% y 27% de la IgG y LF originales, respectivamente.

Los resultados indican que en los momentos iniciales del proceso se produjo un bloqueo importante de poros, provocando la caída brusca del flujo. Tras esta colmatación inicial, se produjo un equilibrio entre la colmatación y el mecanismo de dilución debido a la diafiltración, por lo que el flujo permaneció prácticamente constante.

Los radios efectivos de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA estarían minimizados porque el pH de trabajo está cercano a su punto isoelectrico, y, además, su carga neta sería próxima a cero, por lo que deberían atravesar la membrana. Sin embargo, los rendimientos en filtrado acumulado obtenidos para estas proteínas son muy bajos, mucho menores en el caso de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina que los obtenidos a pH 7.3, por lo que parece que se producen agregados entre proteínas. Estos agregados de proteínas descargadas podrían ser los causantes principales de la gran colmatación inicial de la membrana.

La pérdida de cantidades importantes de IgG y lactoferrina puede deberse a la adsorción de proteína sobre la membrana o a la asociación de proteína con otras proteínas. Por ejemplo, la lactoferrina se une de forma no covalente a la β -lactoglobulina o a la BSA con razones molares 2:1 y 1:1, respectivamente, unión probablemente favorecida por la carga neta nula de estas dos proteínas mayoritarias.

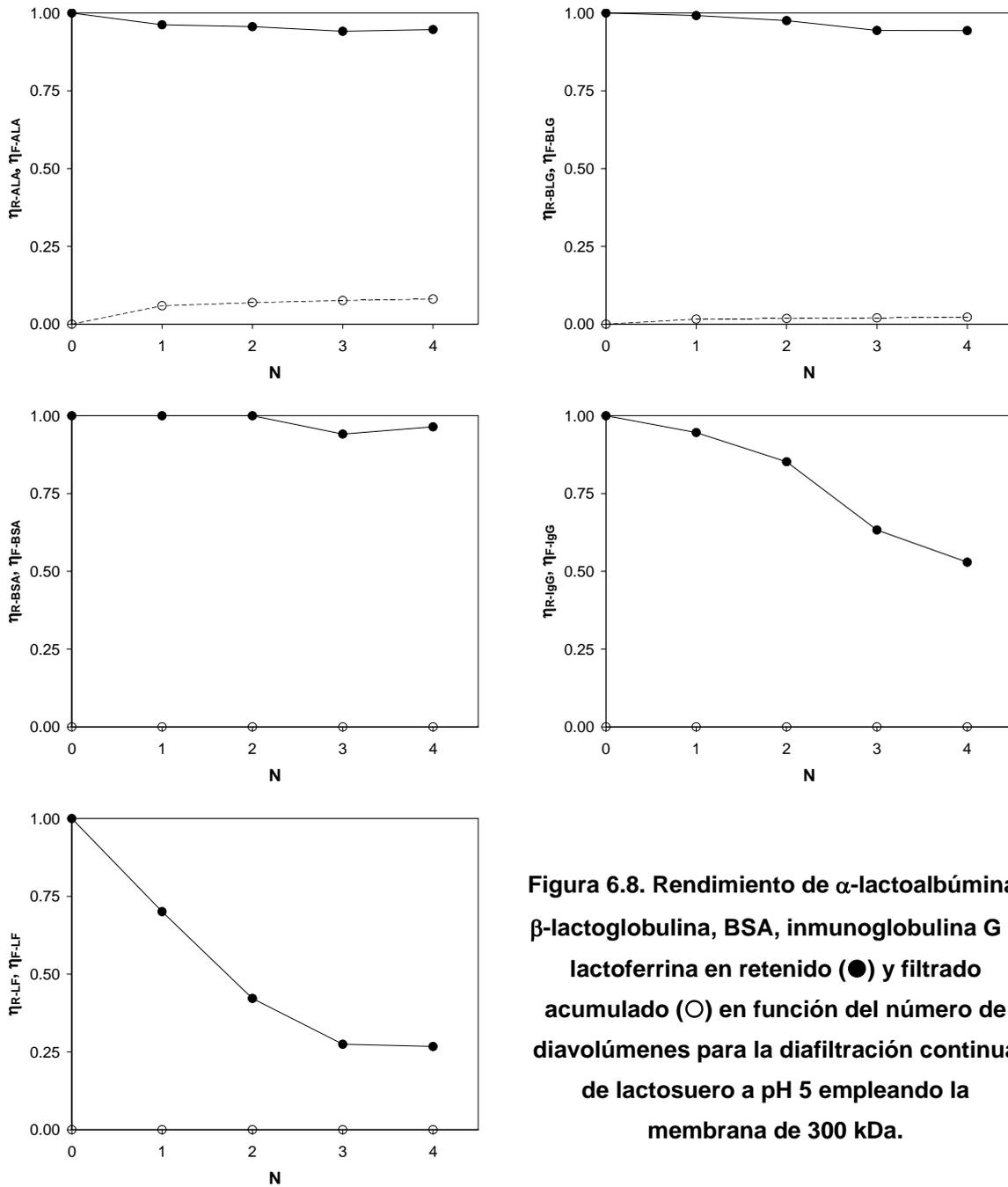


Figura 6.8. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y lactoferrina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes para la diafiltración continua de lactosuero a pH 5 empleando la membrana de 300 kDa.

6.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- La membrana más adecuada para llevar a cabo la primera etapa de fraccionamiento es la de 300 kDa. Los flujos de filtrado para esta membrana son menores que los correspondientes a 0.14 μm , pero el bloqueo completo de poros es similar debido a que las proteínas más grandes pueden adsorberse en el interior de los poros, dando lugar a transmisiones menores de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina que las transmisiones obtenidas para la membrana de 300 kDa.
- En la diafiltración de lactosuero a pH 5 no se obtuvieron los resultados previstos. A este pH se produce un importante bloqueo completo de poros y no sólo no se consigue que la BSA pase al filtrado, sino que los rendimientos de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina son prácticamente nulos. Por tanto, debe haber interacciones proteína-proteína que dan lugar a radios efectivos distintos de los teóricos y, consecuentemente, a transmisiones diferentes a las esperadas.

**7. INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS
EN LA ULTRAFILTRACIÓN DE
LACTOSUERO**

7.1. INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior parecen indicar que existen interacciones proteína-proteína en la diafiltración de lactosuero. Sin embargo, una de las premisas básicas del modelo propuesto para la simulación de la recuperación de lactoferrina por ultrafiltración de lactosuero fue la consideración de que las proteínas no interactuaban entre sí. No se consideraron que existiesen fenómenos de agregación entre las moléculas de una misma proteína o entre moléculas de distintas proteínas.

El objetivo de este capítulo es comprobar si existe o no interacción entre las proteínas del lactosuero y, sobre todo, cómo afecta a la ultrafiltración de lactosuero. Para ello se han seleccionado 2 proteínas: seroalbúmina bovina y β -lactoglobulina. Estas dos proteínas son dos de las tres proteínas mayoritarias del lactosuero y deberían, además, obtenerse en el filtrado acumulado de la primera etapa de fraccionamiento, por lo que las interacciones podrían influir más que sobre las proteínas que se desean retener. Por otra parte, ambas proteínas presentan un punto isoeléctrico similar y cercano al pH óptimo de la primera etapa. Por consiguiente, si se realiza el estudio al pH óptimo, 5, las interacciones entre ambas proteínas deberían minimizarse. Para realizar dicho estudio se analizarán las filtraciones de los sistemas unitarios y de la mezcla binaria, comparando los flujos de filtrado y transmisiones observadas. Los resultados se discutirán teniendo en cuenta las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Procedimiento experimental

Se realizaron tres experimentos, empleando una membrana de tamaño de corte de 300 kDa, en los que únicamente varió la alimentación (2 L):

- BSA (0.25 g/L)
- β -lactoglobulina (0.25 g/L)
- BSA + β -lactoglobulina (0.125 g/L + 0.125 g/L)

Las dos proteínas modelo utilizadas en estos experimentos fueron suministradas por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y tenían una pureza superior al 90% y 96% para la β -lactoglobulina y BSA, respectivamente.

Todos los experimentos se realizaron en el modo de recirculación total, para mantener condiciones homogéneas en el retenido a lo largo del proceso, y utilizando las siguientes condiciones de operación: caudal de retenido de 400 L/h, 30 °C de temperatura, 1.0 bar de presión transmembrana y pH 5. Se utilizó este pH porque, aparte de ser el valor obtenido como óptimo para la primera etapa de fraccionamiento, es cercano a los puntos isoeléctricos de las dos proteínas, por lo que se minimizan las interacciones. Cada experimento tuvo una duración total de 60 minutos, durante los cuales se monitorizó el flujo de filtrado cada 2 minutos hasta los 20 minutos y, posteriormente, cada 5 minutos hasta el final del experimento. Se tomaron muestras de 1 mL de filtrado instantáneo y de retenido a los 3, 7, 15, 30 y 60 minutos para analizar su composición en BSA y β -lactoglobulina mediante RP-HPLC.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Evolución del flujo de filtrado

En la Figura 7.1 se muestran los flujos de filtrado en función del tiempo para los tres experimentos. Se observa que todas las curvas son similares. Se produjo un descenso brusco del flujo al inicio, durante los 10-14 primeros minutos y, a partir de ese tiempo, el flujo permaneció prácticamente constante hasta el final. A pesar de esto, los valores absolutos de los flujos de filtrado fueron muy diferentes. El mayor valor obtenido fue para la filtración de la disolución unitaria de β -lactoglobulina que presentó un flujo de filtrado a los 2 minutos de 202 L/m²h que disminuyó durante los primeros 10 minutos hasta 167 L/m²h, valor que permaneció constante hasta concluir el experimento. Por tanto, el descenso total del flujo de filtrado desde los 2 minutos hasta los 60, fue de 17.4%, respecto al valor inicial.

Cuando se filtró la disolución unitaria de BSA, los flujos de filtrado fueron mucho menores. A los 10 minutos de filtración, el flujo de filtrado había disminuido de 100 L/m²h, valor a los 2 minutos, hasta 70 L/m²h. En los restantes 50 minutos, este valor decreció hasta los 57 L/m²h finales, produciéndose un descenso total de flujo de filtrado de 42.9% respecto al valor inicial.

En el caso de la filtración de la mezcla binaria se obtuvieron valores intermedios de flujo de filtrado entre los correspondientes a las disoluciones unitarias, pero más cercanos a los obtenidos para la BSA. El flujo a los dos minutos fue 114 L/m²h y disminuyó hasta 80 L/m²h durante los 14 primeros minutos. Durante el resto del experimento, el flujo disminuyó hasta 70 L/m²h, lo que supuso una caída de flujo total de 39.1% respecto al valor inicial.

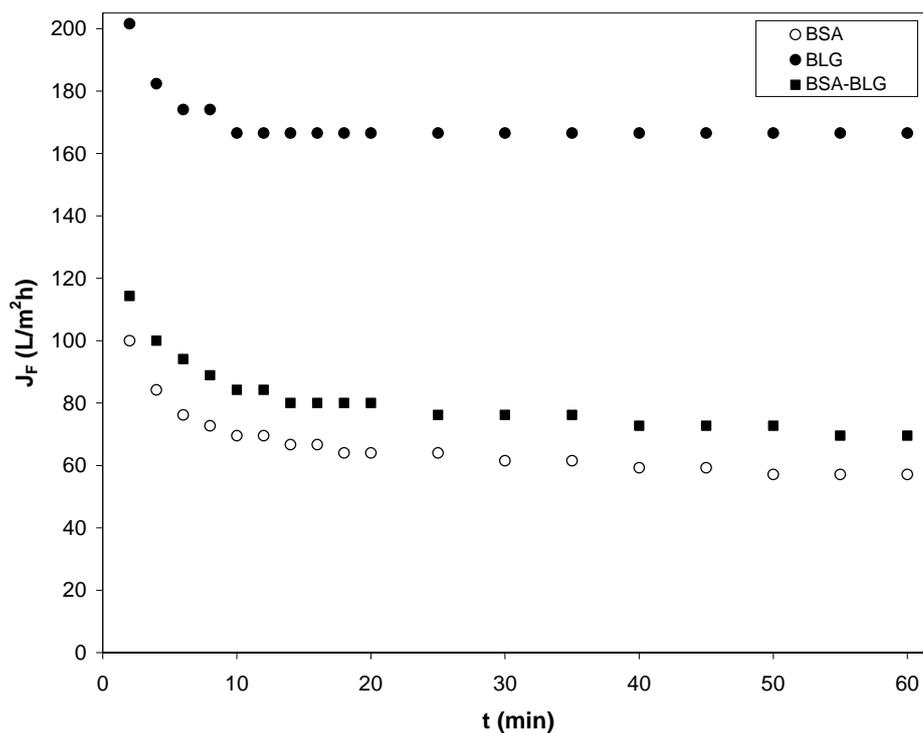


Figura 7.1. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la recirculación total de BSA, β -lactoglobulina y BSA + β -lactoglobulina.

Los datos de flujo de los tres experimentos se ajustaron al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar, con $(J_{F0})_{300kDa}=780.90 \text{ L/m}^2\text{h}$. En la Figura 7.2 se muestran los datos y sus correspondientes ajustes para la filtración de BSA, β -lactoglobulina y la disolución binaria.

En la Tabla 7.1 se indican los parámetros de ajuste del modelo combinado para los tres experimentos.

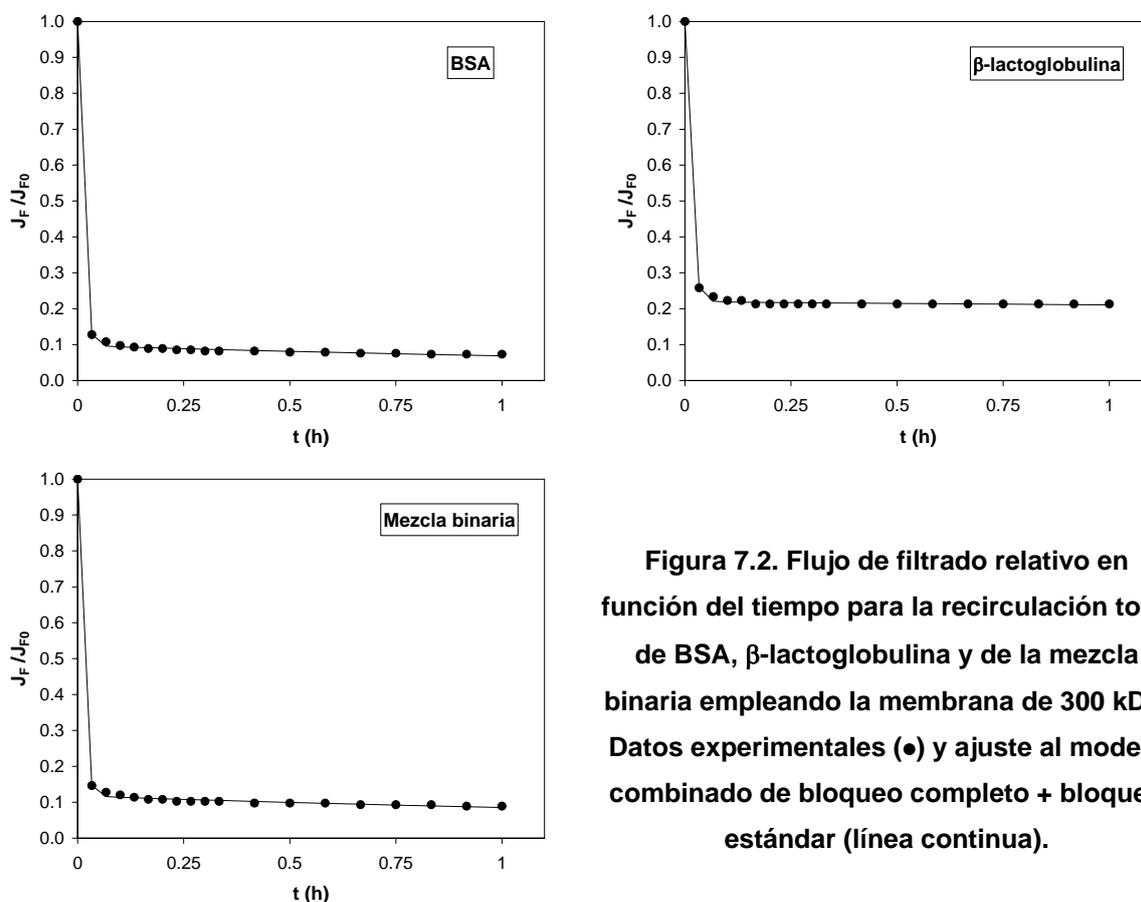


Figura 7.2. Flujo de filtrado relativo en función del tiempo para la recirculación total de BSA, β -lactoglobulina y de la mezcla binaria empleando la membrana de 300 kDa. Datos experimentales (●) y ajuste al modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar (línea continua).

Tabla 7.1. Parámetros de ajuste del modelo combinado de bloqueo completo + bloqueo estándar para la evolución temporal del flujo de filtrado durante la recirculación total de BSA, β -lactoglobulina y de la mezcla binaria.

	α	A (h^{-1})	B (h^{-1})	R^2
BSA	0.9028	99.35	0.1890	0.9997
β -lactoglobulina	0.7808	88.72	0.0205	0.9995
Mezcla binaria	0.8824	100.48	0.1746	0.9995

El parámetro α indica que el mayor bloqueo completo de poros tuvo lugar durante la filtración de la disolución unitaria de BSA y el menor correspondió a la filtración de β -lactoglobulina. El bloqueo correspondiente a la mezcla binaria fue muy similar al de BSA. En cuanto al parámetro cinético de bloqueo completo de poros, A, es muy parecido en los tres casos. Esto justifica que el descenso brusco de flujo se produjo, aproximadamente, en el mismo tiempo para los tres experimentos. El parámetro B es prácticamente coincidente para la BSA y para la mezcla y, casi nulo para la β -lactoglobulina. El valor en este último caso indica que una vez producido el bloqueo completo no se produjo prácticamente bloqueo estándar, lo que resulta en un flujo constante tras el descenso inicial.

7.3.2. Transmisión de proteínas

En la Tabla 7.2 y Tabla 7.3 se muestran las concentraciones de BSA y β -lactoglobulina en retenido y filtrado durante las filtraciones de las disoluciones unitarias y de la mezcla binaria, respectivamente.

Tabla 7.2. Concentración de BSA y β -lactoglobulina en retenido y filtrado durante las filtraciones de las disoluciones unitarias.

	Disolución de BSA		Disolución de BLG	
	C_{R-BSA} (g/L)	C_{P-BSA} (g/L)	C_{R-BLG} (g/L)	C_{P-BLG} (g/L)
0	0.227	0.000	0.245	0.000
3	0.216	0.000	0.214	0.094
7	0.210	0.000	0.218	0.174
15	0.198	0.000	0.218	0.143
30	0.190	0.000	0.223	0.120
60	0.175	0.000	0.227	0.067

Tabla 7.3. Concentración de BSA y β -lactoglobulina en retenido y filtrado durante la filtración de la mezcla binaria.

	BSA + BLG			
	C_{R-BSA} (g/L)	C_{P-BSA} (g/L)	C_{R-BLG} (g/L)	C_{P-BLG} (g/L)
0	0.110	0.000	0.131	0.000
3	0.095	0.002	0.107	0.002
7	0.094	0.010	0.095	0.030
15	0.090	0.017	0.089	0.060
30	0.091	0.017	0.087	0.063
60	0.080	0.012	0.084	0.054

Para evaluar la influencia que tiene la interacción entre proteínas sobre el transporte de proteína a través de la membrana, se evaluó la transmisión observada de BSA y β -lactoglobulina (ecuación [7.1]) para cada experimento.

$$(S_0)_s (\%) = \frac{(C_P)_s}{(C_R)_s} \cdot 100 \quad [7.1]$$

donde $(S_0)_s$, $(C_P)_s$ y $(C_R)_s$ son la transmisión observada, la concentración a la salida del poro (concentración instantánea en el filtrado) y la concentración en el retenido, respectivamente, para la proteína s.

En la Figura 7.3 se muestran las transmisiones observadas de BSA obtenidas para la disolución unitaria y la mezcla binaria. Hay que resaltar que cuando se filtró BSA sola no pasó nada de proteína al filtrado, obteniéndose transmisiones nulas a lo largo de todo el experimento. Por el contrario, sí pasó BSA a través de la membrana cuando se filtró junto con β -lactoglobulina. En este último caso, se produjo un aumento de la transmisión durante los primeros 15 minutos alcanzándose un valor del 19%, que se mantuvo constante hasta el minuto 30 y después disminuyó hasta el valor final del 15%.

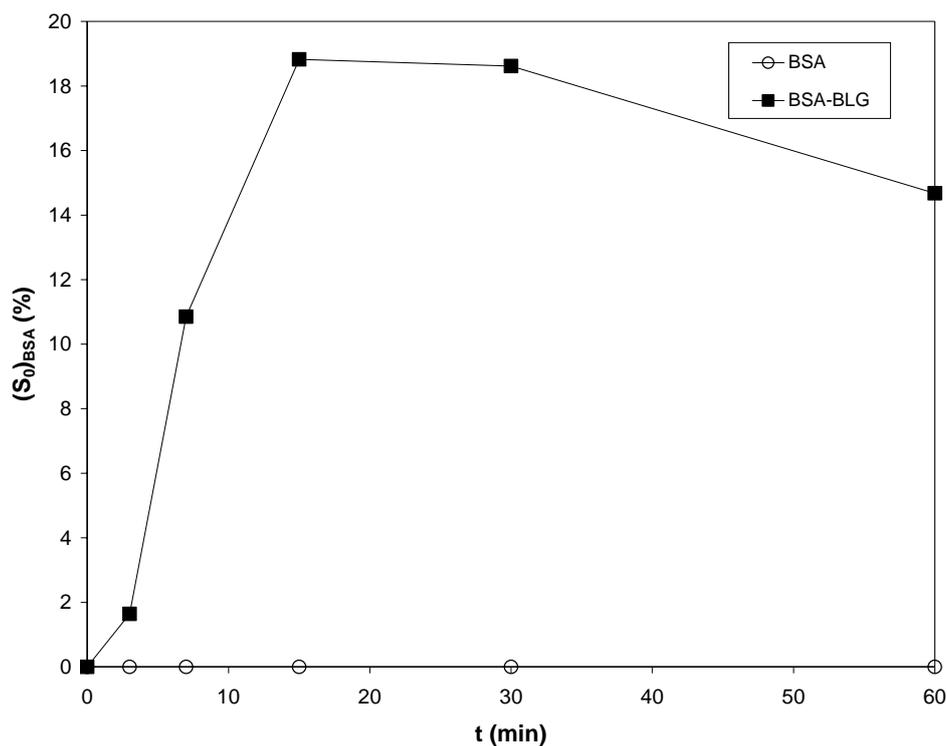


Figura 7.3. Transmisión observada de BSA en función del tiempo para la recirculación total de la disolución unitaria y de la mezcla binaria a pH 5.

La evolución de la transmisión observada de β -lactoglobulina en función del tiempo de filtración para la disolución unitaria y la mezcla binaria se recoge en la Figura 7.4. Se observa que el mayor valor de transmisión observada (80%) se obtuvo para la disolución unitaria a los 7 minutos. A partir de este máximo, se produjo un descenso continuo de la transmisión observada hasta el final del experimento, donde su valor fue del 29%. En la mezcla binaria, las transmisiones de β -lactoglobulina no alcanzaron valores tan elevados pero, desde el minuto 15 hasta el final, la transmisión sólo disminuyó desde 70% a 64%.

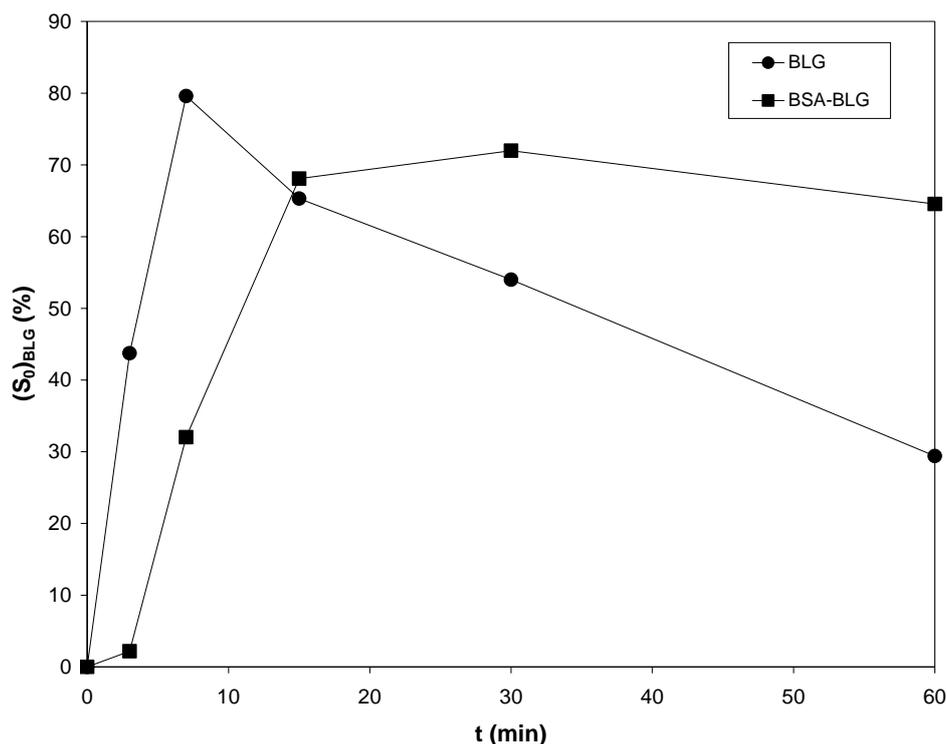


Figura 7.4. Transmisión observada de β -lactoglobulina en función del tiempo para la recirculación total de la disolución unitaria y de la mezcla binaria a pH 5.

Los resultados obtenidos para los flujos de filtrado y las transmisiones observadas parecen indicar que al pH de trabajo, cercano al punto isoelectrico de BSA y β -lactoglobulina, se favorecen las agregaciones de proteínas. El bloqueo completo de poros que se produce en los momentos iniciales de los experimentos y que provoca el descenso brusco del flujo de filtrado puede deberse a que al no existir fuerzas de repulsión entre proteína y membrana, se produce colmatación de la membrana por deposición y adsorción de las proteínas sobre la misma. Además, la formación de agregados unido a la tortuosidad e irregularidad de los poros de la membrana puede favorecer la obstrucción de dichos poros (Persson *et al.*, 2003).

En las filtraciones de las disoluciones unitarias, los mayores valores para los flujos de filtrado y transmisiones observadas obtenidos para la β -lactoglobulina podrían explicarse si se tiene en cuenta el menor tamaño de las moléculas de β -lactoglobulina (peso molecular: 18362 g/mol para el monómero) (Zydney, 1998) frente a las moléculas de BSA (peso molecular: 69000 g/mol) (Zydney, 1998). Para la filtración de la disolución unitaria de β -

lactoglobulina, los resultados parecen indicar que las moléculas no agregadas inicialmente pasaron a través de la membrana consiguiéndose transmisiones elevadas. Pero, probablemente, la agregación de moléculas de β -lactoglobulina disminuyó la transmisión observada tanto por su mayor dificultad para pasar a través de la membrana debido a su mayor tamaño como por provocar una mayor colmatación. En el caso de la disolución unitaria de BSA, los agregados formados debían presentar un gran tamaño que impidió el paso de BSA a través de la membrana, justificándose la ausencia de proteína en el filtrado.

En el caso de la mezcla binaria, las concentraciones de BSA y de β -lactoglobulina son la mitad de las concentraciones de sus respectivas disoluciones unitarias. Por tanto, la colmatación debida a cada proteína sería menor que la de su disolución unitaria. De este modo, los flujos de la mezcla deberían ser muy superiores a los de BSA. Sin embargo, aunque sí son superiores, son muy parecidos. Esto podría deberse a la formación de agregados entre las dos proteínas, que contribuirían a aumentar la suma de las colmataciones individuales de las proteínas. Además, estos agregados mixtos deben ser de menor tamaño que los agregados de BSA, justificándose así la transmisión de BSA en la mezcla binaria. Por otro lado, esta transmisión también podría verse favorecida por la dificultad de formarse agregados de moléculas de BSA en presencia de moléculas de β -lactoglobulina. En cuanto a las transmisiones observadas para la β -lactoglobulina en la mezcla binaria, parecen confirmar la formación de agregados mixtos que impiden que se consigan transmisiones tan elevadas como en la disolución unitaria. Sin embargo, estos agregados mixtos deben ser de menor tamaño que los agregados de β -lactoglobulina, obteniéndose transmisiones más constantes a lo largo del tiempo.

7.4. CONCLUSIONES

El estudio realizado sobre la filtración de disoluciones unitarias de BSA y β -lactoglobulina y de la mezcla modelo de las mismas, han dado lugar a las siguientes conclusiones:

- En las disoluciones unitarias predomina la formación de agregados, favorecida por la proximidad al punto isoelectrico de ambas proteínas. Estas agregaciones influyeron sobre el flujo de filtrado y transmisiones, especialmente en el caso de la BSA ya que impidieron el paso de proteína al filtrado.
- En la filtración de la mezcla binaria, la presencia de otra proteína puede dificultar la formación de agregados y, además, parece que da lugar a agregados mixtos, que son de menor tamaño que los agregados de cada una de las proteínas. Como resultado de estas interacciones se obtuvieron flujos de filtrado menores que los previstos, se produjo transmisión de BSA y la transmisión de β -lactoglobulina no descendió bruscamente sino que se mantuvo prácticamente constante desde el minuto 15 de experimento.

8. INFLUENCIA DEL pH EN EL FRACCIONAMIENTO DE LACTOSUERO

8.1. INTRODUCCIÓN

En la simulación realizada para la recuperación de lactoferrina por ultrafiltración de lactosuero, se obtuvieron como condiciones óptimas para la primera etapa del fraccionamiento las siguientes:

- Etapa 1: pH = 5.04, $r_p = 31.0$ nm, I = 0.0082 M, N = 2.59

En el capítulo 5 se propuso un pretratamiento del lactosuero que mejoraba los flujos de filtrado y permeabilidad de proteínas a través de la membrana mediante eliminación de complejos lipídicos y partículas de fosfato cálcico. Con este proceso se consigue, además, un acercamiento al valor óptimo de la fuerza iónica. Por otro lado, el estudio realizado sobre la diafiltración de lactosuero con membranas comerciales con tamaño cercano al radio de poro óptimo permitió seleccionar la membrana de 300 kDa como la más adecuada para realizar el fraccionamiento de esta primera etapa. El análisis de las filtraciones de disoluciones unitarias y de la mezcla binaria puso de manifiesto la importancia de las interacciones proteína-proteína. Con la diafiltración de lactosuero pretratado, empleando la membrana de 300 kDa y el pH óptimo, 5, se confirmó la influencia de las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana durante la ultrafiltración. Dada la complejidad del lactosuero como mezcla real de proteínas, factores de crecimiento, lactosa, oligosacáridos, sales, materias grasas, minerales y otros compuestos minoritarios, resulta muy complicado cuantificar de forma individualizada las posibles interacciones electrostáticas existentes. Por tanto, se hace necesario estudiar experimentalmente el efecto de la carga de las proteínas y, por consiguiente, el efecto del pH, en el fraccionamiento del lactosuero para poder determinar el pH óptimo para la primera etapa.

De este modo, el objetivo de este capítulo es estudiar el efecto que tiene el pH de trabajo sobre el fraccionamiento de las proteínas del lactosuero clarificado. Este estudio se realizará sobre la primera etapa del proceso en la que se pretenden obtener dos fracciones: (1) un filtrado con un porcentaje significativo de la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA original y (2) un retenido enriquecido en inmunoglobulinas y lactoferrina. Durante los 4 diavolumenes del proceso de diafiltración continua, se analizarán los flujos de filtrado en función del tiempo así como la composición en proteína individual, determinando los rendimientos en retenido y filtrado acumulado de cada una de las proteínas. Los resultados

se tratarán de discutir en función de las posibles interacciones proteína-proteína y proteína-membrana.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1. Procedimiento experimental

Se realizaron experimentos en el modo de diafiltración continua, utilizando 2 L de lactosuero ácido pretratado como alimentación, concluyendo cada experimento al alcanzarse 4 diavolúmenes. Las condiciones de operación empleadas fueron: caudal de retenido de 400 L/h, 30 °C de temperatura y 1.0 bar de presión transmembrana, para trabajar en la zona controlada por la presión (Figura 8.1). Se ensayaron los siguientes valores de pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. En cada experimento se monitorizó el flujo de filtrado cada 50 g recogidos y se retiraron muestras de 1.0 mL de retenido y filtrado acumulado cada diavolumen para analizar la cantidad de proteína individual (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, IgG y LF) mediante RP-HPLC.

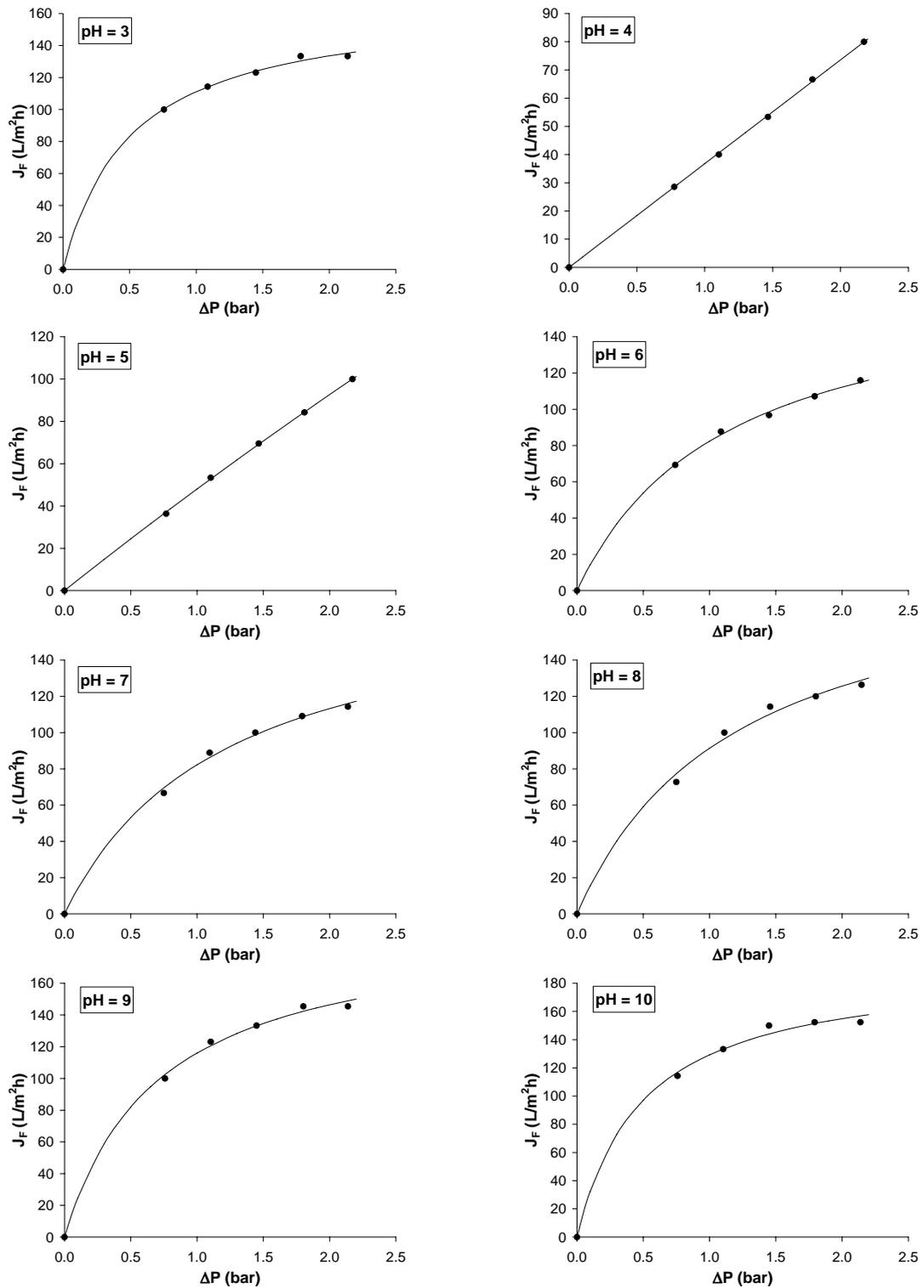


Figura 8.1 Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 3-10.

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Evolución del flujo de filtrado

Los datos obtenidos de flujo de filtrado en función del tiempo para los pHs indicados se representan en la Figura 8.2. Se observan dos tipos de comportamiento: A) curvas típicas caracterizadas por un descenso brusco de flujo en los instantes iniciales del experimento seguido por un flujo prácticamente constante hasta el final del mismo, obtenidas para pH 4, 5, 6, 7 y 8, y B) curvas con flujos oscilantes o ascendentes a lo largo de todo el proceso, obtenidas para los valores extremos de pH, es decir, 3, 9 y 10. Así, al menor pH ensayado, pH 3, se obtuvo un flujo inicial de 68 L/m²h. Después de este punto se produjo un aumento lineal, alcanzándose 85 L/m²h después de 2.2 h al final de los 4 diavolumenes. Las filtraciones más lentas tuvieron lugar a pH 4 y 5. Los flujos de filtrado disminuyeron desde un valor inicial de 40 y 51 L/m²h, respectivamente, hasta 25 L/m²h en las primeras 3 horas, permaneciendo prácticamente constante hasta el final del proceso (más de 6 horas). Las curvas obtenidas para pH 6 y 7 fueron casi idénticas. El principal descenso (desde 65 hasta 42 L/m²h) se obtuvo en las primeras 2 horas, después se mantuvo constante hasta las 3.8 h. Se observó un comportamiento similar a pH 8, decayendo desde 73 a 50 L/m²h con un tiempo total de experimento de 3.2 h. Para pH 9 se obtuvo una curva con oscilaciones. El flujo de filtrado disminuyó desde 91 a 80 L/m²h en 1 hora. Después, se mantuvo un flujo de 87 L/m²h hasta las 2.1 h. Finalmente, la diafiltración más rápida se consiguió a pH 10. En este experimento, el flujo aumentó casi linealmente desde los 89 L/m²h iniciales hasta los 125 L/m²h finales en 1.6 h totales.

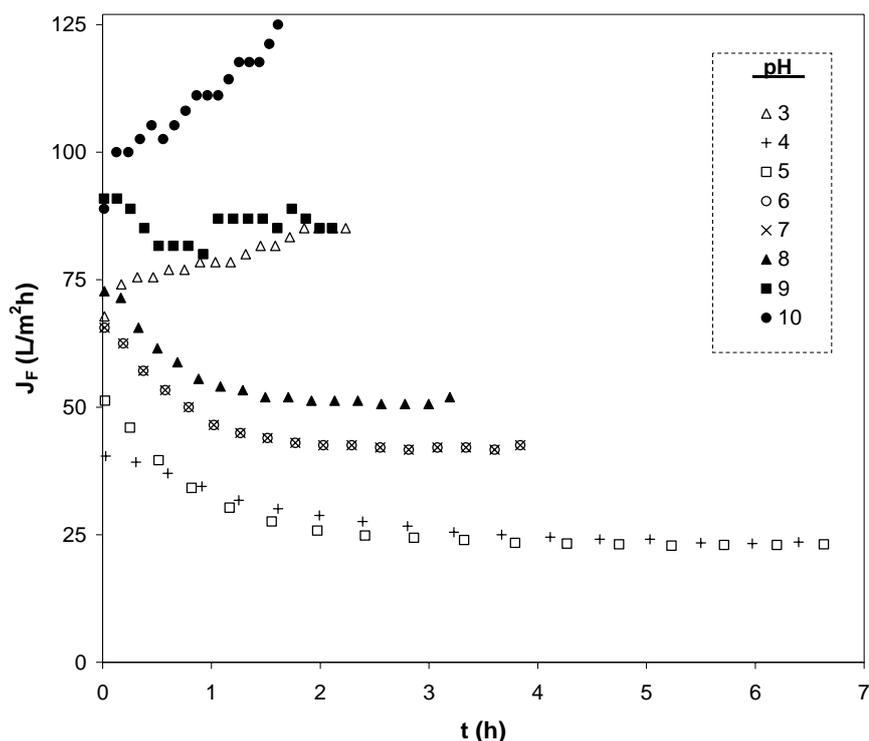


Figura 8.2. Evolución temporal del flujo de filtrado para varios valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado.

Para explicar la evolución temporal del flujo de filtrado en una diafiltración continua, hay que considerar los dos fenómenos opuestos que tienen lugar. En primer lugar, si se produce transmisión de proteína a través de la membrana, la concentración total de proteína en retenido disminuye durante el proceso, lo que favorece el aumento de flujo de filtrado. Por otro lado, la colmatación de la membrana debida a la adsorción de proteínas en su superficie y/o el interior de los poros provoca una disminución del flujo de filtrado. Ambos mecanismos (dilución-colmatación) dependen principalmente de las interacciones proteína-proteína y proteína-membrana, determinadas por la posición relativa del pH de trabajo respecto a los puntos isoeléctricos de las proteínas del lactosuero y el punto de carga cero de la membrana. De este modo, a los valores de pH extremos (3 y 10), todas las proteínas del lactosuero y la membrana tienen carga de igual signo (positiva y negativa, respectivamente). La colmatación, que no se ve favorecida debido a la repulsión, es dominada por el fenómeno de dilución en el tanque de retenido, dando lugar a un aumento en el flujo de filtrado con el tiempo. Por el contrario, a pH 4 y 5 (alrededor del punto

isoelectrico de las proteínas del lactosuero más abundantes) la colmatación domina debido a la deposición sobre la membrana de los agregados de las moléculas descargadas de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA. Esto provocaría el descenso brusco del flujo durante la primera parte del proceso hasta alcanzar un estado estacionario, probablemente debido al efecto de barrido de la corriente tangencial de retenido.

8.3.2. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado

Para evaluar las características filtrantes de la membrana en cada uno de los valores de pH ensayados, se monitorizó durante los 4 diavolumenes de operación los rendimientos de proteína individual tanto para el retenido ($\eta_{R\text{-proteína}}$) como para el filtrado acumulado ($\eta_{F\text{-proteína}}$). La composición del lactosuero ácido pretratado utilizado como alimentación en todos los experimentos se recoge en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1. Concentración inicial de las proteínas individuales del lactosuero ácido pretratado.

Proteína	C_{R0} (g/L)
ALA	1.00
BLG	2.70
BSA	0.10
IgG	0.40
LF	0.04

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los distintos fraccionamientos. En primer lugar se expondrán los rendimientos de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA en retenido y filtrado (la estrategia de esta etapa era obtenerlas en el filtrado) y en segundo lugar, los rendimientos de inmunoglobulinas y lactoferrina en retenido y filtrado (cuyo objetivo era que permaneciesen en retenido).

➤ *α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA*

Los rendimientos de α -lactoalbúmina en función del pH y del número de diavolumenes se muestran en la Figura 8.3. En todos los casos, la principal variación en el rendimiento fue obtenida en los primeros 2 diavolumenes, con sólo pequeñas variaciones en los otros 2 diavolumenes. Esto podría deberse a la colmatación de la membrana, que podría impedir el transporte de proteína al final del proceso. Se puede observar que las curvas para el retenido y el filtrado acumulado son prácticamente simétricas con respecto a una línea imaginaria que pasa por rendimiento igual a 0.5. Se observaron tres comportamientos diferentes. Para pH 4 y 5 se obtuvieron rendimientos muy bajos en filtrado acumulado, lo que supuso la retención en retenido de prácticamente toda la α -lactoalbúmina. Para pH 3, 6 y 10 los rendimientos en filtrado acumulado fueron superiores al 40% pero inferiores al 50%. Finalmente, a pH 7, 8 y 9 se consiguieron los mayores rendimientos en filtrado acumulado, ya que más del 50% de la proteína original pasó a través de la membrana.

Los rendimientos de β -lactoglobulina en retenido y filtrado acumulado se muestran en la Figura 8.4. De nuevo, se obtuvieron curvas simétricas y los principales cambios ocurrieron en los primeros 2 diavolumenes. A pH 4 y 5 no se observó transmisión significativa de proteína. Por el contrario, las máximas transmisiones se consiguieron a pH 3, 7, 8 y 9, en los que el rendimiento en filtrado aumentó hasta el 33% aproximadamente, quedando en retenido sobre el 67% de la proteína inicial. A pH 6 y 10 se obtuvieron rendimientos en filtrado un poco inferiores (20%).

En la Figura 8.5 se muestran los rendimientos para la BSA. No se apreció transmisión alguna de BSA en ninguno de los pHs ensayados, y los rendimientos en retenido fueron cercanos a 1.0 en todos los casos.

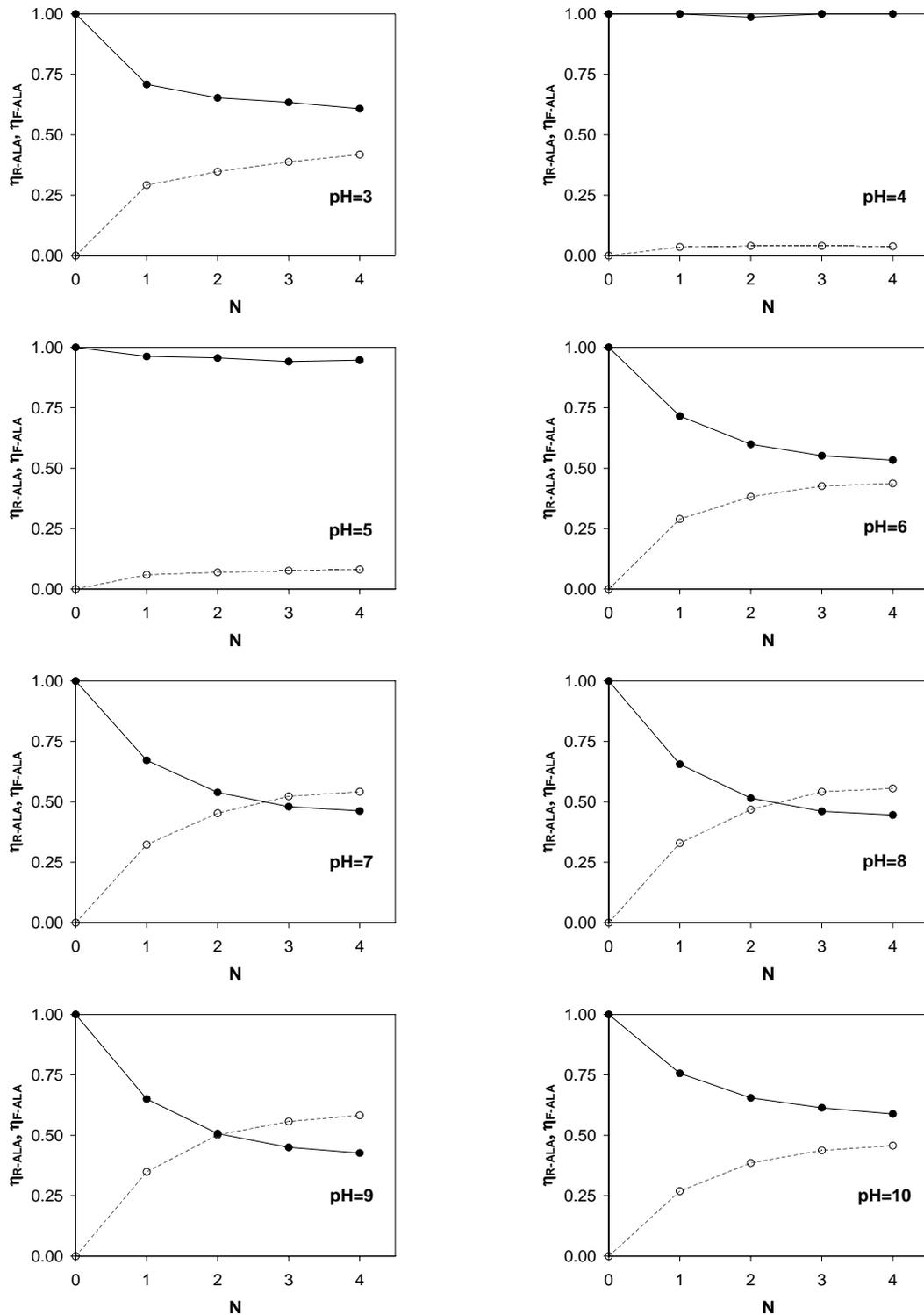


Figura 8.3. Rendimiento de α -lactoalbúmina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavómenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado.

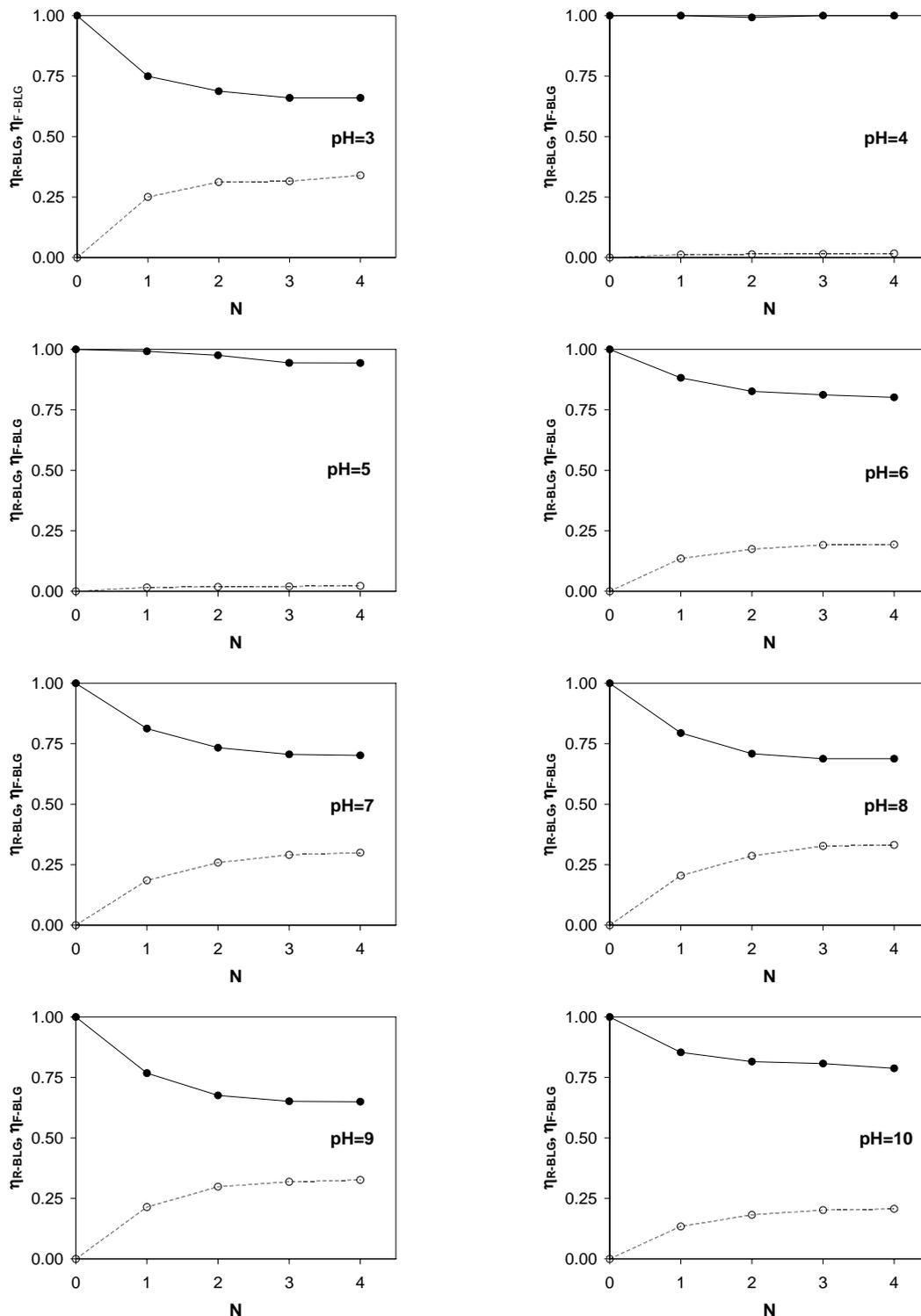


Figura 8.4. Rendimiento de β -lactoglobulina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavómenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado.

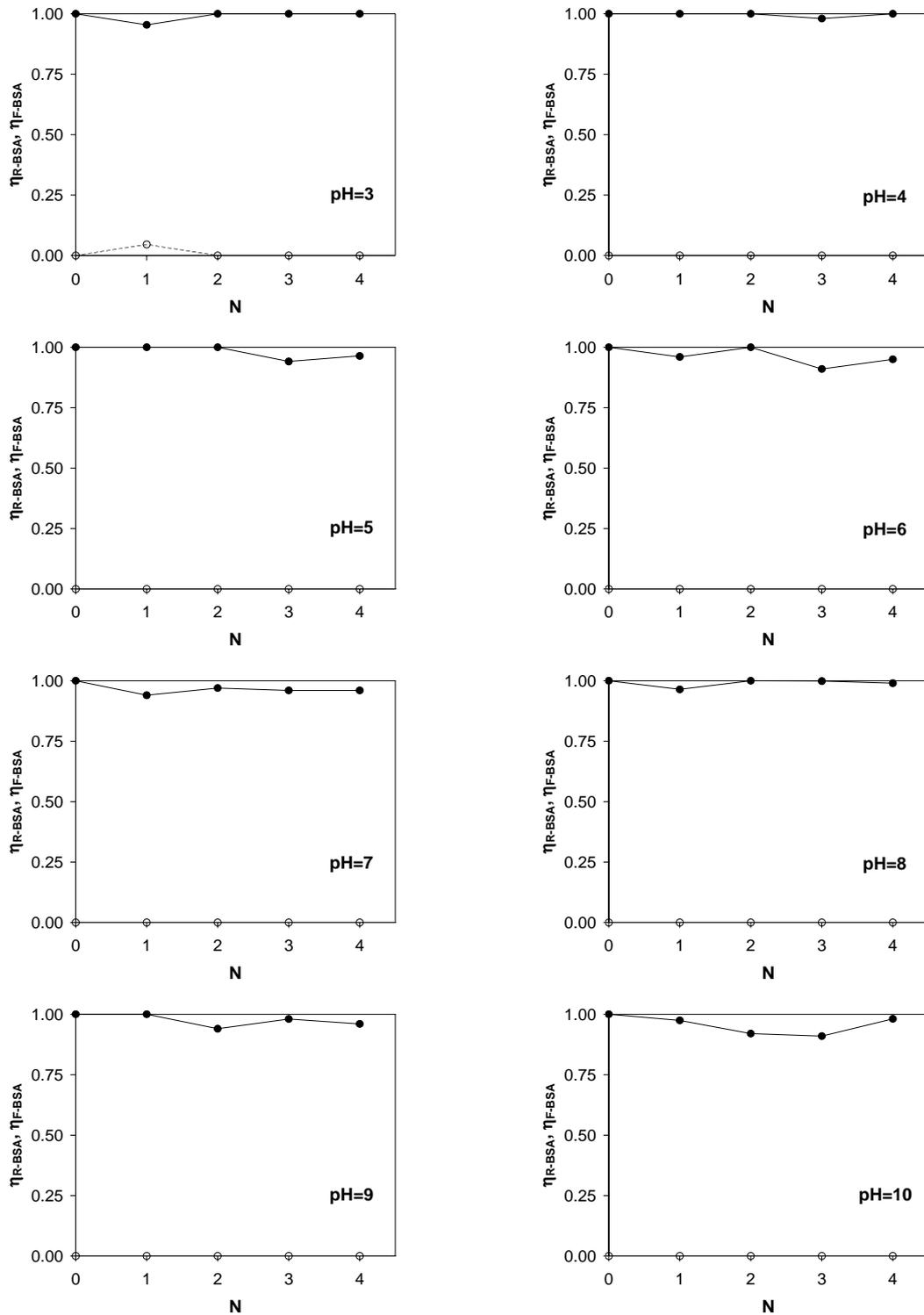


Figura 8.5. Rendimiento de BSA en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado.

Si se considera sólo el peso molecular de los monómeros (α -lactoalbúmina, 14 kDa; β -lactoglobulina, 18 kDa; BSA, 69 kDa), se podría pensar que tanto α -lactoalbúmina como β -lactoglobulina deberían pasar libremente a través de la membrana y que la BSA también podría pasar al filtrado, aunque con mayor dificultad. Sin embargo, no se obtuvo transmisión de BSA en ningún caso. Estos resultados parecen indicar que existen interacciones proteína-proteína (entre las propias moléculas de BSA o con las moléculas de otras proteínas) que aumentan el radio efectivo de la BSA y, por tanto, impiden su paso a través de la membrana. En cuanto a los rendimientos en filtrado de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, tuvieron valores muy diferentes en función del ambiente electrostático. Esto se debe a que la agregación de las moléculas de proteína es dependiente del pH. Por ejemplo, a pH 4 y 5 ambas proteínas están esencialmente descargadas, por lo que se forman grandes agregados de hasta 8 moléculas (Boye *et al.*, 1997; Taulier y Chalikian, 2001), resultando transmisiones muy bajas de proteína. Para los valores de pH en el intervalo 7-9, cercanos al punto de carga cero de la membrana, las interacciones entre las proteínas y la membrana se minimizan, consiguiéndose las transmisiones más altas. Cuando las proteínas y membrana se repelen (es decir, a pH 3 y 10), los valores de los rendimientos en filtrado acumulado fueron mayores de los esperados, probablemente debido a la importancia del transporte convectivo de soluto como consecuencia del flujo de filtrado elevado. Un caso especial ocurrió para la β -lactoglobulina a pH 3, donde se presenta como monómero y, de ahí, que los rendimientos en filtrado fueran tan elevados como los obtenidos en el rango 7-9.

➔ *Inmunoglobulinas y lactoferrina*

Los rendimientos de IgG se representan en la Figura 8.6. Toda la IgG inicial permaneció en el retenido para pH 4, 8, 9 y 10. Para pH 3, 6 y 7, se obtuvieron curvas simétricas con rendimientos en retenido elevados (85-89%). En el caso de pH 5, se observó un comportamiento especial. Aunque el rendimiento en filtrado acumulado fue nulo, sólo el 53% de la IgG original permaneció en el retenido.

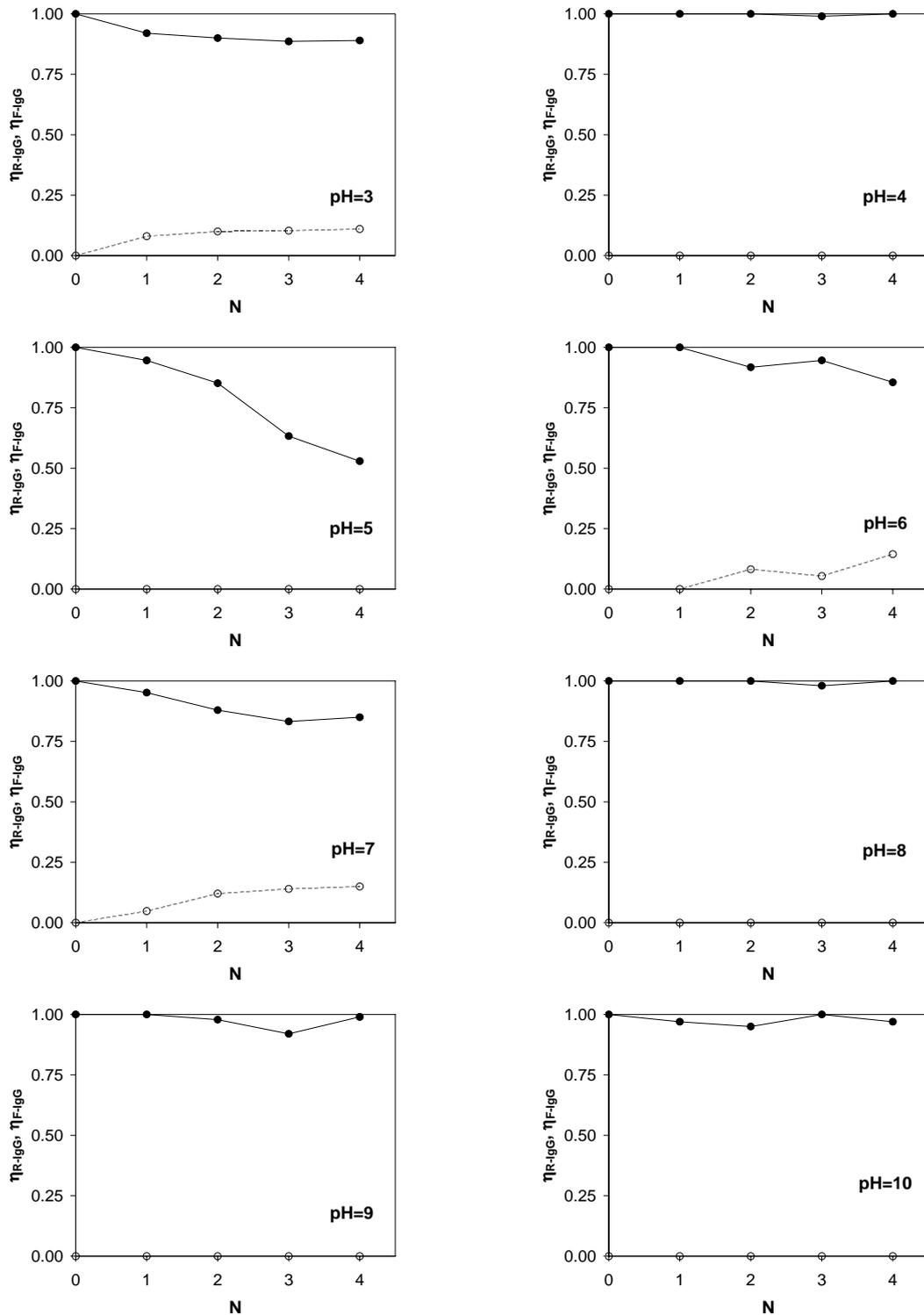


Figura 8.6. Rendimiento de IgG en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado.

Los rendimientos para la lactoferrina se muestran en la Figura 8.7. Los rendimientos en filtrado acumulado fueron nulos en todos los casos. A los valores extremos del pH (3 y 10), el rendimiento en retenido fue 100%. En el experimento correspondiente a su punto isoeléctrico, pH 9, el rendimiento en retenido final fue elevado, 91%. Sin embargo, en el resto de experimentos, los rendimientos en retenido fueron muy inferiores, principalmente a pH 5 y 7, en los cuales sólo el 26% de la lactoferrina inicial permaneció en el retenido tras los 4 diavolúmenes.

Se observa que estas proteínas no pasaron a través de la membrana, debido a sus mayores tamaños moleculares (IgG, 150-1000 kDa; LF, 78 kDa).

La pérdida de cantidades importantes de IgG a pH 5 y lactoferrina a pH 4-9 pueden deberse a tres posibles causas: (1) adsorción de proteína sobre la membrana; (2) desnaturalización de la proteína por el esfuerzo de cizalladura causado por la circulación de la corriente de retenido a altas velocidades (Cheryan, 1998); (3) la asociación de proteína con otras proteínas. Por ejemplo, la lactoferrina forma complejos no covalentes con la β -lactoglobulina o la BSA con razones molares 2:1 y 1:1, respectivamente, siempre que no exista repulsión proteína-proteína, es decir, no se formarían estos complejos cuando la lactoferrina se encuentre neutra o cargada con igual signo que las otras proteínas. Esta agregación se ve favorecida durante la diafiltración debido a la elución de los iones salinos en solución, que están en equilibrio con iones unidos a las cargas locales de las proteínas.

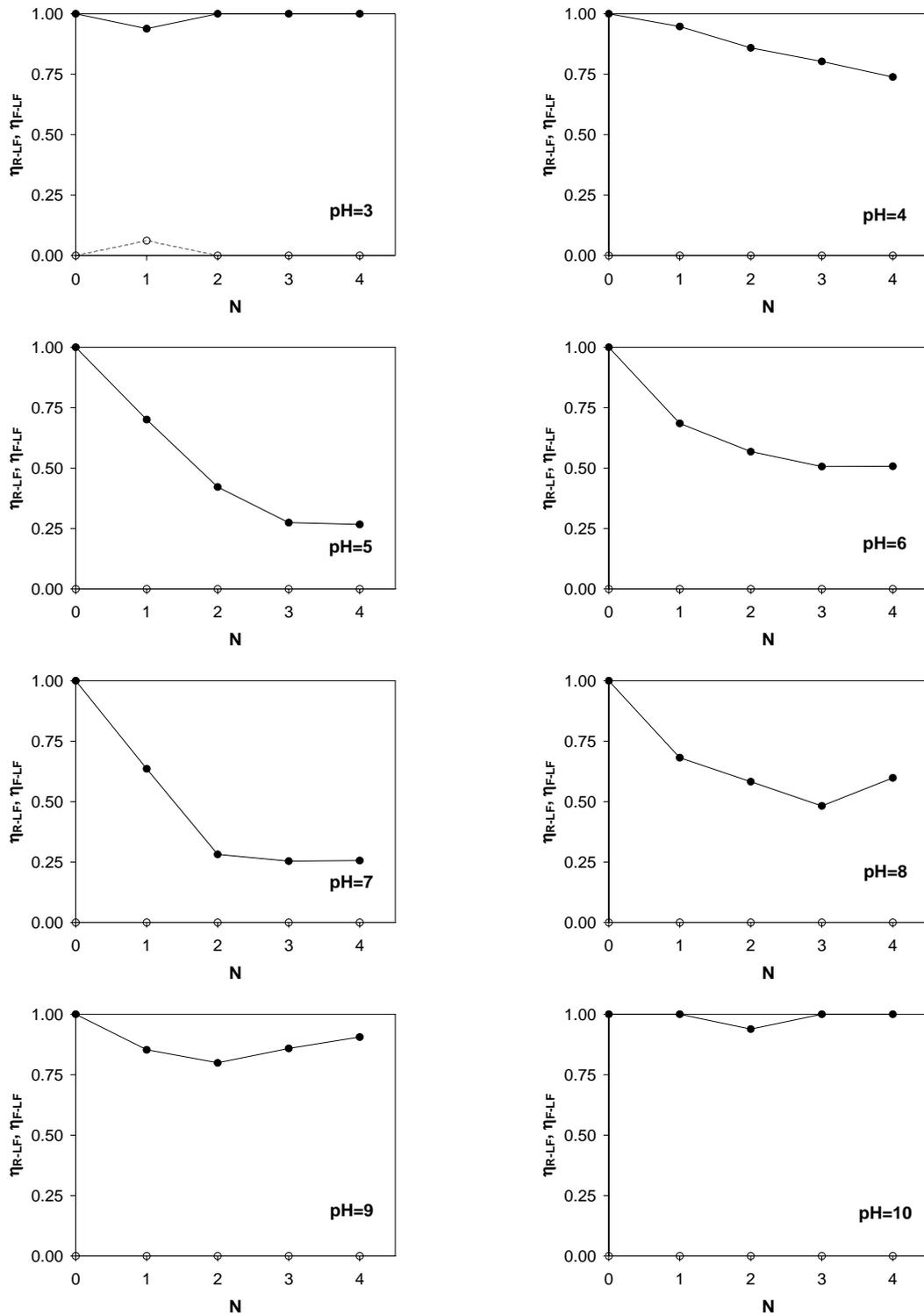


Figura 8.7. Rendimiento de lactoferrina en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes a diferentes valores de pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido bovino pretratado.

8.3.3. Mejora de la pureza de las proteínas retenidas

Los resultados indicados en el apartado anterior muestran algunas tendencias generales. Excepto para pH 4 y 5, los rendimientos de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina en filtrado acumulado fueron importantes. Por otro lado, para el resto de proteínas estudiadas, las transmisiones a través de la membrana fueron prácticamente nulas. Esto sugiere que la membrana de 300 kDa podría emplearse para el fraccionamiento del conjunto inicial de proteínas del lactosuero en dos partes: α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina en el filtrado y BSA, IgG y LF en el retenido. Para evaluar cualitativamente esta posibilidad de fraccionamiento se calculó la mejora en la pureza experimentada por las proteínas retenidas.

La pureza en el lactosuero original para BSA, IgG y lactoferrina se calculó como la relación entre la concentración de proteína individual y la suma de las concentraciones de las 5 proteínas. Los valores obtenidos fueron: BSA, 2.4%; IgG, 9.4%; y LF, 0.9%. La pureza al final del proceso de ultrafiltración se calculó del mismo modo pero considerando los valores de las concentraciones a los 4 diavolumenes. Finalmente, el factor de mejora de pureza se calcula como la relación entre la pureza final y la inicial. Por tanto, valores del factor superiores a 1 implican que el proceso ha sido satisfactorio ya que la pureza de la proteína ha aumentado. Por el contrario, valores inferiores a 1 implican un efecto negativo de la ultrafiltración ya que las proteínas en retenido estarían menos puras que en el lactosuero original.

Los datos del factor de mejora de pureza para BSA, IgG y LF para todo el intervalo de pHs ensayados se muestran en la Figura 8.8. En el caso de la BSA, los mayores incrementos, alrededor del 50%, se consiguieron a pH 3 y 9. Para la IgG, el factor de mejora de pureza disminuyó desde 1.3 a pH 3 hasta 0.6 a pH 5 y después aumentó hasta el óptimo, 1.6, a pH 9. Finalmente, para la lactoferrina sólo se consiguieron mejoras de pureza en los pH extremos, con un valor máximo de 1.5 a pH 3 y 9. Por tanto, si el objetivo es fraccionar BSA, IgG y LF de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina con la membrana de 300 kDa, el pH de trabajo debería ajustarse a 3 o 9. Además ambos valores podrían ser igual de apropiados ya que los tiempos de filtración necesarios para completar los 4 diavolumenes fueron casi idénticos (2.2 y 2.1 h, respectivamente).

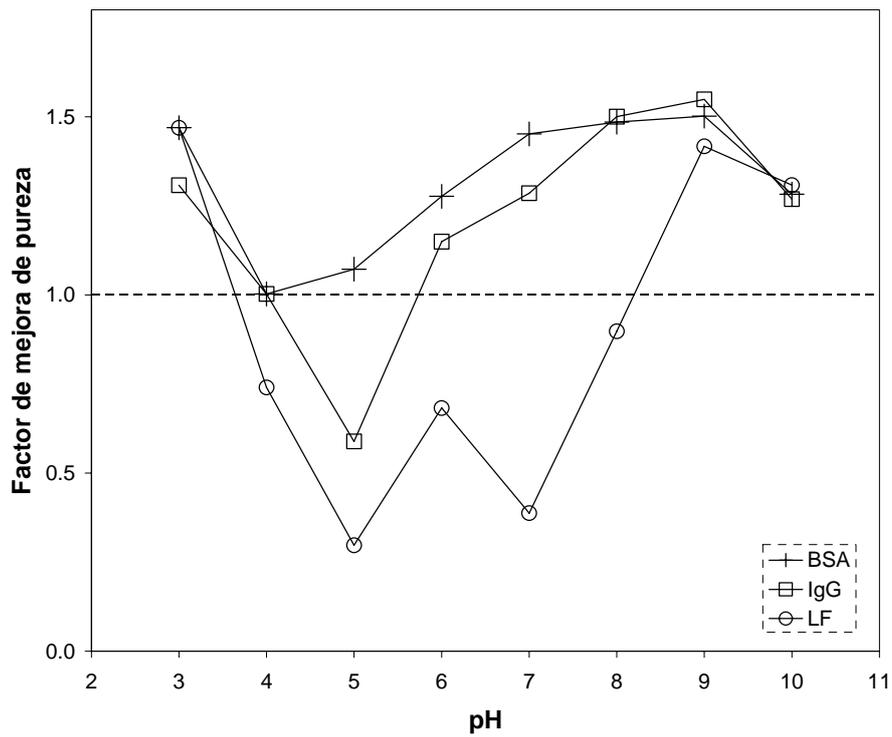


Figura 8.8. Factor de mejora de pureza conseguido para las proteínas retenidas (BSA, IgG y LF) en función del pH para la diafiltración continua de lactosuero ácido pretratado.

8.4. CONCLUSIONES

El estudio realizado acerca del efecto del pH sobre el fraccionamiento de las proteínas del lactosuero ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

- Los flujos de filtrado más bajos se obtuvieron a pH 4 y 5, es decir, a pHs cercanos al punto isoeléctrico de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA. Esto se debe a la colmatación de la membrana, causada principalmente por la deposición de agregados de las moléculas de proteína descargada, que lleva consigo el taponamiento de los poros e implica una caída pronunciada del flujo fundamentalmente en los dos primeros diavolumenes de operación.
- A valores de pH extremos, 3 y 10, la repulsión entre las proteínas y entre las proteínas y la membrana dificultan la colmatación y, por tanto, domina el fenómeno de dilución en el tanque de retenido, dando lugar a un aumento continuado del flujo de filtrado durante el proceso.
- Las proteínas de menor peso molecular, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, fueron eluidas a través de la membrana. Para estas proteínas se obtuvieron los mayores rendimientos en filtrado acumulado en los pHs cercanos al punto de carga cero de la membrana, pH 7-9, con valores de hasta 58% y 33% para α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, respectivamente. Los menores rendimientos en filtrado acumulado correspondieron a pH 4 y 5, con menos de 8% y 2% para α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, respectivamente. Estos valores tan bajos se deben a la presencia de agregados de proteína.
- Las proteínas de mayor peso molecular, BSA, inmunoglobulinas y lactoferrina, fueron preferentemente retenidas. Sin embargo, se observaron pérdidas del 47% de IgG a pH 5 y, de forma más importante, de lactoferrina en el intervalo 4-9, llegando a perderse hasta el 74% de la proteína inicial a pH 5 y 7. Estas pérdidas de proteína pudieron deberse a la adsorción sobre la membrana, a la desnaturalización por esfuerzo de cizalladura y/o a la asociación entre proteínas.
- La pureza de las proteínas retenidas se mejora un 50% a pH 3 y 9.

**9. ESTRATEGIA DE FRACCIONAMIENTO
DE LACTOSUERO PARA LA
RECUPERACIÓN DE LACTOFERRINA**

9.1. INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del pH han puesto de manifiesto que la pureza de LF se mejora en un 50% sólo a pHs 3 y 9. Por otro lado, también cabe destacar los rendimientos conseguidos en elución de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina a pH 7. Además, a este pH la β -lactoglobulina no se encuentra desnaturalizada (la desnaturalización se produce a pHs > 8), no se adiciona prácticamente fuerza iónica puesto que el pH del lactosuero clarificado es 7.3, y está cercano al punto de carga cero de la membrana. Sin embargo, este pH no sería adecuado para la obtención de lactoferrina puesto que se pierde el 74% de la proteína inicial.

La simulación de obtención de lactoferrina indicó para la primera etapa de fraccionamiento un número de diavolúmenes, N, óptimo de 2.59. Sin embargo, después de 4 diavolúmenes no se obtuvo el rendimiento de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina óptimo para ningún valor de pH. Para obtener un N adecuado para la primera etapa de la estrategia se estudiará la diafiltración de lactosuero a pH 9 ya que, a este pH, el flujo de filtrado es oscilante porque existe un equilibrio entre la colmatación de la membrana y la dilución debida a la diafiltración. Se analizará el proceso llegando hasta N = 8, bien con una sola etapa de 8 diavolúmenes o con dos etapas de 4 diavolúmenes con una limpieza intermedia. Otros autores han llegado a estudiar procesos con números de diavolúmenes bastante más elevados, como por ejemplo, 16 (Cheang y Zydney, 2003) o 80 (van Reis et al., 1997), valores demasiado elevados y no muy viables a escala industrial.

Tras el estudio de la influencia del pH en la primera etapa de fraccionamiento, se concluye que la BSA no atraviesa la membrana en ningún caso. Por tanto, el nuevo objetivo de la segunda etapa de fraccionamiento será intentar retirar BSA en el filtrado acumulado. Los agregados de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y de la propia BSA pudieron ser la causa de la falta de transmisión de BSA a cualquier valor de pH. Como en la primera etapa se retira una importante cantidad de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, durante la segunda etapa del fraccionamiento la cantidad de agregados de estas proteínas se minimizarán. De este modo, la segunda etapa se realizará al punto isoeléctrico de la BSA, pH 4.9, para maximizar la transmisión de esta proteína a través de la membrana (Burns y Zydney, 1999; Howell et al., 1999; Ricq et al., 1999; De la Casa et al., 2007).

El objetivo de este capítulo es: por un lado, obtener el número de diavolúmenes adecuado para la primera etapa de fraccionamiento, y por otro lado, proponer una estrategia en dos etapas de diafiltración continua para la obtención de lactoferrina o α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina mediante fraccionamiento de lactosuero. Para ello se estudiarán tres estrategias en las que variará el pH de la primera etapa (3, 7 y 9). La segunda etapa se realizará a pH 4.9 en todos los casos. En cada estrategia se analizará el flujo de filtrado, los rendimientos de proteína en filtrado acumulado y retenido y la pureza de LF o α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, según el caso, a lo largo del proceso.

9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.2.1. Composición del lactosuero ácido pretratado

El lactosuero ácido pretratado utilizado como alimentación en todos los experimentos de este capítulo presentó una composición media en proteínas individuales indicada en la Tabla 9.1.

Tabla 9.1. Concentración inicial de las proteínas individuales del lactosuero ácido pretratado.

Proteína	C_{R0} (g/L)
ALA	1.00
BLG	2.70
BSA	0.10
IgG	0.40
LF	0.04

9.2.2. Selección del número de diavolúmenes adecuado para la primera etapa

Durante un proceso de filtración se produce colmatación de la membrana. Este ensuciamiento supone una resistencia adicional que puede dar lugar a la disminución de la cantidad de proteína que pasa a través de la membrana. Para comprobar si durante la diafiltración continua de lactosuero se produce este fenómeno y, así, poder seleccionar el número de diavolúmenes adecuado para la primera etapa del proceso, se realizaron dos experimentos a pH 9 y con un número de diavolúmenes total de 8. En el primer ensayo, se diafiltraron 2 L de lactosuero durante 8 diavolúmenes (N=8). En el segundo experimento se diafiltraron 2 L de lactosuero durante 4 diavolúmenes y, empleando otra membrana limpia se diafiltró el retenido final anterior durante 4 diavolúmenes más (N=4+4). En ambos experimentos se utilizó un caudal de retenido de 400 L/h, 30°C de temperatura y 1.0 bar de presión transmembrana para trabajar en la zona controlada por la presión (Figura 9.1 y

Figura 9.2). Durante los procesos se monitorizaron el flujo de filtrado y los rendimientos de proteína individual en retenido y filtrado acumulado mediante análisis por RP-HPLC.

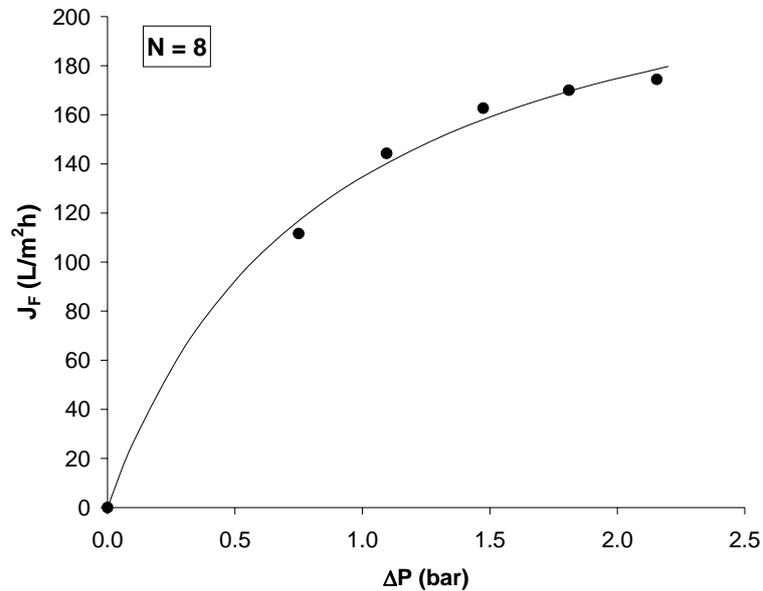


Figura 9.1. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 9 durante 8 diavolumenes.

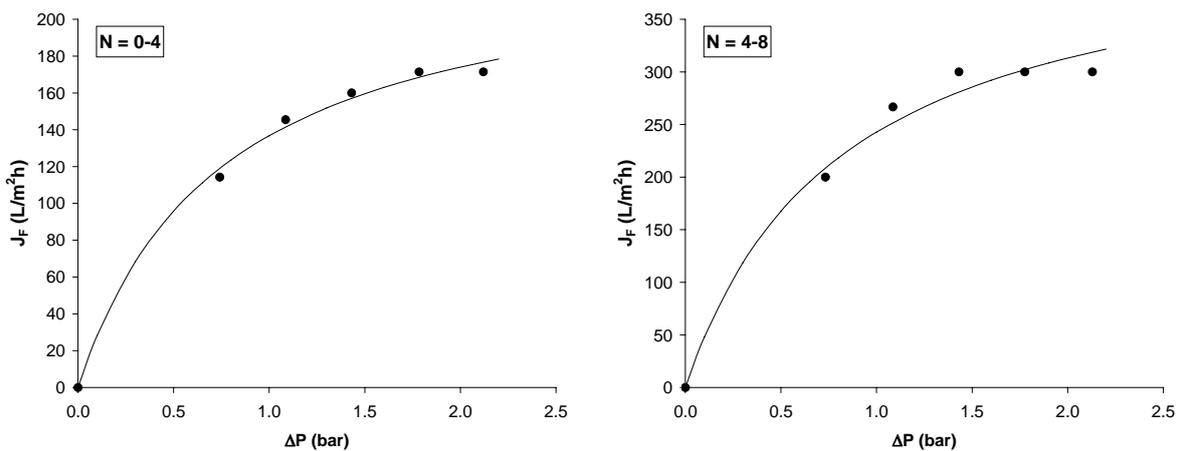


Figura 9.2. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la filtración de lactosuero pretratado a pH 9 durante 4 + 4 diavolumenes.

9.2.2.1. Evolución del flujo de filtrado

Los flujos de filtrado en función del tiempo de diafiltración tanto para el experimento de 8 diavolúmenes como para el experimento de 4 diavolúmenes y otros 4 diavolúmenes con otra membrana limpia (N=4+4) se muestran en la Figura 9.3. La línea discontinua corresponde al tiempo final (1.61 h) de los primeros 4 diavolúmenes del experimento 4+4. En el ensayo de 8 diavolúmenes, los primeros 8 L de filtrado acumulado se consiguieron tras 1.58 h de diafiltración. Se observa que, durante los primeros 4 diavolúmenes, los flujos de filtrado para ambos experimentos fueron muy similares. Estos flujos fueron oscilantes o ligeramente ascendentes desde valores iniciales de 102 L/m²h y 108 L/m²h hasta valores, a los 4 diavolúmenes, de 119 L/m²h y 111 L/m²h para N=8 y N=4+4, respectivamente. Sin embargo, los flujos de los segundos 4 diavolúmenes fueron muy diferentes. En el experimento de 8 diavolúmenes el flujo de filtrado permaneció constante hasta las 2 h de experimento y después disminuyó linealmente hasta los 98 L/m²h finales. Por otro lado, la limpieza de la membrana antes de los últimos 4 diavolúmenes del experimento de 4+4, dio lugar a un aumento del flujo desde los 111 L/m²h hasta 167 L/m²h. Durante los segundos 4 diavolúmenes, el flujo osciló entre 167 y 182 L/m²h.

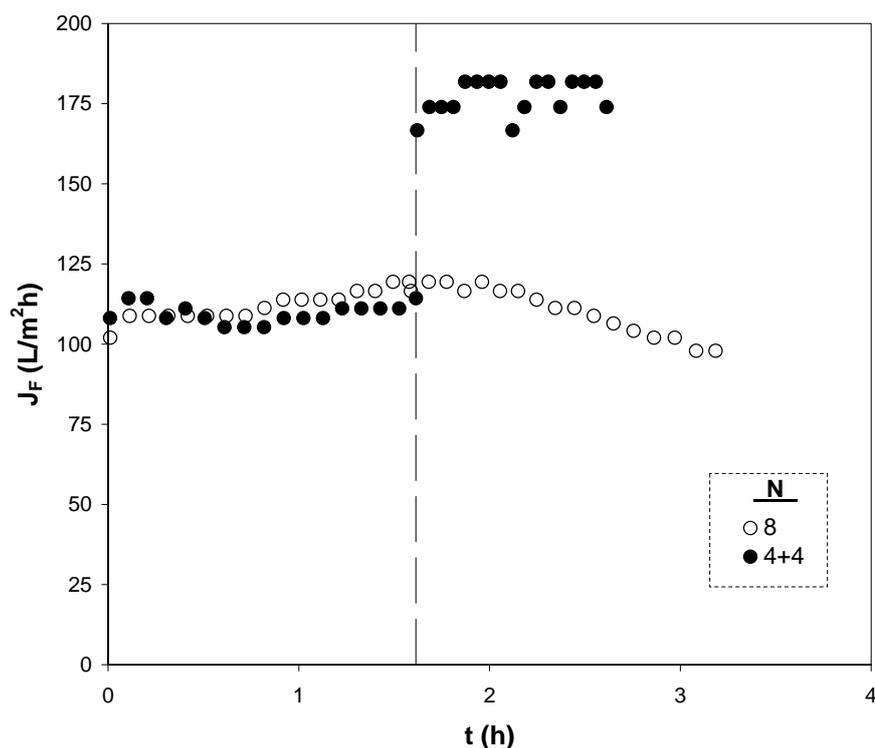


Figura 9.3. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la diafiltración continua de lactosuero ácido pretratado a pH 9 durante 8 diavolumenes y 4 + 4 diavolumenes.

Los resultados indican que en el experimento de los 8 diavolumenes, después de 2 h de diafiltración (aproximadamente $N=5.5$) la colmatación de la membrana provocó la disminución continua del flujo de filtrado. Por el contrario, el uso de la membrana limpia después de los primeros 4 diavolumenes del experimento de $N=4+4$, dio lugar no sólo a que el flujo no disminuyera sino a aumentar enormemente el flujo de filtrado con respecto al flujo inicial debido a que el retenido final de $N=4$ contenía menos concentración total de proteína que el lactosuero inicial.

9.2.2.2. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado

Con el propósito de comparar la capacidad filtrante de la membrana de 300 kDa en la primera etapa según se utilice $N=8$ o $N=4+4$, se analizó la evolución de los rendimientos de proteína individual en retenido ($\eta_{R\text{-proteína}}$) y filtrado acumulado ($\eta_{F\text{-proteína}}$). Estos datos se muestran en la Figura 9.4.

La α -lactoalbúmina fue la proteína con mayor rendimiento en filtrado acumulado. Después de 4 diavolumenes, el 72 y 76% de la proteína inicial había pasado a filtrado en el experimento de N=8 y N=4+4, respectivamente. En los últimos 4 diavolumenes, no se apreció paso significativo de proteína al filtrado en el ensayo de 8 diavolumenes; mientras que en el de 4+4, se alcanzó un rendimiento en filtrado final del 85%. En ambos casos, no se produjo pérdida de proteína ya que se obtuvieron curvas simétricas para retenido y filtrado respecto a $\eta=0.5$.

En el caso de la β -lactoglobulina, tampoco se produjo pérdida de proteína a lo largo del proceso. En el experimento de 8 diavolumenes, el rendimiento en filtrado acumulado fue 0.47 en N=4 y sólo aumentó hasta 0.48 en los diavolumenes finales. En la diafiltración de 4+4, tras los primeros 4 diavolumenes pasó el 50% de la β -lactoglobulina al filtrado y con los siguientes 4 diavolumenes se consiguió aumentar este rendimiento hasta el 53%.

El comportamiento de la BSA fue similar en los dos casos. Durante los primeros 4 diavolumenes ocurrieron los principales cambios, permaneciendo tanto rendimiento en filtrado como en retenido constantes durante los últimos 4 diavolumenes. El rendimiento en filtrado acumulado final fue 14 y 19% para N=8 y N=4+4, respectivamente. También en este caso la suma de rendimiento en retenido y filtrado fueron aproximadamente 100% en todos los casos.

Los rendimientos de la IgG sufrieron los principales cambios también durante los primeros 4 diavolumenes. Pero a diferencia de la BSA, en el proceso de N=4+4 sí se produjo un aumento del rendimiento en filtrado acumulado durante los últimos 4 diavolumenes desde el 23 al 30%. Sin embargo, en la diafiltración de 8 diavolumenes, nuevamente los rendimientos permanecieron constantes en la segunda fase del experimento ($\eta_{R-IgG-N=8}=0.81$ y $\eta_{F-IgG-N=8}=0.18$).

Por último, no se obtuvo lactoferrina en el filtrado acumulado en ninguno de los dos experimentos. Los rendimientos en retenido no fueron 100% sino que se produjo alguna pérdida de proteína, siendo los rendimientos finales del 94 y 89% para N=8 y N=4+4, respectivamente.

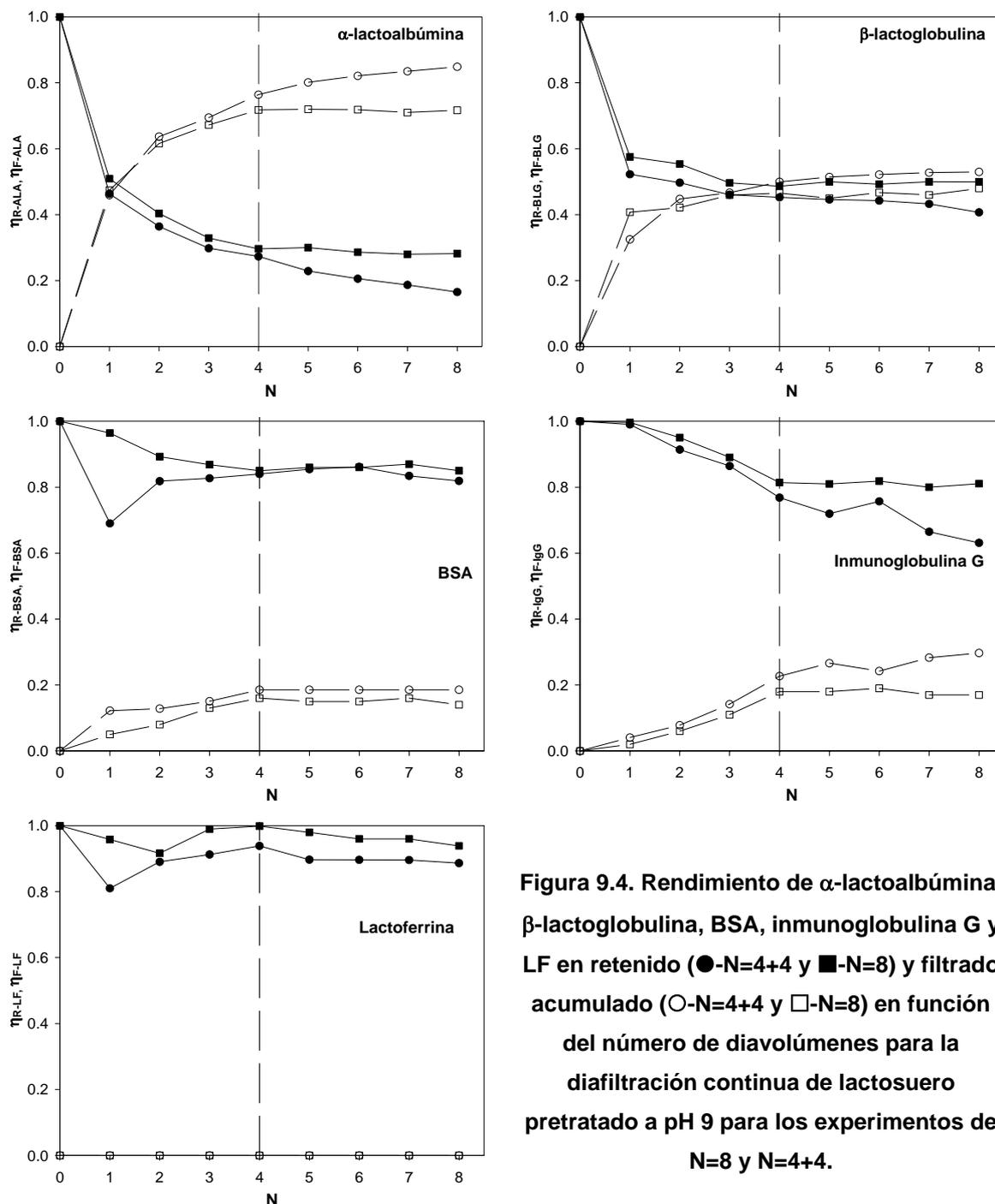


Figura 9.4. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●-N=4+4 y ■-N=8) y filtrado acumulado (○-N=4+4 y □-N=8) en función del número de diavómenes para la diafiltración continua de lactosuero pretratado a pH 9 para los experimentos de N=8 y N=4+4.

Por lo general, se observa que después de los primeros 4 diavómenes, los rendimientos en retenido y filtrado permanecieron constantes cuando se llevó a cabo la diafiltración durante 8 diavómenes seguidos, mientras que disminuyeron y aumentaron, respectivamente, en el proceso de N=4+4. Por tanto, el empleo de una membrana limpia para los segundos 4

diavolumenes favorece el paso a filtrado de las proteínas que se transmiten a través de la membrana.

9.2.2.3. Número de diavolumenes seleccionado para la primera etapa

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados para seleccionar el número de diavolumenes para la primera etapa del proceso de fraccionamiento de las proteínas del lactosuero, han dado lugar a las siguientes conclusiones:

- Tras los primeros 4 diavolumenes, el empleo de una membrana limpia causó un aumento del 50% del flujo de filtrado, impidiendo además, la disminución del mismo observada en la diafiltración durante 8 diavolumenes, consecuencia de la colmatación de la membrana.
- Los rendimientos de las proteínas individuales en filtrado acumulado permanecieron constantes desde el diavolumen 4 hasta el final del proceso cuando se diafiltró el lactosuero durante 8 diavolumenes. Sin embargo, al utilizar una membrana limpia para N=4-8 en el experimento de N=4+4 se consiguió que siguiera pasando proteína a través de la membrana durante los últimos 4 diavolumenes, aumentando así el rendimiento de proteína en filtrado acumulado.

Con todo esto, se selecciona, para la primera etapa, la forma de operar del experimento de N=4+4. Así, tras diafiltrar el lactosuero inicial durante 4 diavolumenes, se empleará una membrana limpia para diafiltrar el retenido final de la fase anterior durante 4 diavolumenes más.

9.2.3. Estrategia I

Esta estrategia de fraccionamiento constará de las etapas indicadas en la Figura 9.5:

- Etapa 1: diafiltración continua de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa, 400 L/h de caudal de retenido, 30°C de temperatura, 1.0 bar de presión transmembrana (zona controlada por la presión-Figura 9.6-), pH 9 y N=4+4.

- Etapa 2: centrifugación del retenido final de la etapa 1 ajustado a pH 4.9, 4500 rpm, 4°C durante 30 minutos. Como la β -lactoglobulina se encuentra desnaturalizada a pH 9, cabe esperar que al disminuir el pH hasta 4.9, cercano a su punto isoeléctrico, se produzca agregación y precipitación de esta proteína. Por tanto, en la segunda etapa se realizará una centrifugación del retenido ajustado a pH 4.9 para separar el precipitado del sobrenadante.

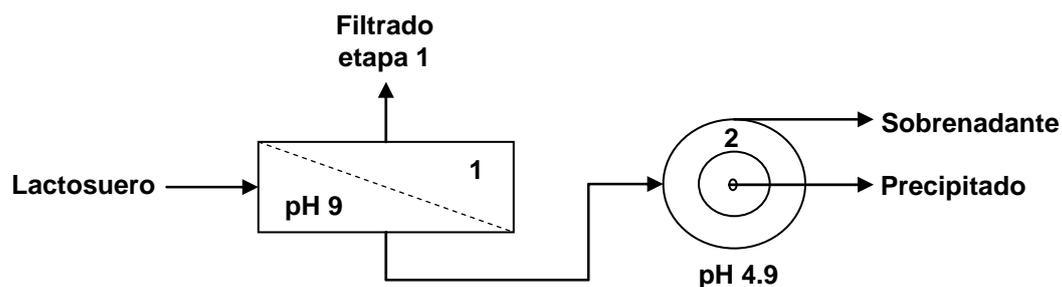


Figura 9.5. Esquema de la estrategia I de fraccionamiento.

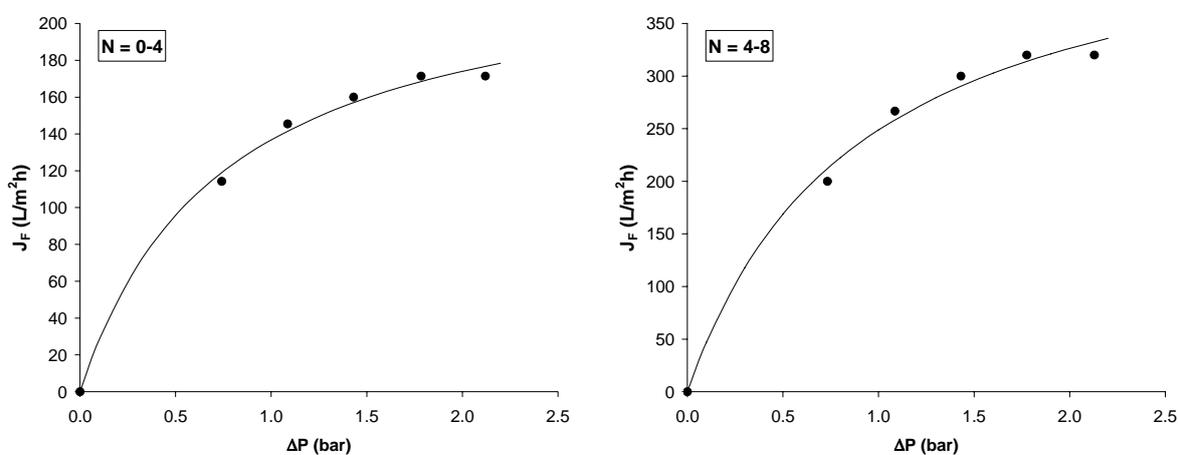


Figura 9.6. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 1 de la estrategia I, N=0-4 y N=4-8.

9.2.3.1. Evolución del flujo de filtrado

En la Figura 9.7 se muestra el flujo de filtrado en función del tiempo de filtración para la etapa 1 de esta estrategia. Las líneas discontinuas indican la separación entre cada 4 diavolumenes, o lo que es lo mismo, limpieza de la membrana. Se observa que los flujos de

filtrado de la segunda fase fueron muy superiores a los de la primera, aunque en ambos casos fueron oscilantes. En los primeros 4 diavolumenes (1.61 h) se produjo oscilación entre 105 y 114 L/m²h, mientras que en los últimos 4 diavolumenes, el flujo varió entre 167 y 182 L/m²h. El tiempo total del proceso fue 2.61 h.

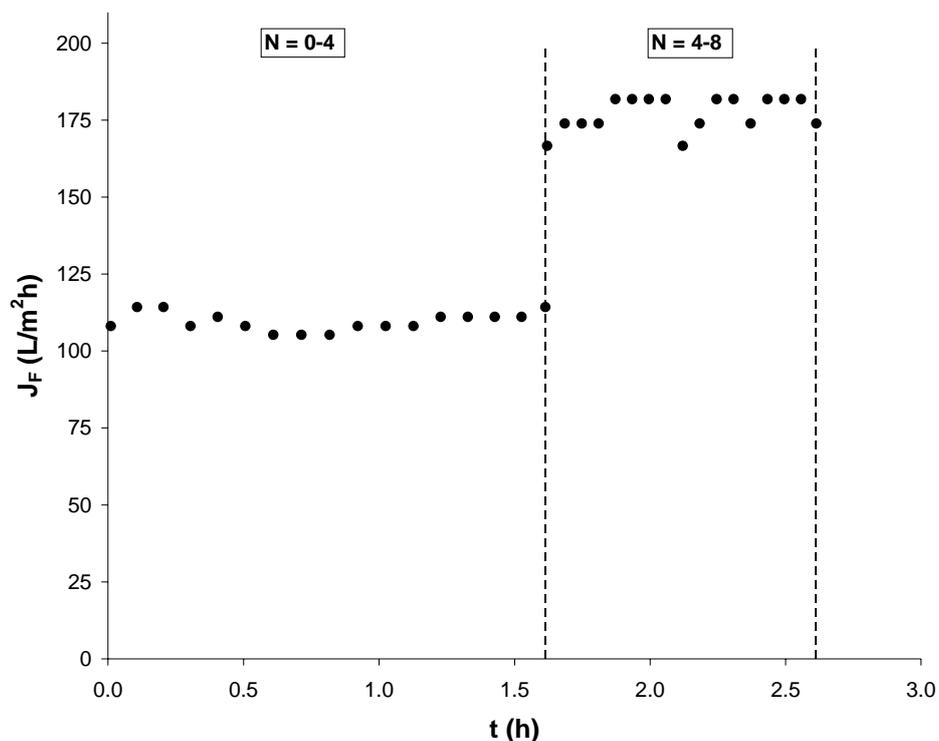


Figura 9.7. Evolución temporal del flujo de filtrado durante la etapa 1 de la estrategia I.

La oscilación obtenida para ambas fases de los flujos de filtrado en torno a un valor medio indica que a pH 9 existe un equilibrio entre el fenómeno de dilución y colmatación. Esta última puede deberse a la proximidad al punto isoeléctrico de LF e IgG, que podrían ver favorecida su deposición sobre la superficie de la membrana. Sin embargo, como la concentración de estas proteínas es muy inferior a la de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, no se produce el descenso brusco característico de colmatación de la membrana provocado por la deposición de estas proteínas mayoritarias como ocurre, por ejemplo, a pH 5.

9.2.3.2. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado

Los rendimientos de cada una de las proteínas del lactosuero en retenido y filtrado acumulado en cada uno de los diavolumenes de la etapa 1 se muestran en la Figura 9.8.

La α -lactoalbúmina fue la proteína con mayor rendimiento en filtrado acumulado. Se obtuvieron curvas simétricas respecto a $\eta=0.5$ a lo largo de los 8 diavolumenes, por lo que no se produjo pérdida de proteína. Los principales cambios ocurrieron en los dos primeros diavolumenes, obteniéndose un rendimiento en filtrado acumulado igual a 0.64. Durante los restantes diavolumenes siguió recogiendo proteína en el filtrado. Al final del proceso, el 85% de la α -lactoalbúmina original había atravesado la membrana.

Para la β -lactoglobulina tampoco se observaron pérdidas significativas de proteína. Al igual que ocurrió con la α -lactoalbúmina, las variaciones más importantes en los rendimientos sucedieron durante los 2 primeros diavolumenes, mediante los cuales se consiguió un rendimiento en filtrado acumulado de 0.49. Desde este punto y hasta el final del proceso, el paso de proteína a través de la membrana fue bastante menor, obteniéndose un rendimiento en filtrado final del 53%.

La suma del rendimiento de BSA en retenido y filtrado para cada diavolumen fue aproximadamente 100% en todos los casos. Durante los 4 primeros diavolumenes, pasó a través de la membrana el 19% de la proteína inicial. Sin embargo, durante los últimos 4 diavolumenes no se apreció transmisión alguna de BSA.

Aunque los rendimientos para la IgG también sufrieron los principales cambios durante los 4 diavolumenes iniciales, durante los segundos 4 diavolumenes se consiguió aumentar el rendimiento en filtrado desde 0.23 (N=4) hasta el 30% final. En este caso tampoco se apreció pérdida significativa de proteína.

El rendimiento de lactoferrina en el filtrado acumulado fue 0 a lo largo de todo el proceso. Sin embargo, los rendimientos en retenido no fueron 100% sino que al final de la estrategia se había perdido el 13% de la proteína original.

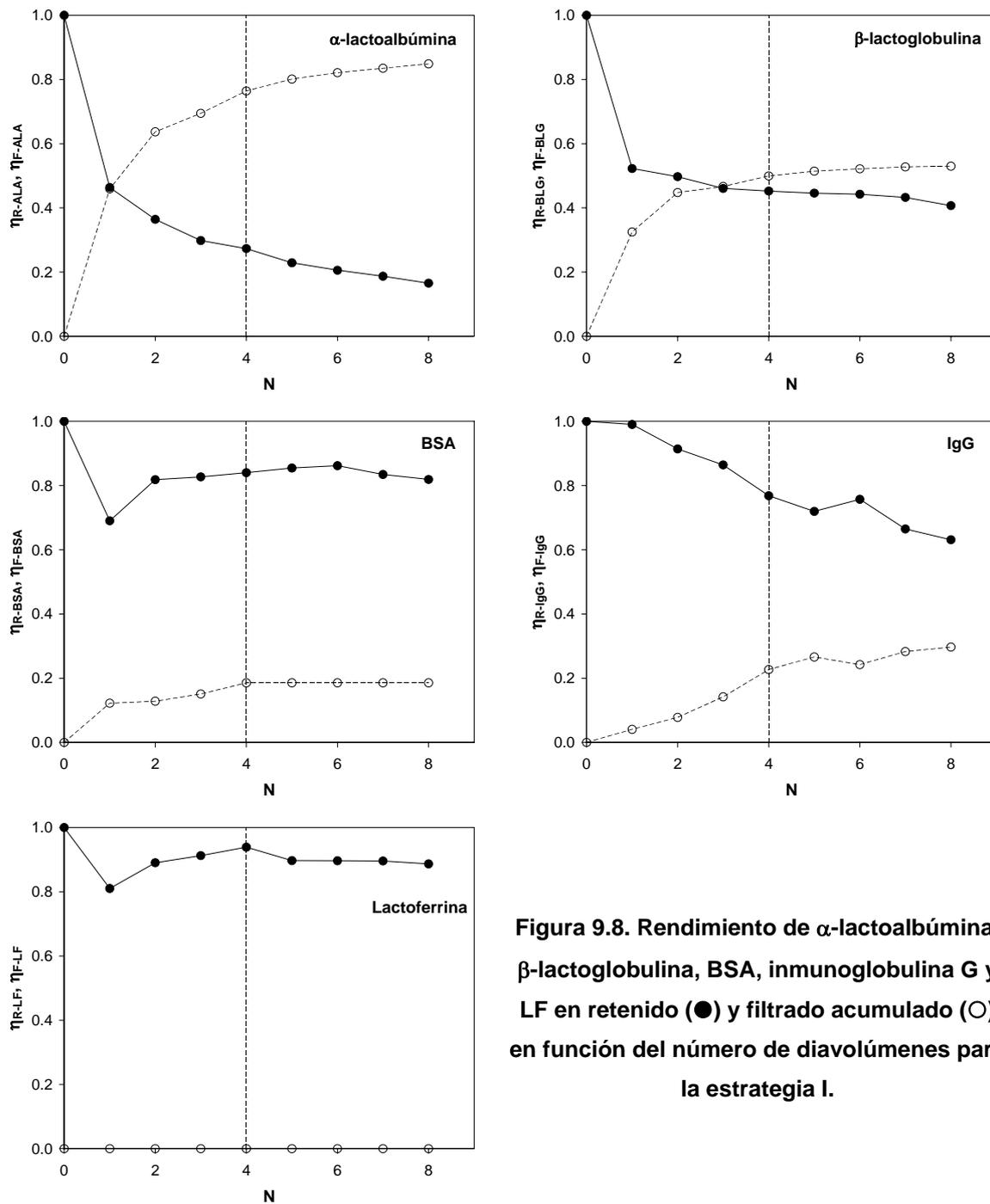


Figura 9.8. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes para la estrategia I.

En esta estrategia se produjeron transmisiones considerables de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina y, algo inferiores, pero también importantes, de IgG y BSA. El pH de esta etapa fue 9, cercano al punto isoeléctrico de LF e IgG. Por tanto, el paso de IgG a través de la membrana estaría justificado por su escasa carga neta. Sin embargo, a este valor de pH, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA están cargadas negativamente, al igual que la

membrana. Pero, la repulsión existente entre la membrana y estas proteínas mayoritarias no debe ser muy elevada por la relativa cercanía al punto de carga cero de la membrana, por lo que existen transmisiones elevadas de estas proteínas, probablemente favorecidas, además, por la importancia del transporte convectivo causado por el elevado flujo de filtrado.

La pérdida de lactoferrina a lo largo del proceso fue inferior a la observada en otros valores de pH. Esto pudo deberse a que la posibilidad de interaccionar con BSA y β -lactoglobulina se minimiza puesto que, a pH 9, la LF presenta carga neta nula.

9.2.3.3. Etapa de centrifugación

Cuando se ajustó el pH del retenido final de la primera etapa a 4.9, se produjo, como se presuponía, una precipitación notable de proteína. Por tanto, se centrifugó este retenido final con el fin de separar el precipitado del sobrenadante y analizar mediante RP-HPLC qué proteína o proteínas componían cada fracción. Para poder realizar el análisis de la fracción precipitada, se redisolvió mediante adición de agua, agitación y ajuste de pH a 9. En la Tabla 9.2 se muestra el rendimiento de proteína en la fracción precipitada (η_{FP}), la fracción de cada proteína presente en la fracción precipitada respecto al total de esa proteína en el retenido final ajustado a pH 4.9 (retenido N=8) y la pureza de esta fracción ($Pureza_{FP}$).

Tabla 9.2. Rendimientos de proteína individual en la fracción precipitada, fracción precipitada de cada proteína respecto al total de dicha proteína en el retenido antes de centrifugar y pureza de la fracción precipitada. Estrategia I.

Proteína	(g proteína FP)/(g proteína retenido N=8)	η_{FP}	$Pureza_{FP}$
ALA	0.085	0.014	0.027
BLG	0.367	0.136	0.700
BSA	0.207	0.148	0.028
IgG	0.416	0.274	0.210
LF	0.611	0.452	0.034

Se observa que prácticamente no precipitó α -lactoalbúmina, mientras que el 61.1% de la lactoferrina presente en el retenido final precipitó al ajustar el pH a 4.9. Una fracción importante, en torno a un 40%, de la IgG y β -lactoglobulina del retenido final también precipitaron, al igual que el 21% de la BSA. Como indica la pureza de cada proteína, la β -lactoglobulina es la proteína mayoritaria, con diferencia, en esta fracción precipitada. Estos resultados corroboran que como a pH 9 la β -lactoglobulina se encuentra desnaturalizada irreversiblemente (Taulier y Chalikian, 2001), al bajar el pH hasta su punto isoeléctrico se favorece su agregación y precipitación. La interacción de la lactoferrina con la β -lactoglobulina pudo causar la precipitación de la lactoferrina. En cuanto a la BSA, como a pH 4.9 se encuentra débilmente cargada, pudo formar agregados y precipitar.

9.2.3.4. Fracciones resultantes y mejora de la pureza de la lactoferrina

Como resultado de la estrategia de fraccionamiento I, a partir del lactosuero ácido pretratado inicial se obtienen 2 fracciones:

- Filtrado acumulado de la etapa 1 (N=8)
- Retenido final (N=8) o la fracción precipitada y el sobrenadante tras ajuste de este retenido a pH 4.9 y centrifugación.

El rendimiento y pureza de cada una de las proteínas del lactosuero inicial se muestra en la Tabla 9.3.

Tabla 9.3. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el lactosuero inicial.

Proteína	Lactosuero inicial	
	η_R	Pureza
ALA	1.00	0.236
BLG	1.00	0.637
BSA	1.00	0.024
IgG	1.00	0.094
LF	1.00	0.009

En la Tabla 9.4 se muestran los rendimientos y purezas en las fracciones del filtrado acumulado de la etapa 1 y del retenido final. Los principales componentes del filtrado acumulado son α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. En el retenido final, el componente principal es β -lactoglobulina que supone el 67.3% de la fracción. Aunque el rendimiento de BSA y LF en el retenido final sea superior al 80%, sus pequeñas concentraciones en el lactosuero inicial dan lugar a bajas purezas: 5.0 y 2.2 %, respectivamente.

Tabla 9.4. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el filtrado acumulado de la etapa 1 y en el retenido final de la estrategia I.

Proteína	Filtrado acumulado etapa 1		Retenido final (N=8)	
	η_F	Pureza	η_R	Pureza
ALA	0.849	0.351	0.165	0.101
BLG	0.530	0.592	0.407	0.673
BSA	0.186	0.008	0.819	0.050
IgG	0.297	0.049	0.631	0.155
LF	0.000	0.000	0.887	0.022

En la Tabla 9.5 se muestran los rendimientos y purezas de la fracción precipitada y del sobrenadante obtenidos después de centrifugar el retenido final a pH 4.9. En ambas fracciones la β -lactoglobulina es la proteína mayoritaria. En la fracción precipitada es además importante la cantidad de IgG presente; mientras que en el sobrenadante, α -lactoalbúmina e IgG son las otras dos proteínas predominantes. En cuanto a la lactoferrina, presenta mejor rendimiento y pureza en la fracción precipitada que en el sobrenadante.

Tabla 9.5. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en la fracción precipitada y sobrenadante de la estrategia I.

Proteína	Fracción precipitada		Sobrenadante	
	η_R	Pureza	η_R	Pureza
ALA	0.014	0.027	0.154	0.153
BLG	0.136	0.700	0.234	0.627
BSA	0.148	0.028	0.566	0.056
IgG	0.274	0.210	0.386	0.153
LF	0.452	0.034	0.287	0.011

Para evaluar la estrategia I desde el punto de vista del objetivo de enriquecer el lactosuero en lactoferrina es necesario analizar cómo varía el factor de mejora de pureza de la lactoferrina a lo largo del proceso. Este factor de mejora para un diavolumen determinado se calcula como la relación entre la pureza de lactoferrina en el retenido de ese diavolumen y la pureza de lactoferrina en el lactosuero original (0.9%). En la Figura 9.9 se muestra el factor de mejora de la pureza de la lactoferrina en función del número de diavolúmenes para esta estrategia. La línea punteada vertical indica la separación entre la etapa de filtración y el factor de mejora de la pureza correspondiente a la fracción precipitada de la etapa de centrifugación. Los resultados indican que la pureza se mejora a lo largo de todo el proceso, consiguiendo una mejora de pureza del 207% para lactoferrina después de los primeros 4 diavolúmenes y 230% al final del experimento. En la fracción precipitada se consiguió aumentar el factor de mejora hasta 3.66, aunque el rendimiento disminuyó desde 0.89 para N=8 hasta 0.45 para la fracción precipitada.

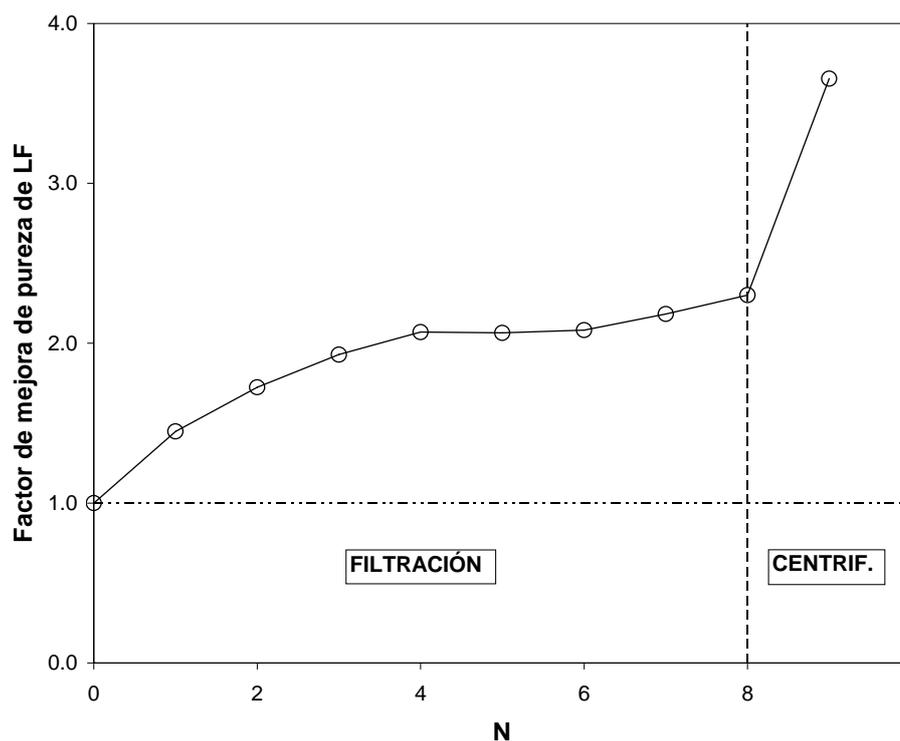


Figura 9.9. Factor de mejora de pureza de lactoferrina en función del número de diavolumenes para la estrategia I.

9.2.4. Estrategia II

Esta estrategia de fraccionamiento constará de las etapas indicadas en la Figura 9.10:

- Etapa 1: diafiltración continua de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa, 400 L/h de caudal de retenido, 30°C de temperatura, 1.0 bar de presión transmembrana (zona controlada por la presión-Figura 9.11-), pH 7 y $N=4+4$.
- Etapa 2: diafiltración continua de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa, 400 L/h de caudal de retenido, 30°C de temperatura, 1.0 bar de presión transmembrana (zona controlada por la presión-Figura 9.12-), pH 4.9 y $N=4$.

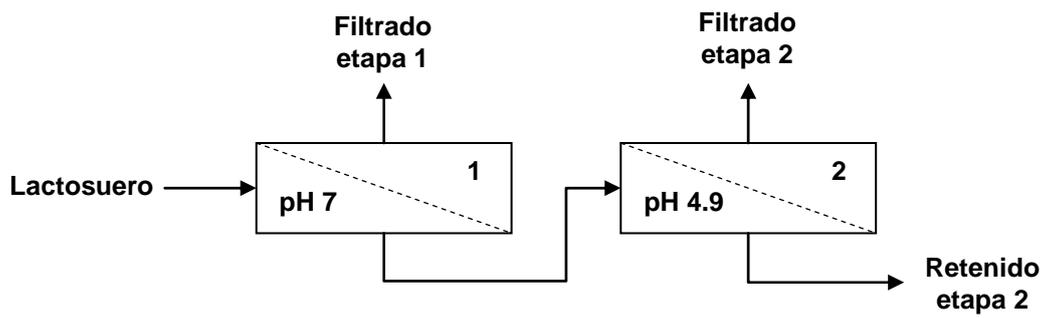


Figura 9.10. Esquema de la estrategia II de fraccionamiento.

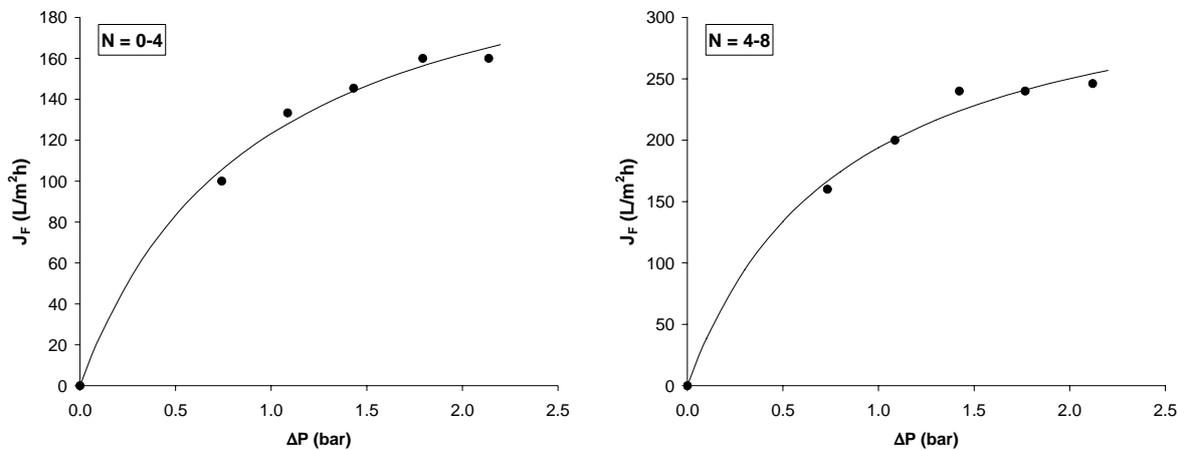


Figura 9.11. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 1 de la estrategia II, $N=0-4$ y $N=4-8$.

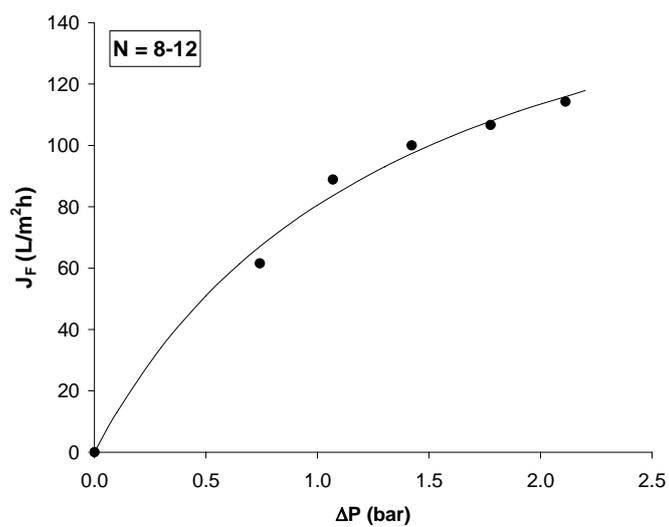
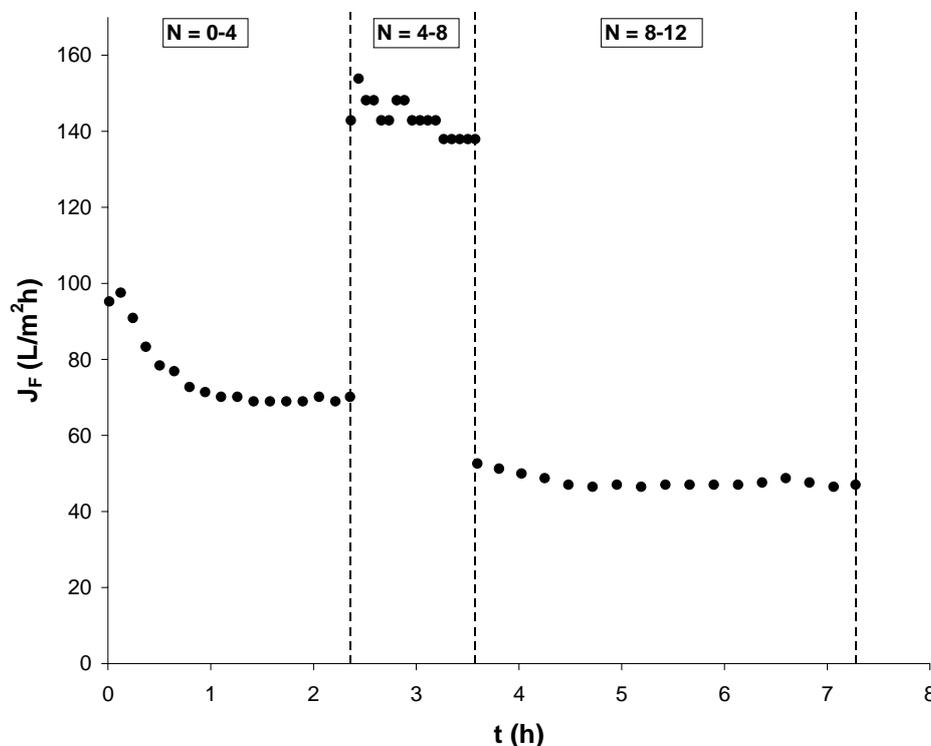


Figura 9.12. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 2 de la estrategia II ($N=8-12$).

9.2.4.1. Evolución del flujo de filtrado

En la Figura 9.13 se muestra el flujo de filtrado en función del tiempo total de diafiltración para las dos etapas de la estrategia II. Los flujos más elevados se obtuvieron en la segunda fase de la primera etapa; mientras que los menores flujos correspondieron a la segunda etapa. El flujo descendió bruscamente desde los 95 L/m²h iniciales hasta 70 L/m²h durante la primera hora de experimento. Desde ese punto y hasta finalizar los primeros 4 diavolumenes, el flujo permaneció prácticamente constante. Al utilizar la membrana limpia para la segunda fase de la primera etapa, el flujo de filtrado aumentó hasta 143 L/m²h. Al inicio de esta fase el flujo aumentó hasta un máximo de 154 L/m²h, oscilando después entre 142 y 148 L/m²h durante la mayor parte de la fase, y disminuyendo hasta 138 L/m²h al final de la misma. La duración total de la primera etapa fue 3.57 horas.

El flujo de filtrado inicial de la segunda etapa fue 53 L/m²h, 2.6 veces inferior al flujo final de la primera etapa. En la primera hora de esta segunda etapa, se produjo un descenso moderado del flujo desde el valor inicial hasta 47 L/m²h. A partir de ahí y hasta las 7.28 h totales de proceso, el flujo de filtrado permaneció prácticamente constante.



En la primera etapa, como a pH 7 la membrana se encuentra con carga neta nula, se favorece la deposición de las proteínas sobre la superficie de la membrana, dando lugar a una disminución del flujo de filtrado. Este descenso es muy brusco principalmente al comienzo del proceso ya que la concentración de proteínas es elevada y la membrana se encuentra limpia con todos los puntos activos libres. Cuando se emplea la membrana limpia para los segundos 4 diavolumenes, el descenso no es tan acusado porque la concentración total de proteínas es bastante inferior. Por esta misma razón se obtienen flujos de filtrado más elevados que en los primeros 4 diavolumenes.

En la segunda etapa de esta estrategia, desarrollada a pH 4.9, la colmatación de la membrana debida a la adsorción de agregados de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA (por encontrarse en las inmediaciones de sus respectivos puntos isoeléctricos) da lugar al descenso del flujo de filtrado durante la primera parte de esta etapa.

El estado estacionario observado tras los descensos iniciales en ambas etapas puede deberse al efecto de barrido de la corriente tangencial de retenido.

9.2.4.2. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado

Los rendimientos de cada una de las proteínas del lactosuero en retenido y filtrado acumulado en cada uno de los diavolumenes de la estrategia II se muestra en la Figura 9.14.

Los rendimientos en filtrado acumulado de α -lactoalbúmina fueron muy elevados a lo largo de todo el proceso. Tras los primeros 3 diavolumenes, ya había pasado al filtrado el 73% de la proteína inicial. Durante los 5 diavolumenes restantes de esta primera etapa, este rendimiento aumentó hasta el 83%. Con la segunda etapa de la estrategia se consiguió elevar aún más este valor hasta el 94% final. Sin embargo, también fue durante esta segunda etapa donde el balance de α -lactoalbúmina fue alejándose de 1, quedando en el retenido final, solamente, el 1% de la proteína original.

Algo similar ocurrió con la β -lactoglobulina. En este caso, con los primeros 3 diavolumenes se consiguió un rendimiento en filtrado acumulado de 0.51. Valor que aumentó hasta 0.58 al final de la primera etapa. Durante la segunda etapa incrementó bruscamente la cantidad de proteína en el filtrado, obteniéndose en el filtrado acumulado de N=12 el 86% de la β -lactoglobulina inicial. Como el paso de proteína a través de la membrana fue más elevado

que en el caso de la α -lactoalbúmina, la suma de los rendimientos en retenido y filtrado acumulado fueron aún menores que en el caso de esta proteína. De hecho, el balance al final del proceso indicó que se había perdido el 14% de la β -lactoglobulina original.

En el primer diavolumen de proceso, pasó al filtrado acumulado el 13% de la BSA inicial y se produjo una pérdida de proteína del 10%. Durante los siguientes diavolumenes y hasta el final de la primera etapa, no se obtuvo más transmisión de BSA y los rendimientos en retenido fueron más o menos constantes, es decir, no se produjo más pérdida de proteína. Sin embargo, durante la segunda etapa, el rendimiento en filtrado acumulado aumentó hasta 0.26 y el rendimiento en retenido disminuyó hasta 0.22, por lo que al final del proceso se había perdido el 52% de la BSA original.

La inmunoglobulina G pasó a través de la membrana durante todo el proceso. En la primera etapa se consiguió un rendimiento en filtrado de 0.25, llegando a convertirse en 0.48 al final del proceso. El balance de proteína se mantuvo en torno a 1 durante los primeros 4 diavolumenes. En el diavolumen 5 se produjo una pérdida del 10% de la proteína, pero fue en el transcurso del diavolumen 8 al 9 donde se produjo la mayor pérdida de IgG, contabilizándose entre retenido y filtrado acumulado el 65% de la proteína original al final de la estrategia.

En cuanto a la lactoferrina, no se observó transmisión a través de la membrana a lo largo de todo el experimento. Sin embargo, el rendimiento en retenido no permaneció constante e igual a 1, sino que, como ocurrió con el resto de proteínas, se produjo pérdida de lactoferrina a lo largo del proceso. Durante el primer diavolumen, se perdió el 44% de la cantidad inicial. En el transcurso restante de la primera etapa se apreciaron pequeñas pérdidas, pero durante la segunda etapa se produjo una pérdida muy importante de proteína, quedando en el retenido final tan sólo un 6% de la lactoferrina original.

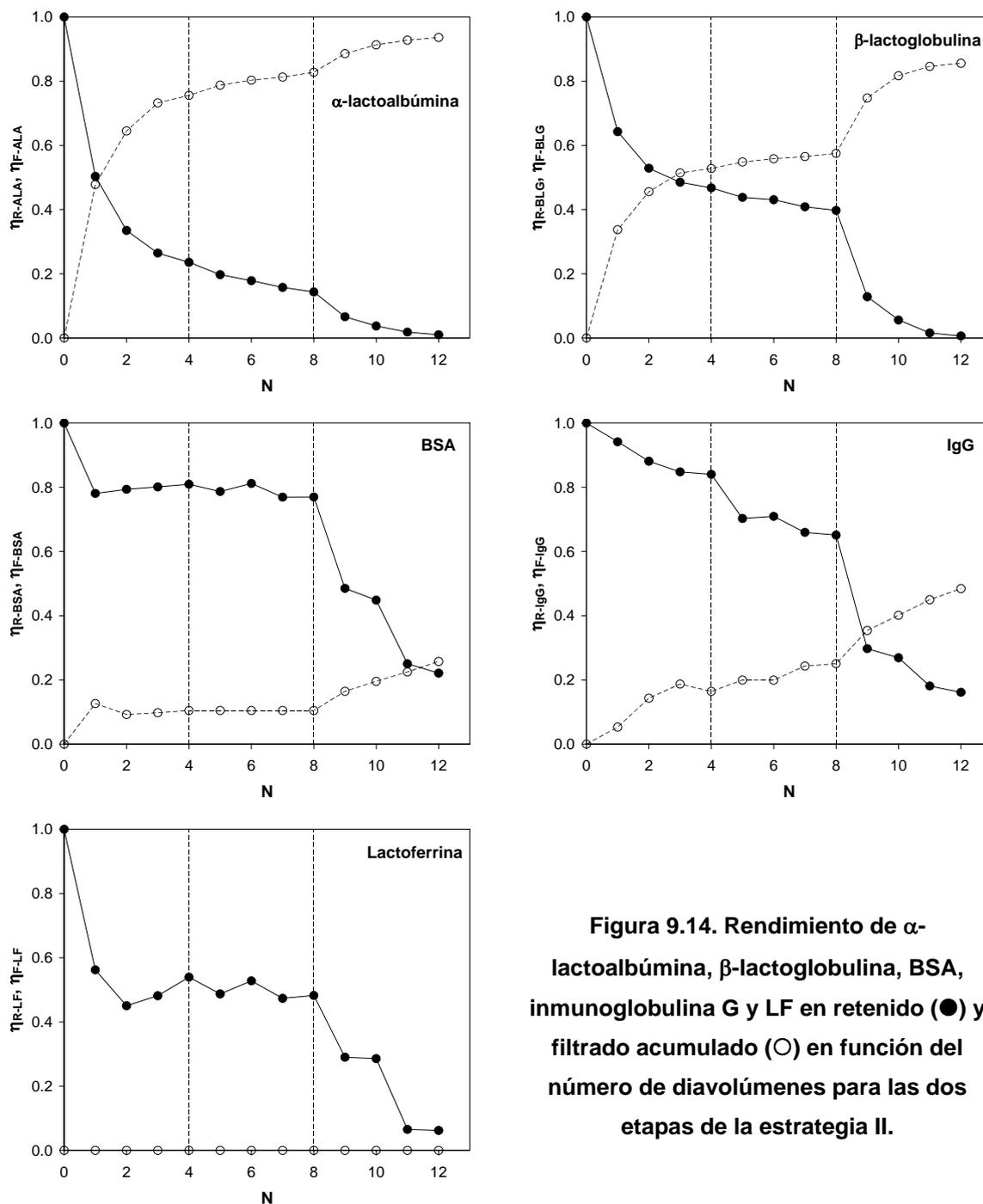


Figura 9.14. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes para las dos etapas de la estrategia II.

Durante la primera etapa del proceso se produjeron transmisiones elevadas para casi todas las proteínas, especialmente α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, debido a que las interacciones entre las proteínas y la membrana neutra se minimizan. En la segunda etapa, BSA, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina pasaron con mayor facilidad al filtrado, favorecidas por su escasa carga neta a pH 4.9.

A pesar de que no se apreció posible precipitación de proteína en ninguno de los retenidos, para analizar dónde podría encontrarse la proteína desaparecida, se procedió a centrifugar el retenido final a 4500 rpm y 4°C durante 30 min. No se obtuvo fracción precipitada, por lo que la pérdida pudo deberse a las 3 causas indicadas ya en capítulos anteriores: adsorción de la proteína sobre la membrana, desnaturalización de la proteína por el esfuerzo de cizalladura o interacción con otras proteínas. Dado que las principales pérdidas para la mayoría de las proteínas se producen cuando la membrana está limpia y/o cuando las transmisiones a través de la membrana son elevadas, parece que la adsorción de proteína sobre la membrana podría ser la causa principal de la desaparición de proteína. En el caso de la lactoferrina, ya que no se produce transmisión, además de la adsorción, la interacción con BSA y β -lactoglobulina podría ser la causa de su pérdida.

9.2.4.3. Fracciones resultantes y mejora de la pureza

Como resultado de la estrategia de fraccionamiento II, a partir del lactosuero ácido pretratado inicial se obtienen 3 fracciones:

- Filtrado acumulado de la etapa 1 (N=8)
- Filtrado acumulado de la etapa 2 (N=8-12)
- Retenido final (N=12) o si se parase a los 10 diavolúmenes, retenido N=10.

El rendimiento y pureza de cada una de las proteínas del lactosuero inicial coincide con el de la estrategia I (Tabla 9.3). En la Tabla 9.6 se muestran los rendimientos y purezas en las fracciones del filtrado acumulado de la etapa 1 y de la etapa 2, así como la suma de ambas por si se prefiriese unir las. Los principales componentes son α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, aunque en la segunda etapa también es importante el porcentaje de IgG que contiene. La suma de ambas fracciones da lugar a purezas intermedias y a la suma de los rendimientos.

Tabla 9.6. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el filtrado acumulado de la etapa 1, filtrado acumulado de la etapa 2 y en las dos fracciones juntas de la estrategia II.

Proteína	Filtrado acumulado etapa 1		Filtrado acumulado etapa 2		Filtrado acumulado etapa 1+etapa 2	
	η_F	Pureza	η_F	Pureza	η_F	Pureza
ALA	0.828	0.332	0.108	0.111	0.936	0.270
BLG	0.575	0.623	0.281	0.777	0.856	0.667
BSA	0.105	0.004	0.153	0.016	0.258	0.007
IgG	0.251	0.040	0.234	0.096	0.484	0.056
LF	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

En la Tabla 9.7 se muestran los rendimientos y purezas del retenido para N=10 y N=12 y para la suma de los filtrados acumulados de las etapas 1 y 2 parando el proceso a los 10 diavolumenes. Los rendimientos de todas las proteínas son superiores para el retenido de N=10. En cuanto a las purezas en retenido, para α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y LF también son superiores para N=10.

Tabla 9.7. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el retenido final, en el retenido N=10 y en la suma del filtrado acumulado de la etapa 1 y etapa 2 con N=10 para la estrategia II.

Proteína	Retenido final (N=12)		Retenido (N=10)		Filtrado acumulado etapa 1+etapa 2 (N=10)	
	η_R	Pureza	η_R	Pureza	η_F	Pureza
ALA	0.010	0.088	0.037	0.106	0.913	0.277
BLG	0.006	0.147	0.056	0.430	0.817	0.669
BSA	0.221	0.190	0.449	0.127	0.196	0.006
IgG	0.161	0.554	0.269	0.305	0.401	0.049
LF	0.062	0.021	0.286	0.032	0.000	0.000

Por tanto, como resultado de esta estrategia se consigue obtener un filtrado acumulado rico en α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, conteniendo el 94 y 86% de la proteína inicial, respectivamente. En cuanto al retenido resultante, el correspondiente al diavolumen 12 presenta un rendimiento de 16 y 6% y una mejora de pureza de 589 y 225% para inmunoglobulina y lactoferrina, respectivamente. Sin embargo, el máximo factor de mejora para lactoferrina se obtiene en el diavolumen 10, cuyo retenido presenta un rendimiento de 27 y 29% y una mejora de pureza de 324 y 343% para inmunoglobulina y lactoferrina, respectivamente. Por tanto, para obtener mayor pureza y rendimiento de lactoferrina sería aconsejable para el proceso tras alcanzar los 10 diavolumenes, obteniéndose un filtrado acumulado con rendimientos y purzas similares a los correspondientes a N=12.

9.2.5. Estrategia III

Esta estrategia de fraccionamiento constará de las etapas indicadas en la Figura 9.15:

- Etapa 1: diafiltración continua de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa, 400 L/h de caudal de retenido, 30°C de temperatura, 1.0 bar de presión transmembrana (zona controlada por la presión-Figura 9.16-), pH 3 y N=4+4.
- Etapa 2: diafiltración continua de lactosuero empleando la membrana de 300 kDa, 400 L/h de caudal de retenido, 30°C de temperatura, 1.0 bar de presión transmembrana (zona controlada por la presión-Figura 9.17-), pH 4.9 y N=4.

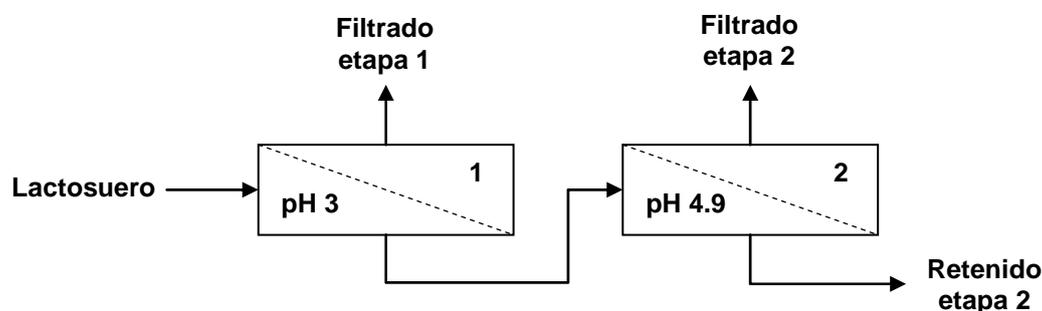


Figura 9.15. Esquema de la estrategia III de fraccionamiento.

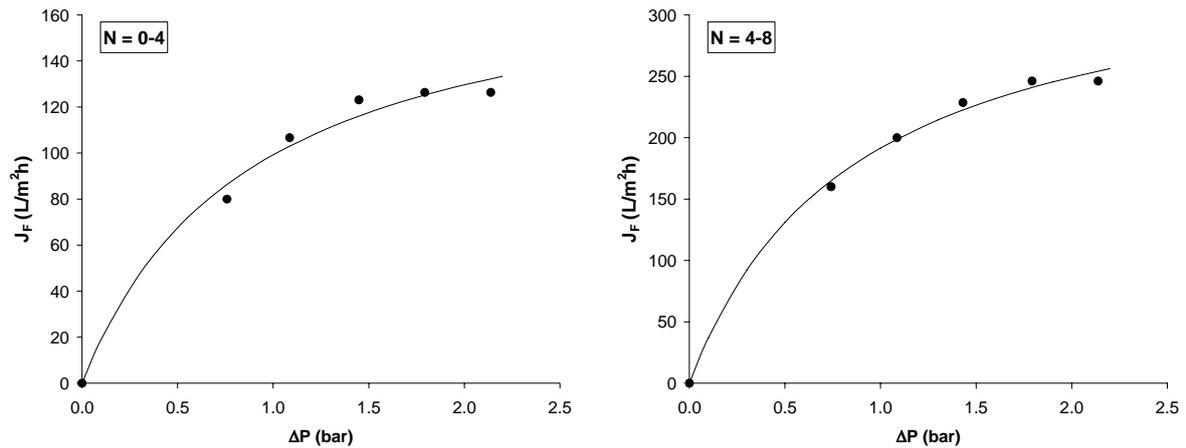


Figura 9.16. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 1 de la estrategia III, N=0-4 y N=4-8.

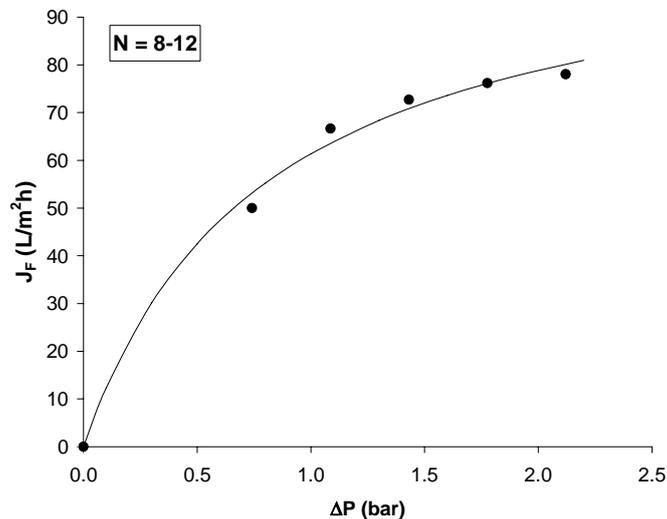


Figura 9.17. Flujo de filtrado en función de la presión transmembrana aplicada para la etapa 2 de la estrategia III (N=8-12).

9.2.5.1. Evolución del flujo de filtrado

En la Figura 9.18 se muestra el flujo de filtrado en función del tiempo total de diafiltración para las dos etapas de la estrategia III. Las líneas discontinuas indican la separación entre 4 diavolumenes, es decir, indica limpieza de la membrana. Los flujos de filtrado mayores correspondieron a N=4-8, mientras que los menores se dieron en la segunda etapa del proceso. El flujo inicial fue $63 L/m^2h$. Durante los primeros 4 diavolumenes se produjo un

ascenso lineal del flujo desde este valor inicial hasta el valor final de 73 L/m²h obtenido tras 2.63 h de proceso. El empleo de la membrana limpia para la segunda fase de la primera etapa causó un aumento del flujo de filtrado desde el valor final indicado para N=4 hasta 114 L/m²h. Durante los primeros instantes de estos segundos 4 diavolumenes se produjo un aumento de flujo hasta 125 L/m²h, permaneciendo este valor constante durante el resto de la primera etapa. La duración total de la primera etapa fue 4.05 horas.

El flujo de filtrado inicial de la segunda etapa fue 37 L/m²h, 3.4 veces inferior al flujo final de la primera etapa. Durante el primer diavolumen de esta segunda etapa, se produjo un descenso del flujo desde el valor inicial hasta 28 L/m²h. A partir de ahí y hasta las 10.33 h totales de proceso, el flujo de filtrado permaneció prácticamente constante.

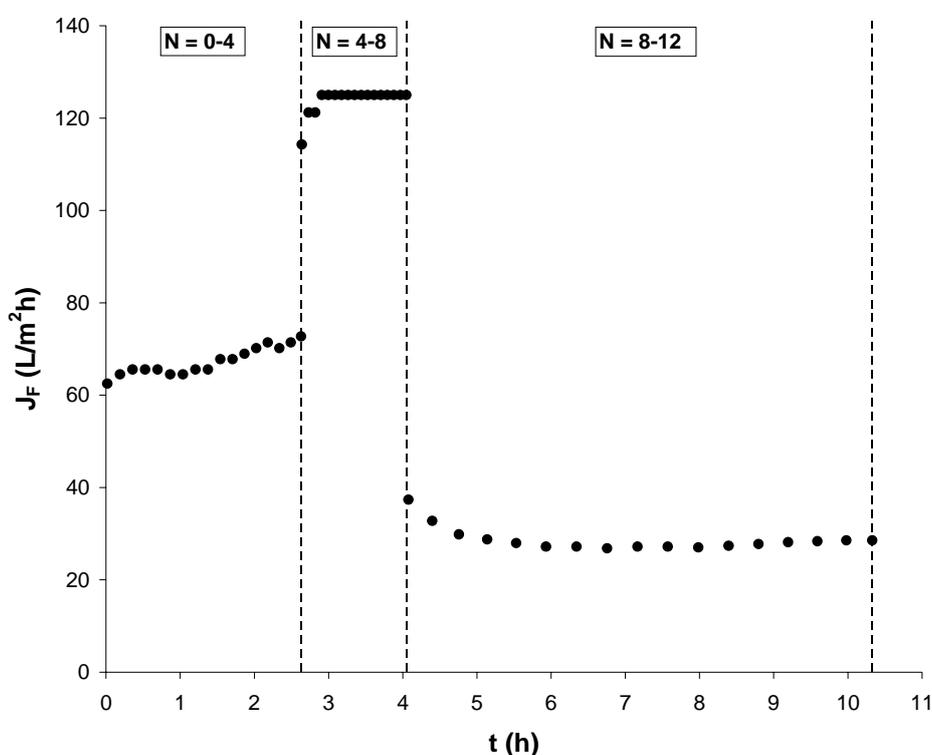


Figura 9.18. Evolución temporal del flujo de filtrado durante las dos etapas de la estrategia III.

Los resultados indican que durante los primeros 4 diavolumenes, donde la diafiltración se realizó a pH 3, existe repulsión entre las proteínas del lactosuero y la membrana (cargadas todas positivamente), dificultando la colmatación de la membrana. Por tanto, el fenómeno

de dilución debido a la adición de agua de diafiltración al tanque de retenido domina el proceso, causando un aumento del flujo de filtrado con el tiempo.

Durante los segundos 4 diavolúmenes, el pH de la diafiltración fue también 3 por lo que el comportamiento es similar al de los primeros 4 diavolúmenes. Sin embargo, en este caso el flujo de filtrado es muy superior debido a que la alimentación es el retenido de N=4 que tiene una concentración total de proteína menor que la del lactosuero pretratado utilizado como alimentación al inicio de la primera etapa en la misma membrana y al mismo pH que en esta segunda fase.

Por último, en la segunda etapa de esta estrategia, desarrollada a pH 4.9, domina la colmatación debido a la deposición sobre la membrana de agregados de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA (por encontrarse en las inmediaciones de sus respectivos puntos isoeléctricos). Esto provoca el descenso del flujo de filtrado durante la primera parte de esta etapa. El estado estacionario observado tras este descenso puede deberse al efecto de barrido de la corriente tangencial de retenido.

9.2.5.2. Rendimiento de proteína individual en retenido y filtrado acumulado

En la Figura 9.19 se muestran los rendimientos en retenido y filtrado acumulado para cada una de las proteínas individuales del lactosuero a lo largo de los 12 diavolúmenes totales de la estrategia III.

La α -lactoalbúmina presentó sus principales cambios durante los 2 primeros diavolúmenes y durante los 4 últimos. Desde el principio del proceso y hasta N=2, el 49% de la proteína inicial había sido recogida en el filtrado acumulado. Sin embargo, durante los restantes 6 diavolúmenes de esta primera etapa no se obtuvo transmisión alguna de α -lactoalbúmina. En la segunda etapa del proceso, la permeabilidad de proteína a través de la membrana mejoró considerablemente, aumentando el rendimiento en filtrado acumulado desde 0.49 hasta 0.75 en los últimos 4 diavolúmenes. La suma de los rendimientos en retenido y filtrado fue prácticamente 1 hasta N=5. A partir de aquí, la suma fue alejándose del 100%, principalmente durante la segunda etapa, al final de la cual sólo permaneció en el retenido el 7% de la proteína inicial.

La suma de los rendimientos de β -lactoglobulina en retenido y filtrado acumulado fue cercana a 1 durante toda la primera etapa. Sin embargo, durante la segunda etapa el rendimiento en retenido disminuyó más rápidamente de lo que aumentó el rendimiento en filtrado, por lo que la suma total fue disminuyendo hasta un valor final de 0.89. En los primeros 4 diavolúmenes pasó a través de la membrana el 52% de la β -lactoglobulina original. Durante el resto de la primera etapa, sólo se consiguió aumentar el rendimiento en filtrado acumulado hasta el 54%. Nuevamente, desde N=8 hasta N=12 aumentó el paso de proteína a través de la membrana, alcanzándose un rendimiento en filtrado acumulado final de 0.81.

La mayor parte de la seroalbúmina bovina original permaneció retenida durante la primera etapa, pasando al filtrado tan sólo el 6%. Durante la segunda etapa se obtuvo algo más en el filtrado acumulado, siendo el rendimiento final en éste de 0.11. Al igual que ocurrió con las otras dos proteínas, durante los últimos 4 diavolúmenes se produjo una pérdida de proteína. En este caso la suma de los rendimientos en retenido y filtrado al final del proceso fue 0.88.

Durante los 4 diavolúmenes iniciales, pasó a través de la membrana un 41% de la inmunoglobulina G inicial; mientras que durante el resto del proceso no se recogió más proteína en el filtrado acumulado. A pesar de no producirse transmisión de IgG durante la segunda etapa, el rendimiento en retenido disminuyó desde 0.62 hasta 0.38, lo que significa que se produjo pérdida de proteína.

Por último, no se observó transmisión de lactoferrina a través de la membrana a lo largo de todo el experimento. Si bien el rendimiento en retenido permaneció prácticamente constante (91-96%) con un valor próximo a 1 durante la primera etapa del proceso, se apreció una pérdida importante de lactoferrina durante la segunda etapa del mismo, obteniéndose un rendimiento en retenido final de 0.65.

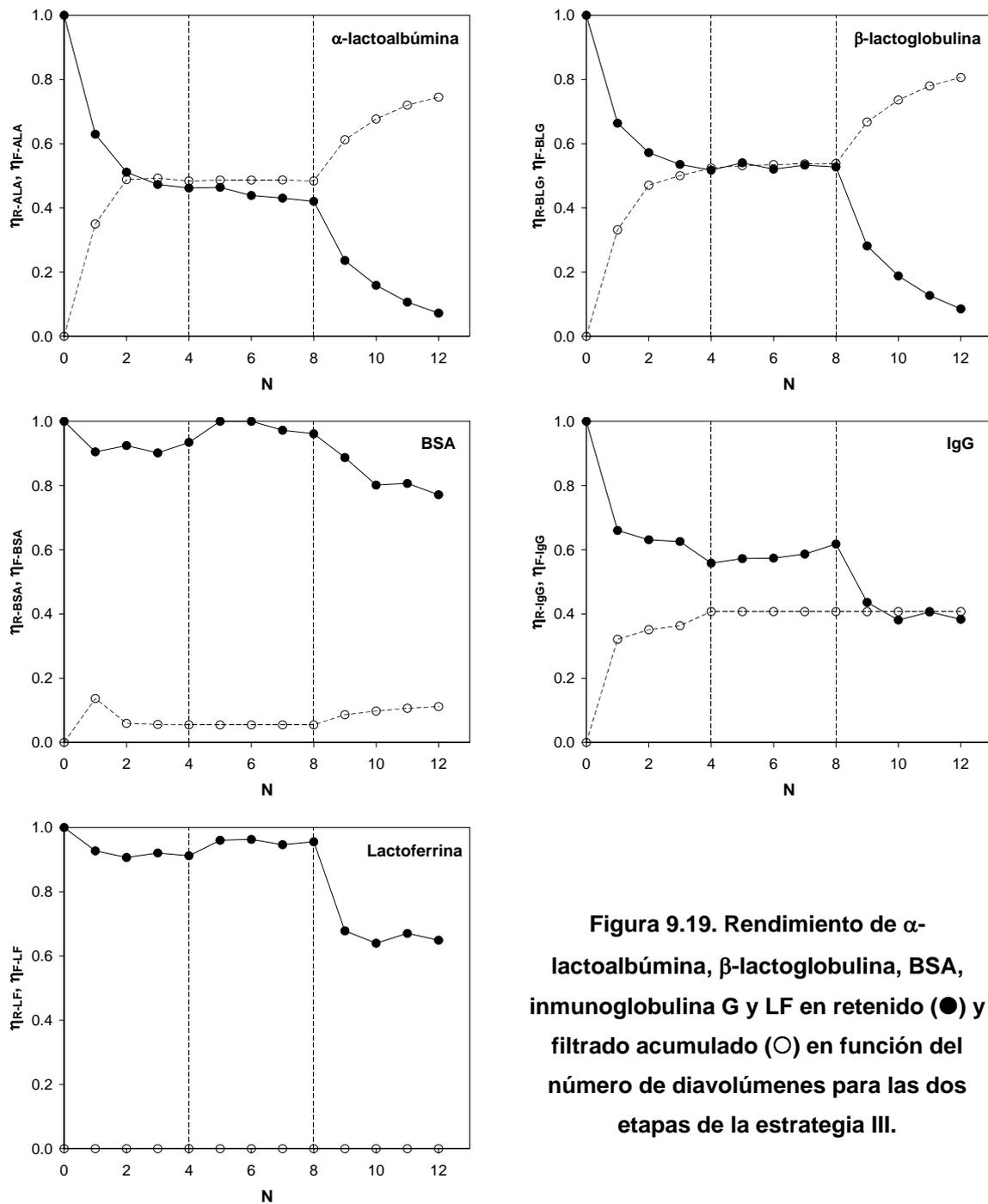


Figura 9.19. Rendimiento de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, BSA, inmunoglobulina G y LF en retenido (●) y filtrado acumulado (○) en función del número de diavolumenes para las dos etapas de la estrategia III.

Durante la primera etapa del proceso, a pH 3, se produjo una transmisión considerable de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina e IgG a través de la membrana, favorecida probablemente por la importancia del transporte convectivo como consecuencia del elevado flujo de filtrado. Además, en el caso de la β -lactoglobulina el rendimiento en filtrado acumulado fue muy elevado debido también a que a este pH la proteína se encuentra en

forma monomérica. Durante la segunda etapa, a pH 4.9, sólo se produjo transmisión de las proteínas cuyo punto isoeléctrico se encuentra cercano a este pH, es decir, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y BSA. Los mayores rendimientos en filtrado correspondieron a las dos primeras puesto que presentan tamaños moleculares menores que la BSA. En esta segunda etapa se observó pérdida de proteína para las cinco proteínas estudiadas. Como al ajustar el pH del retenido final de la primera etapa a 4.9 se observó un ligero color blanquecino que se fue acentuando conforme avanzaba la diafiltración, se decidió reajustar el pH del retenido final a 3 para redissolver la posible proteína precipitada. El rendimiento de proteína en el retenido final (N=12) y en el retenido final redissuelto se recoge en la Tabla 9.8. Según estos resultados, un porcentaje elevado de la lactoferrina e inmunoglobulina G original, 21 y 24%, respectivamente, y menos del 10% de la β -lactoglobulina y BSA inicial se encontraban precipitados en el retenido final. La precipitación de β -lactoglobulina y BSA puede explicarse si se tiene en cuenta que a pH 4.9 ambas se encuentran débilmente cargadas, por lo que pueden formar agregados y precipitar. Como la lactoferrina se une a estas dos proteínas, también aparece, en parte, precipitada.

Tabla 9.8. Rendimiento de proteína individual en el retenido final (N=12) y el retenido final redissuelto (N=12 redissuelto) de la estrategia III.

Proteína	(η_R)_{N=12}	(η_R)_{N=12redissuelto}
ALA	0.072	0.074
BLG	0.085	0.178
BSA	0.772	0.842
IgG	0.383	0.627
LF	0.649	0.854

En la Tabla 9.9 se muestra la suma de los rendimientos de cada proteína en el retenido final redissuelto y en filtrado acumulado final. Prácticamente no se aprecian pérdidas significativas para β -lactoglobulina, BSA e inmunoglobulina G. Por el contrario, se produjo un 18 y 15% de pérdida para α -lactoalbúmina y lactoferrina, respectivamente. En el caso de la α -lactoalbúmina, esta pérdida pudo deberse a la adsorción de la proteína, con

carga neta nula, sobre la membrana o por desnaturalización de la proteína por el esfuerzo de cizalladura causado por la circulación de la corriente de retenido a altas velocidades. En el caso de la lactoferrina, además de estas dos posibles causas, podría deberse a la interacción de esta proteína con la BSA o con la β -lactoglobulina.

Tabla 9.9. Suma de los rendimientos de proteína individual en el retenido final redisuelto (N=12 redisuelto) y en el filtrado acumulado final (N=12) en la estrategia III.

Proteína	$(\eta_R)_{N=12\text{redisuelto}} + (\eta_F)_{N=12}$
ALA	0.82
BLG	0.98
BSA	0.95
IgG	1.03
LF	0.85

9.2.5.3. Fracciones resultantes y mejora de la pureza de la lactoferrina

Como resultado de esta estrategia de fraccionamiento, a partir del lactosuero ácido pretratado inicial se obtienen 3 fracciones:

- Filtrado acumulado de la etapa 1 (N=8)
- Filtrado acumulado de la etapa 2 (N=8-12)
- Retenido final (N=12) o el retenido final redisuelto ajustando el pH a 3.

El rendimiento y pureza de cada una de las proteínas del lactosuero inicial coincide con el de la estrategia I y II (Tabla 9.3). En la Tabla 9.10 se recogen los valores de los rendimientos y purezas de las proteínas en el filtrado acumulado de la primera etapa y en el de la segunda etapa. También se muestra el rendimiento y pureza de ambas fracciones conjuntas. El rendimiento de la fracción conjunta es la suma de los rendimientos individuales, mientras que la pureza presenta un valor intermedio. Ambas fracciones están formadas prácticamente sólo por α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. La principal

diferencia es que la fracción de la segunda etapa no presenta IgG, mientras que el 7.7% del filtrado de la primera etapa corresponde a esta proteína.

Los rendimientos y purezas para el retenido final y el retenido final redisuelto se recogen en la Tabla 9.11. Cabe resaltar que en ambos casos, a pesar de que la β -lactoglobulina es, junto con la α -lactoalbúmina, la proteína que menos rendimiento presenta, debido a su elevada concentración inicial, supone un porcentaje bastante elevado de la fracción. En el retenido final, todas las proteínas excepto la β -lactoglobulina tienen purezas mayores que en el retenido redisuelto. Por el contrario, todos los rendimientos menos el de α -lactoalbúmina, son mayores para el retenido redisuelto.

Tabla 9.10. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el filtrado acumulado de la etapa 1, filtrado acumulado de la etapa 2 y en las dos fracciones juntas de la estrategia III.

Proteína	Filtrado acumulado etapa 1		Filtrado acumulado etapa 2		Filtrado acumulado etapa 1+etapa 2	
	η_F	Pureza	η_F	Pureza	η_F	Pureza
ALA	0.484	0.230	0.261	0.264	0.745	0.241
BLG	0.538	0.690	0.268	0.730	0.806	0.703
BSA	0.055	0.003	0.057	0.006	0.112	0.004
IgG	0.408	0.077	0.000	0.000	0.408	0.053
LF	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 9.11. Rendimiento y pureza de las proteínas individuales en el retenido final y en el retenido final redisuelto de la estrategia III.

Proteína	Retenido final		Retenido final redisuelto	
	η_R	Pureza	η_R	Pureza
ALA	0.072	0.129	0.074	0.080
BLG	0.085	0.412	0.178	0.520
BSA	0.772	0.138	0.842	0.091
IgG	0.383	0.275	0.627	0.271
LF	0.649	0.046	0.854	0.037

Para evaluar la estrategia III desde el punto de vista del objetivo de enriquecer el lactosuero en lactoferrina es necesario analizar cómo varía el factor de mejora de pureza de la lactoferrina a lo largo de los 12 diavolumenes del proceso. En la Figura 9.20 se muestra el factor de mejora de pureza para la lactoferrina en función del número de diavolumen del proceso. Las dos líneas discontinuas verticales separan las dos etapas del proceso, filtración 1 a pH 3 y filtración 2 a pH 4.9, así como el retenido final redisolto. Se observa que a lo largo del proceso siempre se produce mejora de la pureza de lactoferrina ya que el menor valor, 1, corresponde al lactosuero inicial, donde la pureza de lactoferrina es 0.9%. Durante la primera etapa, la pureza inicial de lactoferrina se mejoró hasta un 182%, si bien la mayor parte de esta pureza se consiguió durante los primeros 4 diavolumenes. Pero fue en la segunda etapa donde se produjo el principal aumento del factor de mejora. Así, durante los últimos 4 diavolumenes, la pureza aumentó bruscamente alcanzándose un valor máximo tras los 12 diavolumenes de casi 500% de mejora respecto al valor original. Cuando se redisolvió el retenido de N=12, el factor de mejora disminuyó hasta 392%, pero el rendimiento de lactoferrina en retenido aumentó desde 0.65 (N=12) hasta 0.85 (retenido final redisolto) según se vio en el apartado anterior.

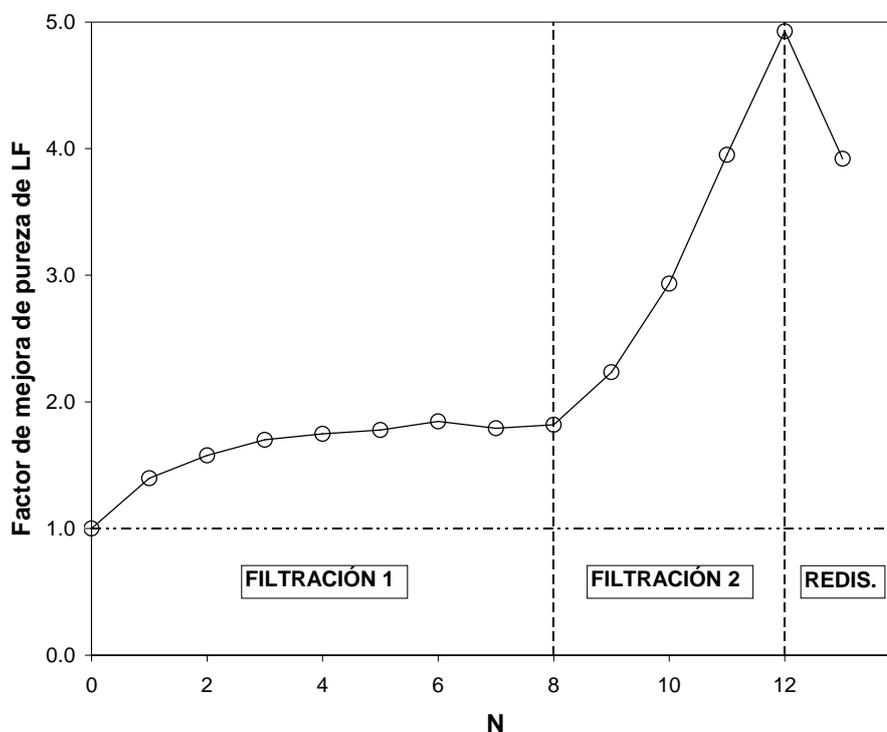


Figura 9.20. Factor de mejora de pureza de lactoferrina en función del número de diavolumenes para la estrategia III.

10. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han puesto de manifiesto la viabilidad de la filtración tangencial de alta resolución para el fraccionamiento de proteínas. Las estrategias de fraccionamiento propuestas mediante dos etapas de ultrafiltración en serie han dado lugar a filtrados y retenidos interesantes desde el punto de vista de la concentración y la purificación de determinadas proteínas. Estas fracciones con mayores purezas en proteína individual que en el lactosuero original, pueden ser empleadas para la formulación de alimentos funcionales, o en el caso de requerimiento de mayor grado de pureza, como partida de procesos de separación por cromatografía, suponiendo una reducción de los costes de esta técnica. No obstante, aunque los resultados son alentadores, se hace necesaria una mayor experimentación para profundizar en el conocimiento de estos sistemas. Las interacciones electrostáticas, principalmente las interacciones proteína-proteína, hace que los resultados obtenidos con disoluciones modelo no sean fácilmente extrapolables a mezclas reales.

De este modo, una de las líneas futuras de investigación irá dirigida a completar el estudio integral del fraccionamiento del lactosuero. Para ello, empleando la estrategia III (primera etapa a pH 3), se optimizará el número de diavolumenes de ambas etapas, y se realizará el estudio del efecto de la etapa de limpieza sobre el comportamiento del sistema.

Otra línea irá dirigida a determinar la funcionalidad de las proteínas presentes en las fracciones resultantes. En este sentido, ya se han comenzado estudios preliminares para comprobar la bioactividad de la lactoferrina de la fracción enriquecida en la misma obtenida en el proceso propuesto. Estos estudios se están realizando en colaboración con la Dra. Olga Martínez del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada.

Como ya se ha mencionado en los antecedentes, la leche materna y, concretamente, algunas proteínas de la misma, así como péptidos derivados, ejercen diversos efectos sobre la inmunidad intestinal con el fin de proteger al recién nacido. Entre las proteínas activas presentes en la leche humana cabe destacar la lactoferrina (LF), que se ha descrito que posee efectos bacteriostáticos, que estimula la fagocitosis de patógenos por macrófagos y que inhibe la acción de virus. Además, diversos estudios han indicado que la lactoferrina es capaz de inhibir la producción de interleukina-8 (IL-8) estimulada por bacterias o por lipopolisacárido (LPS) en distintos tipos de células (Elass *et al.*, 2002; Berlutti *et al.*, 2006),

incluyendo células del epitelio intestinal (Berlutti *et al.*, 2006). La IL-8 es una citokina proinflamatoria producida por enterocitos y otros tipos de células como monocitos y células del epitelio intestinal. Su función esencial es activar y atraer neutrófilos y otras células inmunocompetentes al lugar de la inflamación.

Con el fin de analizar la funcionalidad de la lactoferrina en las fracciones obtenidas, se determinó el efecto sobre la producción de IL-8 del lactosuero inicial (WP) y de la fracción con mayor pureza de lactoferrina (WPLF), es decir, el retenido final (N=12) de la estrategia III. Para ello, se utilizó la línea celular de epitelio intestinal HT-29, cultivada en el medio al que se adicionaron los distintos productos. Se determinó la IL-8 producida en 24 horas empleando varias concentraciones de producto, resultando la concentración más activa la de 1 mg de proteína/mL. Además, como la IL-8 se produce en respuesta a agentes patógenos, se estimularon las células en algunos experimentos con LPS con el fin de observar el efecto de los distintos productos sobre la respuesta inmune en un modelo que simularía una infección bacteriana.

En la Figura 10.1 se muestra la producción de IL-8 para las distintas proteínas individuales presentes en el lactosuero. En la Figura 10.2 se muestra la producción de IL-8, con y sin presencia de LPS, para lactoferrina, lactosuero inicial y fracción enriquecida en lactoferrina. Los resultados indican que la lactoferrina presente en la fracción resultante de la estrategia III sigue manteniendo su funcionalidad.

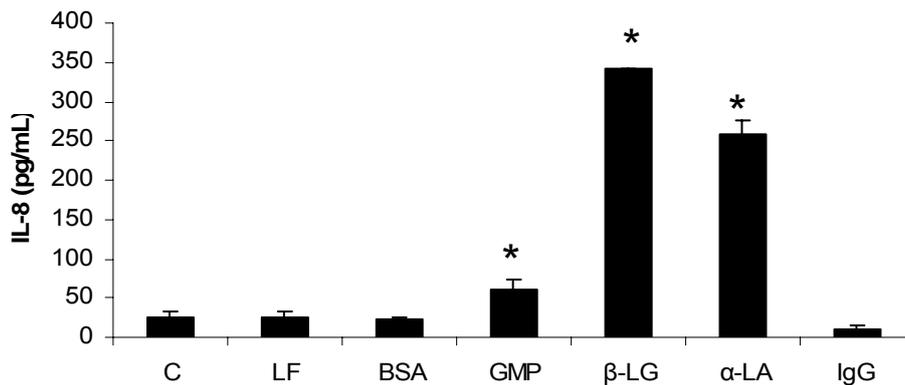


Figura 10.1. Efecto de la adición de proteínas del suero lácteo sobre la producción de IL-8 en células HT-29. Todas las proteínas fueron adicionadas al medio de cultivo en la concentración de 1 mg/mL. Tras 24 h de incubación se determinó la concentración de IL-8 en el medio de cultivo mediante ELISA. Se muestran los datos como media \pm sem de dos experimentos (n=6). C: control, LF: lactoferrina, BSA: albúmina sérica bovina; GMP: glycomacropéptido bovino; β-LG: β-lactoglobulina; α-LA: α-lactoalbúmina, IgG: inmunoglobulinas. Se realizó un ANOVA de una vía y un test a posteriori de LSD.
*: vs C, $p < 0.05$.

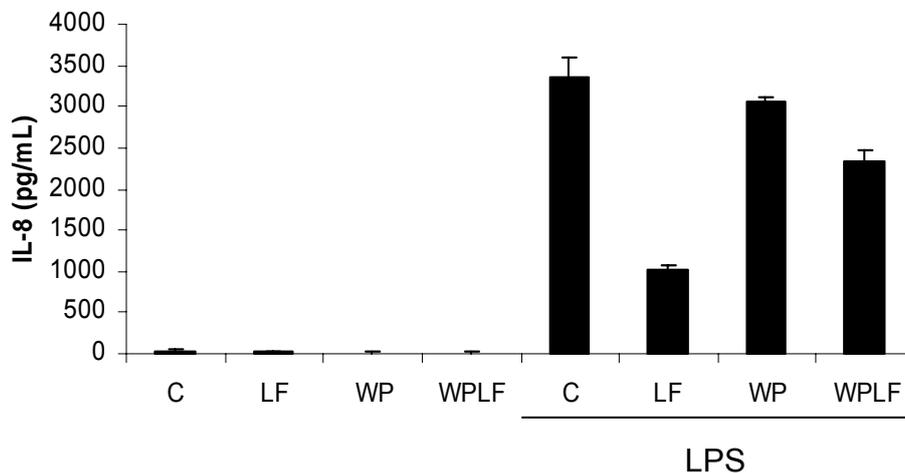


Figura 10.2. Efecto de la adición de lactoferrina (LF), de lactosuero (WP) y de la fracción de proteínas enriquecida en lactoferrina (WPLF) sobre la producción de IL-8 por células HT-29. Todos los productos fueron añadidos en concentraciones finales de 1mg de proteína por mL de medio de cultivo. Tras 24 h de incubación con los distintos productos se determinó la concentración de IL-8 en el medio de cultivo mediante ELISA. Se muestran los datos como media \pm sem de dos experimentos (n=6). Se realizó un ANOVA de una vía para células no estimuladas y otra para células estimuladas con LPS y un test a posteriori de LSD.

11. BIBIOGRAFÍA

Al-Mashikhi, S.A. and Nakai, S., Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques, *J. Dairy Sci.*, 70 (1987) 2486.

Alomirah, H.F. and Alli, I., Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations, *Int. Dairy J.*, 14 (2004) 411.

Álvarez, C., Bertorello, H., Strumla, M. and Sánchez E. I., Preparation and characterization of new biospecific adsorbents with fatty acids as ligands, usable to retain bovine serum albumin, *Polymer*, 37 (1996) 3715.

Ansari, S., Zokaei, F., Kaghazchi, T. and Masoodi, S., Study of microfiltration of sweet cheese whey, *Afinidad*, 63 (2006) 303.

Audic, J-L., Chaufer, B. and Daufin, G., Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review, *Lait*, 83 (2003) 417-438.

Baker, E.N. and Baker, H.M., Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin, *CMLS-Cell. Mol. Life Sci.*, 62 (2005) 2531.

Bazinet, L., Ippersiel, D. and Mahdavi, B., Fractionation of whey proteins by bipolar membrane electroacidification, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5 (2004) 17.

Berlutti, F., Schippa, S., Morea, C., Sarli, S., Perfetto, B., Donnarumma, G. and Valenti, P., Lactoferrin downregulates pro-inflammatory cytokines upexpressed in intestinal epithelial cells infected with invasive or noninvasive *Escherichia coli* strains, *Biochem. Cell Biol.*, 84 (2006) 351.

Beulens, J.W.J., Bindels, J.G., de Graaf, C., Alles, M.S. and Wouters-Wesseling, W., Alpha-lactalbumin combined with a regular diet increases plasma Trp-LNAA ratio, *Physiol. Behav.*, 81 (2004) 585.

Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C. and Datta, S., Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography, *J. Membrane Sci.*, 275 (2006) 141.

Blomkalns, A.L. and Gomez, M.R., Purification of bovine α -lactalbumin by immobilized metal ion affinity chromatography, *Prep. Biochem. Biotech.*, 27 (1997) 219.

Bottomley, R.C., Process for obtaining concentrates having a high alpha-lactalbumin content from whey, US Patent 5,008,376 (1991).

Boye, J.I., Alli, I. and Ismail, A.A., Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy in the study of thermal and structural stability of α -lactalbumin, *J. Agr. Food Chem.*, 45 (1997) 1116.

Bramaud, C., Aimar, P. and Daufin, G., Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment, *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (1997) 391.

Brisson, G., Britten, M. and Pouliot, Y., Electrically-enhanced crossflow microfiltration for separation of lactoferrin from whey protein mixtures, *J. Membrane Sci.*, 297 (2007) 206.

Brock, J.H., The physiology of lactoferrina, *Biochem. Cell Biol.*, 80 (2002) 1.

Burns, D.B. and Zydney, A.L., Effect of solution pH on protein transport through ultrafiltration membranes, *Biotechnol. Bioeng.*, 64 (1999) 27.

Carter, D.C. and Ho, J.X., Structure of Serum Albumin, *Adv. Protein Chem.*, 45 (1994) 153.

Casal, E., Montilla, A., Moreno, F.J., Olano, A. and Corzo, N., Use of chitosan for selective removal of β -lactoglobulin from whey, *J. Dairy Sci.*, 89 (2006) 1384.

Chan, R., Chen, V. and Bucknall, M.P, Quantitative analysis of membrane fouling by protein mixtures using MALDI-MS, *Biotechnol. Bioeng.*, 85 (2004) 190.

Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P. and Brodkorb, A., Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin- Technological implications for processing, *Int. Dairy J.*, 16 (2006) 1229.

Cheang, B. and Zydney, A.L., Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin using membrane ultrafiltration, *Biotechnol. Bioeng.*, 83 (2003) 201.

Cheang, B. and Zydney, A.L., A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate, *J. Membrane Sci.*, 231 (2004) 159.

Chen, L., Guo, C., Guan, Y. and Liu, H., Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation, *Sep. Purif. Technol.*, 56 (2007) 168.

Cheryan, M., *Ultrafiltration and microfiltration handbook*, Technomic Publishing Company, Lancaster, 1998.

Christiansen, K.F., Vegarud, G., Langsrud, T., Ellekjaer, M.R. and Egelanddal, B., Hydrolyzed whey proteins as emulsifiers and stabilizers in high-pressure processed dressings, *Food Hydrocolloids*, 18 (2004) 757.

Clark, W.M., Bansal, A., Sontakke, M. and Ma, Y.H., Protein adsorption and fouling in ceramic ultrafiltration membranes, *J. Membrane Sci.*, 55 (1991) 21.

Conrado, L.S., Veredas, V., Nóbrega, E.S. and Santana, C.C., Concentration of α -lactalbumin from cow milk whey through expanded bed adsorption using a hydrophobic resin, *Braz. J. Chem. Eng.*, 22 (2005) 501.

Cordle, C.T., Thomas, R.L., Criswell, L.G., Enrichment and concentration of proteins by ultrafiltration, US Patent 4,897,465 (1990).

Cui, Z.F., Bellara, S.R. and Homewood, P., Airlift crossflow membrane filtration - A feasibility study with dextran ultrafiltration, *J. Membrane Sci.*, 128 (1997) 83.

Da Fonseca, L.M. and Bradley, R.L., Fractionation of whey proteins by complex formation, U.S. Patent 6,900,290 (2005).

De la Casa, E.J., Tesis doctoral: Estudio de las interacciones proteína-membrana en los procesos de filtración tangencial, 2006.

De la Casa, E.J., Guadix, A., Ibáñez, R. and Guadix, E.M., Influence of pH and salt concentration on the cross-flow microfiltration of BSA through a ceramic membrane, *Biochem. Eng. J.*, 33 (2007) 110.

Doultani, S., Turhan, K.N. and Etzel, M.R., Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography, *Process Biochem.*, 39 (2004) 1737.

Dunlap, C.A. and Côté, G.L., β -lactoglobulin-Dextran Conjugates: Effect of Polysaccharide Size on Emulsion Stability, *J. Agr. Food Chem.*, 53 (2005) 419.

Ekici, P., Backleh-Sohrt, M. and Parlar, H., High efficiency enrichment of total and single whey proteins by pH controlled foam fractionation, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 56 (2005) 223.

Elgar, D.F., Norris, C.S., Ayers, J.S., Pritchard, M., Otter, D.E. and Palmano, K.P., Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene, *J. Chromatogr. A*, 878 (2000) 183.

Elass, E., Masson, M., Mazurier, J. and Legrand, D., Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells, *Infect. Immun.*, 70 (2002) 1860.

Etzel, M.R., Manufacture and use of dairy protein fractions, *J. Nutr.*, 134 (2004) 996S.

Fane, A.G., Fell, C.J.D. and Suki, A., Effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes, *J. Membrane Sci.*, 16 (1983) 195.

FAOSTAT (base de datos estadísticos de la FAO). <http://faostat.fao.org>

Felipe, X. and Law, A.J.R., Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography, *J. Dairy Res.*, 64 (1997) 459.

Firebaugh, J.D. and Daubert, C.R., Emulsifying and foaming properties of a derivatized whey protein ingredient, *Int. J. Food Prop.*, 8 (2005) 243.

FitzGerald, R.J. and Meisel, H., Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides, *Nahrung*, 43 (1999) 165.

Foster, J.F., Albumin structure, function and uses (V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild, eds), Pergamon, Oxford (1977) 53.

Fuda, E., Jauregi, P. and Pyle, D.L., Recovery of lactoferrin and lactoperoxidase from sweet whey using colloidal gas aphanes (CGAs) generated from an anionic surfactant, AOT, *Biotechnol. Progr.*, 20 (2004) 514.

Fuda, E., Bhatia, D., Pyle, D.L. and Jauregi, P., Selective separation of β -lactoglobulin from sweet whey using CGAs generated from the cationic surfactant CTAB, *Biotechnol. Bioeng.*, 90 (2005) 532.

Gesan, G., Daufin, G., Merin, U., Labbe, J.P. and Quemerais, A., Microfiltration performance: physicochemical aspects of whey pretreatment, *J. Dairy Res.*, 62 (1995) 269.

Gésan-Guiziou, G., Daufin, G., Timmer, M., Allersma, D. and Van Der Horst, C., Process steps for the preparation of purified fractions of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from whey protein concentrates, *J. Dairy Res.*, 66 (1999) 225.

Ghosh, R. and Cui, Z.F., Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane, *J. Membrane Sci.*, 167 (2000a) 47.

Ghosh, R. and Cui, Z.F., Simulation study of the fractionation of proteins using ultrafiltration, *J. Membrane Sci.*, 180 (2000b) 29.

Glaser, L.A., Paulson, A.T., Speers, R.A., Yada, R.Y. and Rousseau, D., Foaming behaviour of mixed bovine serum albumin–protamine systems, *Food Hydrocolloid.*, 21 (2007) 495.

Grangeon, A., Lescoche, P., Flat ceramic membranes for the treatment of dairy products: comparison with tubular ceramic membranes, *Lait*, 80 (2000) 5.

Grund, G., Robinson, C.W. and Glick, B.R., Protein type effects on steady-state crossflow membrane ultrafiltration fluxes and protein transmission, *J. Membrane Sci.*, 70 (1992) 177.

Grybos, J., Marszalek, M., Lekka, M., Heinrich, F. and Troger, W., PAC studies of BSA conformational changes, *Hyperfine Interact.*, 159 (2004) 323.

Gurgel, P.V., Carbonell, R.G. and Swaisgood, H.E., Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin, *Bioseparation*, 9 (2001) 385.

Hahn, R., Schulz, P.M., Schaupp, C. and Jungbauer, A., Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 277.

Heebøll-Nielsen, A., Justesen, S.F.L. and Thomas, O.R.T., Fractionation of whey proteins with high-capacity superparamagnetic ion-exchangers, *J. Biotechnol.*, 113 (2004) 247.

Herceg, Z., Rezek, A., Lelas, V., Kresic, G. and Franetovic, M., Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions, *J. Food Eng.*, 79 (2007) 279.

Hermia, J., Constant pressure blocking filtration laws-application to power-law non-newtonian fluids, *Trans. Inst. Chem. Eng. V.*, 60 (1982) 183.

Hill, A.R., Diagrama de alternativas de procesado de lactosuero, Dept. of Food Science, University of Guelph, Canadá (2006). <http://www.foodsci.uoguelph.ca/cheese/sectionh.htm>

Howell, J.A., Wu, D. and Field, R.W., Transmission of bovine albumin under controlled flux ultrafiltration, *J. Membrane Sci.*, 152 (1999) 117.

Huisman, I.H., Prádanos, P. and Hernández, A., The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration, *J. Membrane Sci.*, 179 (2000) 79.

Ibáñez, R., Almécija, M.C., Guadix, A. and Guadix, E.M., Dynamics of the ceramic ultrafiltration of model proteins with different isoelectric point: Comparison of β -lactoglobulin and lysozyme, *Sep. Purif. Technol.*, 57 (2007) 314.

IONICS-Food Center, Diagrama de proceso de obtención de WPI a partir de lactosuero mediante tecnología de membranas (2006). <http://www.ionics.com/pdf/AP2202EUS.pdf>

- Jones, K.L. and O'Melia, C.R., Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: Effects of pH and ionic strength, *J. Membrane Sci.*, 165 (2000) 31.
- Jones, K.L. and O'Melia, C.R., Ultrafiltration of protein and humic substances: Effect of solution chemistry on fouling and flux decline, *J. Membrane Sci.*, 193 (2001) 163.
- Kellam, S., The manufacture of lactose, *Chemical Processes in New Zealand* (1998) III, Dairy, F. http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/chem_processes.html
- Kiesner, C., Clawin-Rädecker, I., Meisel, H. and Buchheim, W., Manufacturing of α -lactalbumin-enriched whey systems by selective thermal treatment in combination with membrane processes, *Lait*, 80 (2000) 99.
- Kim, S.H., Morr, C.V., Seo, A. and Surak, J.G., Effect of whey pretreatment on composition and functional properties of whey protein concentrate, *J. Food Sci.*, 54 (1989) 25.
- Ko, M.K., Pellegrino, J.J., Nassimbene, R. and Marko, P., Characterization of the adsorption-fouling layer using globular proteins on ultrafiltration membranes, *J. Membrane Sci.*, 76 (1993) 101.
- Konrad, G., Lieske, B., and Faber, W., A large-scale isolation of native β -lactoglobulin: Characterization of physicochemical properties and comparison with other methods, *Int. Dairy J.*, 10 (2000) 713.
- Kouoh, F., Gressier, B., Luyckx, M., Brunet, C., Dine, T., Cazin, M. and Cazin, J.C., Antioxidant properties of albumin: Effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes, *Il Farmaco*, 54 (1999) 695.
- Kushibiki, S., Hodate, K., Kurisaki, J., Shingu, H., Ueda, Y., Watanabe, A. and Shinoda, M., Effect of β -lactoglobulin on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves, *J. Dairy Res.*, 68 (2001) 579.
- Lain, E.R., Conferencia: El suero lácteo de quesería: el ayer y el presente. (2000)

Lampreave, F., Pineiro, A., Brock, J.H., Castillo, H., Sanchez, L. and Calvo, M., Interaction of bovine lactoferrin with other proteins of milk whey, *Int. J. Biol. Macromol.*, 12 (1990) 2.

Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M. and Mazurier, J., Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62 (2005) 2549.

Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M. and Mazurier, J., Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function, *Biochem. Cell Biol.*, 84 (2006) 282.

Liang, M., Chen, V.Y.T., Chen, H-L. and Chen, W., A simple and direct isolation of whey components from raw milk by gel filtration chromatography and structural characterization by Fourier transform Raman spectroscopy, *Talanta*, 69 (2006) 1269.

Li-Chan, E.C.Y., Ler, S.S., Kummer, A. and Akita, E.M., Isolation of lactoferrin by immunoaffinity chromatography using yolk antibodies, *J. Food Biochem.*, 22 (1998) 179.

Lien, E.L., Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin, *Am. J. Clin. Nutr.*, 77 (2003) 1555.

Liu, Y., Sun, X. and Li, B.H., Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin by a convenient liquid-solid extraction system: Application to milk whey, *Chem. Eng. Technol.*, 29 (2006) 1424.

Lu, R.R., Xu, S.Y., Wang, Z. and Yang, R.J., Isolation of lactoferrin from bovine colostrum by ultrafiltration coupled with strong cation exchange chromatography on a production scale, *J. Membrane Sci.*, 297 (2007) 152.

Lucas, D., Rabiller-Baudry, M., Millesime, L., Chaufer, B. and Daufin, G., Extraction of α -lactalbumin from whey protein concentrate with modified inorganic membranes, *J. Membrane Sci.*, 148 (1998) 1.

Lucena, M.E., Alvarez, S., Menéndez, C., Riera, F.A. and Alvarez, R., Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates. Production of milk derivatives as a base for infant formulas, *Sep. Purif. Technol.*, 52 (2006) 310.

Markus, C.R., Olivier, B., Panhuysen, G.E.M., Van der Gugten, J., Alles, M.S., Tuiten, A., Westenberg, H.G.M., Fekkes, D., Koppeschaar, H.F. and de Haan, E.E.H.F., The bovine protein α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress, *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (2000) 1536.

Marshall, A.D., Munro, P.A. and Trägårdh, G., Influence of ionic calcium concentration on fouling during the cross-flow microfiltration of β -lactoglobulin solutions, *J. Membrane Sci.*, 217 (2003) 131.

Mathews, C.K., van Holde, K.E. and Ahern, K.G., *Biochemistry* 3 rd. edition, Addison Wesley Longman, Inc. Benjamin/Cummings, 2000.

Matthews, M.E., Doughty, R.K., Short, J.L., Pretreatment of acid casein wheys to improve processing rates in ultrafiltration, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 13 (1978) 216.

Matzinos, P. and Álvarez, R., Effect of ionic strength on rinsing and alkaline cleaning of ultrafiltration inorganic membranes fouled with whey proteins, *J. Membrane Sci.*, 208 (2002) 23.

McIntosh, G.H., Royle, P.J., Le Leu, R.K., Regester, G.O., Johnson, M.A., Grinsted, R.L., Kenward, R.S. and Smithers, G.W., Whey proteins as functional food ingredients?, *Int. Dairy J.*, 8 (1998) 425.

Mehra, R. and Kelly, P.M., *A membrane filtration approach to whey protein fractionation*, The Irish Scientist Year Book, Oldbury Publishing Limited, 2004.

Mehra, R., Marnila, P. and Korhonen, H., Milk immunoglobulins for health promotion, *Int. Dairy J.*, 16 (2006) 1262.

Mehta, A. and Zydney, A.L., Permeability and selectivity analysis for ultrafiltration membranes, *J. Membrane Sci.*, 249 (2005) 245.

Menon, M.K. and Zydney, A.L., Effect of ion binding on protein transport through ultrafiltration membranes, *Biotechnol. Bioeng.*, 63 (1999) 298.

Mignard, D. and Glass, D.H., Fouling during the cross-flow ultrafiltration of proteins: A mass-transfer model, *J. Membrane Sci.*, 186 (2001) 133.

Militello, V., Vetri, V. and Leone, M., Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin, *Biophys. Chem.*, 105 (2003) 133.

Militello, V., Casarino, C., Emanuele, A., Giostra, A., Pullara, F. and Leone, M., Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering, *Biophys. Chem.*, 107 (2004) 175.

Millesime, L., Amiel, C. and Chaufer, B., Ultrafiltration of lysozyme and bovine serum albumin with polysulfone membranes modified with quaternized polyvinylimidazole, *J. Membrane Sci.*, 89 (1993) 223.

Millesime, L., Dulieu, J., Chaufer, B., Protein retention with modified and unmodified inorganic ultrafiltration membranes: Model of ionic strength controlled retention, *J. Membrane Sci.*, 108 (1995) 143.

Moore, S.A., Anderson, B.F., Groom, C.R., Haridas, M. and Baker, E.N., Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 274 (1997) 222.

Mullally, M.M., Meisel, H. and FitzGerald, R.J., Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins, *Int. Dairy J.*, 7 (1997) 299.

Muller, A., Daufin, G. and Chaufer, B., Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey, *J. Membrane Sci.*, 153 (1999) 9.

Muller, A., Chaufer, B., Merin, U. and Daufin, G., Prepurification of α -lactalbumin with ultrafiltration ceramic membranes from acid casein whey: Study of operating conditions, *Lait*, 83 (2003a) 111.

Muller, A., Chaufer, B., Merin, U. and Daufin, G., Purification of α -lactalbumin from a prepurified acid whey: Ultrafiltration or precipitation, *Lait*, 83 (2003b) 439.

- Musale, D.A. and Kulkarni, S.S., Effect of Whey Composition on ultrafiltration performance, *J. Agr. Food Chem.*, 46 (1998) 4717.
- Neiryneck, N., Van der Meeren, P., Gorbe, S.B., Dierckx, S. and Dewettinck, K., Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins, *Food Hydrocolloid.*, 18 (2004) 949.
- Nel, R.G., Oppenheim, S.F. and Rodgers, V.G.J., Effects of solution properties on solute and permeate flux in bovine serum albumin-IgG ultrafiltration, *Biotechnol. Progr.*, 10 (1994) 539.
- Neyestani, T.R., Djalali, M. and Pezeshki, M., Isolation of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity, *Protein Expres. Purif.*, 29 (2003) 202.
- Noordman, T.R., Ketelaar, T.H., Donkers, F. and Wesselingh, J.A., Concentration and desalination of protein solutions by ultrafiltration, *Chem. Eng. Sci.*, 57 (2002) 693.
- Nyström, M., Aimar, P., Luque, S., Kulovaara, M. and Metsämuuronen, S., Fractionation of model proteins using their physiochemical properties, *Colloid Surface A*, 138 (1998) 185.
- Oppenheim, S.F., Phillips, C.B. and Rodgers, V.G.J., Analysis of initial protein surface coverage on fouled ultrafiltration membranes, *J. Colloid Interf. Sci.*, 184 (1996) 639.
- Outinen, M., Tossavainen, O., Tupasela, T., Koskela, P., Koskinen, H., Rantamäki, P., Syväoja, E.-L., Antila, P. and Kankare, V., Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 29 (1996) 411.
- Palacio, L., Tesis doctoral: Caracterización estructural y superficial de membranas microporosas, Universidad de Valladolid, 1999.
- Palmano, K.P. and Elgar, D.F., Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene, *J. Chromatogr. A*, 947 (2002) 307.

Pérez, M.D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., Oria, R. and Calvo, M., Effect of β -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk, *Biochim. Biophys. Acta*, 1123 (1992) 151.

Persson, A., Jönsson, A.S. and Zacchi, G., Transmission of BSA during cross-flow microfiltration: Influence of pH and salt concentration, *J. Membrane Sci.* 223 (2003) 11.

Pessela, B.C.C., Torres, R., Batalla, P., Fuentes, M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R. and Guisán, J.M., Simple purification of immunoglobulins from whey proteins concentrate, *Biotechnol. Progr.*, 22 (2006) 590.

Pharmacia Biotech, Gel filtration calibration kit, Technical document (1999).

Pihlanto-Leppälä, A., Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides, *Trends Food Sci. Technol.*, 11 (2001) 347.

Plate, K., Beutel, S., Buchholz, H., Demmer, W., Fischer-Frühholz, S., Reif, O., Ulber, R. and Scheper, T., Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1117 (2006) 81.

Poole, S., West, S.I. and Walters, C.L., Protein-protein interactions: Their importance in the foaming of heterogeneous protein systems, *J. Sci. Food Agric.*, 35 (1984) 701.

Prádanos, P., Hernández, A., Calvo, J.I. and Tejerina, F., Mechanisms of protein fouling in cross-flow UF through an asymmetric inorganic membrane, *J. Membrane Sci.*, 114 (1996) 115.

Prieto, C.A., Guadix, A., González-Tello, P. and Guadix, E.M., A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein, *J. Food Eng.*, 78 (2007) 257.

Pujar, N.S. and Zydney, A.L., Electrostatic and electrokinetic interactions during protein transport through narrow pore membranes, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 33 (1994) 2473.

Pujar, N.S. and Zydney, A.L., Charge regulation and electrostatic interactions for a spherical particle in a cylindrical pore, *J. Colloid Interf. Sci.*, 192 (1997) 338.

Pujar, N.S. and Zydney, A.L., Electrostatic effects on protein partitioning in size-exclusion chromatography and membrane ultrafiltration, *J. Chromatogr. A*, 796 (1998) 229.

Rabiller-Baudry, M., Chaufer, B., Lucas, D. and Michel, F., Ultrafiltration of mixed protein solutions of lysozyme and lactoferrin: Role of modified inorganic membranes and ionic strength on the selectivity, *J. Membrane Sci.*, 184 (2001) 137.

Rao, S. and Zydney, A.L., Controlling protein transport in ultrafiltration using small charged ligands, *Biotechnol. Bioeng.*, 91 (2005) 733.

Ricq, L., Narçon, S., Reggiani, J-C. and Pagetti, J., Streaming potential and protein transmission ultrafiltration of single proteins and proteins in mixture: β -lactoglobulin and lysozyme, *J. Membrane Sci.*, 156 (1999) 81.

Rinn, J.C., Morr, C.V., Seo, A. and Surak, J.G., Evaluation of nine semi-pilot scale whey pretreatment modifications for producing whey protein concentrate, *J. Food Sci.*, 55 (1990) 510.

Rodrigues, L.R., Venâncio, A. and Teixeira, J.A., Partitioning and separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two-phase systems, *Biotechnol. Lett.*, 23 (2001) 1893.

Saksena, S. and Zydney, A.L., Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins (IgG) by selective filtration, *Biotechnol. Bioeng.*, 43 (1994) 960.

Saksena, S. and Zydney, A.L., Influence of protein-protein interactions on bulk mass transport during ultrafiltration, *J. Membrane Sci.*, 125 (1997) 93.

Sandoval Pinto, K.P., Bebida proteica saborizada a partir de lactosuero, Proyecto de Investigación, 2005.

Schlatterer, B., Baeker, R. and Schlatterer, K., Improved purification of β -lactoglobulin from acid whey by means of ceramic hydroxyapatite chromatography with sodium fluoride as a displacer, *J. Chromatogr. B*, 807 (2004) 223.

Shah, T.N., Foley, H.C. and Zydney, A.L., Development and characterization of nanoporous carbon membranes for protein ultrafiltration, *J. Membrane Sci.*, 295 (2007) 40.

Skoog, B. and Wichman, A., Calculation of the isoelectric points of polypeptides from the amino acid composition, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 5 (1986) 82.

Stamler, J.S., Singel, D.J. and Loscalzo, J., *Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms*, Science, 258 (1992) 1898.

Swiss Institute of Bioinformatics. <http://www.expasy.org>

Taulier, N. and Chalikian, T.V., Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies, *J. Mol. Biol.*, 314 (2001) 873.

Tsuda, H., Sekine, K., Fujita, K. and Iigo, M., Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms-a review of experimental and clinical studies, *Biochem. Cell Biol.* 80 (2002) 131.

Ulber, R., Plate, K., Weiss, T., Demmer, W., Buchholz, H., and Scheper, T., Downstream processing of bovine lactoferrin from sweet whey, *Acta Biotechnologica*, 21 (2001) 27.

Valenti, P. and Antonini, G., Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62 (2005) 2576.

Van der Kraan, M.I.A., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E.C.I., Bolscher, J.G.M. and Amerongen, A.V.N., Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin, *Peptides*, 25 (2004) 177.

Van Reis, R., Gadam, S., Frautschy, L.N., Orlando, S., Goodrich, E.M., Saksena, S., Kuriyel, R., Simpson, C.M., Pearl, S. and Zydney, A.L., High performance tangential flow filtration, *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (1997) 71.

Van Reis, R., Brake, J.M., Charkoudian, J., Burns, D.B. and Zydney, A.L., High-performance tangential flow filtration using charged membranes, *J. Membrane Sci.*, 159 (1999) 133.

Van Reis, R. and Zydney, A., Membrane separations in biotechnology, *Curr. Opin. Biotech.*, 12 (2001) 208.

Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D.F. and Appel, R.D., Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - A World-Wide-Web-accessible tool, *Electrophoresis*, 18 (1997) 403.

Wolman, F.J., Maglio, D.G., Grasselli, M. and Cascone, O., One-step lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography, *J. Membrane Sci.*, 288 (2007) 132.

Xu, Y., Sleight, R., Hourigan, J. and Johnson, R., Separation of bovine immunoglobulin G and glycomacropeptide from dairy whey, *Process Biochem.*, 36 (2000) 393.

Yang Jr., F., Zhang, M., Chen, J. and Liang, Y., Structural changes of α -lactalbumin induced by low pH and oleic acid, *BBA-Proteins Proteom.*, 1764 (2006) 1389.

Ye, X., Yoshida, S. and Ng, T.B., Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32 (2000) 1143.

Zeman, L. and Wales, M., Steric rejection of polymeric solutes by membranes with uniform pore size distribution, *Sep. Sci. Technol.*, 16 (1981) 275.

Zeman, L.J. and Zydney, A.L., *Microfiltration and ultrafiltration: Principles and applications*, Marcel Dekker, Inc., 1996.

Zhang, N.T., Nakano, T. and Ozimek, L., Isolation of lactoferrin from bovine colostrum by SP-Sepharose cation-exchange chromatography, *Milchwissenschaft*, 57 (2002) 614.

Zulkali, M.M.D., Ahmad, A.L. and Derek, C.J.C., Membrane application in proteomic studies: Preliminary studies on the effect of pH, ionic strength and pressure on protein fractionation, *Desalination*, 179 (2005) 381.

Zydney, A.L., Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation, *Int. Dairy J.*, 8 (1998) 243.