

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA

QUÍMICA



DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN REACTOR DE
MEMBRANA DISCONTINUO PARA LA HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

TESIS DOCTORAL

CARLOS ALBERTO PRIETO VELASCO

2007

Durante los años que he trabajado en esta tesis he tenido la suerte de contar con muchos compañeros y amigos que han significado una gran ayuda en mi labor, tanto en el ámbito profesional como en el personal. A todos ellos van dedicadas estas líneas de agradecimiento:

Al Dr. Antonio Guadix Escobar por haber aportado tanto trabajo y dedicación a esta tesis doctoral, casi siempre fuera de su horario laboral. Sin duda, su papel de director ha sido ejemplar en todos los aspectos.

A la Dra. Emilia M. Guadix Escobar por su minuciosa y paciente labor de revisión página a página del contenido de esta tesis. Más allá de lo que significa esta tesis, gracias por tu amistad.

Al Dr. Pedro González Tello, no sólo en su papel de director de tesis sino como responsable del proyecto de investigación dentro del cual me inicié en el mundo investigador.

Sobre todo, gracias a los tres por vuestra extraordinaria calidad humana y vuestra cercanía. Estoy seguro de haber tenido los mejores maestros.

A todos mis antiguos compañeros del Departamento de Ingeniería Química, ha sido un gran placer conocerlos y por supuesto, trabajar con vosotros durante estos años. Especialmente a quienes compartisteis conmigo muchas horas en el laboratorio y muchas buenas experiencias fuera de él: JuanFra, Mari Carmen, Rubén, Encarni, José Edgar, Emilio, Marian, Miguel, Alejandro, Deisi y Nela. Seguro que en el futuro seguiremos compartiendo buenos momentos.

A todos mis compañeros del Departamento Químico de PETRESA, por su ánimo y apoyo para que esta tesis llegara a buen puerto. En especial, gracias a Ignacio López que me ha facilitado en todo momento flexibilidad para poder trabajar en la tesis. Gracias a José Luis Almeida y José Luis Berna por demostrar que la investigación de calidad tiene cabida también en la empresa. A todos gracias por vuestra confianza y amistad.

Este trabajo tan largo y agotador no habría sido posible sin el apoyo de mi familia y amigos.

Gracias a mis padres, ellos no me han enseñado Química, pero eso se aprende en los libros. Ellos me han dado lo fundamental: todo el amor y cariño. Gracias por apoyarme incluso cuando me he equivocado. Gracias por todo.

Mi hermano Juan Antonio me ha aclarado las ideas en muchos aspectos de esta tesis y también en cómo afrontar muchas situaciones en la vida. A veces tú pareces el más maduro de los dos. Gracias por enseñarme tanto, cada día aprendo más de ti. Gracias por estar siempre donde se te necesita.

Gracias a los amigos de siempre porque aunque pasa el tiempo y la vida nos lleva de aquí para allá, sé dónde encontrarlos. Gracias a todos: Miguel, Juan, Rafa, Manu, Antonio, José, Rafa Contreras, Arkaitz, Paco, Agu y Enrique.

Tanto a mi familia como amigos debo pedirles perdón por las frecuentes ausencias, es lo peor de tener que luchar en tantos frentes. Espero que los reencuentros hayan merecido la pena.

A Lupe, gracias por compartir conmigo el camino que nos ha traído hasta aquí. Saber que tú estabas ahí me ha dado fuerza de ánimo en todas las situaciones. Gracias por lo pasado, por nuestro día a día y por todo lo que nos queda por delante.

1. RESUMEN DEL TRABAJO	5
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1 Hidrólisis enzimática de proteínas	13
2.1.1 <i>Química del enlace peptídico</i>	13
2.1.2 <i>Medida del grado de hidrólisis.</i>	14
2.1.3 <i>Sustratos</i>	15
2.1.4 <i>Enzimas</i>	17
2.2 Aplicaciones	21
2.2.1 <i>Propiedades funcionales.</i>	22
2.2.2 <i>Nutrición infantil y clínica</i>	25
2.2.3 <i>Fuente de péptidos bioactivos</i>	27
2.3 Métodos de producción	30
2.3.1 <i>Reactores tipo tanque agitado por lotes</i>	30
2.3.2 <i>Reactores de enzimas inmovilizadas</i>	34
2.3.3 <i>Reactores de membrana</i>	38
3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	47
4. MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1 Materiales	53
4.1.1 <i>Sustrato</i>	53
4.1.2 <i>Enzima</i>	54
4.2 Métodos analíticos	55
4.2.1 <i>Determinación del grado de hidrólisis</i>	55
4.2.2 <i>Determinación del potencial antigénico</i>	58
4.2.3 <i>Distribución de pesos moleculares</i>	61
4.3 Correlación entre grado de hidrólisis y potencial antigénico	62
4.4 Selección del módulo de membrana	62
4.4.1 <i>Tamaño nominal de corte</i>	62
4.4.2 <i>Caracterización del módulo de membrana</i>	63

4.5	Reactor discontinuo de membrana	66
4.5.1	<i>Unidad de reacción</i>	66
4.5.2	<i>Unidad de separación</i>	66
4.5.3	<i>Modo de operación</i>	69
4.6	Influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en la operación del reactor discontinuo de membrana	70
4.7	Estimación de parámetros	72
4.8	Optimización numérica	73
5.	ASPECTOS TEÓRICOS	77
5.1	Modelo sin desactivación enzimática	82
5.2	Modelo para desactivación enzimática de orden 0	83
5.3	Modelo para desactivación enzimática de orden 1	83
5.4	Modelo para desactivación enzimática de orden 2	84
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
6.1	Correlación entre grado de hidrólisis y potencial antigénico	87
6.2	Selección del tamaño de corte y caracterización de la membrana	89
6.2.1	<i>Selección del tamaño de corte de la membrana</i>	89
6.2.2	<i>Caracterización del módulo de membrana</i>	92
6.3	Influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en la operación del reactor discontinuo de membrana	97
6.4	Estimación de parámetros cinéticos	119
6.5	Optimización de la operación del reactor discontinuo de membrana	130
6.5.1	<i>Optimización a temperatura fijada</i>	132

6.5.2	<i>Optimización a temperatura constante</i>	207
6.5.3	<i>Optimización a temperatura variable</i>	214
7.	CONCLUSIONES	227
8.	NOMENCLATURA	233
9.	BIBLIOGRAFÍA	239
10.	APÉNDICE: DATOS EXPERIMENTALES	257
10.1	Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 45 °C.	259
10.2	Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 50 °C.	265
10.3	Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 55 °C.	272
10.4	Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 60 °C.	277
10.5	Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 65 °C.	282
10.6	Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 70 °C.	292
10.7	Tiempo de hidrólisis. Resumen	298

1. RESUMEN DEL TRABAJO

Los hidrolizados de proteínas se emplean a escala comercial en productos hipoalergénicos y en nutrición clínica debido a la reducción de antigenicidad de la proteína conseguida mediante la hidrólisis enzimática. Actualmente, los hidrolizados enzimáticos de proteínas se producen en operaciones por lotes en reactores tipo tanque agitado. Sin embargo, este modo de operación conlleva importantes inconvenientes: infrautilización de enzima, coste energético asociado a la desactivación térmica de la enzima, coste de mano de obra, variabilidad lote a lote, etc. Para superar estos inconvenientes se han empleado reactores con enzimas inmovilizadas y reactores continuos de membrana. Sin embargo, hasta la fecha su aplicación industrial es muy limitada, debido por una parte al alto coste asociado a la inmovilización y, por otra, a los fenómenos de colmatación de las membranas que limitan su operatividad.

El presente trabajo presenta el reactor discontinuo de membrana como una alternativa que auna las ventajas de los diferentes modos de operación: la flexibilidad y sencillez de la operación del reactor tipo tanque agitado junto a la reutilización de la enzima del reactor de membrana en continuo. El modo de operación del reactor discontinuo de membrana consiste en la sucesión de varios ciclos de: 1) hidrólisis, 2) recuperación de la enzima por ultrafiltración y 3) reutilización de la enzima en una nueva hidrólisis.

Así, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el diseño y optimización del funcionamiento de un reactor discontinuo de membrana para la producción de hidrolizados enzimáticos de proteínas.

Como estudio de caso se ha abordado la producción de un hidrolizado de proteínas del lactosuero bovino con el objeto de reducir 10^3 veces el carácter alergénico de la proteína nativa y así poder ser empleado en la formulación de productos para nutrición infantil y clínica. Se ha correlacionado la reducción de antigenicidad con el grado de hidrólisis y se ha determinado que es necesario alcanzar un grado de hidrólisis de 0.15 para reducir la antigenicidad en un 99.9 %. Para dicho grado de hidrólisis el peso molecular de los péptidos liberados es menor de 8000 Da, por lo que se ha seleccionado una membrana de ultrafiltración con dicho tamaño nominal de corte. Mediante un ensayo de caída de pH se ha comprobado que para dicha membrana no existe fuga de enzima.

Se ha analizado la influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en el proceso de reacción. Se han desarrollado varios modelos cinéticos correspondientes a diferentes órdenes de desactivación enzimática. Los datos experimentales se ajustan a un modelo de desactivación enzimática de segundo orden y cinética de hidrólisis de orden cero. Mediante técnicas de regresión no lineal se ha determinado el valor de los parámetros cinéticos, k_h y k_d , característicos del modelo propuesto.

A partir del modelo cinético se ha planteado la optimización del sistema en tres situaciones diferentes de operación: temperatura fijada, temperatura constante y temperatura variable.

En la operación a temperatura fijada se ha demostrado que para cada temperatura de operación el valor de la función objetivo sólo depende de la productividad P exigida al reactor y que existe un número óptimo de usos de enzima que minimiza el valor de consumo total de enzima. El número óptimo de usos de enzima varía entre 8 usos para la operación a 45 °C y 4 usos para la operación a 65 °C. En todos estos casos existe un ahorro de enzima para el reactor discontinuo de membrana frente a la operación por lotes que varía entre 57 % y 5 % para 45 °C y 65 °C, respectivamente. Además, la cantidad de enzima no aprovechada durante la reacción es muy alta en el caso de la operación por lotes (entre un 52-83 %), mientras que con la reutilización, la enzima sobrante apenas llega al 22-25 % de la cantidad inicial añadida.

Por otra parte, en la operación a temperatura constante se ha optimizado conjuntamente la temperatura y número de usos de enzima para el reactor. Nuevamente se ha determinado que el modo de operación óptimo depende de la productividad requerida al reactor. Así pues, para valores de productividad mayores de 0.62 h^{-1} el número óptimo de usos de enzima es igual a uno; esto es no se reutiliza la enzima. Sin embargo, por debajo de dicha productividad sí existe un número óptimo de usos de enzima que mejora la operación del reactor por lotes. En este caso, el número óptimo de usos de enzima más alto es 4 para operación con productividad inferior a 0.58 h^{-1} , siendo 59.4 °C la temperatura óptima de operación. En estas condiciones existe un ahorro de enzima respecto a la operación óptima del reactor batch convencional que puede llegar a ser del 18%.

En cuanto a la operación con temperatura variable se ha planteado un problema de optimización conjunta del número de usos de enzima y la progresión de temperaturas que minimicen la cantidad total de enzima empleada en el proceso. Se ha hallado que la progresión óptima de temperaturas y el número óptimo de usos de enzima sólo es función de la productividad. Para productividad superior a 0.99 h^{-1} el número óptimo de usos de enzima es uno. El mayor número de usos de enzima se obtiene para valores de $P < 0.58 \text{ h}^{-1}$ siendo el número óptimo de usos de enzima igual a 5. En cada uso la temperatura óptima es la siguiente: $54.8 \text{ }^\circ\text{C}$, $56.4 \text{ }^\circ\text{C}$, $58.3 \text{ }^\circ\text{C}$, $60.9 \text{ }^\circ\text{C}$ y $65.7 \text{ }^\circ\text{C}$. En este rango de productividad ($<0.58 \text{ h}^{-1}$), la enzima sobrante al final de la operación es de sólo 15 % respecto a la cantidad inicial de catalizador. Por último, existe un ahorro adicional máximo de un 11 % si se compara la mejor operación con temperatura variable respecto a la operación a temperatura constante.

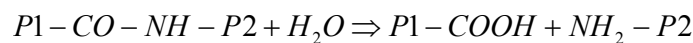
2. INTRODUCCIÓN

La modificación de la estructura de las proteínas alimentarias mediante hidrólisis enzimática permite mejorar las propiedades funcionales, nutricionales e inmunológicas del alimento original sin perder valor nutritivo. La hidrólisis mejora la solubilidad, el poder espumante y la capacidad emulsificante de las proteínas. Aumenta su digestibilidad y reduce el carácter alergénico. Además, mediante hidrólisis enzimática se obtienen determinados péptidos de actividad biológica demostrada, que se emplean en la formulación de nuevos productos proteicos de alto valor añadido (alimentos funcionales). Por todo ello, el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas es de gran interés para la industria alimentaria, siendo los hidrolizados ampliamente utilizados en la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos y nutrición infantil y clínica.

2.1 Hidrólisis enzimática de proteínas

2.1.1 Química del enlace peptídico

La reacción de hidrólisis consiste en la ruptura del enlace existente entre los aminoácidos que componen una cadena peptídica, consumiéndose una molécula de agua por cada enlace roto. Las proteasas catalizan esta ruptura del enlace peptídico:



Su actuación continuada sobre la proteína da lugar a las siguientes especies intermedias:

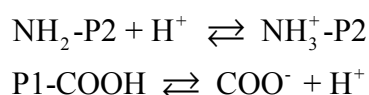


Cada una de estas especies se diferencia fundamentalmente por su solubilidad, y se corresponde aproximadamente con los pesos moleculares medios y con la relación nitrógeno amino / nitrógeno total que se recogen en la Tabla 2-1 (Knights, 1985).

Tabla 2-1. Relación nitrógeno amino / nitrógeno total para diferentes secuencias peptídicas

Especie proteica	Peso molecular (g / mol)	Nitrógeno amino / nitrógeno total
Proteínas	>20000	<0.01
Proteosomas	5000-10000	<0.01
Peptonas	1000-6000	0.1-0.5
Péptidos	200-500	0.5-0.8
Aminoácidos	75-200	0.8-0.9

La hidrólisis del enlace peptídico supone además la liberación de los grupos amino y carboxilo terminales, estableciéndose los siguientes equilibrios ácido-base en el medio:



Por tanto, el estado de protonización de una proteína depende del pH del medio. Los valores de pK a 25 °C de estos grupos en el polipéptido se estiman entre 3.1-3.6 y 7.5-7.8, respectivamente (Steinhardt y Beychok, 1964; Rupley, 1967). A valores de pH superiores a 7.5-7.8, los grupos carboxilo estarán totalmente disociados y parcialmente los grupos amino. Por tanto, la rotura de un equivalente de enlaces conduce a una liberación de 0.5-1.0 equivalentes de protones, es decir, el pH disminuirá. En el caso de pH inferiores a 3.1-3.6 ocurrirá lo contrario y el pH aumentará. En definitiva, si la hidrólisis se produce a valores de pH fuera del rango dado por los valores de pK de los grupos amino y carboxilo, será necesaria la adición de base o de ácido para mantener el pH constante.

2.1.2 Medida del grado de hidrólisis.

El criterio cuantitativo para la medida del avance de la reacción proteolítica es el grado de hidrólisis, que se define como la relación entre el número de enlaces peptídicos rotos y el número total de enlaces peptídicos en la proteína.

Existen diferentes métodos para medir el grado de hidrólisis. Éstos se basan fundamentalmente en 1) la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético (TCA), 2) la determinación de los grupos α -amino

libres, 3) la valoración del protón liberado tras la ruptura del enlace peptídico a determinados valores de pH y 4) la medida del descenso del punto crioscópico.

Determinación del nitrógeno soluble: las técnicas más usuales son el método Kjeldhal, la reacción de Biuret (Hung *et al.*, 1984) o la determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos (Pelissier, 1984).

Determinación de los grupos α -amino libres: la técnica más antigua es la reacción con ninhidrina (Moore y Stein, 1948), aunque presenta problemas de interferencias con amonio y una elevada duración. Otro reactivo empleado es el ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS). Este método presenta importantes inconvenientes: alto color de los blancos, contaminación del TNBS con ácido pícrico, interferencia de azúcares reductores y amonio, falta de reactividad de la prolina e hidroxiprolina así como la alteración de los resultados por la reacción de los grupos ϵ -amino de lisina con el reactivo. También el ortofenilaldehído (OPA) se ha empleado como reactivo, aunque tiene el inconveniente de no reaccionar con prolina y sólo parcialmente con la cisteína.

Valoración del protón. Técnica del pH-estato: Como se ha expuesto anteriormente la reacción de hidrólisis de proteínas transcurre con liberación o consumo de protones. Por ello el control de la hidrólisis enzimática puede ser realizado por medida del consumo de agente neutralizante necesario para mantener constante el pH (Adler-Nissen, 1986; Camacho *et al.*, 2001). Cabe destacar que sólo el método del pH-estato permite determinar el grado de hidrólisis de forma continua.

Descenso del punto crioscópico: el proceso de hidrólisis da lugar a la aparición de nuevas especies y por tanto a un aumento de la osmolalidad. Esto permite la determinación del grado de hidrólisis mediante medida del descenso en el punto crioscópico de la mezcla (Adler-Nissen, 1986; Guadix, 2001).

2.1.3 Sustratos

La función primaria de las proteínas alimentarias es aportar a los organismos animales nitrógeno y aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, en las cantidades y proporciones necesarias para la síntesis de tejido proteico. Está ampliamente reconocido que no todas las proteínas poseen igual capacidad para promover el

crecimiento y la formación de tejidos, sino que el contenido y el perfil de aminoácidos está directamente relacionado con la calidad nutricional de la proteína (FAO, 1981).

La calidad de la proteína puede cuantificarse mediante parámetros como la utilización neta de proteína (NPU: proporción de proteína ingerida que se retiene), la digestibilidad verdadera (TD: porcentaje de proteína retenida), el valor biológico (BV: proporción del nitrógeno absorbido que se retiene) y la eficiencia proteica (PER: relación entre la ganancia de masa corporal y la masa de proteína ingerida). En la Tabla 2-2 se compara el valor de estos parámetros para diferentes proteínas. Las proteínas lácteas presentan los valores más altos de NPU, por ello, son las más utilizadas para la obtención de hidrolizados de proteínas con fines nutricionales.

Asimismo, los hidrolizados de proteínas son también muy utilizados en la industria alimentaria por su mayor solubilidad, poder espumante y capacidad gelificante que la proteína nativa. Por consiguiente la elección de la fuente debe hacerse teniendo en cuenta tanto la aplicación como el valor añadido del alimento final.

Tabla 2-2. Valor biológico de diferentes proteínas

Proteína	VB	TD	NPU	PER
Leche	84.5	96.9	81.6	3.09
Caseína	79.7	96.3	72.1	2.86
Proteínas séricas	82.0	97.0	79.5	3.43
Proteína de soja			61.0	
Gluten de trigo			35.0	

La incorporación de hidrolizados de proteínas en la formulación de alimentos no tuvo interés industrial hasta 1960, cuando los primeros concentrados y aislados de proteínas de soja aparecieron en el mercado norteamericano. Inicialmente, la investigación en estos nuevos productos de soja se justificó por la necesidad de incorporar otras proteínas a la dieta tras el encarecimiento de las fuentes tradicionales: carne, huevos y leche (Adler-Nissen, 1976). Es por ello que la investigación se centró en la hidrólisis de proteínas de soja (Deeslie y Cheryan, 1981-1982) y se publicaron numerosos estudios sobre la producción de estos hidrolizados destinados a alimentación humana (Knights, 1985, Adler-Nissen, 1986, Chiang *et al.*, 1999, Liu, 2001, Jianping, 2002).

Hoy en día, entre los hidrolizados de proteínas más utilizados en la industria alimentaria cabe destacar los de gluten de trigo y de maíz, que se utilizan como potenciadores de sabor o agentes emulsificantes (Kammoun, 2003 y Li, 2002; respectivamente). También se emplean con este fin en sopas, salsas y comidas precocinadas los hidrolizados de proteínas de origen cárnico (Nielsen y Olsen, 2002). Los hidrolizados de proteínas de pescado (producidos a partir de desechos de la industria conservera) se emplean como medio de fermentación o como fuente de nitrógeno en alimentación animal (Kristinsson, 2000; Guerard, 2002 y Pastoriza, 2004), mientras que en alimentación humana se utilizan preferentemente hidrolizados de proteínas lácteas.

Es interesante mencionar que la sangre procedente de los mataderos es una fuente infrautilizada de proteína en la industria alimentaria. En los últimos años se han publicado diferentes trabajos de investigación (Man-Ji *et al.*, 2002 y Kapel *et al.*, 2003) sobre el posible aprovechamiento de proteínas de plasma (hemoglobina, fundamentalmente) al ser fuente de biopéptidos e hidrolizados ricos en hierro, por lo que podrían utilizarse en nutrición clínica.

2.1.4 Enzimas

Se considera que una enzima es una proteína con propiedades catalíticas debidas a su poder de activación específico (Dixon y Webb, 1979). Las enzimas catalizan las reacciones metabólicas que tienen lugar en el interior de las células de organismos vivos, por lo que su actividad catalítica se desarrolla en las condiciones de un medio de reacción biológico. Es por ello que su actividad catalítica se caracteriza por:

- Tener lugar en condiciones suaves de temperatura y pH
- Son altamente específicas hacia un sustrato o hacia sustratos muy similares desde el punto de vista químico
- La velocidad de reacción es muy alta
- Gran variedad de enzimas y, por tanto, multitud de reacciones pueden llevarse a cabo. Este hecho es consecuencia de la especificidad de la enzima, de manera que cada proceso biológico es catalizado por una sola enzima.

Las enzimas se clasifican según su actividad catalítica y el sustrato al que atacan. En la Tabla 2-3 se muestran algunas enzimas de interés industrial. Las oxidoreductasas catalizan reacciones redox, en las que existen transferencia de electrones de una molécula a otra. En los sistemas biológicos más comunes estas enzimas catalizan la eliminación de hidrógeno (deshidrogenasas), oxígeno (oxidadas) y peróxidos (peroxidadas). Las transferasas catalizan la transferencia de determinados grupos funcionales o átomos desde una molécula a otra. Por ejemplo, las aminotransferasas o transaminasas promueven la transferencia de grupos amino desde un aminoácido hacia un α -ceto-ácido. Las hidrolasas catalizan reacciones en las que se adiciona agua a un sustrato, de manera que moléculas de gran tamaño son divididas en unidades más pequeñas. Estas enzimas catalizan la ruptura de enlaces peptídicos en proteínas y polipéptidos (proteasas), enlaces glicosídicos en carbohidratos (amilasas, celulasas, etc.) y enlaces tipo éster en lípidos (lipasas). Las enzimas liasas catalizan la adición de grupos funcionales a dobles enlaces o la formación de enlaces π a través de la eliminación de sustituyentes. Por ejemplo, las pectato-liasas rompen enlaces glicosídicos mediante eliminación β . Las isomerasas catalizan la transferencia de grupos funcionales desde una posición a otra dentro de la misma molécula. Es decir, estas enzimas cambian la estructura química del sustrato por reordenación de sus componentes. Las glucosa-isomerasas cambian la conformación de la molécula de glucosa. Por último, las ligasas catalizan la unión de diferentes moléculas mediante enlaces covalentes. La formación de nuevos enlaces conlleva una transferencia de energía, por lo que estas enzimas intervienen en la acción del ATP.

Tabla 2-3. Enzimas típicas empleadas en procesos industriales

Clase	Enzimas
1. Oxidorreductasas	Peroxidasas, Catalasas, Glucosa-oxidadas, Lacasas
2. Transferasas	Fructosil-transferasas, Glucosil-transferasas
3. Hidrolasas	Amilasas, Celulasas, Lipasas, Pectinasas, Proteasas, Pululanasas
4. Liasas	Pectato-liasas, Alfa-acetolactato decarboxilasas
5. Isomerasas	Glucosa-isomerasas
6. Ligasas	Sin empleo actual en la industria

A su vez, las proteasas pueden clasificarse según:

- *su origen*: animal, vegetal, bacteriano o fúngico.
- *su acción catalítica*: endopeptidasas si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasas, si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas.
- *la naturaleza del centro catalítico*: las endopeptidasas pueden ser serinoproteasas, cisteínoproteasas, metaloproteasas y aspartatoproteasas. Las exopeptidasas pueden ser: aminopeptidasas, carboxipeptidasas o dipeptidasas.

Las serinoproteasas deben su actividad catalítica a un residuo serina y tienen su máxima actividad catalítica a pH alcalino. Las cisteínoproteasas actúan de manera similar a las serinoproteasas con la diferencia de que poseen en su centro catalítico un grupo –SH en lugar de un –OH y su máxima actividad se encuentra a pH alcalino aunque más cercanos a la neutralidad que en el caso de las serinoproteasas. Las metaloproteasas contienen un átomo metálico en su estructura, normalmente Zn, y su pH óptimo se sitúa alrededor de la neutralidad. Su actividad y estabilidad se ve afectada por la presencia de cationes Ca^{2+} y agentes quelantes como el EDTA, que eliminan el átomo de Zn, convirtiéndose en inhibidores. Las aspartatoproteasas tienen un grupo carboxilo de ácido aspártico en el centro activo y presentan su máxima actividad catalítica a pH ácido.

Las enzimas proteolíticas más importantes en la industria son las serinoproteasas, que se dividen en dos tipos principales: las proteasas con actividad catalítica similar a la de la quimotripsina, y las de actividad catalítica tipo subtilisina. En ambos casos, las serinoproteasas actúan mediante un ataque nucleofílico formando un complejo acil-enzima y una posterior ruptura del complejo, liberando los productos de reacción y la enzima libre, tal como se aprecia en la Figura 2-1, Figura 2-2 y Figura 2-3. Las proteasas más comunes con aplicación industrial son preparados que incluyen mezclas de diferentes enzimas individuales y compuestos añadidos para estabilizar el producto. En la Tabla 2-4 se muestran las características de algunas proteasas comerciales empleadas en diferentes aplicaciones industriales.

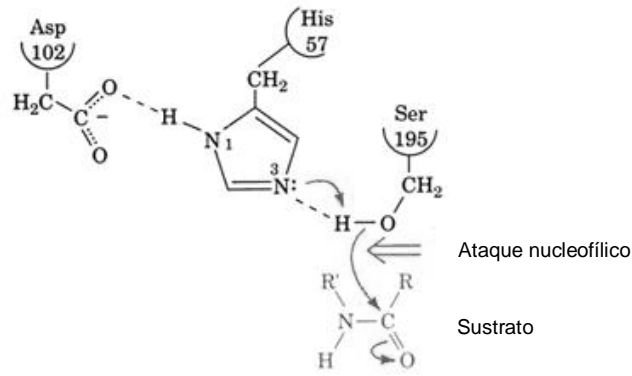


Figura 2-1. Inicio de la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas: complejo de Michaelis

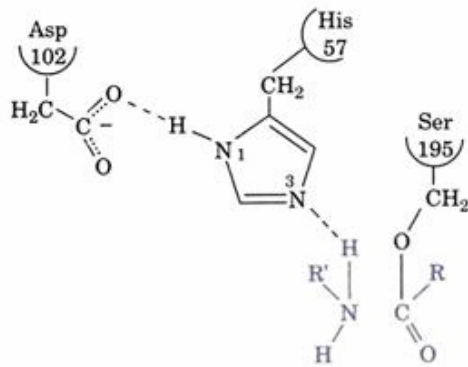


Figura 2-2. Enzima ligada: complejo intermedio acil-enzima

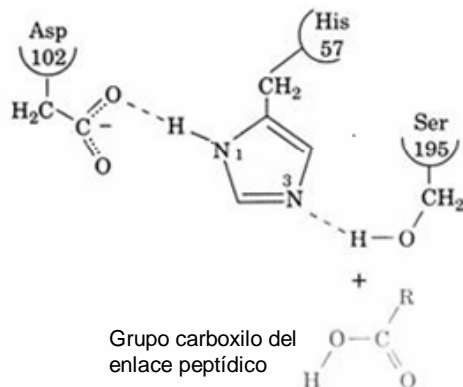


Figura 2-3. Ruptura del enlace peptídico y enzima libre

Tabla 2-4. Clasificación de las endoproteasas

Tipo de proteasa	Fuente	Nombres comunes o comerciales	pH de operación	Temperatura de operación (°C)
Serino-proteasas	<i>Bacillus licheniformis</i>	Subtilisin Carlsberg Alcalase	6-10	10-80
	<i>Bacillus lentus</i>	Subtilisin Esperase	7-12	10-80
	<i>Bacillus GMO</i>	Subtilisin Savinase Novo-Pro D	8-11	15-80
	Pancreáticas	Tripsina	7-9	10-55
Metallo-proteasa	<i>Bacillus amyloliquefacus</i>	Neutrased	6-8	10-65
Aspartato-proteasa	<i>Rhizomucor miehei</i>	Hannilase Fromase	3-6	10-50
	Cuajo	Rennet	3-6	10-50
Mezcla de aspartato proteasas, metaloproteasas y carboxilpeptidasas	<i>Bacillus</i>	Protamex	6-8	10-65
	<i>Aspergillus Oryzae</i>	Flavourzyme	4-8	10-55

2.2 Aplicaciones

Los hidrolizados de proteínas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales, en nutrición infantil y clínica y como fuente de péptidos bioactivos. En general, atendiendo al grado de hidrólisis necesario, los hidrolizados pueden clasificarse en tres grupos:

- hidrolizados con un bajo grado de hidrólisis (inferior a 10%). Se emplean fundamentalmente como modificadores de las propiedades funcionales de los alimentos (especialmente en panadería, bollería, heladería y elaboración de salsas y mayonesas)
- hidrolizados con un alto grado de hidrólisis (superior a 10%). Se utilizan como fuente de nitrógeno en la formulación de alimentos infantiles y dietas especiales. Estos hidrolizados deben mejorar las características nutricionales de la

proteína de partida (Pedroche *et al.*, 2003). También es frecuente su uso como potenciadores del sabor (principalmente en sopas, salchichas, alimentos precocinados y productos cárnicos).

- péptidos con funcionalidad biológica. De interés creciente para la industria alimentaria y farmacéutica (Korhonen y Pihlanto, 2003).

2.2.1 Propiedades funcionales.

La influencia de la hidrólisis enzimática sobre las propiedades funcionales de diferentes proteínas ha sido ampliamente descrita por numerosos investigadores (Adler-Nissen y Olsen, 1979; Chobert *et al.*, 1989; Ju *et al.*, 1995; Gbogouri *et al.*, 2004; Surowka *et al.*, 2004). La incorporación de hidrolizados de proteínas a alimentos permite modificar propiedades como la solubilidad, el poder emulsificante, la capacidad espumante, la adsorción de agua, etc (Singh y Dalgleish, 1998; van der Ven *et al.*, 2001; Foegeding *et al.*, 2002) muy importantes desde un punto de vista tecnológico. Además de estas propiedades físico-químicas, los hidrolizados de proteínas son potenciadores del sabor en alimentos preparados.

Tabla 2-5. Propiedades funcionales y aplicaciones de los hidrolizados de proteínas

Propiedad	Aplicación
Emulsificante	Productos cárnicos, café soluble, salsas
Adsorción de agua	Pastelería, productos cárnicos
Espumante	Pastelería y bollería
Solubilidad	Bebidas energéticas
Potenciador del sabor	Condimentos, extractos de carne y levadura

La solubilidad es un requisito indispensable para que las proteínas puedan emplearse en la formulación de alimentos líquidos. Esta propiedad depende de la fuente de proteína utilizada y de la forma de procesado, pudiendo ser modificada mediante la hidrólisis enzimática. La proteólisis parcial afecta a la solubilidad de las proteínas, incluso si se alcanza un grado de hidrólisis muy limitado. Este fenómeno es de especial interés en el caso de proteínas poco solubles en medio acuoso como las de cereales. Se ha conseguido aumentar la solubilidad de proteínas de maíz hasta en un 30-50% con sólo un grado de hidrólisis del 2% (Casella y Whitaker, 1990).

Con una hidrólisis extensiva, 36.7 %, se aumentó la solubilidad de una harina de proteínas de trigo desde un 7.1 % hasta un 53 % (Bombara *et al.*, 1996). Recientemente, Pastoriza *et al.* 2004, han descrito la hidrólisis de desechos de la industria conservera de pescado con pepsina, papaína y mezclas de proteasas endógenas para solubilizar el material proteico y poder emplearlo en alimentación animal. Se consiguió solubilizar hasta un 76% del nitrógeno proteico con pepsina a 49 °C y pH 8.5. Kong *et al.*, (2006) hidrolizaron proteínas de gluten de trigo con diferentes proteasas comerciales (tripsina, pepsina y Alcalase) alcanzando diferentes grado de hidrólisis: 5.0, 10.0 y 15.0 %. Los hidrolizados de Alcalase presentaron una mayor eficacia hidrolítica que los de tripsina y pepsina, consiguiéndose solubilizar más de un 60 % con excelentes propiedades emulsificantes y espumantes.

Guan *et al.*, (2006) ensayaron la hidrólisis de avena con tripsina, alcanzándose grado de hidrólisis entre 4-8 %. Tanto la solubilidad como la capacidad de adsorción de agua, actividad emulsificante y capacidad espumante aumentan a medida que los hacía el grado de hidrólisis.

Por otra parte, se ha comprobado que la longitud de la cadena peptídica que compone la proteína influye de manera notable en las propiedades funcionales (Adler-Nissen, 1979), especialmente en el poder emulsificante y la capacidad espumante. Los hidrolizados de caseína o soja al 1-2% presentan una mayor capacidad emulsificante que la proteína nativa, disminuyendo significativamente a grados de hidrólisis mayores. También ocurre así para las proteínas séricas: un hidrolizado de proteínas del suero lácteo con Corolase PN-L al 1% empleado como agente emulsificante en salsas, mostró mejores propiedades emulsificantes y dio lugar a un emulsión más estable que en el caso de usar un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) o β -lactoglobulina nativa (Christiansen *et al.*, 2004). Tuncturk y Zorba (2006) comrpobaron que la hidrólisis limitada de caseína con Neutrase mejora la capacidad emulsificante, la estabilidad de la emulsión formada y la densidad de la emulsión frente a la proteína nativa. Por el contrario, un mayor grado de hidrólisis conlleva un empeoramiento de las propiedades anteriores.

En cuanto a la capacidad espumante, se ha demostrado (Halling, 1981) que la proteolisis aumenta el poder espumante de las proteínas pero disminuye la estabilidad de la espuma formada. La rotura de enlaces y el desdoblamiento de la proteína por el

proceso de hidrólisis favorecen el reagrupamiento de péptidos y la formación de una película en la interfase agua-aire. Sin embargo, la película formada no es lo suficientemente gruesa ni viscoelástica para dar estabilidad a la espuma. Por tanto, el tamaño molecular medio de los péptidos liberados durante la hidrólisis es decisivo en la formación de espumas. Popineau *et al.* (2002) compararon la capacidad espumante de hidrolizados de proteínas de gluten. La hidrólisis se realizó con quimotripsina y el hidrolizado resultante se fraccionó mediante ultrafiltración (corte de 50 kDa y 150 kDa). Para los dos tamaños de corte ensayados, los hidrolizados completos presentaron una gran capacidad espumante, aunque la espuma formada era poco estable. Los filtrados (de bajo peso molecular) apenas poseían poder espumante mientras que los retenidos (péptidos de cadena larga) formaban fácilmente espumas y además, éstas poseían mayor estabilidad que las formadas por el hidrolizado completo.

Al igual que el poder espumante, la capacidad de adsorción de agua está íntimamente relacionada con los fenómenos interfaciales. De hecho, una adsorción rápida conlleva una mejor capacidad espumante y emulsificante. Kumagai *et al.* (2002) estudiaron la interacción agua-proteínas y los fenómenos superficiales asociados. Los autores hidrolizaron con tripsina ovoalbúmina, un aislado de proteínas de soja (SPI) y caseína. El grado de hidrólisis, la actividad de agua y la capacidad espumante fueron medidos. Los valores de actividad de agua decrecían a medida que el grado de hidrólisis aumentaba, mostrando la ovoalbúmina el menor valor de adsorción de agua. Se concluyó en el estudio que la disminución de la adsorción de agua puede relacionarse con un aumento de la capacidad espumante del hidrolizado para todas las proteínas ensayadas.

La hidrólisis de proteínas permite obtener potenciadores del sabor por la liberación de ácido glutámico (el potenciador de sabor más empleado en la industria alimentaria). Se emplean hidrolizados de proteínas de soja y gluten de trigo como potenciadores del sabor en sopas o los hidrolizados de proteínas lácteas en la producción de aromas para quesos (Nielsen, 1994). Periago *et al.* (1998) estudiaron la influencia de la hidrólisis en medio ácido de harinas proteicas de guisantes con una enzima obtenida a partir de la fermentación de *Aspergillus saitoi*. Los autores determinaron el perfil de aminoácidos y evaluaron las propiedades funcionales del hidrolizado (solubilidad, capacidad espumante, adsorción de agua, poder emulsionante y gelificante y la adsorción de

grasa) con el objetivo de obtener un potenciador del sabor en alimentos vegetales preparados. En general, el grado de hidrólisis necesario para liberar aminoácidos y péptidos de pequeño tamaño debe ser alto. Por ello es frecuente que para la producción de potenciadores del sabor, ya sean hidrolizados de proteínas cárnicas o vegetales, se combinen tratamientos químicos con hidrólisis enzimática. Por ejemplo, Hamm (1992) patentó un proceso en dos etapas para la fabricación de un potenciador a partir de gluten de trigo. En la primera etapa se hidroliza en medio ácido a 95 °C durante 1 hora y posteriormente se emplea una preparación enzimática (mezcla de endo y exoproteasas) obtenida de la fermentación de *Aspergillus oryzae*. El grado de hidrólisis alcanzado llega al 50-70 %. Para conseguir un potenciador del sabor mediante hidrólisis extensiva de proteínas de soja (hasta un 60-70 %) también se ha propuesto el empleo conjunto de Flavourzyme más Alcalase (mezcla de endo y exoproteasas) evitando así el tratamiento ácido (Nielsen, 1994).

Los hidrolizados de proteínas de carne también se añaden a concentrados de sopa, salsas y comidas preparadas como saborizantes. El material proteico de partida suele ser un subproducto de industrias de procesamiento de alimentos (se emplea ternera, cerdo, pavo o pollo). En la hidrólisis de proteínas de vacuno se requieren dos etapas: en primer lugar, una hidrólisis con una endoproteasa (incluso una combinación de metalo y serino proteasas) para solubilizar el sustrato. La segunda etapa consiste en una hidrólisis mediante exoproteasas (Flavourzyme) o mediante incubación de un microorganismo que secreta proteasas como la aminopeptidasa (Kwon, 1992). El producto hidrolizado final se utiliza como potenciador del sabor y modificador de la textura de embutidos y aperitivos (Nielsen y Olsen, 2002). Finalmente, los hidrolizados de proteínas de pescado se emplean como aditivos alimentarios (Nilsang *et al.*, 2004) o como fuente de proteínas en nutrición animal (Alarcón *et al.*, 2001).

2.2.2 Nutrición infantil y clínica

Desde un punto de vista nutricional, la hidrólisis aumenta la digestibilidad de las proteínas y favorece su absorción en el intestino humano. Además, el proceso de hidrólisis enzimática reduce el carácter alergénico de las proteínas. En este sentido, los hidrolizados pueden utilizarse en nutrición infantil, geriátrica y clínica. Un hidrolizado para formulación de dietas enterales requiere ser ósmoticamente equilibrado, hipoalergénico, altamente nutritivo y tener sabor agradable. Por ello, estos productos

deben contener una cantidad limitada de aminoácidos libres, ya que esto los hace hiperósmóticos, provocando secreción intestinal y diarrea. Por otra parte los problemas de alergenicidad están relacionados con la presencia de proteína y péptidos de alto peso molecular en el hidrolizado. También se produce cierto amargor durante el proceso de hidrólisis por la presencia de restos hidrofóbicos. Se ha comprobado que ambos factores negativos, alergenicidad y amargor, desaparecen para hidrolizados con un tamaño molecular medio menor de 1000 Da (Otani y Hosono, 1989).

La hidrólisis parcial de caseína bovina mediante enzimas pancreáticas ha demostrado ser un método válido para la reducción del poder alergénico de esta proteína (Mahmoud *et al.*, 1992). Sado *et al.* (1993) patentaron un proceso para reducir la alergenicidad de las proteínas séricas. Los autores ensayaron la hidrólisis extensiva y selectiva de β -lactoglobulina con proteínas vegetales (papaína y bromelaína) en medio alcalino, reduciendo considerablemente la alergenicidad del preparado proteico.

Boza *et al.* (1995) caracterizaron un hidrolizado comercial de proteínas del lactosuero. Los autores determinaron la composición química, la distribución de pesos moleculares, la calidad nutricional (mediante ensayos con ratas) y el potencial antigénico (mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*). La mayor parte del hidrolizado se componía de péptidos de bajo peso molecular, con sólo una fracción del 7.5 % entre 1000 y 3000 Da. La calidad nutricional de la proteína (medida mediante el índice NPU) fue alta si se compara a una proteína de referencia (caseína más 5% de DL-metionina), aunque el índice PER fue ligeramente inferior para el hidrolizado. La antigenicidad del hidrolizado resultó ser cinco veces menor que para la β -lactoglobulina y mostró propiedades profilácticas y terapéuticas en ensayos con animales. Por todo ello, se concluyó que los hidrolizados de proteínas del lactosuero eran aptos para la formulación de dietas especiales para nutrición enteral.

Wroblewska *et al.* (2004) comprobaron que la hidrólisis de proteínas del suero lácteo en dos etapas, con Alcalase en primer lugar y una posterior adición de papaína permitía obtener un hidrolizado hipoalergénico y con unas propiedades organolépticas y sensoriales excelentes, sin amargor y con buen sabor. Se ha demostrado que el método más efectivo para la reducción de la alergenicidad de leche de vaca es eliminar el alérgeno totalmente o reducir su peso molecular. En la hidrólisis de un concentrado de proteínas del suero (WPC) y β -lactoglobulina con tripsina, Neutrase, Corolase PC y

Corolase PP se encontró que para las fracciones del hidrolizado con peso molecular medio entre 1000 y 5000 Da la reducción de la alergenicidad era máxima (Svenning *et al.*, 2000). Peñas *et al.* (2006) estudiaron el efecto combinado del tratamiento a presión elevada más la hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo. Los autores encontraron que la efectividad del tratamiento a presión depende de la enzima empleada, así para la hidrólisis a 300 MPa con Corolase y Neutrase se detectó una reducción de la antigenicidad residual del hidrolizado asociada a un cambio en el perfil de péptidos del hidrolizado (determinado por RP-HPLC). Sinha *et al.* (2007) han formulado una bebida funcional basada en un hidrolizado de proteínas del lactosuero empleando papaína y una proteasa de origen fúngico. Los autores han estudiado el perfil de aminoácidos del hidrolizado, sus propiedades funcionales (adsorción de agua, capacidad emulsionante y poder espumante) y la presencia de péptidos bioactivos (bactericidas y antihipertensivos). Finalmente, demostraron que una bebida basada en un hidrolizado de proteínas presenta una digestibilidad *in vitro* tres veces superior a la bebida formulada con proteína nativa.

Para controlar el tamaño medio de los hidrolizados y conseguir reducir la alergenicidad de la proteína, la ultrafiltración del hidrolizado ha demostrado ser el mejor método (Clemente, 2000). La eliminación por UF de los restos de proteína nativa y de grandes péptidos tras la hidrólisis de proteínas del suero lácteo reduce la alergenicidad hasta seis veces (Nakamura *et al.*, 1992).

2.2.3 Fuente de péptidos bioactivos

Los hidrolizados de proteínas son también fuente de péptidos con actividad biológica (Pihlanto-Leppala, 2001). Estos biopéptidos actúan como reguladores y moduladores de diferentes procesos de los organismos animales y pueden emplearse en la formulación de alimentos funcionales. Las proteínas lácteas son especialmente interesantes como fuente de péptidos bioactivos. Estos péptidos no son activos en el interior de la proteína original sino que deben ser liberados. Los péptidos bioactivos pueden ser liberados mediante: 1) digestión gastrointestinal de la leche, 2) fermentación de la leche o 3) hidrólisis enzimática de la proteína nativa. A escala semi-industrial, se emplean tecnologías de membrana y cromatografía de intercambio iónico (Korhonen y Pihlanto-Leppala, 2006) para la concentración-purificación de los biopéptidos liberados.

Se han encontrado péptidos derivados de caseína y proteínas del lactosuero (veáse Tabla 2-6) con actividad opioide, antihipertensiva, antitrombótica y antibiótica (Korhonen y Pihlanto-Leppala, 2001; Zhang y Otani, 2003). Mediante la hidrólisis con quimotripsina y termolisina de β -lactoglobulina caprina y ovina se liberan péptidos inhibidores de ACE (Hernández-Ledesma *et al.*, 2002). Estos péptidos (lactorfinas, lactotensinas, albuntensinas y lactoquininas) con actividad inhibidora de ACE intervienen en la regulación de la presión sanguínea. La identificación de dichos biopéptidos puede llevarse a cabo mediante técnicas de cromatografía líquida y espectrometría de masas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2004). Hernández-Ledesma *et al.* (2006) hidrolizaron β -Lg empleando termolisina en condiciones térmicas de desnaturalización de la proteína y en condiciones sin desnaturalización. Se identificaron 25 péptidos mediante HPLC-MS/MS en la hidrólisis a 37°C y 5 min. Entre ellos se identificaron péptidos con fuerte actividad inhibitoria de la enzima ACE. Aunque presentaron menor actividad moduladora que los fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión, estos péptidos podrían incorporarse a fórmulas nutracéuticas para la prevención de la hipertensión (Fitzgerald y Meisel, 1999). Ferreira *et al.* (2007) monitorizaron la liberación de un biopéptido tras la hidrólisis de proteínas del lactosuero con tripsina. Los autores establecieron una curva de correlación entre producción de dicho péptido y el tiempo de hidrólisis. La liberación de biopéptidos sólo fue considerable a tiempos de reacción superiores a 120 min.

La capacidad inmunorreguladora de diferentes secuencias peptídicas que forman parte de las proteínas del suero lácteo ha sido propuesta en diferentes investigaciones. Gauthier *et al.* (2006) revisaron algunas de estas propiedades: activación del sistema linfático, regulación de la producción de anticuerpos, etc. Los autores pusieron de manifiesto que la capacidad inmunorreguladora no está aún suficientemente probada. En la Tabla 2-6, Tabla 2-7 y Tabla 2-8 se muestran los biopéptidos obtenidos a partir de proteínas del suero lácteo, recogidos por Shah (2000) a partir de diversas fuentes.

Tabla 2-6. Principales biopéptidos derivados de proteínas de leche bovina (Meisel y Schlimme, 1990 y 1993)

Biopéptidos	Proteína precursora	Bioactividad
Casomorfina	α -, β -caseína	Agonista de opioide
Casoquininas	α -, β -caseína	Antihipertensivo
Casoxinas	κ -caseína	Antagonista de opioide
Casoplatelinas	κ -caseína, transferrina	Antitrombótico
α -lactorfina	α -lactalbúmina	Agonista de opioide
β -lactorfina	β -lactoglobulina	Agonista de opioide
Lactoferroxinas	Lactoferrina	Antagonista de opioide
Inmunopéptidos	α -, β -caseína	Inmunoestimulantes
Casein-fosfopéptidos	α -, β -caseína	Portador de minerales

Tabla 2-7. Biopéptidos derivados de proteínas del lactosuero

Fuente	Fragmento	Secuencia	Nombre	Actividad
α -lactoalbúmina	50-53	Tyr-Gly-Leu-Phe	α -lactorfina	Opioide, inhibidor ACE
β -lactoglobulina	102-105	Tyr-Leu-Leu-Phe	β -lactorfina	Antagonista de opioide
	142-148	Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg		Inhibidor ACE
	146-149	His-Ile-Arg-Leu	β -lactotensina	Contractor del ileum
Seroalbúmina bovina (BSA)	399-404	Tyr-Gly-Phe-Gln-Asp-Ala	Serorfina	Opioide
	208-216	Ala-Leu-Lys-Ala-Trp-Ser-Val-Ala-Arg	Albutensina A	Contractor ileum, inhibidor ACE
Lactoferrina	17-42	Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Glu-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe	Lactoferricina	Antimicrobiana

Tabla 2-8. Biopéptidos lácteos con actividad opioide

<i>Agonista</i>	Fuente	Estructura
β -casomorfina 5	β -caseína	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly
β -casomorfina 5 h	β -caseína	Tyr-Pro-Phe-Val-Gly
Morficeptina	β -caseína	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂
α -casein exorfina	α_{s1} -caseína	Arg-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala
<i>Antagonista</i>		
Casoxina 4	κ -caseína	Tyr-Pro-Ser-Tyr (O-CH ₃)
Casoxina A	κ -caseína	Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-Asn-Tyr
Casoxina B h	κ -caseína	Tyr-Pro-Tyr-Tyr (O-CH ₃)
Casoxina C	κ -caseína	Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg
Casoxina D h	α_{s1} -caseína	Tyr-Val-Pro-Phe-Pro-Pro-Phe
Lactoferroxina	Lactoferrina	Tyr-Leu-Gly-Ser-Gly-Tyr (-OCH ₃)

2.3 Métodos de producción

2.3.1 Reactores tipo tanque agitado por lotes

El método de producción de hidrolizados enzimáticos de proteínas más utilizado es el reactor tipo tanque agitado en funcionamiento discontinuo (Nielsen y Olsen, 2002). La producción discontinua se emplea fundamentalmente por su simplicidad de diseño y funcionamiento, así como por la flexibilidad de operación. Además, no necesita un sistema de control complejo y permite trabajar a elevadas concentraciones de sustrato. Sin embargo, presenta considerables inconvenientes:

- Elevado coste de enzima. En el reactor discontinuo se debe desactivar la enzima empleada en cada lote después de alcanzar el grado de hidrólisis deseado, de manera que la enzima no puede ser reutilizada.
- Los procesos discontinuos conllevan un alto coste energético y de mano de obra.
- Los procesos discontinuos son lentos y presentan bajo rendimiento y productividad, debido a que la hidrólisis enzimática de proteínas presenta, a menudo, inhibición por producto.

La hidrólisis enzimática de proteínas en reactores discontinuos ha sido ampliamente estudiada. A continuación se describen brevemente algunos de los trabajos más significativos:

González-Tello *et al.* (1994a) estudiaron la cinética de la hidrólisis enzimática de proteínas del lactosuero a pH 8 y 50 °C con dos proteasas comerciales de origen bacteriano y una de origen animal. Los autores proponen un modelo que responde a un mecanismo de reacción de orden cero para el sustrato y desnaturalización enzimática de segundo orden.

Margot *et al.* (1997) analizaron la hidrólisis parcial de proteínas del lactosuero con tripsina. Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor tipo tanque agitado discontinuo, empleando como sustrato un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) con un 22 % en peso de proteína. El pH de operación fue 7.3 y la enzima una tripsina comercial. Se ensayaron dos temperaturas, 55 °C y 60 °C. Los autores postularon que, dada la complejidad de la reacción de hidrólisis, los modelos basados en un mecanismo tipo Michaelis-Menten no eran adecuados para describir el proceso y propusieron varios modelos empíricos. Para los experimentos realizados, ajustan los valores de proteína soluble (medida como NPN, nitrógeno no proteico) con el tiempo de operación y comprobaron la validez de los modelos empíricos. En el caso de las proteínas del lactosuero con tripsina el modelo más preciso es de 2 parámetros y es adecuado para inhibición por producto y una desactivación enzimática lenta.

Otte *et al.* (1998) hidrolizaron β -lactoglobulina con el objetivo de encontrar las condiciones en las que se liberan cadenas peptídicas de alto peso molecular. Las enzimas empleadas fueron bromelaína, papaína, pepsina, tripsina, endoproteasa Arg-C, aminopeptidasa y carboxipeptidasa. Las exoproteasas empleadas (aminopeptidasa y carboxipeptidasa) y la endoproteasa Arg-C no consiguieron alterar la estructura de la proteína original. Tanto la bromelaína como la pepsina hidrolizaron rápidamente la proteína liberando un gran número de péptidos pequeños. Por último, la papaína y la tripsina dieron lugar a péptidos de mediano tamaño (entre 1-5 kDa).

Krisstinson y Rasco (2000) estudiaron la hidrólisis de proteínas de salmón con varias endoproteasas (Alcalase 2.4L, Flavourzyme 1000L, Corolase PN-L y Corolase 7089). Los autores compararon la efectividad y el coste de cada una de las enzimas empleadas. Para ello calcularon la velocidad inicial de reacción para cada proteasa y la correlacionaron con la actividad de la enzima, obteniendo una relación lineal entre ambas variables. También determinaron la actividad necesaria para alcanzar un grado

de hidrólisis de 5 %, 10 % y 15 %. La enzima que presentaba el menor coste para alcanzar estos grado de hidrólisis es Alcalase 2.4L.

Guerard *et al.* (2002) obtuvieron un hidrolizado de proteínas de pescado (FPH) usando como sustrato un subproducto de la industria conservera y utilizando dos enzimas, Umamizyme y Alcalase. La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor tipo tanque agitado a pH 7 y 45 °C. Los autores analizaron la influencia de las variables de operación, relación enzima/sustrato y tiempo de reacción, sobre el grado de hidrólisis final, el nitrógeno liberado y la distribución de pesos moleculares obtenida. El máximo grado de hidrólisis (22.5 %) se obtuvo para una relación enzima/sustrato de 1.5 % tras 4 horas de hidrólisis. Umamizyme y Alcalse mostraron la misma actividad, sin embargo, Alcalase fue significativamente más estable a largo plazo.

Alarcón *et al.* (2002) optimizaron la medida del grado de hidrólisis en proteína empleando proteasas de pescado y la técnica del pH-estado. Los autores estudiaron la influencia de diferentes variables (tipo de enzima, autólisis, relación enzima/sustrato y efectos inhibitorios) y determinaron que un extracto enzimático de pescado permitía obtener grados de hidrólisis superiores a proteasas comerciales.

Kammoun *et al.* (2003) emplearon la enzima comercial Neutrase para la hidrólisis de proteínas de trigo. El proceso presentó inhibición no competitiva de producto. El grado de inhibición depende del grado de hidrólisis a grado de hidrólisis bajos y permaneció constante a partir de grado de hidrólisis 7.5 %. El estudio demostró que existía un alto grado de correlación entre inhibición y tamaño molecular pequeño de los péptidos, siendo las fracciones inhibidoras menores de 3 kDa.

Barros y Malcata (2004) estudiaron la hidrólisis enzimática de las proteínas de suero lácteo con una aspartato-proteasa (cardosina A, extraída de las flores de *Cynara Cardunculus*). La hidrólisis se llevó a cabo a 55 °C, en el rango de pH 5.2-6.0 y diferentes relaciones enzima/sustrato. Los autores propusieron un modelo tipo Michaelis-Menten considerando que coexisten dos sustratos diferentes, la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina. Se determinaron los parámetros cinéticos del modelo y se puso de manifiesto una afinidad mayor de la enzima por la α -lactalbúmina que por la β -lactoglobulina.

Khaled El-Zahar *et al.* (2005) llevaron a cabo la hidrólisis de β -lactoglobulina y α -lactalbúmina ovina con pepsina a 37 °C y pH ácido, alcanzando un grado de hidrólisis del 87 % tras 20 horas. En el trabajo, los autores compararon también la acción de la pepsina a su pH de máxima actividad (pH 2.5) sobre la β -Lg bovina y ovina. A pesar de las mínimas diferencias estructurales entre las variantes bovina y ovina, la β -Lg bovina no es hidrolizada, mientras que la ovina es ampliamente degradada. Los autores caracterizaron los péptidos obtenidos mediante cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas.

Mota *et al.* (2006) estudiaron la hidrólisis de un concentrado de proteínas de lactosuero empleando tripsina como catalizador en diferentes condiciones de pH y temperatura. Los autores monitorizaron la degradación de la proteína mediante RP-HPLC con detección UV, separando siete péptidos principales. Se observaron diferencias considerables entre la hidrólisis de α -lactoalbúmina y β -Lg. Se desarrollaron modelos matemáticos relacionando la degradación de la proteína con el grado de hidrólisis de cada proteína.

Una parte importante de los estudios de hidrólisis enzimática de proteínas en reactores discontinuos han sido objeto de patentes debido al interés económico del proceso. A continuación se citan las patentes más recientes:

Sawhill (2003) patentó una fórmula a base de péptidos procedentes de la hidrólisis de proteínas séricas, así como el proceso para su producción. El sustrato empleado fue un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC). El proceso patentado constaba de dos etapas: hidrólisis de proteínas con una proteasa de origen fúngico, seguida del secado de la mezcla de reacción. El producto obtenido no presentaba alergenicidad ni amargor, por lo que podía emplearse en la formulación de sustitutivos de leche y otros productos alimenticios.

Schaefer *et al.* (2003) patentaron un hidrolizado con actividad biológica. El sustrato empleado fue un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) al 4.1 %. La enzima es una mezcla de endo- y exoproteasas. La reacción se llevó a cabo a 50 °C, pH 7 y una relación enzima/sustrato de 2 %. El procedimiento de fabricación incluye las siguientes etapas: preparación de la solución de proteínas, ajuste de la temperatura y el pH del

medio de reacción, adición de la mezcla proteolítica, hidrólisis, desactivación de las enzimas y secado por atomización o liofilización de la suspensión final.

Luppo *et al.* (2003) describieron la producción de un hidrolizado de caseína para su incorporación a bebidas y alimentos dietéticos. La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor tipo tanque a pH 4 en dos etapas: adición de Delvolase más adición de una endoproteasa específica de prolina hasta alcanzar un grado de hidrólisis del 16-20 %. Seguidamente, el hidrolizado de caseína se mezclaba en diferentes proporciones con un concentrado de proteínas séricas (WPC) para obtener un sustitutivo de leche.

Sorensen (2004) patentó un método de producción de hidrolizados de proteínas empleando una metaloproteasa como catalizador y un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) como sustrato. El producto obtenido podía emplearse como ingrediente en la formulación de alimentos funcionales.

Kapitskii (2004) patentó un preparado alimenticio basado en un hidrolizado de proteínas lácteas. Se usó WPC como sustrato y una protosubtilisina como enzima proteolítica. La reacción se lleva a cabo en medio alcalino, en un reactor tipo tanque agitado. El preparado contenía un 55-65 % en péptidos de diferentes tamaños, 3-13% en aminoácidos libres, 8-12 % en lactosa, 5-9 % de grasas, 2.5-3.5 % de minerales y 3-7 % de humedad residual.

2.3.2 Reactores de enzimas inmovilizadas

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

Las principales ventajas que presenta esta técnica son:

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

Sin embargo, las técnicas de inmovilización también presentan inconvenientes:

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

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

A continuación se resumen los principales trabajos relacionados con la inmovilización de enzimas para la hidrólisis de proteínas.

Mehaia y Cheryan (1983) hidrolizaron caseínas con pepsina y quimosina inmovilizadas sobre soportes de vidrio. Se comparó su efectividad (medida como la cantidad de nitrógeno no proteico –NPN- presente en el hidrolizado) frente a las mismas enzimas solubles. Los mejores resultados para la quimosina se obtuvieron para la enzima libre (NPN = 7.56 mg N/mg caseína frente a 4.20). También en el caso de la pepsina se obtuvieron valores más altos de NPN para la enzima soluble.

Lasch *et al.* (1987) estudiaron la hidrólisis en continuo de proteínas (caseína, α -lactoalbúmina, seroalbúmina humana y una mezcla de proteínas séricas) con enzimas inmovilizadas (Pronase, Thermitase y leucin-aminopeptidasa) en cinco tipos diferentes de soporte. En todos los casos, los autores detectaron problemas en la difusión a través de los poros, bajos coeficientes externos de transmisión de materia y efectos de exclusión por tamaño en el soporte (proporcionales al peso molecular del sustrato y los péptidos liberados).

Tras los primeros resultados, las investigaciones se centraron en la mejora del proceso de inmovilización y en el empleo de diferentes configuraciones de reactores, con el objetivo de disminuir la pérdida de actividad-estabilidad de la enzima inherente a la técnica de inmovilización:

Gea *et al.* (1996) ensayaron la hidrólisis de caseína en un reactor de columna con endo y exoproteasas inmovilizadas sobre soportes especialmente tratados para mejorar la transferencia de materia. Se usaron diferentes enzimas: una proteasa de *Aspergillus Oryzae*, una exopeptidasa pancreática y otra de origen hepático. Los autores

obtuvieron un hidrolizado de caseína de grado de hidrólisis alto y elevado contenido en aminoácidos libres (35 %), que podía ser empleado como suplemento proteínico en la industria alimentaria.

Szczesna y Galas (2000) inmovilizaron células de *Bacillus subtilis* sobre un criogel de polivinilacetato (PVA) y fibras de triacetilcelulosa (TAC). Esta especie de microorganismos secreta enzimas metaloproteasas y subtilisinas, por lo que puede emplearse en la hidrólisis enzimática de proteínas. Los autores ensayaron la hidrólisis de caseína en un reactor de lecho fijo (fibras TAC) y en un reactor de lecho fluidizado (geles de PVA), alcanzando en ambos casos un alto grado de hidrólisis (hasta el 25 %).

Tardioli *et al.* (2003) analizaron la actividad y la estabilidad de Alcalase soluble e inmovilizada sobre soportes de glioxil-agarosa. Los autores compararon el comportamiento de la enzima libre y de la enzima inmovilizada en la hidrólisis de caseína a pH 8 y diferentes temperaturas (entre 40 °C y 90 °C). Los resultados obtenidos mostraron comportamientos muy diferentes en todo el rango de temperaturas. La enzima soluble era más activa que la enzima inmovilizada, pero a su vez, menos estable. La enzima inmovilizada presentaba su máxima actividad a 85 °C, frente a los 65 °C de la enzima soluble. La estabilidad a largo plazo se comparó con experimentos a 45 °C y 80 °C. La enzima soluble presentaba mayor actividad a 45 °C, aunque su desactivación fue más rápida (perdió el 50 % de su actividad tras 22 horas, mientras que la enzima inmovilizada conservaba el 90 % de su actividad tras 20 días). A 80 °C la enzima soluble se desnaturalizaba muy rápidamente (5 minutos), mientras que la Alcalase inmovilizada conservaba su actividad al cabo de 1 h. Los autores destacaban que el uso de esta técnica de inmovilización permitiría hidrolizar caseína a elevadas temperaturas, evitando así el riesgo de contaminación bacteriana que ocurre a temperaturas moderadas.

Ticu *et al.* (2004) compararon la hidrólisis de hemoglobina bovina nativa y hemoglobina desnaturalizada con pepsina inmovilizada sobre dos soportes diferentes, uno de óxido de aluminio y otro de óxido de aluminio modificado con 2-EAOP. La hidrólisis se llevó a cabo a 23 °C y pH 4.5. El hidrolizado contenía varios péptidos bioactivos (VV-hemorphin-4, VV-hemorphin-7 y neokyotorphin). Los mejores resultados (menor adsorción de péptidos y sustrato sobre el soporte) se obtuvieron con el soporte modificado.

Sousa *et al.* (2004) estudiaron la hidrólisis de suero de quesería con Alcalase inmovilizada sobre soportes inertes de gel de agarosa. La hidrólisis se llevó a cabo a una temperatura de 50 °C y en el rango de pH 6-11. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo cinético tipo Michaelis-Menten, una cinética de primer orden y un modelo con inhibición competitiva de producto. Ninguno de los dos primeros pudo explicar los resultados obtenidos, mientras que el modelo con inhibición ajustaba con precisión los datos. Se determinó la influencia del pH sobre los parámetros cinéticos k , K_M y la constante de inhibición K_I .

Barros *et al.* (2004) hidrolizaron α -lactalbúmina con una proteasa de origen vegetal (cardosina A). Los autores encontraron que esta enzima, solubilizada en el medio de reacción, es muy inestable, por lo que abordaron su inmovilización sobre soportes de agarosa-glutaraldehído. A continuación estudiaron la estabilidad de la enzima inmovilizada durante 48 h a diferentes temperaturas (40 °C , 50 °C y 55 °C), obteniendo que la enzima era igualmente estable en este rango de temperaturas. Finalmente, se llevó a cabo la hidrólisis de la proteína con la enzima inmovilizada a pH 5.2 y 55 °C (condiciones de mayor actividad) durante 5 h. El hidrolizado obtenido estaba constituido fundamentalmente por péptidos con PM menor de 6500 Da.

Resende *et al.* (2005) llevaron a cabo la hidrólisis de suero lácteo usando Alcalase inmovilizada sobre gel de agarosa en un reactor de flujo de vórtice, a 50 °C y pH 9.5. Este tipo de reactores permite una agitación efectiva sin dañar los frágiles soportes. Se realizaron ensayos de distribución de tiempos de residencia para determinar los parámetros de transferencia de materia del sistema. Se propuso un modelo de redes neuronales para predecir los parámetros de reacción para determinadas fracciones de péptidos de diferentes pesos moleculares.

Benkhelifa *et al.* (2005) estudiaron la hidrólisis de caseína empleando una endoproteasa inmovilizada en partículas de quitosan en un reactor tórico, y la compararon con la misma enzima libre en un reactor tipo tanque agitado. Los parámetros cinéticos (de acuerdo a una cinética de Michaelis-Menten) se determinaron para el reactor tórico y el tanque, sin encontrar diferencias significativas entre la enzima libre e inmovilizada, aunque la constante de velocidad aparente fue 25 veces menor para la enzima inmovilizada. También se cuantificó una pérdida de actividad del 5% en la enzima inmovilizada frente a la enzima soluble.

2.3.3 Reactores de membrana

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

La membrana es un medio semipermeable, que crea una barrera físico-química selectiva al paso de determinadas especies. Las especies permeables se separan selectivamente de la mezcla de reacción debido a la existencia de una fuerza impulsora (potencial químico, presión o campos eléctricos) que genera el movimiento de solutos a través de la membrana (por difusión, convección o migración electroforética, respectivamente). Por otra parte, la membrana rechaza por completo la enzima, que se recircula al recipiente de reacción, donde se pone en contacto con nuevo sustrato. Dado el tamaño molecular de la mayoría de las enzimas (generalmente entre 10000-100000 Da), la mayoría de los reactores enzimáticos de membrana están equipados con membranas de ultrafiltración.

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

- *Reactores de difusión.* En esta configuración, el contacto entre enzima y sustrato no se produce en el recipiente que contiene la enzima, sino que el contacto se establece sólo después de la difusión de las moléculas de sustrato a través de los microporos de la membrana hacia el compartimento donde está la enzima (bien soluble, bien inmovilizada).

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

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

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

- b) Reactores de diálisis. En estos reactores se ponen en contacto dos corrientes, una a cada lado de la membrana. El sustrato se añade a la corriente que contiene la enzima. El producto formado puede atravesar la membrana hacia la segunda corriente debido a la existencia de un gradiente de concentraciones entre ambos lados de la membrana.
- c) Reactores de membrana agitados con recirculación. Están formados por un tanque agitado de reacción al que se le acopla un módulo de ultrafiltración. Este tipo de reactores pueden operar de modo discontinuo o continuo. En el primer caso, se emplea la membrana una vez completada la reacción en el tanque y se reutiliza el retenido en una nueva reacción en el tanque. En el segundo caso, la mezcla reaccionante se pasa continuamente a través de la membrana. La membrana retiene la enzima y los productos de bajo peso molecular la atraviesan. La enzima se recircula continuamente al tanque que se alimenta en continuo con nuevo sustrato. Esta configuración de reactor es la más usada y la que más habitualmente aparece en la literatura (Prazeres y Cabral, 1994).

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

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

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

- Pérdida de actividad enzimática debido a fugas de catalizador, desactivación térmica y efectos de cizalladura.

- Heterogeneidad de las condiciones de reacción entre el núcleo de la reacción y la superficie de la membrana.
- Colmatación de la membrana.
- Formación de una capa de polarización por concentración.

Los principales trabajos realizados en reactores de membrana para la hidrólisis de proteínas se resumen seguidamente.

Deeslie y Cheryan (1981) hidrolizaron un aislado de proteínas de soja (Promine-D) con Alcalase en un reactor continuo de membrana. Los autores estudiaron la cinética del proceso y la influencia de las principales variables de operación (caudal, volumen de reacción, concentraciones de enzima y de sustrato) en las características del producto final y la conversión alcanzada. Se destacó la inestabilidad del reactor. La productividad bajó a un 60 % al cabo de 10 h de operación, debido al paso de enzima a través de la membrana. En un trabajo posterior, los autores identifican las fracciones de péptidos menores de 2500 Da producidos en el reactor de membrana (Deeslie y Cheryan, 1988).

Sannier *et al.* (1994) estudiaron la estabilidad de un reactor de membrana para la hidrólisis de hemoglobina con pepsina. Se comprobó que no existía inhibición por productos y que el daño mecánico y la autólisis de la pepsina eran limitados en presencia de hemoglobina. La pérdida de actividad de la enzima se debía principalmente a la fuga de la proteasa a través de la membrana, estando influida la transmisión por interacciones electrostáticas de hemoglobina y pepsina con la superficie de la membrana.

Perea y Ugalde (1996) hidrolizaron proteínas del suero lácteo en un reactor de membrana con recirculación utilizando como proteasa Alcalase 0.6L. El sustrato empleado fue un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) con un 35 % en peso de proteína. Se empleó una membrana de ultrafiltración de fibra hueca con un tamaño de corte de 10000 Da. La hidrólisis se llevó a cabo a pH 8.5 y 50 °C. Los autores estudiaron la influencia de la relación enzima-sustrato (variando entre 2.5-22 %) y el tiempo de residencia (entre 18-180 minutos) sobre la operación, eligiendo unos valores de relación enzima/sustrato de 10 % y 182 minutos de tiempo de residencia. El proceso no fue estable más allá de 7 h de operación, debido a la colmatación de la membrana y a la desactivación de la enzima. El producto final obtenido contenía un 72 % de

péptidos de menos de 1000 Da, con unas propiedades funcionales y nutricionales de gran interés industrial.

Lebrun *et al.* (1998) encontraron una alta retención de péptidos en la ultrafiltración de hidrolizados de hemoglobina empleando una membrana de poliétersulfona con un tamaño de corte molecular de 10 kDa. Las fracciones peptídicas del retenido y el permeado se caracterizaron mediante espectroscopia UV-visible, electroforesis SDS-PAGE, cromatografía líquida de exclusión por tamaño (SE-HPLC) y cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC). Los autores identificaron dos fracciones peptídicas con propiedades diferenciadas: por una parte el retenido estaba compuesto por péptidos de alto peso molecular y carácter hidrófobo, por otra, el permeado se componía de péptidos hidrófilos. Los autores sostenían que la elevada retención se debía a la aparición de macropéptidos por la formación de enlaces entre los péptidos hidrófobos y largas cadenas, de manera que el tamaño molecular del retenido era mucho mayor que el previsto inicialmente.

Chiang *et al.* (1999) hidrolizaron un aislado de proteínas de soja (SPI) con una mezcla de Alcalase y Flavorzyme en un reactor continuo de membrana. Se utilizaron dos tamaños de corte diferente, 3000 y 30000 Da. Los autores estudiaron la solubilidad, la capacidad de adsorción de agua y la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos. Los resultados experimentales evidenciaban que las propiedades funcionales son determinadas por el tamaño de corte de las membranas. El estudio del funcionamiento del reactor a largo plazo mostró que la producción estable del hidrolizado se mantenía durante 16 h de funcionamiento.

Belhocine *et al.* (2000) optimizaron el funcionamiento de un reactor de membrana para la hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina con una proteasa de origen vegetal (papaína). La hidrólisis se llevó a cabo a 55 °C y pH 8 y se emplearon dos membranas cerámicas tubulares diferentes: una membrana de microfiltración de 0.14 μm y otra de ultrafiltración de 10000 Da. Los autores propusieron una cinética tipo Michaelis-Menten para la hidrólisis y estudiaron la influencia de los parámetros hidrodinámicos, presión transmembrana y velocidad tangencial, sobre el caudal de permeado. Los mejores resultados se obtuvieron para 1.25 bar y 0.7 m/s. En todos los casos ensayados, la actividad de la enzima disminuía considerablemente (entre un 30 % para la membrana de microfiltración y 15 % para la ultrafiltración), debido a la fuga de

enzima a través de la membrana y a la alteración del tamaño de poro debida a la adsorción de proteínas.

Choi *et al.* (2000) estudiaron la hidrólisis de proteínas de pescado en un reactor de ultrafiltración para obtener un producto con buenas propiedades funcionales. La hidrólisis se llevó a cabo en dos etapas: en primer lugar se empleó pepsina en discontinuo (para disminuir el “fouling” en la membrana) durante 5 h, posteriormente, se emplea Pronase E en un reactor continuo de membrana. En ambas las condiciones de operación fueron 45 °C y pH 2. El tamaño molecular medio de los hidrolizados tras la primera etapa fue 2.500-20.000 Da, mientras que tras la operación en el reactor de membrana 700-10.000 Da. La productividad del reactor continuo de membrana (medida como mg de hidrolizado/mg de enzima) fue 14 veces superior al reactor tipo tanque agitado en discontinuo.

Guadix (2001) obtuvo un hidrolizado de proteínas lácteas constituido fundamentalmente por tri- y dipéptidos en un reactor de membrana. El sustrato empleado fue un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) del 76 % en proteína y la proteasa una subtilisina de origen bacteriano. El proceso se llevó a cabo a pH 8.5 y 50 °C. El módulo de filtración se equipó con una membrana plana de poliétersulfona de corte 3000 Da. Se optimizaron las condiciones de operación. En estas condiciones, no se produjo fuga de enzima a través de la membrana ni pérdida de actividad por efecto del bombeo. El reactor de membrana se mantuvo estable durante 16 horas continuas de operación. Se alcanzaron grados de hidrólisis superiores al 20 % y se obtuvo una productividad 5-6 veces superior a la obtenida en el reactor tanque agitado discontinuo.

Prata-Vidal *et al.* (2001) realizaron un estudio experimental de la hidrólisis de caseinmacropéptido con tripsina en un reactor de celda agitada con la finalidad de obtener péptidos bioactivos. El sustrato, caseinmacropéptido, se obtiene por hidrólisis de caseinato sódico con quimosina y tripsina porcina. Se empleó una membrana de acetato de celulosa con un tamaño de corte de 3000 Da. La reacción se llevó a cabo a pH 7.5 y 40 °C. Se determinaron los perfiles de los péptidos obtenidos en función de los principales parámetros de operación: concentración de sustrato, fuerza iónica y presión transmembrana. Los autores no señalaron el tiempo máximo de operación, pero sí señalaron la aparición de “fouling” en la membrana y la gran importancia que

la fuerza iónica tiene sobre la transmisión de algunas fracciones peptídicas, siendo el parámetro clave para la optimización del uso del reactor.

Kapel *et al.* (2003 y 2006) emplearon un reactor de membrana para la producción continua de un hidrolizado rico en el péptido opioide LVV-hemorfina-7. Este péptido se obtiene en las primeras etapas de la hidrólisis enzimática de hemoglobina con pepsina porcina. Mediante ensayos en modo discontinuo se determinó que el péptido LVV-hemorfina-7 se obtenía a los 2 minutos de reacción a pH 3 y 25 °C de temperatura. Para producir en continuo este péptido se ensayaron las mismas condiciones de operación (25 °C y pH 3) en un reactor de membrana, equipado con un tanque de 40 mL de capacidad y una membrana orgánica plana de corte 10000 Da. El tiempo de residencia se ajustó a 2 min y se mantuvo constante el caudal de permeado aumentando la presión transmembrana hasta alcanzar un valor de 3.2 MPa. El tiempo máximo de operación conseguido es de 48 minutos. Los autores sostenían que la limitación en el tiempo máximo de operación se debía a una elección inadecuada del módulo de membrana (no permitía la operación a elevadas presiones) y no a la existencia de “fouling”. A pesar de que el producto obtenido presentaba una cantidad apreciable del biopéptido deseado, se necesita una posterior purificación mediante técnicas cromatográficas.

Prevot-D'alvise *et al.* (2004) estudiaron la hidrólisis enzimática de proteínas de alfalfa (APC) en un reactor continuo de membrana. Los autores seleccionaron la enzima (entre pepsina y Delvolase), las condiciones de operación (pH y temperatura para lograr la máxima solubilidad de las proteínas) y las concentraciones de enzima y sustrato mediante experimentos previos en un reactor discontinuo tipo tanque agitado. Los experimentos en el reactor continuo de membrana se efectuaron a pH 9.5 y 40 °C, con la enzima Delvolase y una membrana cerámica tubular Carbosep M5 de 10000 Da. En las mejores condiciones ensayadas (concentración de sustrato 32 g/L de APC - concentración de enzima 3.2 g/L de Delvolase) se mantuvo la operación durante 24 horas alcanzando una conversión del 75.9 %. Se concluyó que las condiciones óptimas para el reactor de ultrafiltración eran: caudal 2.22 cm³/min, volumen de reacción 400 cm³, tiempo de residencia 180 min.

Guadix *et al.* (2006) obtuvieron hidrolizados de proteínas lácteas en un reactor continuo de membrana empleando un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC)

como sustrato y una subtilisina de origen bacteriano a pH 8.5 y 50 °C. Se empleó una membrana plana de poliétersulfona de corte 3000 Da. El reactor mantuvo una operación estable durante 16 horas y se llegó a un estado estacionario después de 13 horas de operación. Se alcanzaron grados de hidrólisis superiores al 20 % y una reducción de la alergenicidad del 99.97 %, por lo que el hidrolizado podía incorporarse a fórmulas para nutrición infantil y clínica.

Chiang et al. (2006) emplearon un reactor de membrana equipado con membranas de ultrafiltración con diferentes cortes nominales (entre 1-30 kDa) para la hidrólisis de un concentrado de proteínas de soja. Se ensayaron cinco enzimas como catalizador: Alcalase, Flavourzyme, tripsina, quimotripsina y pepsina. Los hidrolizados producidos presentaban propiedades antihipertensivas, especialmente en el caso de Alcalase y con membranas de 10 kDa. Por ello, se optimizaron las condiciones de operación del reactor de membrana para esta enzima y se llevó a cabo un estudio de estabilidad del reactor. Los autores consiguieron una operación estable sólo durante 8 h.

Mokrane et al, (2006) compararon la operación de un reactor de membrana para la hidrólisis de hemoglobina empleando dos membranas diferentes: una membrana de microfiltración de 0.14 µm y una membrana de ultrafiltración de 10 kDa. Debido a la adsorción inicial de la proteína nativa y la consiguiente modificación de la porosidad y las propiedades superficiales de la membrana, el rendimiento de ambas membranas fue prácticamente idéntico.

Poulin et al, (2006) hidrolizaron β-Lactoglobulina en un reactor de ultrafiltración acoplado a una célula de electrodiálisis, con el objetivo de separar los péptidos liberados de acuerdo a su tamaño y a su carácter aniónico / catiónico. Los autores estudiaron el efecto del pH del medio en la migración y separación de péptidos. La mayor migración se logró para un péptido de carácter hipertensivo (fragmento 142-148) y se consiguió separar hasta trece péptidos. La utilización combinada de ultrafiltración y electrodiálisis permitió mantener el rendimiento de la membrana y minimizar el ensuciamiento.

Cheison et al. (2006, 2007) estudiaron la influencia de las variables de operación (concentración de sustrato, enzima y flujo de filtrado inicial) de un reactor continuo de membrana para la hidrólisis de proteínas del lactosuero. Los autores utilizaron un

modelo de superficie de respuesta para la optimización del sistema y un posible escalado. La concentración de enzima óptima fue 0.055 %, la de sustrato 4.7 % y el flujo inicial de filtrado 6.9 mL / min. No obstante, los autores emplearon una membrana plana de 10 kDa, no habiendo optimizado el corte nominal de la membrana de ultrafiltración empleada.

Por último se citan procesos patentados en los que se lleva a cabo la hidrólisis de proteínas unida a una etapa de separación por membranas:

Chataud *et al.* (1987) hidrolizaron caseína con Neutrased, Alcalase y PEM hasta alcanzar un 33 % de hidrólisis. El hidrolizado se ultrafiltró obteniéndose un porcentaje de aminoácidos libres menor al 8%. El permeado se pasó a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico. La composición del efluente obtenido fue de 1.5 % de oligopéptidos, 19.5 % tetrapéptidos, 38 % de tripéptidos, 38 % de dipéptidos y sin aminoácidos libres. Posteriormente se ultrafiltró, se esterilizó y se incorporó a un preparado con maltodextrinas, triglicéridos y vitaminas para alimentación clínica.

Lysberg *et al.* (1993) hidrolizaron proteínas lácteas en un reactor continuo de membrana con proteasas comerciales y una proteasa de origen fúngico empleada en la elaboración de queso. Los autores patentaron un sistema equipado con control de pH y temperatura y una membrana de ultrafiltración de 10000 Da. El sistema es válido para diferentes aplicaciones biotecnológicas, incluyendo la hidrólisis enzimática de proteínas.

O'Callaghan *et al.* (1993) prepararon un hidrolizado de proteínas del suero lácteo hipoalergénico y bajo en sales. El hidrolizado se preparó en dos etapas: digestión de la proteína con tripsina (50 °C y pH 8) y clarificación del hidrolizado mediante microfiltración en una membrana de fibra hueca. El permeado final contenía un 83 % de nitrógeno proteico y una cantidad moderada de Na⁺ y K⁺. Un hidrolizado de estas características es apto para su empleo en la formulación de alimentos infantiles.

Nielsen (1996) hidrolizó caseinato sódico con una mezcla de proteasas de origen bacteriano (Alcalase, Flavourzyme y Neutrased) para la formulación de leches de sustitución y alimentos dietéticos. Las proteínas se hidrolizaron hasta alcanzar un grado de hidrólisis del 35-55 % y seguidamente se ultrafiltraron con una membrana de

100 kDa. A continuación, el permeado se concentró mediante nanofiltración y se seca por atomización. El producto obtenido es hipoalergénico.

Lin *et al.* (2002) hidrolizaron chitosan con un preparado enzimático que contiene proteasas (papaína), celulasas y pectasas a 38-45 °C y pH 4.5. Emplearon un reactor de membrana compuesto de un tanque agitado más un módulo de ultrafiltración.

Tamura *et al.* (2003) hidrolizaron proteínas del suero lácteo con diferentes proteasas para obtener un preparado gelificante de buen sabor. Las proteasas empleadas fueron: bromelaína o papaína, Alcalase más tripsina y proteasa proveniente de bacterias lácticas. Posteriormente el hidrolizado (con un grado de hidrólisis del 16 %) se ultrafiltró para eliminar fracciones mayores de 50 kDa. Las mejores propiedades gelificantes se obtuvieron con papaína, tripsina y proteasas provenientes de *Lactobacillus helveticus*.

Yamaguchi (2003) patentó un preparado peptídico con propiedades anti-inflamatorias para nutrición enteral. Se empleó un aislado de proteínas del lactosuero (WPI) como sustrato. El proceso de fabricación constaba de 2 etapas: hidrólisis enzimática con liberación de citoquininas y ultrafiltración con un corte de 5000-100000 Da.

Paulsen *et al.* (2004) patentaron un hidrolizado de proteínas del lactosuero para su incorporación a alimentos líquidos y sólidos. Los autores emplearon un aislado de proteínas del lactosuero comercial que se disolvía hasta obtener una solución con un 17-18 % en peso de proteína. La enzima utilizada fue un preparado comercial, Debitrase. La hidrólisis se llevó a cabo durante 2 h a 45 °C y pH 7.5 en un reactor tipo tanque agitado. Tras las 2 h de reacción, se desactivó la enzima mediante calentamiento a 75 °C durante 5 min y seguidamente se refrigeró hasta 16-19 °C. El grado de hidrólisis alcanzado variaba entre el 8-12 %. El hidrolizado se nanofiltró y, finalmente, se secó por atomización. El hidrolizado obtenido contenía 86-90 % de proteína, 1-2 % de hidratos de carbono, 2-5 % de humedad y 6-8 % de cenizas.

3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Como ha quedado patente en el capítulo de Introducción, la hidrólisis enzimática de proteínas ha sido objeto de numerosos estudios en las últimas dos décadas. El interés científico en esta tecnología ha estado influenciado por el amplio abanico de aplicaciones que los hidrolizados de proteínas han encontrado en la industria alimentaria. La hidrólisis implica modificaciones en la solubilidad, textura, digestibilidad, antigenicidad y actividad de las proteínas y por consiguiente de los productos en los que se incluyen estos hidrolizados en su formulación. Hoy día, las investigaciones se centran principalmente en dos líneas: la obtención de biopéptidos y la mejora del proceso de reacción. La mayoría de los procesos implantados a escala industrial se llevan a cabo aún en reactores discontinuos tipo tanque agitado.

En esta investigación se presenta un reactor discontinuo de membrana, que aúna la flexibilidad y sencillez de la operación del reactor tipo tanque agitado junto a la reutilización del catalizador del reactor de membrana en continuo. El modo de operación del este reactor consiste en la sucesión de n etapas sucesivas de:

- hidrólisis
- recuperación de la enzima por ultrafiltración
- reutilización de la enzima en una nueva hidrólisis. Este modo de operación ha sido empleado con éxito en la fermentación de lactosa (Fitzpatrick et al., 1995).

Por tanto, el objetivo de esta Tesis Doctoral es el diseño y optimización del funcionamiento de un reactor discontinuo de membrana para la producción de hidrolizados enzimáticos de proteínas. Como estudio de caso se abordará la producción de un hidrolizado de proteínas del lactosuero bovino para reducir el carácter antigénico de la proteína nativa en un 99.9 % y así poder ser empleado en la formulación de productos para nutrición infantil y clínica.

El diseño y optimización del reactor discontinuo de membrana comprenderá la determinación del grado de hidrólisis que conlleve una reducción de 10^3 de la antigenicidad respecto a la proteína nativa. Posteriormente se seleccionará el tamaño de corte de la membrana que permita el flujo del hidrolizado obtenido y, simultáneamente la retención de la enzima. Una vez seleccionada la membrana, se determinarán las principales variables de operación en el proceso de ultrafiltración con

objeto de minimizar la colmatación. A continuación se llevará a cabo el estudio de la influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en el funcionamiento del reactor, así como la estimación de los parámetros cinéticos característicos del proceso. En cuanto a la optimización del reactor, se describen diferentes modos de operación y se optimizará el funcionamiento de cada uno de ellos: 1) operación a una temperatura fijada con la optimización del número de usos de enzima, 2) operación a una temperatura constante con optimización conjunta de l números de usos de enzima y la temperatura de operación y 3) operación con temperatura variable.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Sustrato

El sustrato empleado es un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC), Lactalbumin 75L, con un contenido medio en proteínas del 76 % en peso, suministrado por Milei (Stuttgart, Alemania). La secuencia de aminoácidos y la configuración de las proteínas mayoritarias se recogen en las Figura 4-1, Figura 4-2 y Figura 4-3.

- β -lactoglobulina

ATVPLTMDGL	DLQKVAGMWH	SMAMAASDIS	LLDSETAPLR	VYVQELRPTP	50
RDNLEIILRK	WEDNRCVEKK	KFNINYLDEN	VLAEKTECAA	ELIVLDTDYE	100
NYLFFCLENA	DAPDQNLVCQ	CLTRTLKADN	EVMEKFDRAL	QTLPVHVRLF	150
FDPTQVAEQC	RI				162



Figura 4-1. Estructura secundaria de β -lactoglobulina

- α -lactoalbúmina

EQLTKCEVFR	ELKDLKGYGG	VSLPEWVCTA	FHTSGYDTQA	IVQNNDSTEY	50
GLFQINNKIW	CKDDQNPSS	NICNISCDKF	LDDDLTDDIM	CVKKILDKVG	100
INYWLAHKAL	CSEKLDQWLC	EKL			
123					



Figura 4-2. Estructura secundaria de α -lactoalbúmina

▪ Seroalbúmina bovina (BSA)

MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA	50
FSQYLQQCPF	DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK	100
VASLRETYGD	MADCCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF	150
KADEKKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLEY	ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC	200
LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPKAE	250
FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE	300
CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAKDAFL	350
GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL	400
KHLVDEPQNL	IKQNCQDFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS	450
RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC	500
TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT	550
ALVELLKHKP	KATEEQKQTV	MENFVAFVVK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV	600
STQTALA					

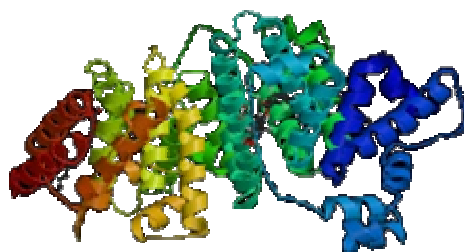


Figura 4-3. Estructura secundaria de seroalbúmina bovina (BSA)

4.1.2 *Enzima*

La enzima utilizada es una endoproteasa de origen bacteriano, Protex 6L, suministrada por Genencor Inc. (Rochester, EE.UU.). Protex 6L es una subtilisina (código E.C. 3.4.21.62) procedente de la fermentación controlada de cepas seleccionadas de *Bacillus licheniformis*. La subtilisina es una serino-proteasa, es decir, su actividad catalítica se produce por la acción del residuo de serina. La secuencia de péptidos que presentan actividad proteolítica en la subtilisina es: Leu Asn Gly Thr Ser Met Ser Pro His (Dixon y Webb, 1979). Tiene una estructura primaria de 275 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 22500 Da. El rango de pH en el que la enzima presenta actividad está entre 7 y 10. El rango de temperatura varía entre 25 y 70 °C y no es necesario utilizar activadores. En la Figura 4-4 se muestra la configuración de la subtilisina.



Figura 4-4. Estructura secundaria de subtilisina

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Determinación del grado de hidrólisis

Se define h como el número de equivalentes de enlaces peptídicos rotos por gramo de proteína y h_{tot} como el número total de equivalentes de enlaces peptídicos por gramo en la proteína nativa. Por tanto, el grado de hidrólisis de una proteína (DH) puede calcularse según:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad [4.1]$$

El valor h_{tot} se calcula sobre la base de la composición de aminoácidos de la proteína. Para la mayoría de proteínas alimentarias, el peso molecular medio de los aminoácidos es aproximadamente 125 g / mol, de manera que el valor de h_{tot} se sitúa alrededor de 8 equivalentes por kg de proteína. La Tabla 4-1 relaciona el factor Kjeldahl y el contenido de enlaces peptídicos para varias proteínas.

Tabla 4-1. Factor de conversión Kjeldahl y número de enlaces peptídicos para varias proteínas

Proteína	Factor de conversión Kjeldahl (f_n)	h_{tot} (eq / kg ($N \times f_n$))
Caseína	6.38	8.2
Séricas	6.38	8.8
Carne	6.25	7.6
Músculo pescado	6.25	8.6
Clara de huevo	6.25	Aprox. 8

Soja	6.25	7.8
Semillas de algodón	6.25	7.8
Hemoglobina	6.25	8.3
Trigo	5.70	8.3
Gelatina	5.55	11.1

En el presente trabajo de investigación se emplea la técnica del pH-estato para la medida del grado de hidrólisis. Esta técnica permite correlacionar grado de hidrólisis con la cantidad de base añadida para mantener constante el pH (Adler-Nissen, 1986; Camacho *et al.*, 2001) según la siguiente ecuación:

$$DH = \frac{V_B \cdot N_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad [4.2]$$

donde:

- V_B es el volumen de base consumida (mL)
- N_B es la normalidad de la base
- M_P es la masa de proteína (g de proteína en cada “batch”)
- h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos (eq/g proteína). Para las proteínas del lactosuero su valor es 0.0088 eq/g (Adler-Nissen, 1986).
- α es el grado de disociación de los grupos amino liberados durante la hidrólisis. Este grado de disociación es función del pH del medio y del pK medio de los grupos α -amino liberados y puede calcularse según:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad [4.3]$$

En la Tabla 4-2 se muestran los valores del grado de disociación del grupo amino para diferentes temperaturas y pH.

Tabla 4-2. Grado de disociación para proteínas en función de la temperatura y el pH

pH	Temperatura (°C)					
	40	50	60	70	75	80
6.5	-	0.2	0.29	0.39	0.44	0.50
7.0	0.33	0.44	0.55	0.67	0.71	0.76
7.5	0.61	0.71	0.80	0.86	0.89	0.91
8.0	0.83	0.89	0.93	0.95	0.96	0.97
8.5	0.94	0.96	0.97	0.98	0.99	0.99

La longitud media de cadena peptídica (PCL en sus siglas en inglés) puede calcularse a partir de la determinación del grado de hidrólisis. El parámetro PCL es el número medio de aminoácidos en los péptidos. Así, una proteína con una longitud de cadena PCL_0 tendrá un número total de enlaces en la proteína de PCL_0-1 . Si se hidroliza en n péptidos, se romperán $n-1$ enlaces peptídicos. Por tanto, teniendo en cuenta que grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos:

$$DH = \frac{n-1}{PCL_0-1} \quad [4.4]$$

Si $PCL = PCL_0/n$ la ecuación anterior queda:

$$DH = \frac{\frac{1}{PCL} - \frac{1}{PCL_0}}{1 - \frac{1}{PCL_0}} \quad [4.5]$$

En el caso de proteínas lácteas, $PCL_0 \rightarrow \infty$ por lo que el denominador puede considerarse igual a la unidad. Además, para valores de grado de hidrólisis altos, la ecuación [4.5] se simplifica a:

$$DH = \frac{1}{PCL} \quad [4.6]$$

Esta aproximación es válida en, prácticamente todos los casos (Adler-Nissen, 1986).

4.2.2 Determinación del potencial antigénico

La determinación del potencial antigénico de una proteína o un hidrolizado de proteínas se realiza mediante un ensayo de inmunoenzimología de inhibición (ELISA) según el método descrito por Knights (1985). Esta prueba consiste en la determinación del porcentaje de inhibición de la unión de IgG frente a la propia proteína o sus hidrolizados a diferentes concentraciones.

La técnica ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente.

Un ensayo ELISA comprende cuatro fases:

1) Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima (Figura 4-5).

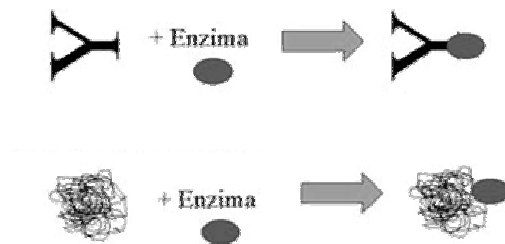


Figura 4-5. Ensayo ELISA: marcaje del anticuerpo y del antígeno

2) Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas (Figura 4-6).

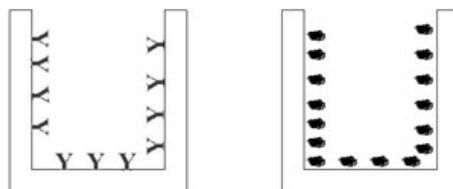


Figura 4-6. Ensayo ELISA: unión del anticuerpo a la fase sólida

3) En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal, al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno (Figura 4-7).

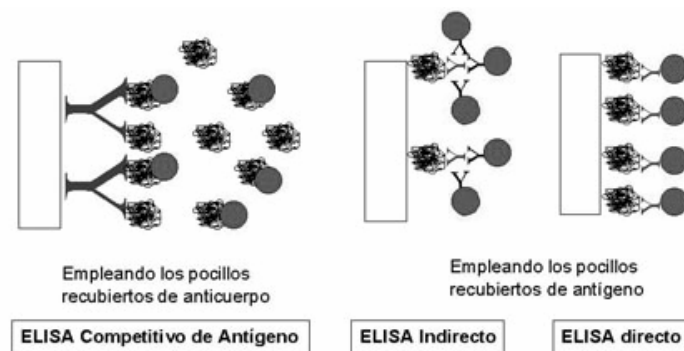


Figura 4-7. Ensayo ELISA: formación del inmuno complejo sobre la fase sólida según el tipo de inmuno ensayo

4) Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado, para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante técnicas espectrofotométricas (Figura 4-8).



Figura 4-8. Ensayo ELISA: reacción enzima-sustrato inmovilizado

A continuación se describe el protocolo ELISA seguido para la determinación del potencial antigénico de los hidrolizados de proteínas del lactosuero:

- Materiales
 - Placas Microtiter (Flow, Herts, Reino Unido).

- Lavador de placas Microtiter (SLT Instruments, Salzburgo, Austria).
- Lector de placas Microtiter (SLT Instruments, Salzburgo, Austria).
- Reactivos
 - Tampón carbonato/bicarbonato: Na_2CO_3 30 mM y NaHCO_3 80 mM (pH 9.6).
 - Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0.14 M, Na_2HPO_4 17 mM, KCl 2.6 mM y KH_2PO_4 1.4 mM (pH 7.4).
 - Tampón PBS suplementando con gelatina al 0.1% (p/v) y Tween 20 al 0.05% (p/v) (PBSGT).
 - Tampón PBSGT suplementado con gelatina al 2% (p/v) (PBSGTG).
 - Suero IgG frente a proteínas del suero lácteo producido en conejo (Sigma, St. Louis, EE.UU.).
 - Suero anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma, St. Louis, EE.UU.).
 - Sustrato: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en concentración de 20 mg/mL en dimetilsulfóxido.
 - Agua oxigenada al 10% (v/v).
 - Tampón citrato: ácido cítrico 25 mM y Na_2HPO_4 50 mM.
 - Ácido sulfúrico 2.5 M.

- Metodología

Las placas Microtiter se activan mediante la adición de 200 μL por pocillo del sustrato (50 mg / mL) en tampón carbonato / bicarbonato pH 9.6, e incubación a 4°C durante toda la noche. Los enlaces libres residuales son bloqueados con PBS (pH 7.4) que contiene 0.1 % de gelatina y 0.05 % de Tween (PBSGT) y se incuban durante 30 minutos a 37 °C. Los pocillos se lavan tres veces con 0.05 M PBSGT. 100 μL de WPC o solución de hidrolizado se mezclan con 100 μL de solución de antisuero (anticuerpos contra proteínas del lactosuero, desarrollados en conejos, dilución 1:1000 en 0.05 M PBS. Después de incubación a 37 °C durante 1 hora, la mezcla se añade a los pocillos y se incuba de nuevo a 37 °C durante 1 hora.

Durante la primera incubación, la proteína o restos proteicos presentes en las distintas muestras, reaccionan con los anticuerpos específicos frente a proteínas del suero lácteo presentes en el suero de conejo. Posteriormente, al incubar en la placa las distintas

muestras, los anticuerpos que hayan quedado sin reaccionar en la primera incubación se unen a la proteína que cubre las paredes de los pocillos.

Tras lavar las placas 3 veces con tampón PBSGT, se añaden 200 μL por pocillo de suero anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 1:5000 en PBSGT, incubándose 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Seguidamente se procede al lavado de las placas, de la misma forma que en anteriores pasos, dispensándose 150 μL por pocillo de tampón sustrato (formado por 100 mL de TMB, 5 mL de agua oxigenada al 10 % y 20 mL de tampón citrato). Tras la aparición de color azul, se detiene la reacción con 50 μL de H_2SO_4 2.5 M, tornando la coloración a amarillo con un máximo de absorción a 450 nm. Considerando como máximo de absorbancia la obtenida en los pocillos en los que sólo hay antisuero, es decir, donde no existe inhibición, se calcula el porcentaje de inhibición según:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{muestra}}}{A_0} \right) \times 100 \quad [4.7]$$

donde:

- A_{muestra} es la absorbancia medida en los tests ELISA para las muestras ensayadas.
- A_0 es la absorbancia medida en ausencia de sustrato.

4.2.3 Distribución de pesos moleculares

La determinación de la distribución de pesos moleculares en un hidrolizado se realiza usando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC) descrita por Richter *et al.* (1983). Esta técnica conduce a una buena separación de péptidos y a una correlación entre el logaritmo del peso molecular y el tiempo de retención.

Como fase estacionaria se emplean dos columnas TSK-gel G2000-SW (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania) de 300 mm de longitud y 7.5 mm de diámetro interno conectadas en serie. La fase móvil es guanidina clorhídrica 6 M a 1 mL / min. Los eluyentes de la columna se detectan mediante lecturas de absorbancia a 280 nm. Las

proteínas y péptidos utilizados como referencia (Sigma, St Louis, EE.UU.) se recogen en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3. Determinación de la distribución de pesos moleculares de un hidrolizado de proteínas por HPLC. Péptidos patrón

Patrón	Peso molecular (g/mol)	t _R (min)
Ovoalbúmina	44000	10.45
Quimotripsinógeno	25000	12.17
Ribonucleasa	13700	13.93
Insulina	6000	16.52
Insulina A	2531	17.45
Péptido inductor del sueño	849	19.30
Phe-Gly-Gly	279	20.36

4.3 Correlación entre grado de hidrólisis y potencial antigénico

Para determinar la correlación entre grado de hidrólisis y potencial antigénico se lleva a cabo una reacción de hidrólisis a 50 °C y pH 8.5, con una concentración inicial de sustrato de 5 g / L y una concentración de enzima de 0.05 g / L. Durante la reacción de hidrólisis se toman diferentes muestras y se determina su antigenicidad mediante un inmunoensayo ELISA. De esta manera se asigna a cada grado de hidrólisis un potencial antigénico. A continuación, se representan las curvas de inhibición que expresan el porcentaje de inhibición de respuesta del suero específico en función del logaritmo de la concentración de proteína. Finalmente, la reducción de antigenicidad (AR) se calcula como el logaritmo del cociente entre las concentraciones de hidrolizado y WPC nativo que dan un 50 % de inhibición.

4.4 Selección del módulo de membrana

4.4.1 Tamaño nominal de corte

Una vez seleccionado el grado de hidrólisis de operación, se debe seleccionar el tamaño nominal de corte de membrana, que en la etapa de separación permita el paso de los péptidos liberados durante la reacción. Con este fin, se determina la distribución de pesos moleculares del hidrolizado mediante SE-HPLC y su perfil cromatográfico se compara con el de la proteína nativa. El tamaño nominal de corte seleccionado debe

ser mayor que el peso molecular correspondiente al mínimo tiempo de retención para el que se detectan péptidos en el hidrolizado.

Además, la membrana seleccionada debe cumplir una segunda condición: el tamaño nominal de corte debe ser suficientemente pequeño para asegurar que no existe paso de la enzima a través de la membrana.

La fuga o paso de enzima a través de la membrana, se detecta mediante la determinación de la actividad enzimática en el filtrado. Para ello se realiza el siguiente ensayo: se hidrolizan 200 mL de una solución de WPC a 50 °C y pH 8.5 hasta el grado de hidrólisis fijado (con concentración inicial de sustrato 5 g / L y concentración de enzima 0.05 g /L) y, a continuación, se filtra el producto hidrolizado a través de la membrana seleccionada, hasta recoger 150 mL de filtrado en una probeta cónica graduada. A continuación 50 mL de este filtrado se añaden a una disolución de WPC fresco (150 mL con igual concentración de sustrato, 5 g / L) y se registra la caída de pH, provocada por la actividad enzimática residual del filtrado, mediante un pH-metro Titrimo 718 (Metrohm, Herisau, Suiza). Si la caída de pH es considerable (superior a 0.5 unidades de pH) se considera que el paso de enzima es significativo y el tamaño nominal de corte seleccionado no es suficiente para retener totalmente la enzima. Por el contrario, una caída no significativa de pH, confirma que la actividad enzimática en el filtrado es prácticamente nula y, por tanto, el tamaño nominal de corte es adecuado para retener el catalizador.

4.4.2 Caracterización del módulo de membrana

La caracterización del módulo de membrana comprende diferentes ensayos.

- Determinación del caudal de filtrado de agua frente a la presión transmembrana aplicada.

La determinación del caudal de filtrado de agua frente a la presión transmembrana se explica a continuación: se pasa agua desionizada Milli-Q a 20 °C a través de la membrana de ultrafiltración y se mide el caudal de filtrado a diferentes presiones transmembrana. La medición del caudal de filtrado se realiza siguiendo el siguiente protocolo: se fija la presión transmembrana aplicada hasta obtener lecturas manométricas estables. Una vez estabilizada la presión, se recoge agua proveniente del

canal de filtrado de la membrana durante 1 minuto en una probeta graduada. El cociente entre el volumen de filtrado obtenido y el tiempo de filtración necesario es el caudal de filtrado para una presión transmembrana fijada. Esta operación se repite para al menos 5 valores de presión transmembrana.

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

- Determinación del caudal de filtrado de hidrolizado frente a presión transmembrana.

Para la determinación del caudal de filtrado de hidrolizado frente a la presión transmembrana se filtra un hidrolizado de proteínas a través de la membrana, registrando el caudal de filtrado a diferentes presiones aplicadas. El hidrolizado se prepara a partir de una disolución de WPC con una concentración de proteína de 5 g / L y la hidrólisis se lleva a cabo con una concentración de enzima de 0.05 g / L, a una temperatura de 50 °C y pH 8.5. La filtración se realiza a 20 °C. El caudal se mide del siguiente modo: se parte del valor más bajo de presión transmembrana a ensayar, y una vez estabilizada la presión, se recoge en una probeta graduada el caudal de filtrado obtenido durante 1 minuto de filtración. El cociente entre volumen recogido y tiempo de filtración es el caudal a la presión fijada. A continuación se aumenta la presión hasta el siguiente valor de ensayo y se mide el caudal de la misma manera, y así

sucesivamente hasta llegar al mayor valor del ensayo. Finalmente se ensayan los mismos valores de presión transmembrana pero en orden descendente, es decir, partiendo del valor más alto se baja la presión hasta llegar al menor. El objetivo de repetir las medidas de caudal en orden descendente de presión transmembrana es comprobar si en el comportamiento del módulo de membrana aparecen fenómenos de histéresis.

La determinación de la relación entre caudal de filtrado y presión transmembrana permite calcular el óptimo de presión de operación. Para la mayoría de sustratos esta relación presenta dos zonas de comportamiento diferente. Un primer tramo de dependencia lineal, donde el proceso de filtración es controlado por la presión, y un segundo tramo, normalmente a elevadas presiones de trabajo, donde esta relación es asintótica, esto es, ante incrementos considerables de presión aplicada, el aumento de caudal no es significativo. En este caso, es la transferencia de materia la que regula el proceso de filtración. La zona óptima de operación del módulo de membrana corresponde a la región lineal.

- Protocolo de limpieza.

El protocolo establecido para la limpieza del módulo de membrana es el siguiente:

- 1) Enjuague con agua desmineralizada con el canal de retenido abierto hasta observar transparencia para eliminar restos de producto.
- 2) Limpieza del canal de retenido. Con el retenido abierto se pasa una solución con NaOH 0.5 N y dodecilsulfato sódico al 0.1 % en peso a 45 °C a una presión de entrada de 2 bar durante 5 minutos.
- 3) Limpieza del canal de filtrado con NaOH 0.5 N más dodecil sulfato sódico (SDS) 0.1 % en peso a 45 °C. Se abre el filtrado y se recircula el retenido durante 15 minutos.
- 4) Enjuague del canal de retenido. Se pasa agua desmineralizada hasta alcanzar la neutralidad en el retenido.
- 5) Enjuague del canal de filtrado. Se pasa agua desmineralizada abriendo el filtrado y recirculando el retenido hasta alcanzar la neutralidad en el filtrado.

Este protocolo se realiza después de cada operación de filtración de hidrolizado. En el caso de no recuperar al menos el 90 % de la permeabilidad inicial de la membrana, se intensifica la limpieza aumentando el tiempo de recirculación de la solución en el paso 3.

Si se observa un aumento del tiempo de filtración a medida que aumenta el número de usos de la membrana, se intensifica la limpieza, aumentando el tiempo de recirculación de la solución de limpieza en el paso 3.

4.5 Reactor discontinuo de membrana

El reactor discontinuo de membrana consta de una unidad de reacción a la que se acopla un módulo de ultrafiltración. A continuación se describe detalladamente el dispositivo experimental.

4.5.1 Unidad de reacción

Es un reactor encamisado tipo tanque agitado de 200 mL de capacidad. El reactor dispone de control de temperatura (mediante circulación forzada de agua caliente a través de la camisa) y de pH (mediante un valorador automático Titrino 718 Metrohm). El tanque es de vidrio y dispone de cinco bocas en su tapa para sondas de temperatura y pH. El grado de mezcla completa se consigue mediante agitación magnética. La reacción de hidrólisis se monitoriza mediante la medida del porcentaje de enlaces peptídicos rotos (grado de hidrólisis).

4.5.2 Unidad de separación

Como unidad de separación producto-enzima se emplea un equipo Labscale TFF (Millipore Corp., Bedford, EE.UU.) equipado con membranas orgánicas planas de poliétersulfona (PES) Biomax. El área efectiva de filtración es 50 cm². El equipo se compone de un tanque de alimentación, bomba y módulo de ultrafiltración. Está equipado con medidor de caudal y medidores de presión en las corrientes de alimentación, retenido y filtrado.

La poliétersulfona (PES) es un termoplástico amorfo, transparente y de color ámbar. La estructura química de la PES se muestra en la Figura 4-9. De acuerdo con Cheryan (1998), los módulos de PES se caracterizan por:

- baja adsorción/deposición de proteína sobre la superficie activa
- temperaturas de trabajo relativamente altas (hasta 75 °C)
- rango de pH de trabajo amplio (1-13)
- buena resistencia a los cloruros (hasta 200 ppm en limpiezas y 50 ppm en condiciones de operación)
- facilidad de fabricación en diferentes configuraciones
- amplio rango de tamaños de corte disponibles (entre 1000 Da y 0.2 μm)
- buena resistencia química frente a hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos halogenados, alcoholes y ácidos (aunque la resistencia frente a aromáticos, cetonas, ésteres y éteres es menor).
- presiones de trabajo moderadas (aptos para microfiltración y ultrafiltración)

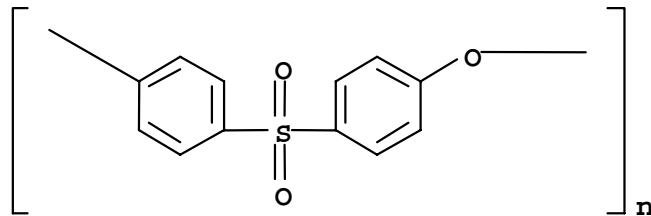


Figura 4-9. Estructura química del monómero de poliétersulfona

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

Desde un punto de vista físico, los módulos de membrana de PES (veáse Figura 4-10) presentan una microestructura de capa fina microporosa parecida a una barrera perforada, pudiendo ser atravesada por aquellos solutos cuyo tamaño sea inferior al tamaño de poro. Por otra parte, las membranas de PES son asimétricas, es decir, presentan propiedades morfológicas y funcionales distintas por ambas caras de la membrana (Palacios, 1999).

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

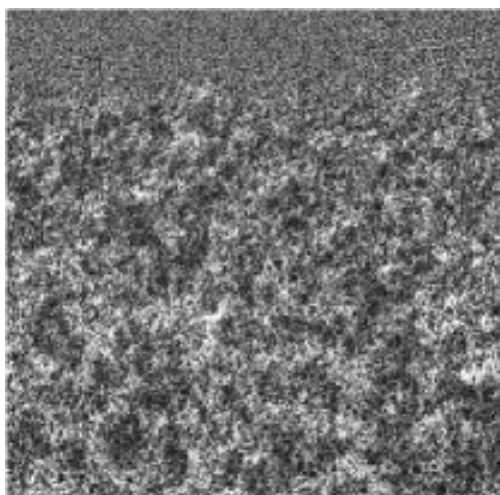


Figura 4-10. Estructura física de una membrana de poliétersulfona

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

Figura 4-11 se muestra el porcentaje de rechazo de la membrana Biomax de corte 10000 Da. Se observa que las especies menores de 10 kDa pasan a través de la membrana sin retención y que el rango de peso molecular para el que hay retención parcial es muy estrecho en comparación con una membrana convencional.

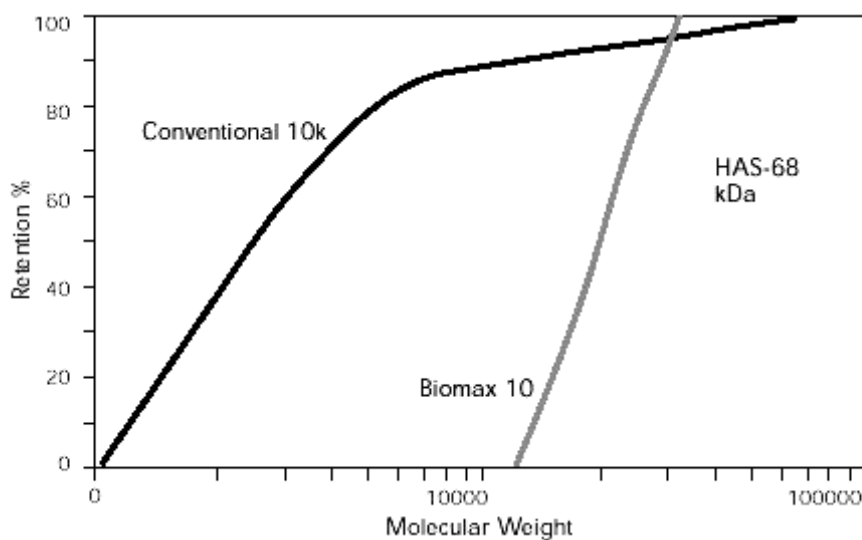


Figura 4-11. Rechazo de proteína en función del peso molecular del soluto para membranas Biomax (Millipore, 2001)

4.5.3 Modo de operación

El reactor discontinuo de membrana opera en un modo cíclico compuesto de tres etapas:

- *Hidrólisis*

Para preparar la solución de WPC se precalienta agua Milli-Q hasta 35-40 °C y se diluye WPC hasta una concentración de proteína (S_0) de 5 g/L. A continuación se añaden al tanque de reacción 200 mL de esta disolución y se ajusta a la temperatura de trabajo y a pH 8.5 mediante adición de hidróxido sódico 1 N. Se añade la enzima al medio y la reacción comienza. Durante la reacción de hidrólisis el pH se mantiene constante mediante la adición de NaOH 1 N. Si se denomina P_0 al número de enlaces peptídicos al inicio de esta etapa, al final de la hidrólisis el número de enlaces peptídicos viene dado por $P_0 (1-DH)$.

- *Ultrafiltración*

Una vez se completa la reacción (es decir, se alcanza el grado de hidrólisis requerido), la mezcla reaccionante se enfría hasta 20 °C, ya que a esta temperatura la proteasa no muestra actividad enzimática significativa. A continuación el hidrolizado se pasa a través de la unidad de membrana para la separación del producto y de la enzima. El producto se recoge en el filtrado mientras que la totalidad de la enzima permanece en la línea de retenido y se lleva a un factor de concentración 4, es decir, se pasa desde un volumen inicial de 200 mL hasta obtener 150 mL de filtrado, quedando la enzima en los 50 mL de retenido restantes. El volumen retenido se recicla a la unidad de reacción para una nueva etapa de hidrólisis.

Asumiendo una transmisión total de péptidos a través de la membrana, la concentración final de enlaces peptídicos en el retenido es $P_0 (1-DH)$.

Después de cada filtración, se procede a la limpieza de la membrana hasta la recuperación de sus características filtrantes de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito.

- *Reutilización de la enzima*

En esta etapa el concentrado de retenido que contiene la enzima se calienta hasta la temperatura de trabajo y se devuelve al tanque de reacción para llevar a cabo una

nueva hidrólisis. El tanque de reacción contiene una nueva disolución de WPC a la temperatura y pH de trabajo. Teniendo en cuenta que la concentración de enlaces peptídicos debe ser igual en cada una de las reacciones de hidrólisis, la concentración de la solución de WPC que se añade en la segunda hidrólisis y sucesivas será:

$$\frac{P_0(1-(1-DH)(1-R))}{R} \quad [4.8]$$

donde R se define como:

$$R = \frac{V_F}{V_0} \quad [4.9]$$

Siendo V_F es el volumen de filtrado y V_0 el volumen inicial.

4.6 Influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en la operación del reactor discontinuo de membrana

Con el objeto de estudiar la influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en la operación del reactor se planifican experimentos en el rango de temperaturas en el que la proteasa muestra actividad enzimática: 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C y 70 °C; y se ensayan diferentes concentraciones iniciales de enzima: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 g/L. La concentración de sustrato en todo caso es de 5 g/L (por tanto, la relación enzima/sustrato es: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05) y el pH de operación el de máxima actividad-estabilidad de la enzima, pH=8.5. Por tanto, se trata de un diseño factorial de 2 variables, temperatura con 6 niveles y concentración de enzima con 5 niveles. En total se realizan 30 series de experimentos.

La temperatura máxima de operación se selecciona teniendo en cuenta las reacciones de pardeamiento no enzimático denominadas reacciones de Maillard de los productos lácteos. En estas reacciones los grupos aldehído de la lactosa y de otros hidratos de carbono minoritarios pueden reaccionar con los grupos amino de las proteínas lácteas y los aminoácidos liberados durante la hidrólisis.

La extensión de las reacciones de Maillard depende del aporte de calor (Burton, 1984), por lo que una temperatura elevada contribuye a su aparición. En el primer paso de la reacción de Maillard, la porción de glucosa de la lactosa reacciona con el grupo ϵ -

amino de la lisina, tanto la libre como la ligada en una proteína, formándose una enamina (base de Schiff). En pasos posteriores de la reacción se produce una reorganización de Amadori que provoca la aparición de los productos de Amadori fructosa-lisina, lactosa-lisina, lactulosa-lisina y tagatosa-lisina, que dan lugar a la formación de 5-hidroximetil furfural (HMF) y maltol como productos finales de reacción (véase Figura 4-12; Schlimme y Buchheim, 2002). Según este mecanismo, las reacciones de Maillard son indeseables desde un punto de vista nutricional puesto que reducen la biodisponibilidad de la lisina. La disponibilidad de la lisina como nutriente también disminuye a elevadas temperaturas por la formación de lisino-alanina, aunque en este caso no se trata de una auténtica reacción de Maillard (Annan y Manson, 1981). Además, los productos de reacción de Maillard influyen negativamente en las propiedades organolépticas del producto final (color, olor, sabor, apariencia, etc.). También pueden conllevar una pérdida de proteína útil, disminución de la solubilidad, destrucción de vitaminas o incremento de la acidez (Saltmarch and Labuza, 1981).

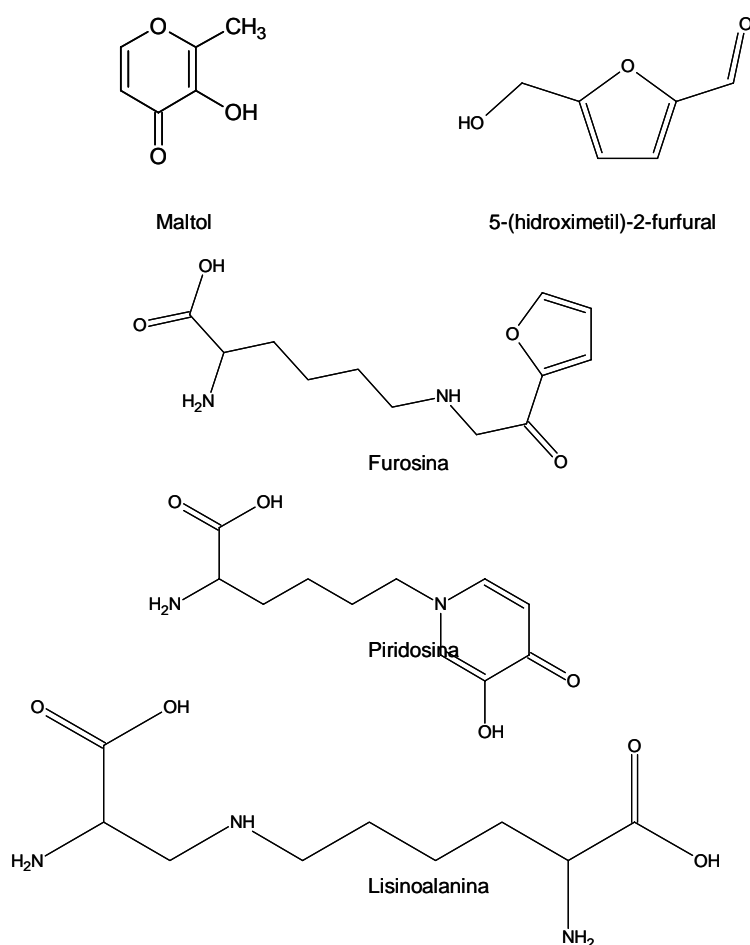


Figura 4-12. Estructura química de algunos productos de Maillard y de adición.

La extensión de la reacción de Maillard depende de la temperatura, del pH, del contenido en carbohidratos y de componentes aminados (aminoácidos libres, péptidos y proteínas) y, por último, del grado de humedad. Desde un punto de vista cinético, la reacción de Maillard puede describirse como una reacción de orden cero, ya que la concentración de compuestos cromóforos es despreciable en comparación con los reactivos presentes (Franzen et al., 1990). Por otra parte, la energía de activación de la reacción de Maillard es pequeña por lo que se produce a temperaturas bajas (incluso a 10 °C). Sin embargo, sólo si el calentamiento es suficientemente intenso y prolongado puede producirse el pardeamiento característico provocado por los productos de la reacción de Maillard. Por ejemplo, se ha observado que en varios lactosueros en polvo comerciales el pardeamiento típico de Maillard aparece tras 19 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (Sithole *et al.*, 2005). En el caso de hidrólisis del WPC se ha observado que la coloración amarillenta intensa aparece cuando se hidroliza a temperaturas superiores a 70 °C. La reacción se ve favorecida a pH neutro o básico y se han observado reacciones de Maillard en productos lácteos con sólo un 7 % de agua.

Como anteriormente se ha descrito, en cada experiencia se opera en ciclos de operación que comprenden tres etapas: reacción, separación y reutilización de la enzima. En cada etapa de reacción se monitoriza la evolución del grado de hidrólisis con el tiempo. Tras alcanzar el grado de hidrólisis requerido, el hidrolizado es ultrafiltrado con el fin de recuperar la enzima y parar la reacción. La enzima es devuelta al tanque de reacción donde se lleva a cabo una nueva hidrólisis. Ésta se reusa hasta que el tiempo de reacción sobrepasa un valor orientativo de 3 horas.

4.7 Estimación de parámetros

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

Para la regresión no lineal se emplea la herramienta Solver de la aplicación Excel de Microsoft Office. Esta herramienta permite minimizar (o maximizar) el valor de una celda objetivo variando un conjunto de celdas seleccionadas. En la resolución de

problemas de optimización con funciones no lineales (NLP, Non-linear Programming), Solver utiliza el método del gradiente reducido generalizado (GRG); siempre y cuando la función objetivo o alguna de las restricciones sean funciones continuas y también sus derivadas sean funciones continuas. Los pasos de los que consta el algoritmo GRG son:

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

4.8 Optimización numérica

Biegler y Grossman (2003) clasifican los diferentes problemas de optimización de interés en ingeniería atendiendo a las características de la función objetivo y sus variables, Figura 4-13.

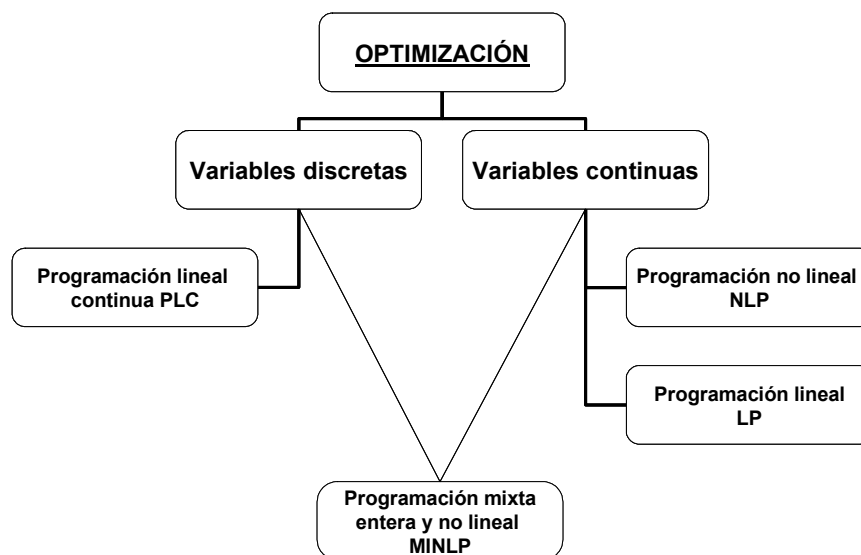


Figura 4-13. Clasificación de los problemas de optimización en Ingeniería

Muchos problemas requieren la solución de ecuaciones que incluyen tanto funciones lineales como no lineales con variables discretas o continuas. Este caso corresponde a los problemas de programación no lineal con enteros (MINLP, del inglés Mixed

Integer Non-Linear Programming). El modelo matemático de un problema de programación entera es el mismo que el de programación no lineal (o lineal), con la única restricción añadida de que las variables deben tomar valores enteros. Si este último requisito no se exige a todas las variables se dice que es un problema de programación entera mixta.

Un problema de optimización MINLP se escribe en forma algebraica de la siguiente manera (Grossman, 2002):

Min $Z = f(x,y)$ con las posibles restricciones $g_j(x,y) \leq 0$ con $j \in J$, $x \in X$, $y \in Y$.

Siendo f y g funciones continuas y derivables, J el número de restricciones y; x e y , dos variables, continua la primera y discreta la segunda.

Para la resolución de los problemas de optimización MINLP se emplean diferentes métodos (Biegler *et al.*, 1997):

- Enumeración de todos los posibles valores enteros. En este caso se resuelve cada sub-problema NLP para encontrar el óptimo de las variables continuas (Smith, 1996). El resultado de esta búsqueda es una solución óptima para cada posible combinación de variables enteras. La mejor de estas soluciones es la solución al problema MINLP completo.

- Método de ramificación-acotación (Branch-and-Bound o BB). El método de ramificación-acotación fue inicialmente desarrollado para la resolución de problemas de programación lineal con enteros (ILP) (Dakin, 1965). Sin embargo, en trabajos posteriores se ha generalizado para poder resolver problemas de programación no lineal en diversos campos (Gupta y Ravindran, 1985).

En el presente trabajo de investigación se formulan tres modos de operación para el sistema de reactor discontinuo de membrana que conllevan tres problemas de optimización diferenciados: a) la determinación del número óptimo de usos de enzima para la operación con temperatura fijada, b) la determinación conjunta de número de usos de enzima y temperatura para la operación a temperatura constante y c) determinación de número de usos de enzima y temperatura con operación con temperatura variable en cada una de las reacciones de hidrólisis.

Para estos problemas de optimización se emplea la técnica de enumeración y posterior resolución de los problemas NLP asociados. Se emplea programación lineal sucesiva (*successive linear programming* o SLP) para la determinación de las direcciones de búsqueda del óptimo. Esta técnica consiste en una aproximación lineal en los cálculos para acelerar los tiempos de iteración. Se ha empleado el software LINGO 10.0 (LINDO Systems, Inc. Chicago –EE.UU.) para el cálculo de las temperaturas óptimas de operación en cada uno de los casos planteados.

5. ASPECTOS TEÓRICOS

Considerando un reactor discontinuo de membrana en el que se llevan a cabo n hidrólisis y se utiliza la enzima n veces, la velocidad de la reacción en cada etapa de hidrólisis, siendo temperatura y pH constantes es:

$$r = \frac{dS}{dt} = f(x, T) \cdot e \quad [5.1]$$

donde:

- S es la concentración de sustrato.
- e es la concentración de enzima activa.
- $f(x, T)$ una ecuación cinética que sólo depende de la conversión de sustrato, esto es, el grado de hidrólisis y la temperatura.

Si la concentración de sustrato S es:

$$S = S_0 \cdot (1 - x) \quad [5.2]$$

Donde:

- S_0 es la concentración inicial de sustrato y x es el grado de hidrólisis; entonces, la velocidad de reacción puede expresarse como:

$$r = S_0 \cdot \frac{dx}{dt} = f(x, T) \cdot e \quad [5.3]$$

Separando variables e integrando se obtiene para una reacción de hidrólisis cualquiera que:

$$\int_0^x \frac{S_0}{f(x, T)} dx = \int_0^t e \cdot dt \quad [5.4]$$

Si se cumplen las siguientes hipótesis:

- la desactivación enzimática es despreciable durante la filtración
- la cantidad inicial de sustrato y el grado de hidrólisis final se mantienen en cada etapa de hidrólisis
- la temperatura es igual en cada una de las sucesivas reacciones de hidrólisis.

Considerando una cinética de orden cero para la hidrólisis enzimática de proteínas del lactosuero con subtilisina (González-Tello et al. 1994a); para n reacciones de hidrólisis sucesivas queda:

$$n \cdot \frac{S_0}{k_h} \cdot x = \int_{t_0}^{t_n} e \cdot dt \quad [5.5]$$

siendo t_n el tiempo correspondiente a las n hidrólisis realizadas. Dado que x y T son fijadas e iguales para las n hidrólisis, la conversión x (expresada como grado de hidrólisis) y la función $f(x,T)$ son constantes.

Como la ecuación [5.5] muestra, se necesita una expresión matemática de la desactivación enzimática para desarrollar un modelo completo para el reactor discontinuo de membrana.

El tiempo total de operación del reactor, t_T , incluye el tiempo correspondiente a las n hidrólisis (t_n) más el tiempo correspondiente a las $n-1$ filtraciones que se realizan (t_F) para reutilizar la enzima. Si se desprecia el tiempo empleado en la etapa de reutilización, el tiempo total queda:

$$t_T = t_n + (n-1)t_F \quad [5.6]$$

En la operación del sistema se llevan a cabo n usos de enzima, se recupera la enzima después de cada hidrólisis mediante ultrafiltración y posteriormente se vuelve a utilizar en una nueva reacción. Según lo descrito en la sección 4.5.3, el hidrolizado se filtra desde un volumen inicial V_0 hasta obtener un volumen filtrado V_F , quedando la enzima confinada en el volumen de retenido, V_R . Por tanto se define la razón R como el cociente entre el volumen de filtrado y el volumen inicial, de manera que:

$$R = \frac{V_F}{V_0} \quad [5.7]$$

Si se tiene en cuenta que se realizan n hidrólisis y $n-1$ filtraciones, se puede concluir que existen $n-1$ batch de hidrólisis de volumen $R \cdot V_0$, mientras que el último batch no se filtra, siendo su volumen final V_0 . En la Figura 5-1 se muestra el volumen de hidrolizado obtenido para cada batch. En los batch 1, 2... hasta $n-1$, el volumen que se obtiene de hidrolizado es V_F , puesto que se filtra después de cada hidrólisis. Sin

embargo, en la hidrólisis n-ésima el volumen obtenido es V_0 , puesto que se desactiva la enzima sin necesidad de ultrafiltrar.

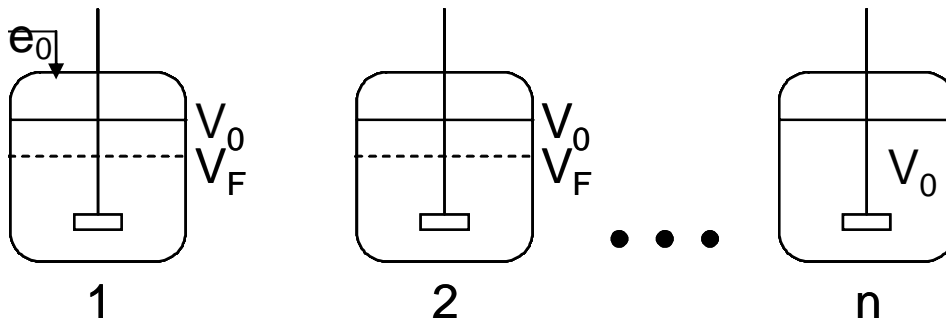


Figura 5-1. Esquema del modo de operación del reactor discontinuo de membrana

Teniendo en cuenta que se obtienen n-1 hidrólisis de volumen V_F y una de volumen V_0 , siendo $V_F = R \cdot V_0$, la productividad del reactor se expresa como la cantidad de hidrolizado obtenida en un tiempo de operación t_T , esto es:

$$P = \frac{(n-1)R + 1}{t_T} \quad [5.8]$$

Por todo ello, pueden plantearse dos objetivos en la operación del reactor discontinuo de membrana: por una parte conseguir un aprovechamiento intensivo de la enzima y por otra, conseguir la máxima producción posible. Así pues, la optimización del reactor discontinuo de membrana se plantea como un problema de optimización multivariante (esto es, con diferentes funciones objetivo). La resolución de este tipo de problemas (referencias) conlleva la optimización de una de las variables quedando fijada la alternativa. Es decir, debe elegirse una de las variables como función objetivo y optimizar la restante. En la Tabla 5-1 se muestran las dos posibles formulaciones del problema de optimización.

Tabla 5-1. Optimización multivariante de la operación del reactor discontinuo de membrana

<i>Optimización 1</i>	<i>Optimización 2</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dada una productividad P para el sistema ▪ Determinar el número de utilizaciones de enzima, n ▪ Para minimizar el consumo de enzima expresado como gramos de enzima por hora de operación y volumen de hidrolizado producido 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dada una concentración inicial de enzima e_0 ▪ Determinar el número de utilizaciones de enzima, n ▪ Para maximizar la productividad P del reactor

Dado que la principal desventaja de los reactores tipo tanque agitado es el elevado coste asociado a la enzima, se ha escogido el consumo de enzima como función objetivo en la operación del reactor discontinuo de membrana. La función objetivo a optimizar, consumo de enzima, se define como la razón e_0 , cantidad inicial de enzima entre el tiempo total de operación.

$$E_T = \frac{e_0}{t_T} \quad [5.9]$$

Esta optimización se realizará para funcionamiento a temperatura constante (igual temperatura de hidrólisis en todos los usos de la enzima) y a temperatura variable (posibilidad de emplear temperaturas diferentes en cada uso). A continuación se desarrolla la función objetivo propuesta para diferentes órdenes de desactivación enzimática.

5.1 Modelo sin desactivación enzimática

En el caso ideal de que no existiese desactivación enzimática:

$$-\frac{de}{dt} = 0 \quad [5.10]$$

separando variables e integrando se obtiene que la concentración de enzima activa permanece constante, $e = e_0$. Por tanto:

$$n \cdot \frac{S_0}{k_h} \cdot x = \int_0^{t_n} e \cdot dt = e_0 \cdot t_n \quad [5.11]$$

5.2 Modelo para desactivación enzimática de orden 0

La desactivación térmica de orden cero puede expresarse:

$$-\frac{de}{dt} = k_d \quad [5.12]$$

En este caso, la concentración de enzima activa vendría dada por:

$$e = e_0 - k_d \cdot t_n \quad [5.13]$$

resultando:

$$n \cdot \frac{S_0}{k_h} \cdot x = \int_0^{t_n} e \cdot dt = e_0 \cdot t_n - \frac{k_d \cdot t_n^2}{2} \quad [5.14]$$

La correlación mediante regresión no lineal de las variables n / t_n^2 frente a e_0 / t_n permite calcular las constantes cinéticas correspondientes a este modelo.

5.3 Modelo para desactivación enzimática de orden 1

La concentración de enzima activa se expresa como:

$$-\frac{de}{dt} = k_d \cdot e \quad [5.15]$$

separando variables e integrando:

$$e = e_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t_n) \quad [5.16]$$

Para n batch, la desactivación es:

$$n \cdot \frac{S_0}{k_h} \cdot x = \int_0^{t_n} e \cdot dt = \frac{e_0}{k_d} \cdot [1 - \exp(-k_d \cdot t_n)] \quad [5.17]$$

La correlación mediante regresión no lineal de las variables n / e_0 frente a t_n permite calcular las constantes cinéticas correspondientes a dicho modelo.

5.4 Modelo para desactivación enzimática de orden 2

Si la desactivación enzimática es de segundo orden, la concentración de enzima activa variaría según:

$$-\frac{de}{dt} = k_d e^2 \quad [5.18]$$

separando variables e integrando:

$$e = \frac{1}{\frac{1}{e_0} + k_d t_n} \quad [5.19]$$

Para n lotes, la desactivación es:

$$n \cdot \frac{S_0}{k_n} \cdot x = \int_0^{t_n} e \cdot dt = \frac{1}{k_d} \cdot \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t_n) \quad [5.20]$$

En este caso, el ajuste de n frente a e_0 / t_n permite calcular los parámetros característicos del modelo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Correlación entre grado de hidrólisis y potencial antigénico

El grado de hidrólisis de operación en el reactor debe fijarse con el objetivo de obtener una reducción del potencial antigénico determinada. Para ello es necesario correlacionar ambas magnitudes para los hidrolizados de proteínas del lactosuero. En la Figura 6-1 se muestran las curvas de inhibición para la proteína nativa y sus hidrolizados con diferentes grados de hidrólisis (entre 2.5 y 17.5 %). En una curva de inhibición se representa el porcentaje de inhibición alcanzado (eje de ordenadas) respecto a la concentración ensayada de WPC o hidrolizado (eje de abscisas). Cada serie de la Figura 6-1 corresponde a hidrolizados de diferentes grado de hidrólisis, para los cuales se han ensayado varias concentraciones en el *test* ELISA. En dicha figura se puede observar que el porcentaje de inhibición alcanzado guarda una relación lineal con la concentración de hidrolizado. Por tanto, el porcentaje de inhibición aumenta a medida que la concentración de sustrato crece. Para iguales concentraciones de sustrato, el grado de inhibición aumenta cuanto menor es grado de hidrólisis. Es decir, el mayor porcentaje de inhibición en el ensayo ELISA se registra para la proteína nativa (serie denominada WPC en la Figura 6-1), mientras que cuanto mayor es el grado de hidrólisis más se reduce el porcentaje de inhibición de la proteína.

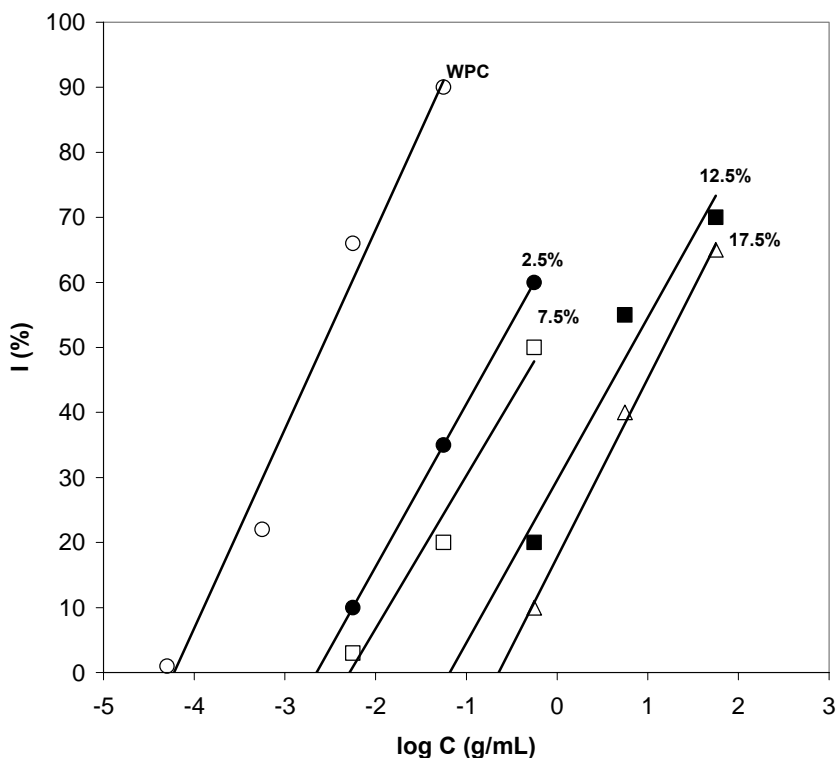


Figura 6-1. Curvas de inhibición ELISA para el WPC (○), e hidrolizados x=0.025 (●), x=0.075 (□), x=0.125 (■) y x=0.175 (Δ).

A partir de los resultados de inhibición frente a concentración se calcula el potencial antigénico de los hidrolizados de proteínas. El potencial antigénico se expresa como factor de reducción de antigenicidad (AR) y se calcula como el logaritmo de la relación entre la concentración de hidrolizado y la de sustrato original que da un valor de inhibición del 50 %. La Figura 6-2 muestra en el eje de ordenadas los valores de AR frente al grado de hidrólisis experimental de cada uno de los hidrolizados ensayados. Estos valores de AR para cada grado de hidrólisis se pueden correlacionar mediante regresión lineal obteniéndose la ecuación siguiente:

$$AR = 11 \cdot DH + 1.325 \quad [6.1]$$

con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9902$.

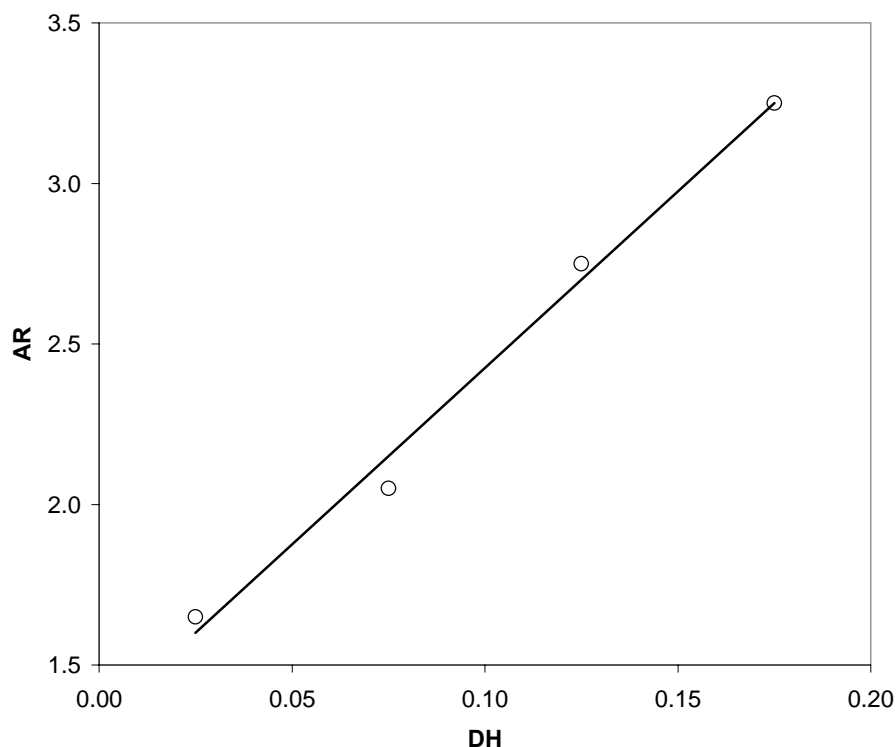


Figura 6-2. Reducción de la antigenicidad con el grado de hidrólisis

Dado que el objetivo es producir un hidrolizado de baja antigenicidad logrando una reducción al menos de 10^3 respecto al WPC nativo, se puede deducir a partir de la correlación dada por la ecuación [6.1] (o por interpolación a partir de la Figura 6-2) que es necesario alcanzar un grado de hidrólisis de 0.15.

6.2 Selección del tamaño de corte y caracterización de la membrana

6.2.1 Selección del tamaño de corte de la membrana

La selección del tamaño de corte de la membrana se efectúa teniendo en cuenta el tamaño de los péptidos liberados durante la hidrólisis y el de la enzima empleada. El tamaño de corte debe ser tal que los péptidos atraviesen la membrana y que simultáneamente la enzima quede retenida. Así pues, se caracteriza el hidrolizado obtenido mediante su distribución de pesos moleculares, empleando separación por cromatografía líquida y detección UV-visible a 280 nm. Se efectúa un calibrado previo para el cálculo de la distribución de pesos moleculares. En la Figura 6-3 se representa el peso molecular en función del tiempo de retención de las proteínas y péptidos patrones. En dicha figura se observa una dependencia lineal entre tiempo de retención y el logaritmo del peso molecular, distinguiéndose dos zonas lineales correspondientes

a pesos moleculares mayores y menores de 7000 Da, límite que coincide con el valor por debajo del cual se encuentran péptidos solubles en ácido tricloroacético 0.8 M (Guadix, 2001).

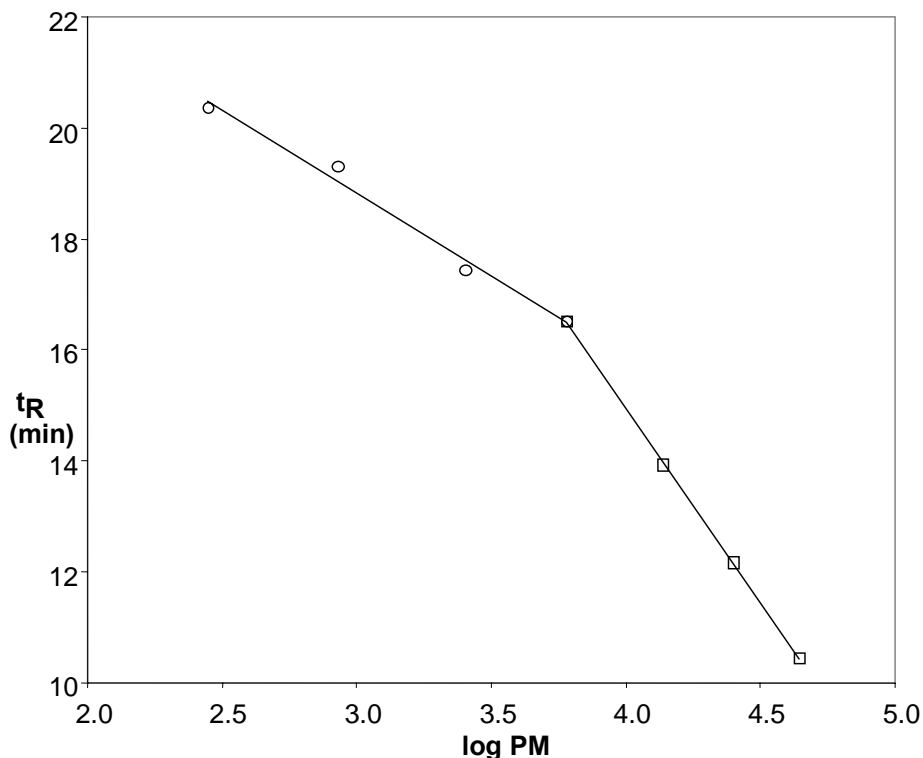


Figura 6-3. Correlación entre peso molecular de diferentes péptidos patrón y tiempo de retención cromatográfico.

Las rectas de calibrado obtenidas mediante regresión lineal para las dos regiones de pesos moleculares son los siguientes:

Para $PM < 7000$,

$$t_R = -2.991 \cdot \log PM + 27.796 \quad [6.2]$$

con $r^2 = 0.9876$.

Para $PM > 7000$,

$$t_R = -6.997 \cdot \log PM + 42.929 \quad [6.3]$$

con $r^2 = 0.9998$.

La distribución de pesos moleculares obtenida para la proteína nativa y para la proteína hidrolizada en las condiciones experimentales con grado de hidrólisis de 0.15 se muestra en la Figura 6-4. El cromatograma del WPC nativo (Figura 6-4a) presenta dos picos principales con tiempos de retención de 12.73 min y 14.52 min, correspondientes a las proteínas mayoritarias del lactosuero, β -lactoglobulina y α -lactalbumina respectivamente. El cromatograma del hidrolizado (Figura 6-4b) pone de manifiesto que la cantidad de péptidos con peso molecular mayor de 8000 Da (es decir, tiempo de retención menor de 15.62 min) es despreciable si se compara a las fracciones de péptidos con pesos moleculares pequeños. La mayor parte de péptidos corresponden a los picos equivalentes a tiempos de retención de 18.44 min y 20.49 min, es decir, se localizan en un rango de pesos moleculares entre 1500 Da y 3000 Da. También existe una fracción menos abundante compuesta de di- y tripéptidos fundamentalmente ($t_R=21.73$ min). Por otra parte, también se puede apreciar en el cromatograma del hidrolizado (Figura 6-4b) una pequeña fracción de proteína nativa. En la hidrólisis de proteínas del lactosuero con diferentes proteasas, esta fracción se ha identificado como seroalbúmina bovina, con una abundancia relativa entre 2-3%, resistente a la hidrólisis enzimática en las condiciones experimentales empleadas (González-Tello *et al.*, 1994b).

La longitud media de las cadenas peptídicas puede estimarse según la ecuación [4.6], $PCL = 1/0.15 = 6.66$. Es decir, el hidrolizado resultante se compone mayoritariamente de péptidos de 6-7 aminoácidos. Sin embargo, el parámetro PCL es el valor medio representativo de una distribución muy amplia de péptidos, que incluye pequeños di y tripéptidos hasta restos de proteína no hidrolizados. Si se considera un peso molecular medio de los péptidos en el hidrolizado de WPC de 118 g / mol (Guadix, 2001), el peso molecular medio de los péptidos mayoritarios liberados durante la hidrólisis es de 800 Da aproximadamente. Este cálculo teórico coincide con la caracterización mediante cromatografía líquida UV mostrada en la Figura 6-4.

Así pues, teniendo en cuenta la distribución de pesos moleculares del hidrolizado, una membrana con tamaño nominal de corte 8000 Da permitirá el paso a su través de prácticamente el 100% de los péptidos obtenidos, y será por tanto, la membrana adecuada del módulo de filtración del reactor discontinuo de membrana.

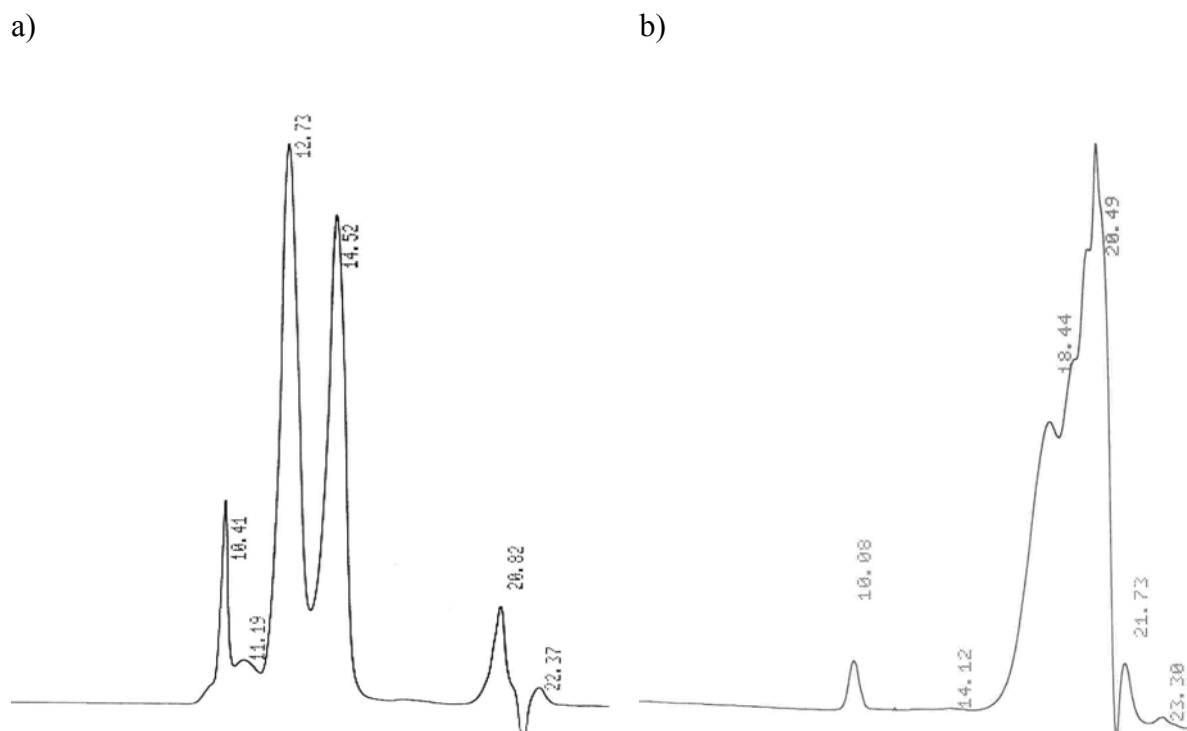


Figura 6-4. a) Cromatograma de WPC nativo y b) cromatograma de un hidrolizado con grado de hidrólisis 0.15

Por otro lado, la membrana seleccionada para el reactor debe retener completamente la enzima. En esta investigación la enzima empleada, Protex 6L, tiene un peso molecular aproximado de 22500 Da, por lo que una membrana de 8000 Da debe retenerla por completo. Para comprobar que la enzima no pasa a través de la membrana de 8000 Da se realiza un ensayo de actividad, por el método de la caída de pH (Deeslie y Cheryan, 1982), del permeado obtenido al filtrar un hidrolizado de grado de hidrólisis 0.15. En este ensayo, el permeado obtenido se añade a una solución de proteína nativa y se mide la caída de pH provocada en la solución de sustrato por el filtrado adicionado. En nuestro caso, la caída de pH registrada al cabo de 2 horas de reacción es menor a 0.2 unidades de pH, por lo que se puede concluir que la actividad que presenta el filtrado es meramente residual y no existe paso de la enzima Protex 6L a través de la membrana de 8000 Da.

6.2.2 Caracterización del módulo de membrana

La caracterización del módulo de membrana de poliétersulfona de tamaño de corte 8000 Da comprende: i) la determinación de la relación caudal de agua frente a presión transmembrana. Esta relación permite determinar la permeabilidad de referencia de la

membrana para poder evaluar la efectividad de los ciclos de limpieza. Para ello se calcula el porcentaje de recuperación del caudal de filtrado tras la limpieza para una presión determinada; ii) la determinación de la relación caudal de filtrado de un hidrolizado frente a la presión transmembrana, que permite determinar la presión de operación óptima; iii) la evolución temporal del caudal de filtrado.

- Determinación del caudal de filtrado de agua frente a presión transmembrana aplicada.

En la Figura 6-5 se representan los datos experimentales obtenidos para el caudal de filtrado de agua a diferentes valores de presión transmembrana. Las presiones aplicadas varían entre 69-172 kPa y el caudal de filtrado de agua llega hasta 30 mL / min en el mayor valor de presión ensayado.

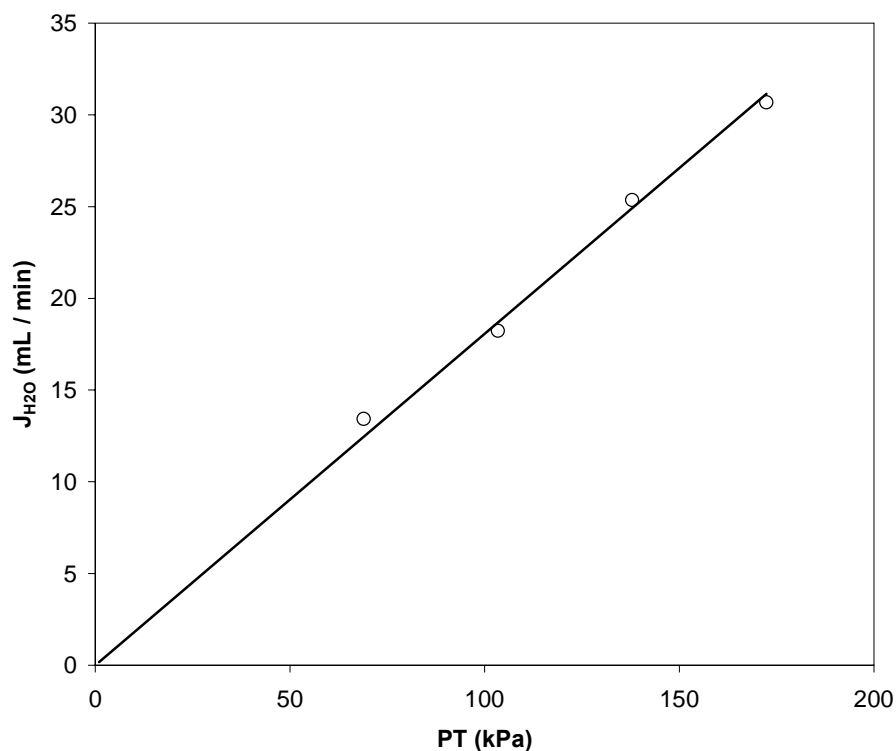


Figura 6-5. Relación entre caudal de filtrado y presión transmembrana para agua a 20°C

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

$$J_{H_2O} = 0.1806 \cdot P_T \quad [6.4]$$

con $r^2 = 0.991$.

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

$$J_{H_2O} = \frac{P_T}{R_m} \quad [6.5]$$

donde P_T es la presión transmembrana y R_m es la resistencia intrínseca de la membrana para agua pura, igual a la inversa de la pendiente de la recta [6.4]: $R_m = 5.537 \text{ kPa} \cdot \text{min} / \text{mL}$. La permeabilidad de la membrana se define como la inversa de la resistencia intrínseca de la membrana, esto es, $0.181 \text{ mL} / \text{kPa} \cdot \text{min}$. Tanto resistencia como permeabilidad son valores característicos de la membrana nueva y se emplean como referencia para calcular el porcentaje de recuperación del módulo de membrana después de cada ciclo de filtración/limpieza.

- Determinación del caudal de filtrado de hidrolizado frente a presión transmembrana.

En la Figura 6-6 se representan los datos experimentales de caudal de filtrado del hidrolizado frente a la presión transmembrana. Las presiones aplicadas varían desde 69 kPa hasta 172 kPa, al igual que en el caso de la relación caudal de agua vs. P_T . Sin embargo, la relación caudal de filtrado de hidrolizado vs. P_T presenta diferencias considerables. La relación entre caudal de filtrado y presión no es lineal en todo el rango de presión transmembrana (como ocurría en el caso del agua). Se aprecia la existencia de un primer tramo, a presiones bajas, que se ajusta a una recta que pasa por el origen de coordenadas, y un segundo tramo, generalmente a presiones altas, asintótico. Se ha comprobado que para procesos de microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF) de diferentes disoluciones y suspensiones existe un caudal por debajo del cual la relación caudal vs P_T es lineal, denominado caudal crítico (Wu et al, 1999; Bacchin et al, 2005). Esto quiere decir que se debe operar por debajo de este caudal y, consecuentemente por debajo de una presión transmembrana crítica, para minimizar el ensuciamiento de la membrana y mantener el caudal de filtrado aproximadamente constante. Además, en operaciones de MF y UF se ha encontrado un flujo “plateau” por encima del cual un aumento de P_T no se corresponde con un mayor caudal (véase Figura 6-6). Como más adelante se discute, esta circunstancia puede

explicarse por la combinación del fenómeno de la polarización de concentración y el “fouling” irreversible de la membrana. Este caudal “plateau” máximo se denomina flujo limitante. El caudal limitante y el caudal crítico no deben confundirse, aun cuando en determinadas ocasiones pueden coincidir. Así pues, se ha comprobado paradójicamente que en algunos casos de MF, operando con un caudal mucho menor que el limitante se incrementa tanto el caudal de filtrado como la transmisión de proteína (Wu et al, 1993).

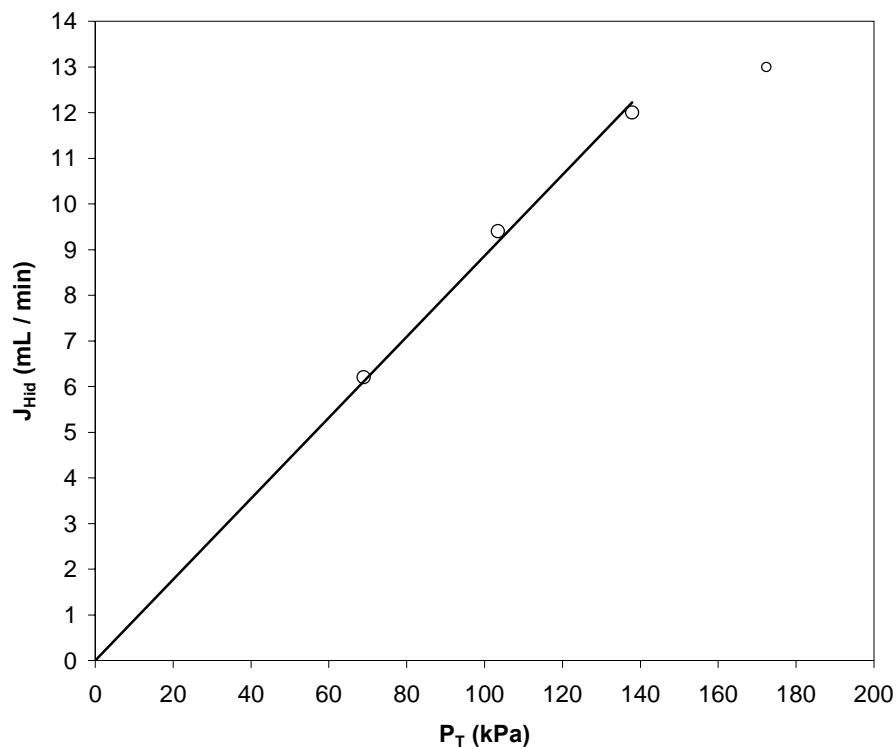


Figura 6-6. Relación entre caudal de filtrado y presión transmembrana para el hidrolizado

En cuanto a la modelización del caudal de filtrado frente a la presión transmembrana, la capa de polarización por concentración en la superficie de la membrana añade otra resistencia, R_G , que se puede considerar proporcional a la presión transmembrana aplicada. Por tanto, la ecuación general queda en la forma dada por la expresión [6.6].

$$J_{Hid} = \frac{P_T}{R_m + R_G} \quad [6.6]$$

Esta ecuación explica la existencia de dos regiones de comportamiento diferenciado frente a la presión. A bajas presiones, bajas concentraciones de alimentación y altas

velocidades de recirculación en la que los efectos de polarización son mínimos, el caudal de filtrado guarda una relación lineal con la P_T (como ocurre para el caso de agua o de hidrolizado a bajas presiones). En el caso de altas presiones, concentraciones muy elevadas o baja velocidad de recirculación los efectos de polarización (y colmatación) son considerables, y la operación está controlada por la transferencia de materia. Es decir, el caudal de filtrado se hace independiente de la presión aplicada, debido a la formación de una capa de polarización y a la colmatación de la superficie activa de la membrana.

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de una recta de mínimos cuadrados para la región de control de la presión viene dado por la ecuación [6.7]:

$$J_{\text{Hid}} = 0.0886 \cdot P_T \quad [6.7]$$

Si se aplica la ecuación [6.6] para el calibrado con hidrolizado (Figura 6-6) se puede calcular la resistencia de la capa de gel. La inversa de la pendiente en la ecuación [6.7] es $R_m + R_G$, teniendo en cuenta el valor calculado para R_m anteriormente (inversa de la pendiente de la ecuación [6.4]), queda: $R_G = 5.750 \text{ kPa} \cdot \text{min/mL}$.

La formación de la capa de gel sobre la superficie de la membrana constituye un ensuciamiento reversible de ésta. Sin embargo, si se trabaja durante mucho tiempo en la región independiente de la presión puede ocurrir la precipitación de macromoléculas, que quedan estacionarias en la capa de gel y dañan irreversiblemente la membrana (colmatación). Para evitar un daño irreversible de la membrana se debe operar en la región controlada por la presión y limpiar adecuadamente la membrana para eliminar las macromoléculas atrapadas en su estructura.

Si tiene lugar colmatación de la membrana debida a interacciones específicas membrana-soluto por deposición sobre la superficie o por taponamiento de los poros, la resistencia de la membrana cambiará. Puesto que este tipo de ensuciamiento es debido generalmente a interacciones fisicoquímicas, no estará afectada por los parámetros de operación. La resistencia asociada a este fenómeno se denomina resistencia de “fouling” y se denota por R_F . Añadiendo un término a la ecuación [6.6] correspondiente a la resistencia por colmatación resulta la ecuación [6.8]

$$J_{Hid} = \frac{P_T}{R_M + R_G + R_F} \quad [6.8]$$

Por último, dado que la operación óptima del módulo de membrana seleccionado debe situarse en la región de control de la presión aplicada y que el flujo crítico de la membrana es de 12 mL/min, se decide trabajar a un caudal de 7.5 mL/min. Dada un área efectiva de filtración de 50 cm², el flujo a través de la membrana es de 90 L/(h·m²). Dicho caudal se obtiene aplicando una presión transmembrana de 85 kPa. Dado que en estas condiciones el caudal de filtrado se mantiene prácticamente constante y se deben obtener 150 mL de filtrado, el tiempo de filtración es aproximadamente 20 minutos.

6.3 Influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en la operación del reactor discontinuo de membrana

Con el objeto de estudiar la influencia de la temperatura y la concentración de enzima en la operación del reactor se plantea un diseño factorial de 2 variables, temperatura con 6 niveles y concentración de enzima con 5 niveles: 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C y 70 °C; y 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 g/L. La concentración de sustrato es de 5 g/L (por tanto, la relación enzima/sustrato es: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05) y el pH de operación el de máxima actividad-estabilidad de la enzima, pH=8.5. La reacción se monitoriza por el método del pH-estado (véase sección 4.2.1).

Los resultados obtenidos se muestran en la curva de hidrólisis para cada reacción. La curva de hidrólisis es la representación gráfica de la evolución del grado de hidrólisis frente al tiempo de reacción para cada uno de los usos de la enzima en el reactor (Figura 6-7 a 6-40). Cada uso de enzima se representa como una curva diferente, es decir, una figura con cinco curvas de hidrólisis equivale a un experimento en el que se ha empleado cinco veces una misma carga inicial de enzima. A medida que aumenta el número de usos de enzima, el tiempo de necesario para alcanzar el grado de hidrólisis marcado aumenta progresivamente.

En las Figura 6-7-Figura 6-11 se muestran las curvas de hidrólisis para los experimentos a 45 °C. Entre las Figura 6-12-Figura 6-16, los experimentos a 50 °C. Las Figura 6-17 a Figura 6-21 corresponden a 55 °C. Las Figura 6-22 a Figura 6-26 se

refieren a la operación a 60 °C. La operación a 65 °C y 70°C se muestra en las Figura 6-27-Figura 6-31 y Figura 6-32-Figura 6-36; respectivamente.

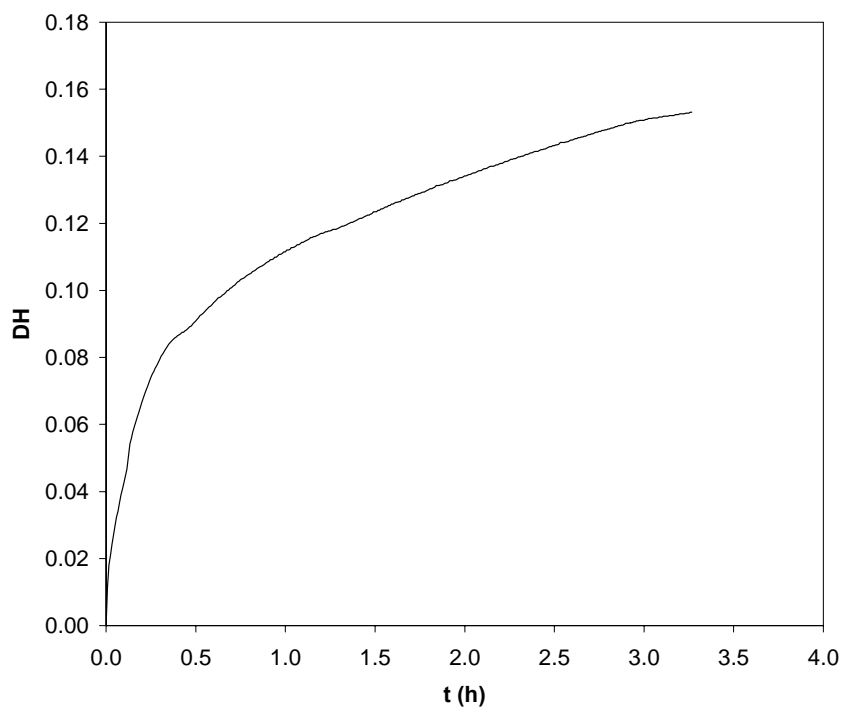


Figura 6-7. Curva de hidrólisis. T=45 °C. e₀=0.05 g/L (n=1)

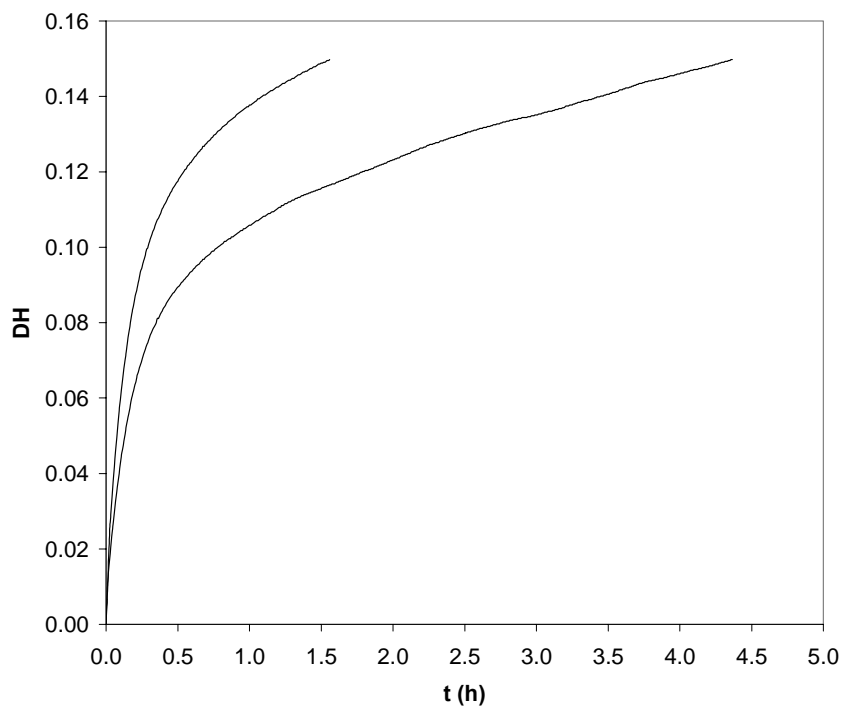


Figura 6-8. Curva de hidrólisis. T=45°C. e₀=0.10 g/L (n=2)

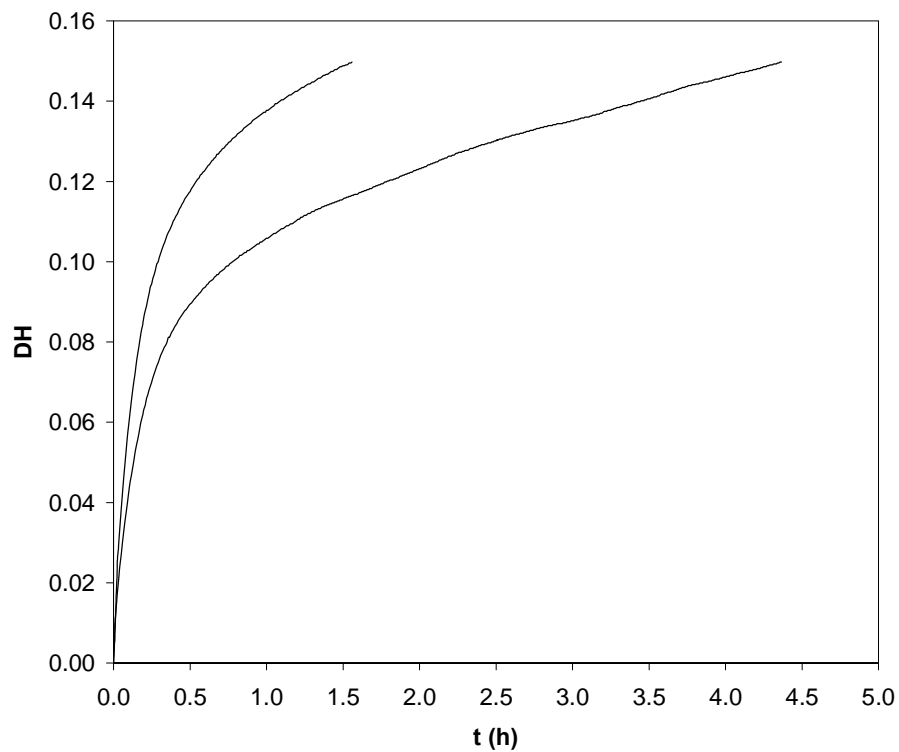


Figura 6-9. Curva de hidrólisis. $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$. $e_0=0.15\text{ g/L}$ ($n=2$)

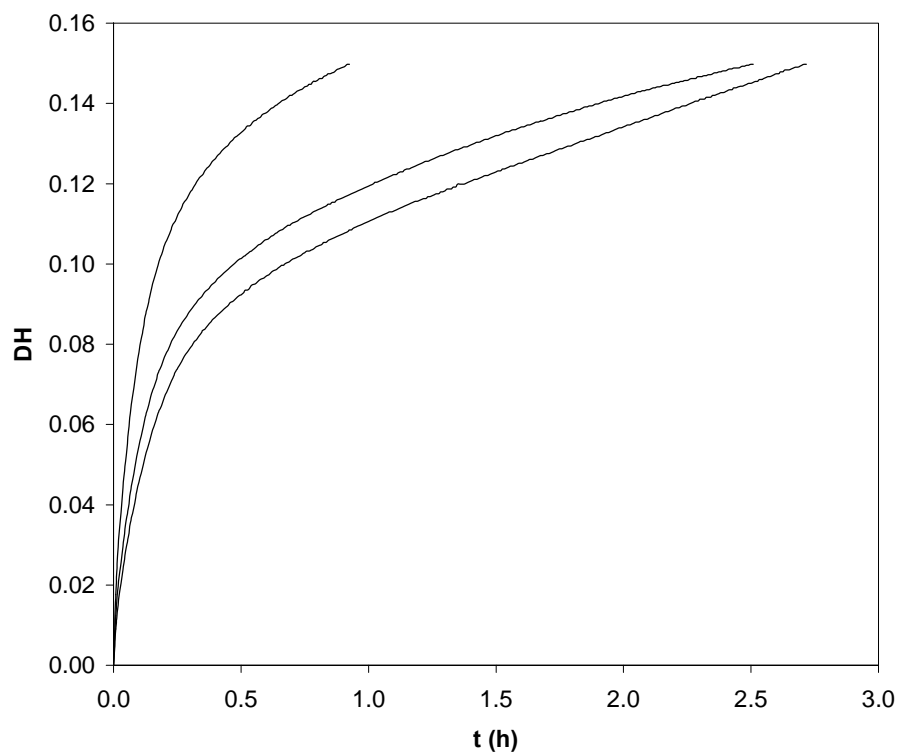


Figura 6-10. Curva de hidrólisis. $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$. $e_0=0.20\text{ g/L}$ ($n=3$)

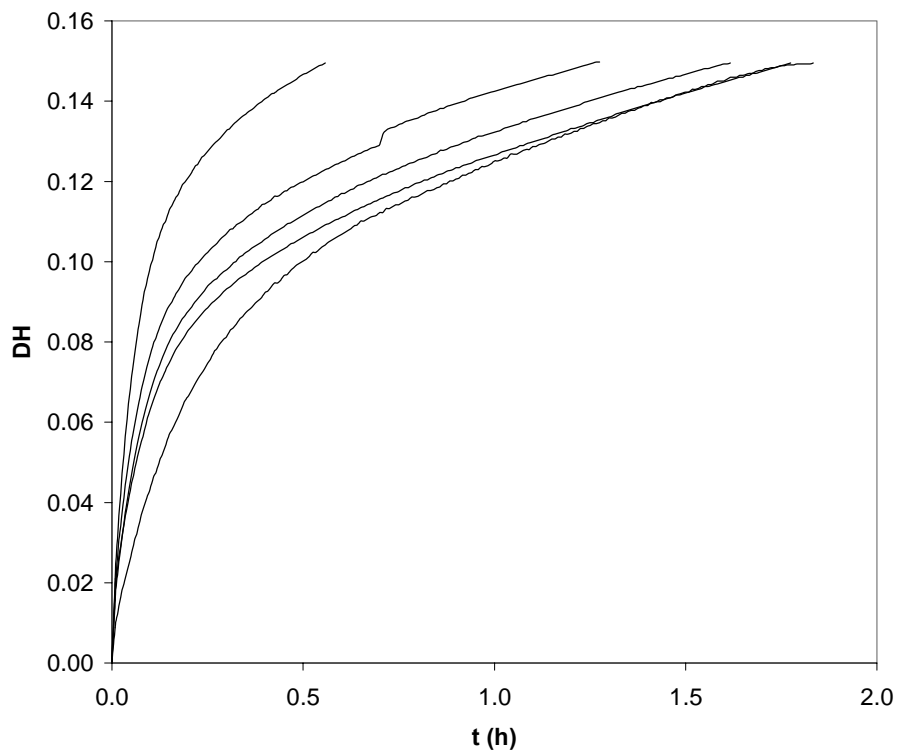


Figura 6-11. Curva de hidrólisis. T=45 °C. $e_0=0.25$ g/L (n=5)

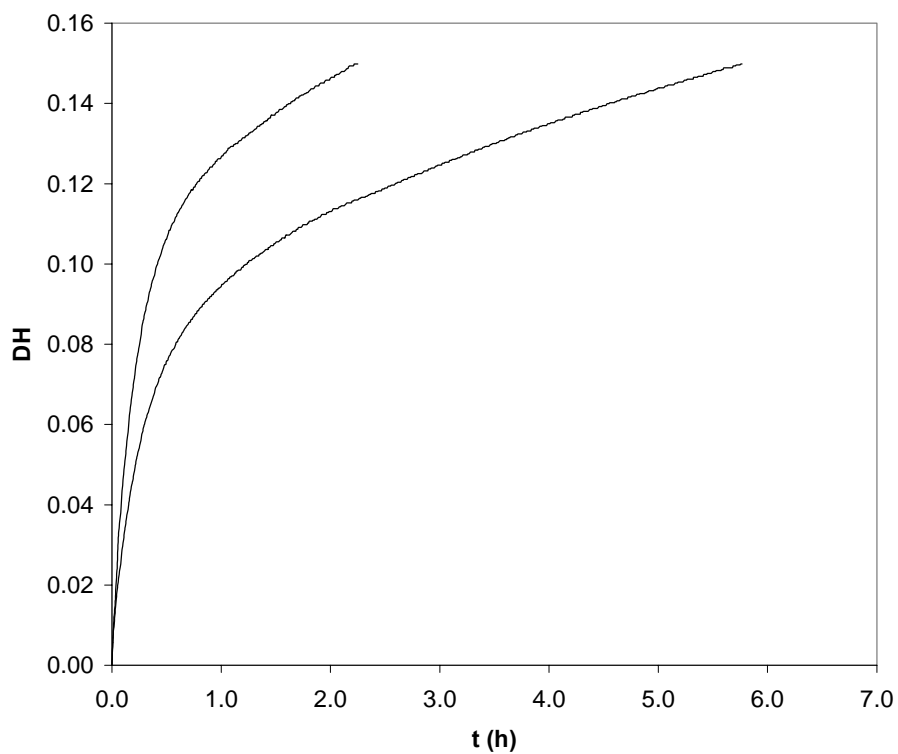


Figura 6-12. Curva de hidrólisis. T=50 °C. $e_0=0.05$ g/L (n=2)

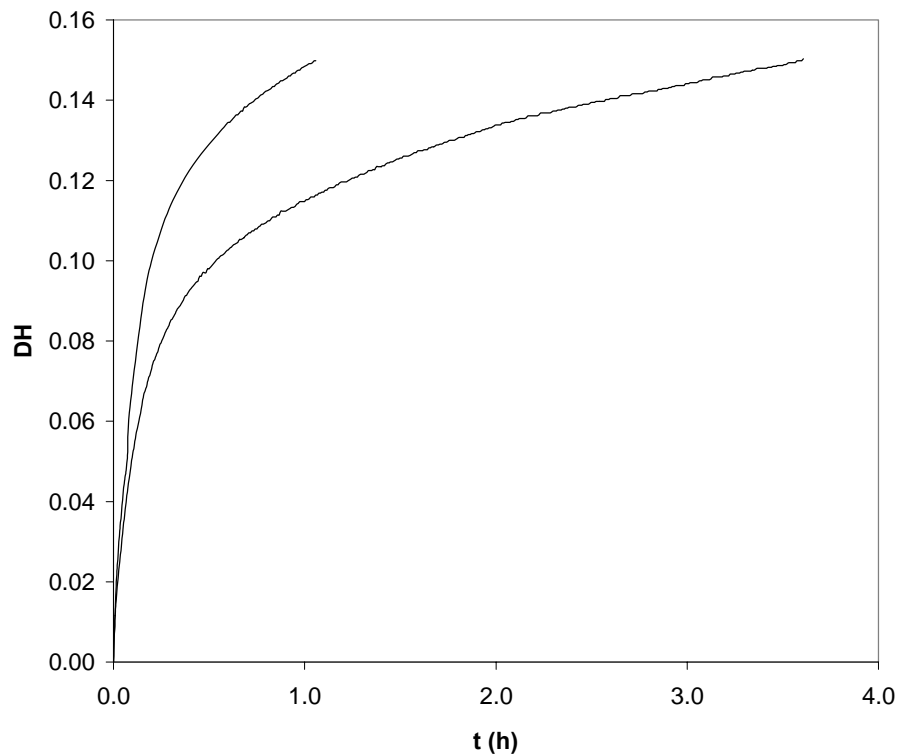


Figura 6-13. Curva de hidrólisis. T=50 °C. $e_0=0.10$ g/L (n=2)

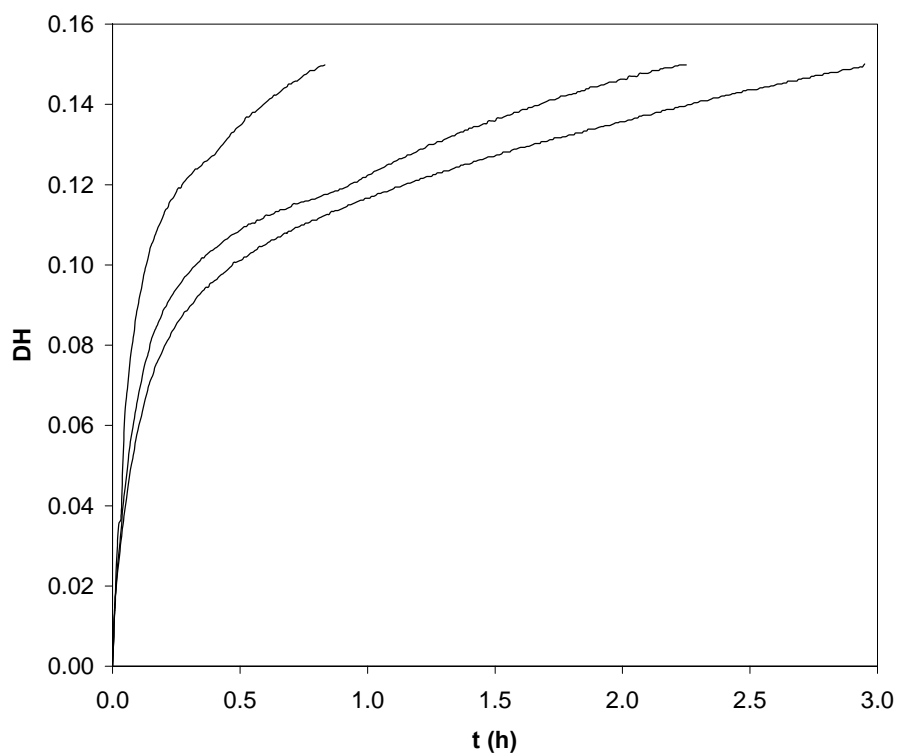


Figura 6-14. Curva de hidrólisis. T=50 °C. $e_0=0.15$ g/L (n=3)

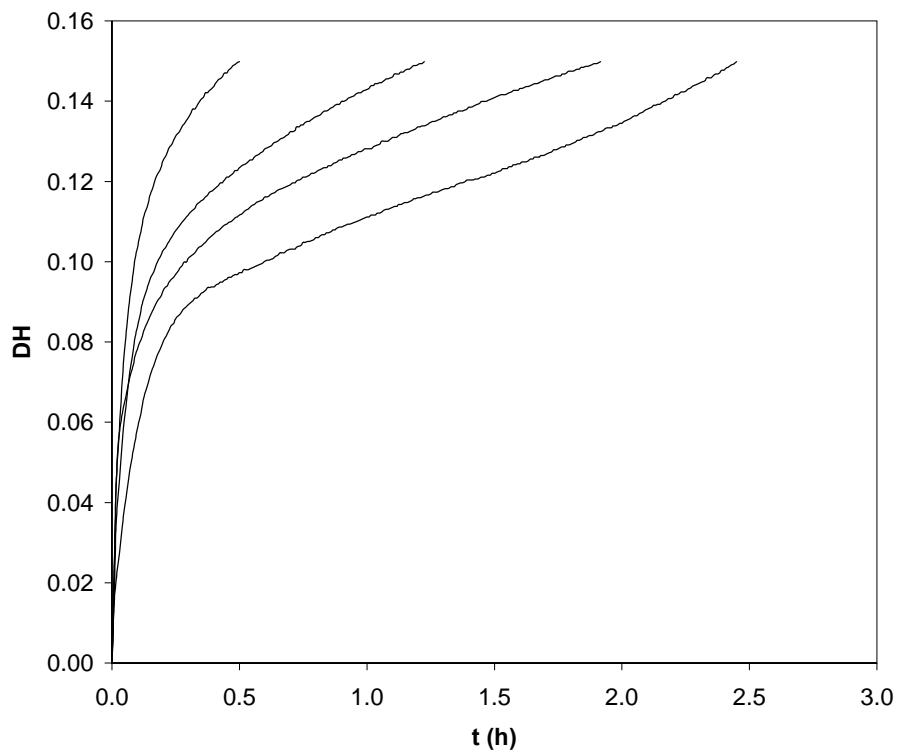


Figura 6-15. Curva de hidrólisis. T=50 °C. $e_0=0.20$ g/L (n=4)

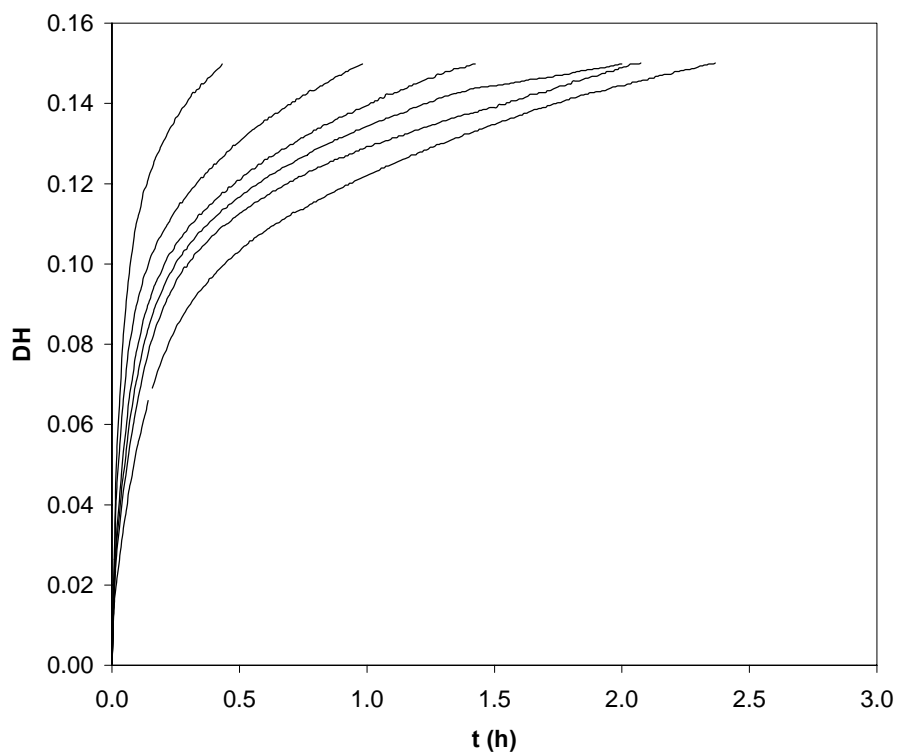


Figura 6-16. Curva de hidrólisis. T=50 °C. $e_0=0.25$ g/L (n=6)

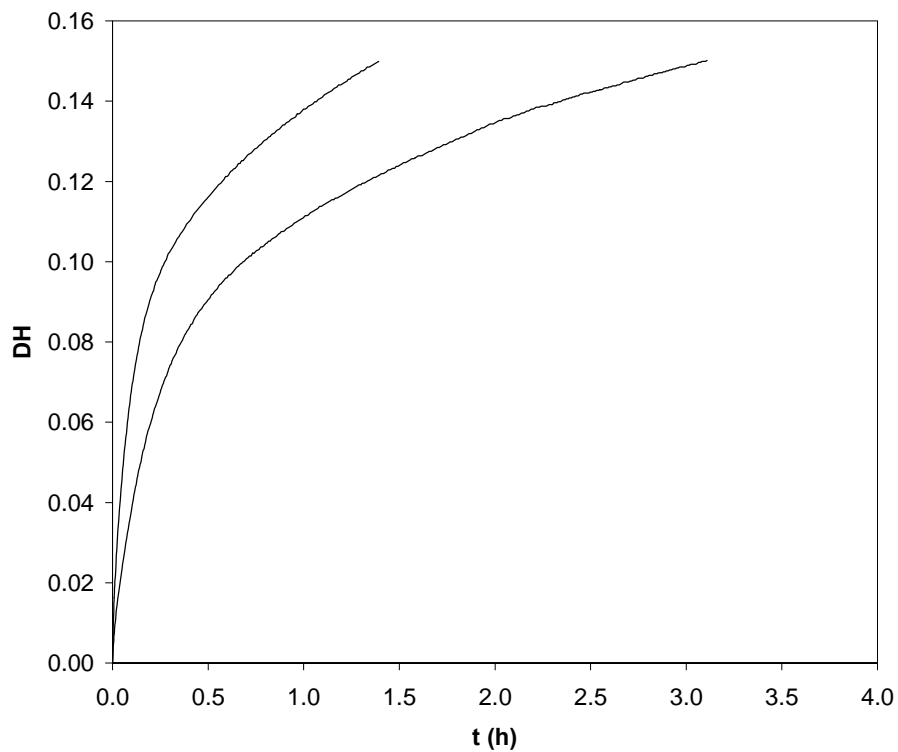


Figura 6-17. Curva de hidrólisis. T=55 °C. $e_0=0.05$ g/L (n=2)

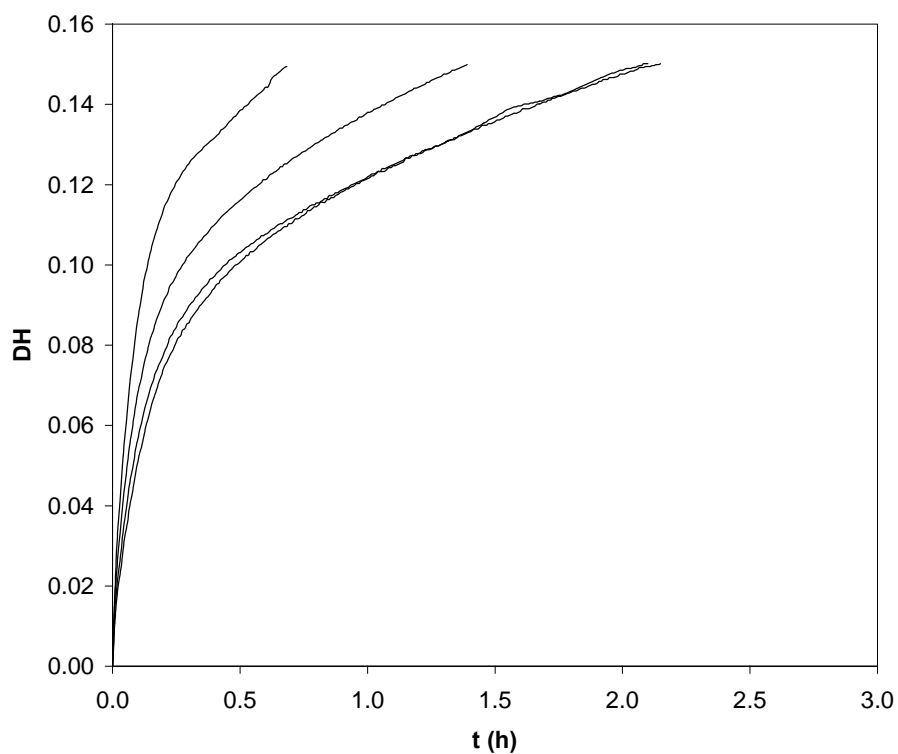


Figura 6-18. Curva de hidrólisis. T=55 °C. $e_0=0.10$ g/L (n=4)

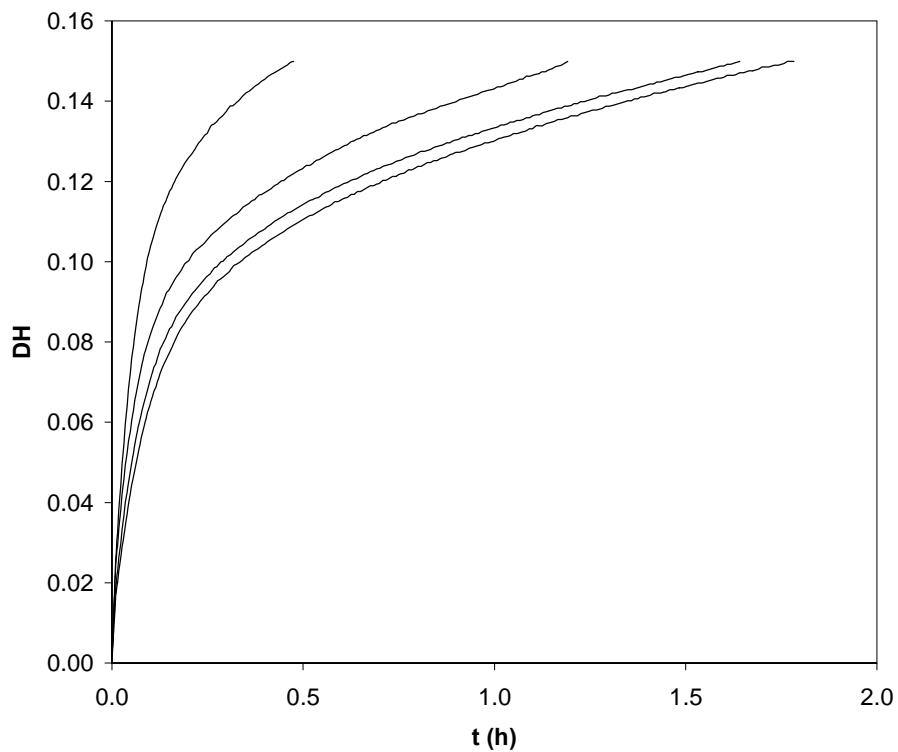


Figura 6-19. Curva de hidrólisis. T=55 °C. $e_0=0.15$ g/L (n=4)

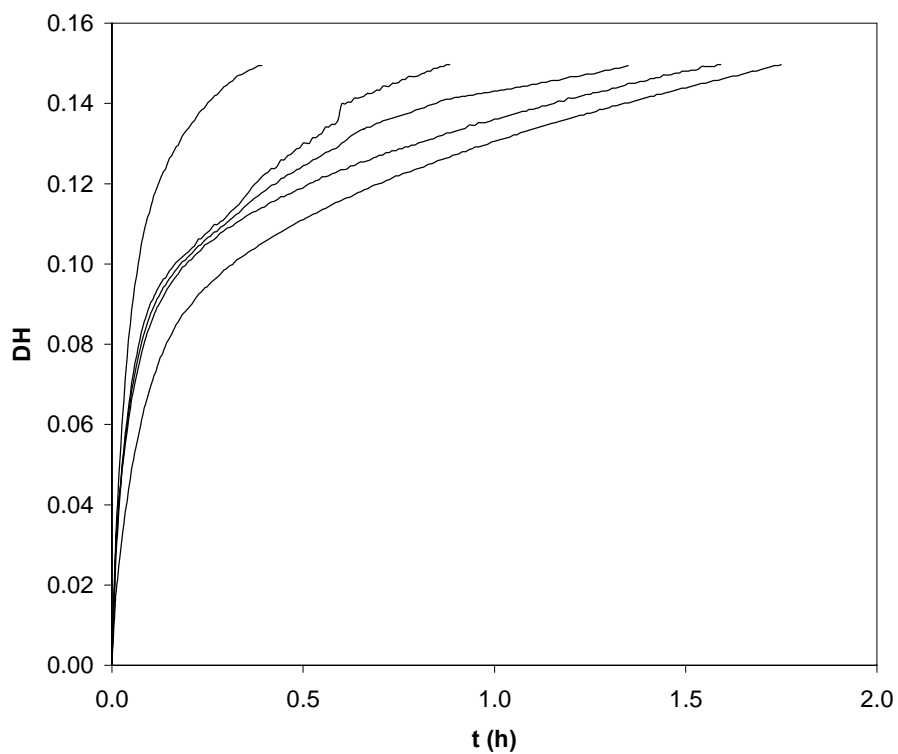


Figura 6-20. Curva de hidrólisis. T=55 °C. $e_0=0.20$ g/L (n=5)

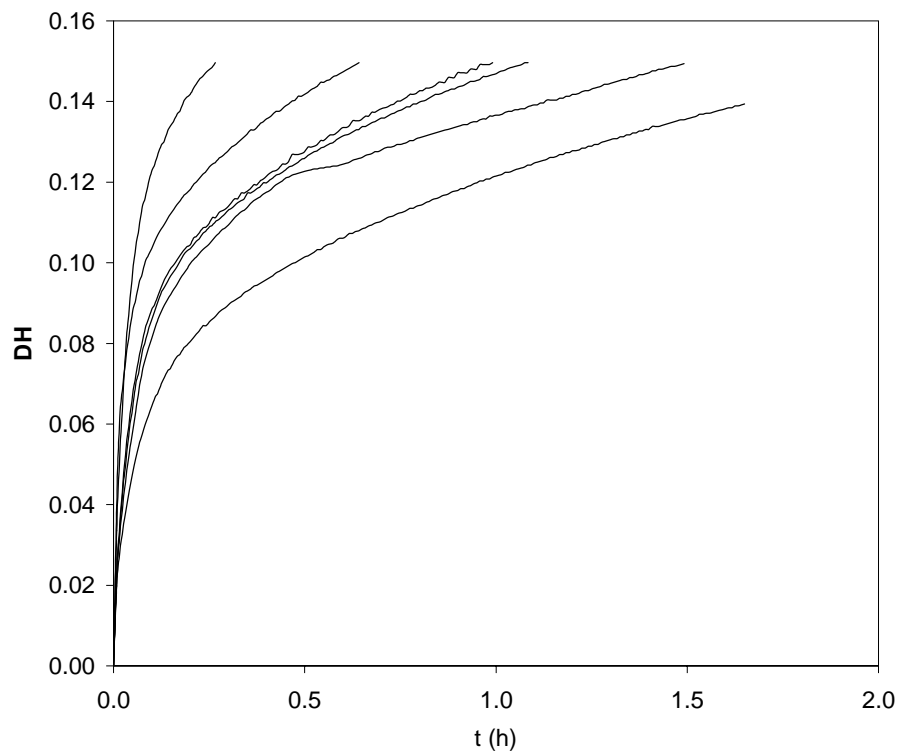


Figura 6-21. Curva de hidrólisis. T=55 °C. $e_0=0.25$ g/L (n=6)

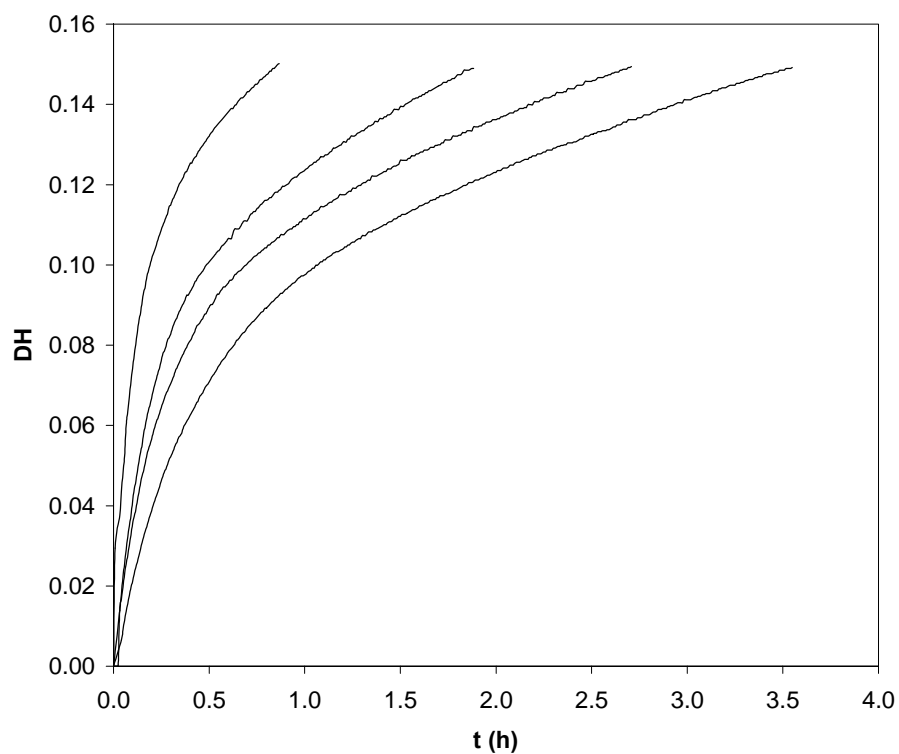


Figura 6-22. Curva de hidrólisis. T=60 °C. $e_0=0.05$ g/L (n=4)

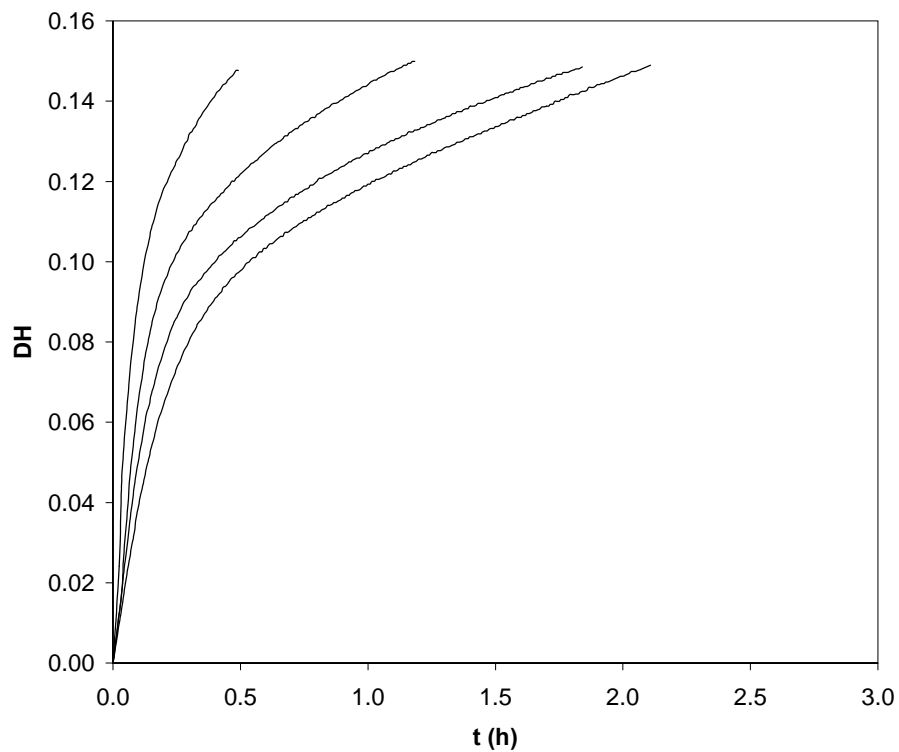


Figura 6-23. Curva de hidrólisis. $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$. $e_0=0.10\text{ g/L}$ ($n=4$)

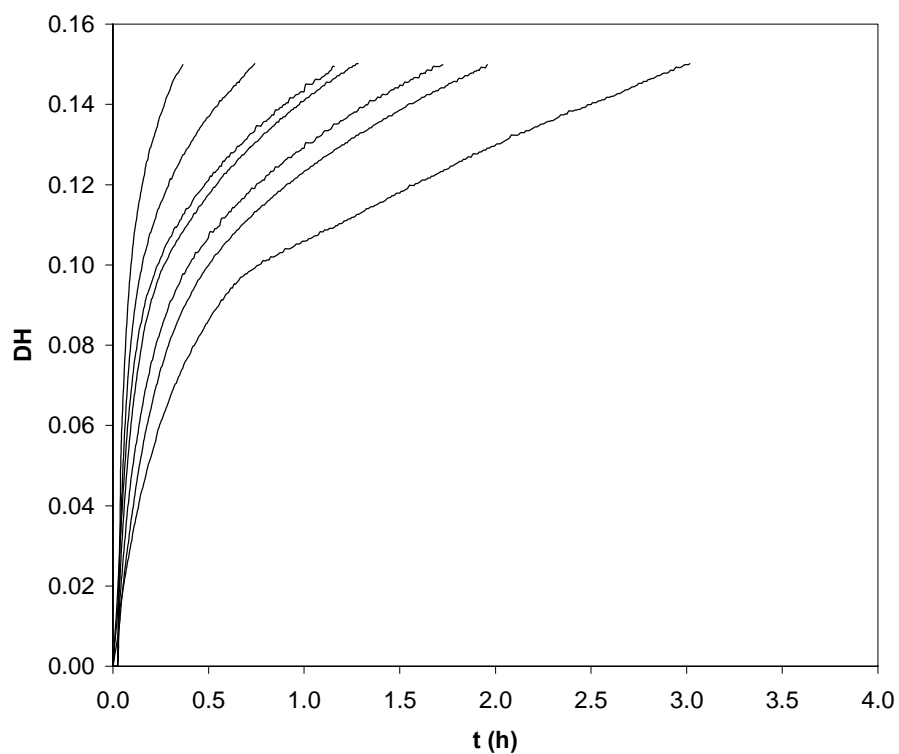


Figura 6-24. Curva de hidrólisis. $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$. $e_0=0.15\text{ g/L}$ ($n=7$)

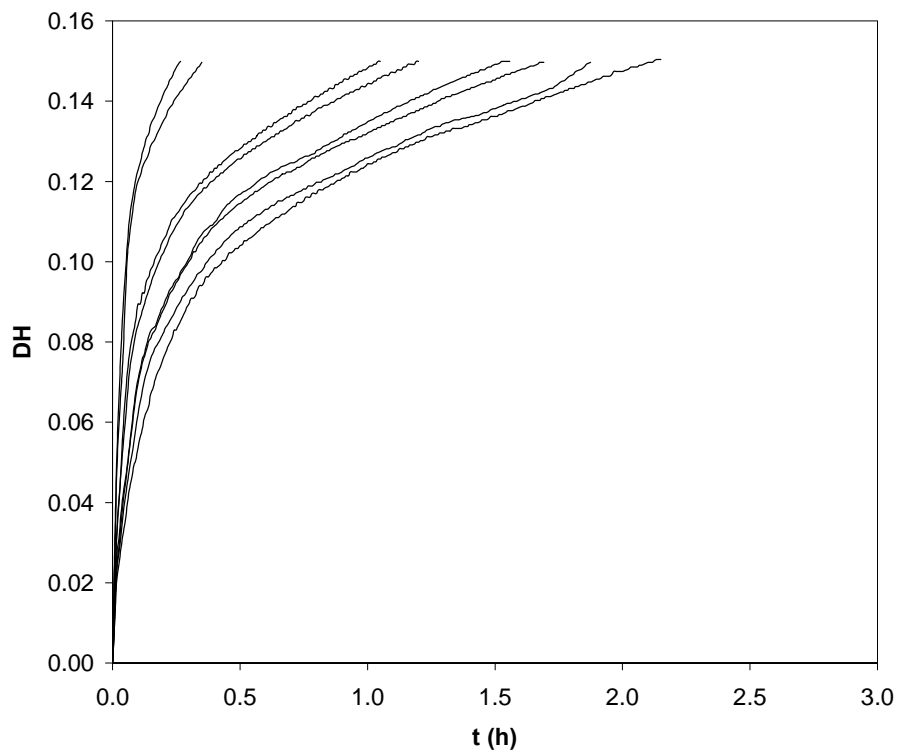


Figura 6-25. Curva de hidrólisis. T=60 °C. $e_0=0.20$ g/L (n=8)

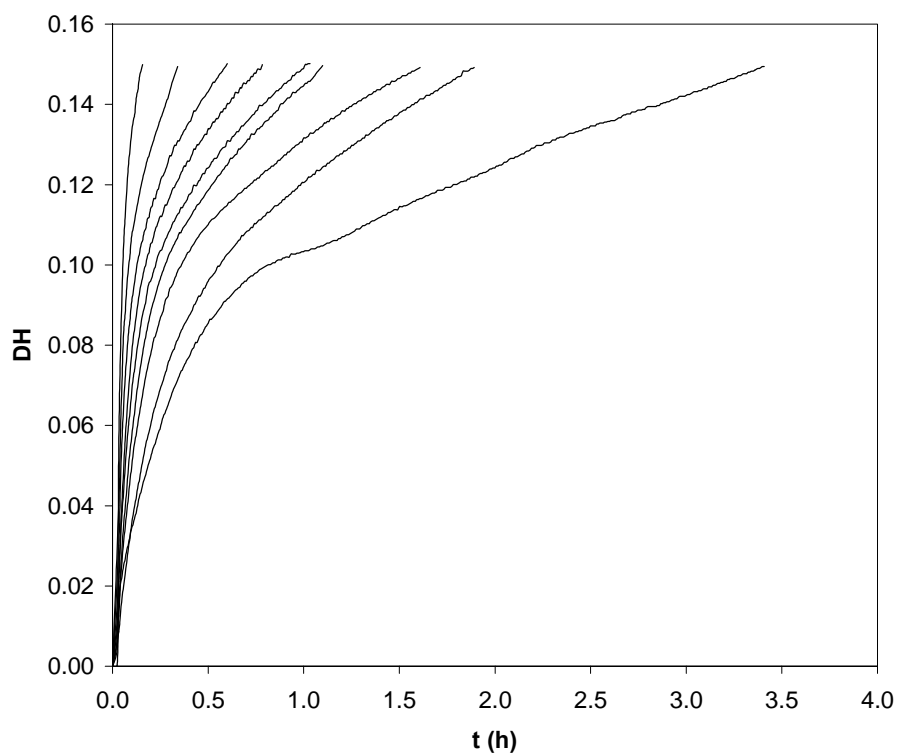


Figura 6-26. Curva de hidrólisis. T=60 °C. $e_0=0.25$ g/L (n=9)

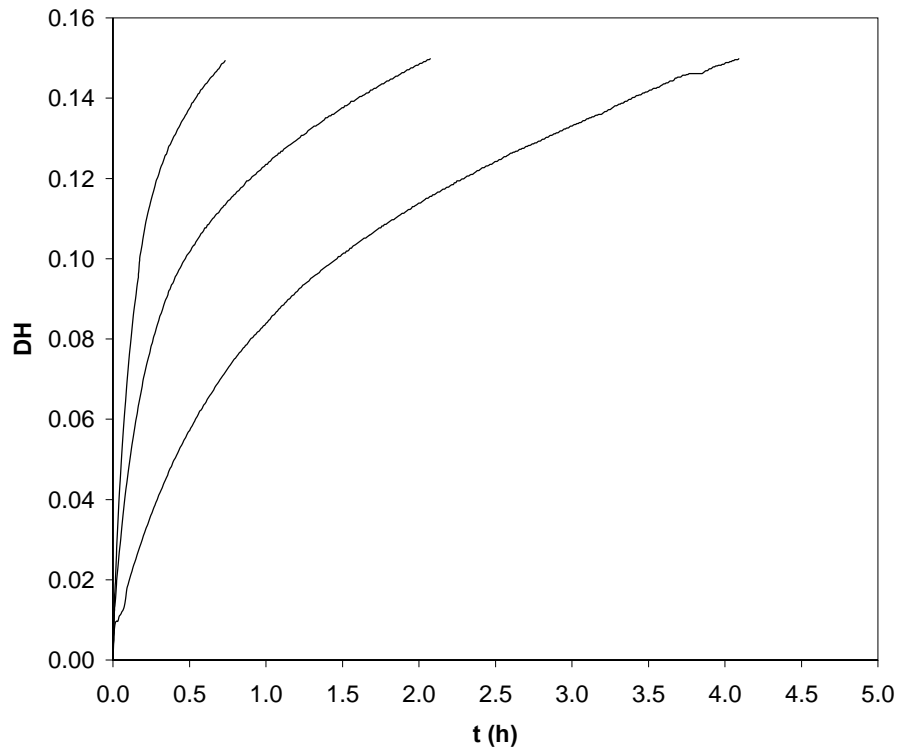


Figura 6-27. Curva de hidrólisis. T=65 °C. $e_0=0.05$ g/L (n=3)

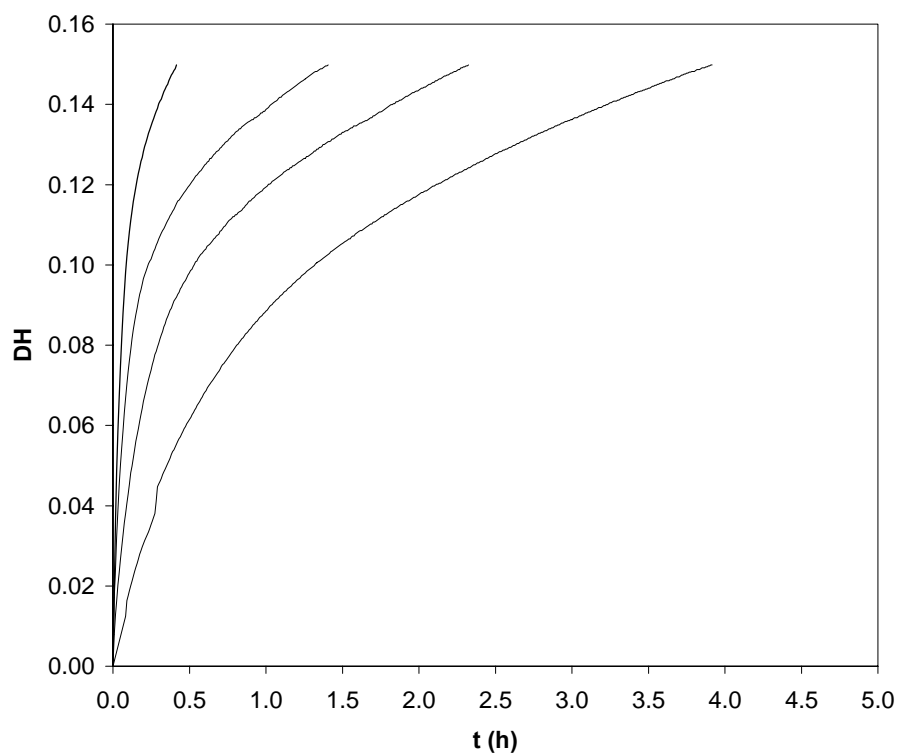


Figura 6-28. Curva de hidrólisis. T=65 °C. $e_0=0.10$ g/L (n=4)

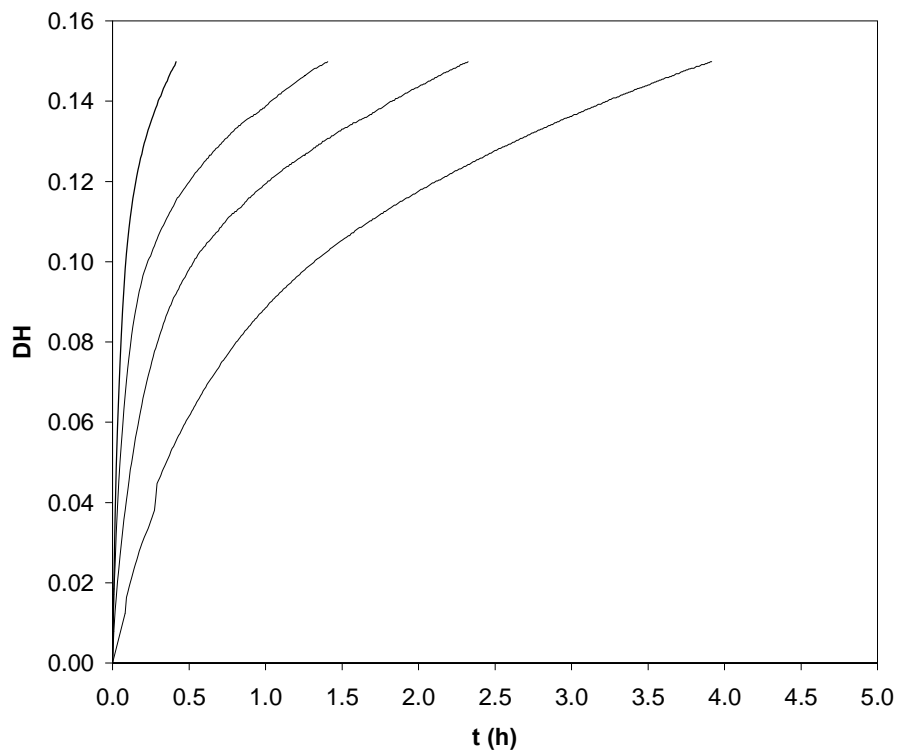


Figura 6-29. Curva de hidrólisis. $T=65\text{ °C}$. $e_0=0.15\text{ g/L}$ ($n=4$)

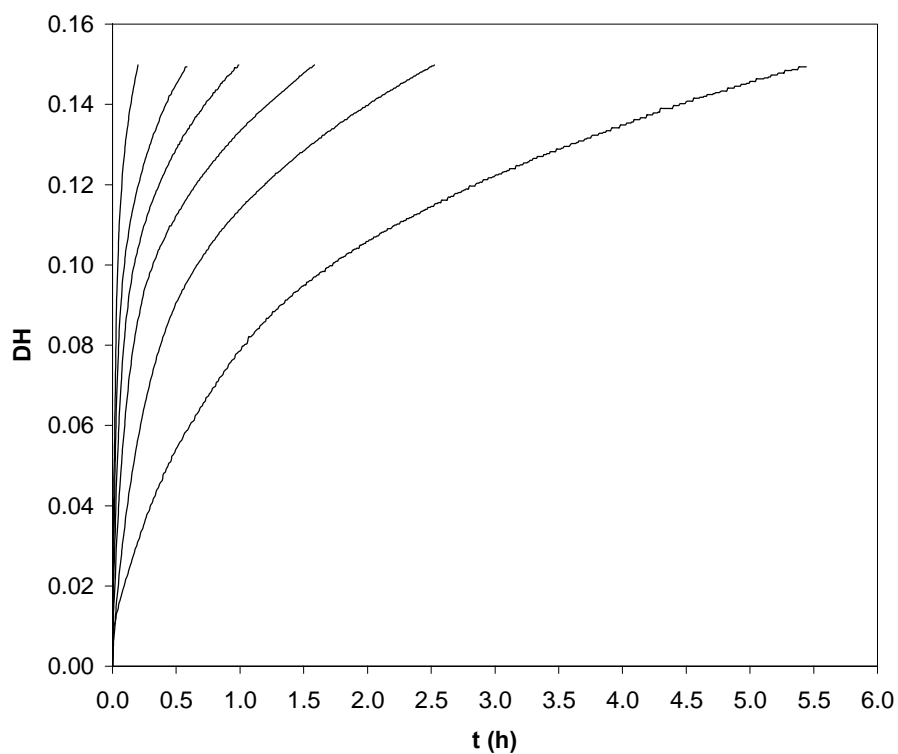


Figura 6-30. Curva de hidrólisis. $T=65\text{ °C}$. $e_0=0.20\text{ g/L}$ ($n=5$)

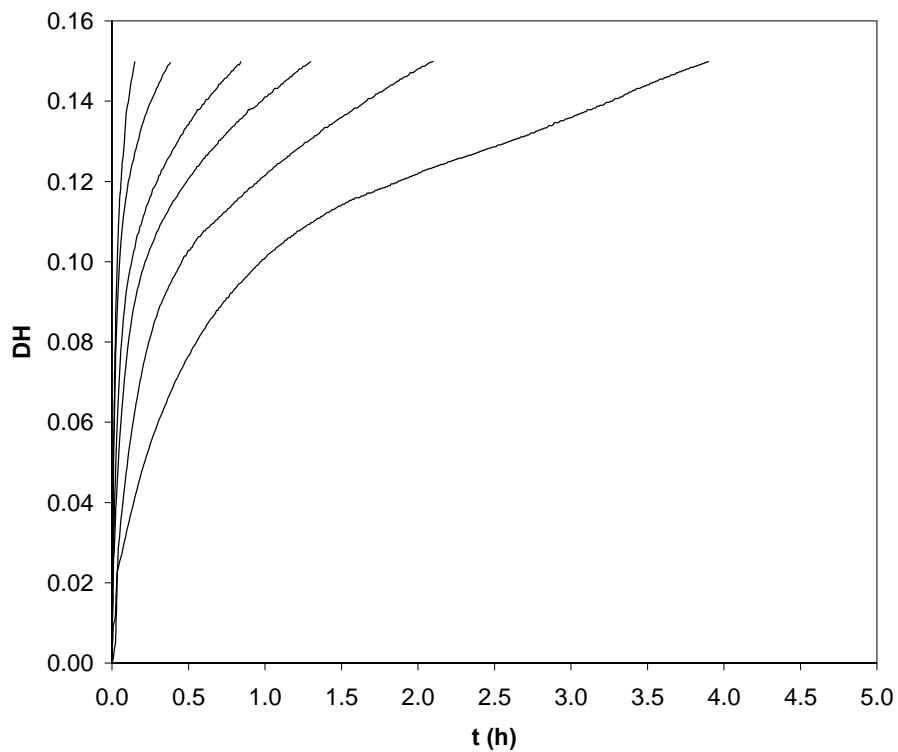


Figura 6-31. Curva de hidrólisis. T=65 °C. $e_0=0.25$ g/L (n=6)

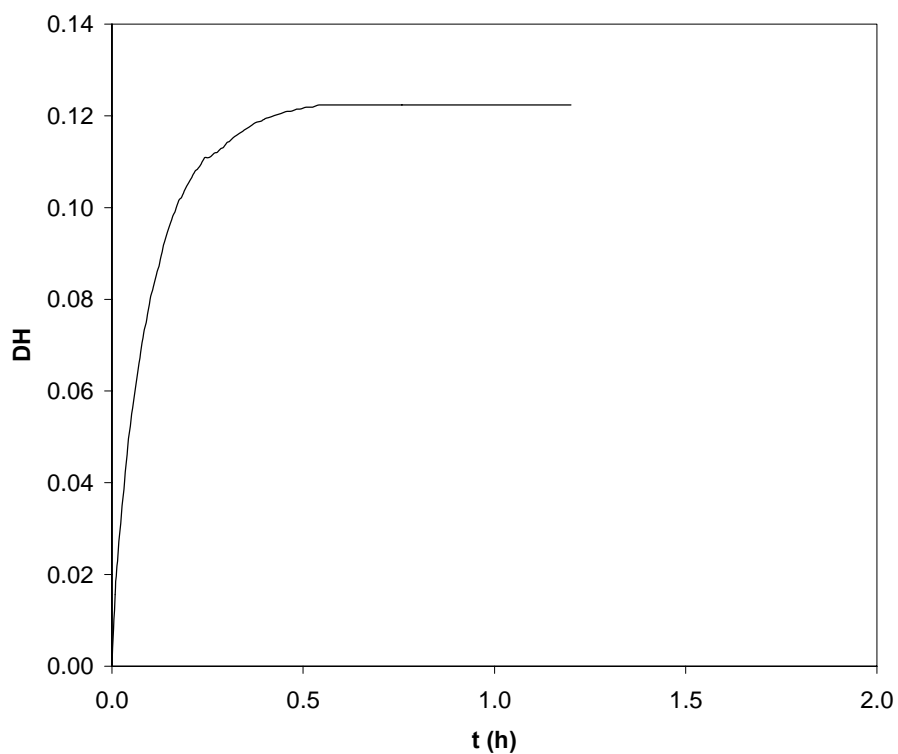


Figura 6-32. Curva de hidrólisis. T=70 °C. $e_0=0.05$ g/L (n=0)

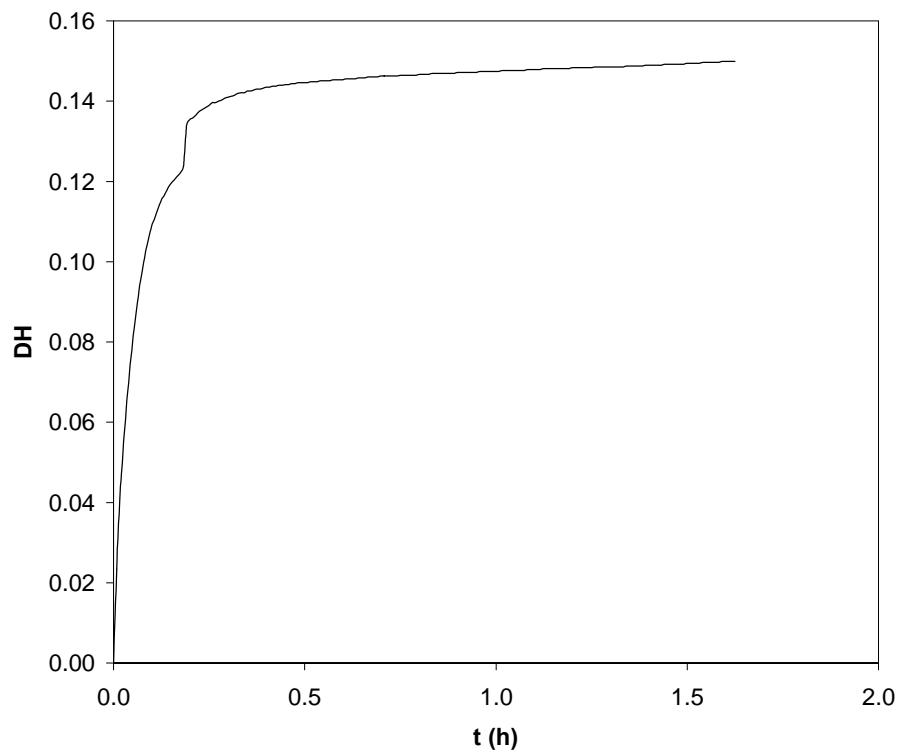


Figura 6-33. Curva de hidrólisis. T=70 °C. $e_0=0.10$ g/L (n=1)

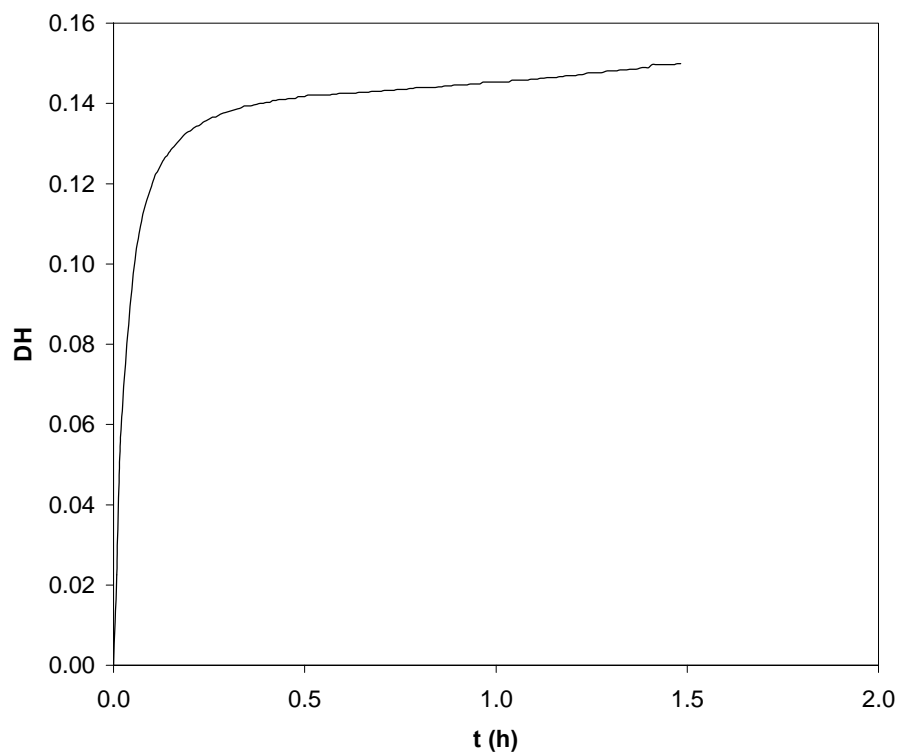


Figura 6-34. Curva de hidrólisis. T=70 °C. $e_0=0.15$ g/L (n=1)

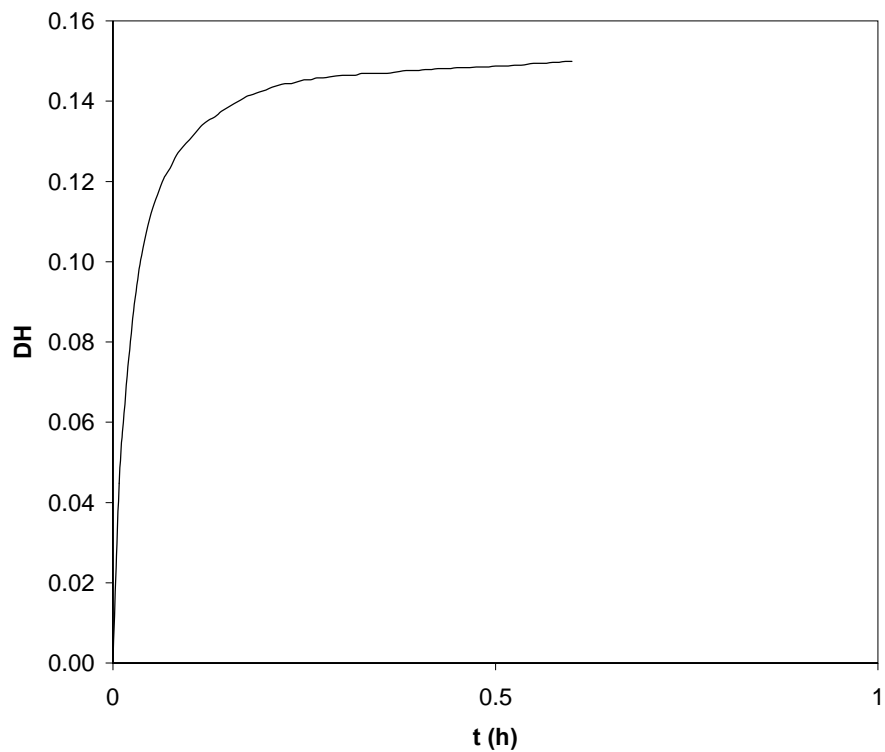


Figura 6-35. Curva de hidrólisis. T=70 °C. $e_0=0.20$ g/L (n=1)

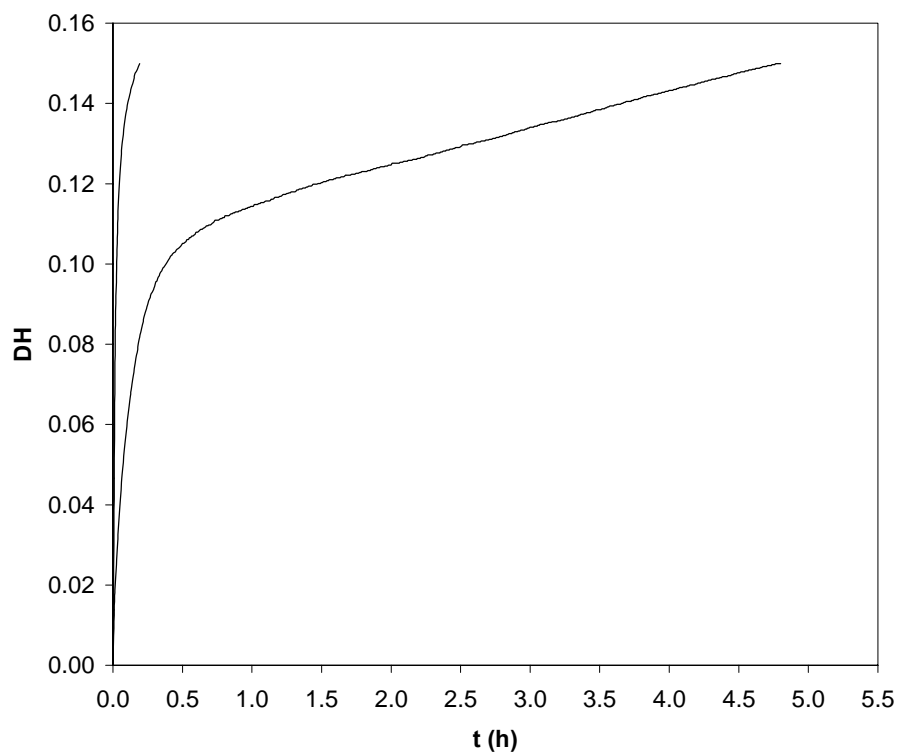


Figura 6-36. Curva de hidrólisis. T=70 °C. $e_0=0.25$ g/L (n=2)

Las curvas de hidrólisis de proteínas presentan una forma característica. La velocidad inicial de reacción es muy alta (en la técnica del pH-estato esto se traduce en un consumo de agente neutralizante muy rápido) y, por tanto, la pendiente de la curva grado de hidrólisis vs. tiempo es alta. Por otra parte, a medida que transcurre la hidrólisis, la velocidad de reacción disminuye gradualmente y la pendiente es cada vez menor. Esta forma típica responde aparentemente a un mecanismo de hidrólisis modelizado por una cinética de primer orden, consecuencia del ataque inicial de la enzima a la estructura terciaria de la proteína (Vorob'ev *et al.*, 1996). Sin embargo, la causa de esta curvatura no parece deberse a un mecanismo de este tipo. De acuerdo con Svendsen (1976) o Adler-Nissen (1986), una cinética tipo Michaelis-Menten puede explicar la actividad de las serinoproteasas sobre diferentes sustratos (Postolache y Oncescu, 1989). En este mecanismo, la curvatura típica de la curva de hidrólisis puede interpretarse fácilmente como un caso de inhibición por producto. Por otra parte, es posible pensar que los polipéptidos liberados durante la hidrólisis pueden competir por el sitio activo de la enzima. Por ello, la hidrólisis enzimática de proteínas puede explicarse mediante un mecanismo con inhibición competitiva por el sustrato (especialmente cuando el grado de hidrólisis es alto) en una serie de reacciones en paralelo y consecutivas (Adler-Nissen, 1986 y González-Tello *et al.*, 1994a). Así pues, no existe una explicación unánime sobre el mecanismo de la reacción de hidrólisis. Estudios más recientes parecen descartar tanto la cinética de primer orden como los modelos tipo Michaelis-Menten sin ningún tipo de inhibición, aunque éstos hayan sido los más utilizados tradicionalmente para explicar la hidrólisis enzimática de proteínas (Sousa *et al.*, 2004), y apuntan a fenómenos de inhibición y desactivación térmica de la enzima como causantes del descenso de la actividad enzimática a altos grado de hidrólisis y a altas temperaturas de operación, respectivamente.

En cuanto a la influencia de la concentración de enzima en la reacción de hidrólisis, si se comparan las curvas correspondientes a una misma temperatura y diferentes concentraciones de enzima (0.05 a 0.25 g/L para 45 °C) se puede observar que la velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de enzima añadida. De hecho, se aprecia una relación lineal entre la velocidad inicial de reacción y la concentración inicial de enzima para iguales concentraciones de sustrato. Esto se debe al hecho de que la extensión de la reacción está íntimamente relacionada con la formación del complejo intermedio sustrato-enzima, que es función de la cantidad de enzima activa

en el medio (Deqinq *et al.*, 2005). No obstante la cantidad de enzima empleada está limitada por factores como el coste de enzima o la autólisis, como en el caso de la tripsina. Normalmente, el fenómeno de la autólisis de enzima no se produce, ya que la concentración de sustrato es mucho mayor que la de enzima (esto es, $S_0 \gg e_0$) y, por tanto, las moléculas de enzima hidrolizan el sustrato sin interferir su actividad (Adler-Nissen, 1986).

Comparando las curvas de hidrólisis para 50 °C (Figura 6-12-Figura 6-16) con las curvas de hidrólisis a 45 °C (Figura 6-7-Figura 6-11) se observa un menor tiempo de hidrólisis y un mayor número de usos de enzima con iguales concentraciones de enzima (por ejemplo, si se comparan las curvas de la Figura 6-11 y Figura 6-16). Por tanto, la velocidad inicial de reacción aumenta con la temperatura como es bien conocido. Para la operación a 55 °C, 60 °C y 65°C se aprecian similares tendencias a las descritas para la operación a 45 °C y 50 °C. Esto es, mayores velocidades de reacción para concentraciones crecientes de enzima y elevadas temperaturas. El número de usos de enzima crece a medida que se añade enzima, puesto que existe una mayor concentración de catalizador disponible en el medio de reacción en las sucesivas hidrólisis. Por el contrario, la operación a 70 °C presenta un comportamiento singular: el número de usos de enzima es muy pequeño y para concentraciones de enzima pequeñas, no se alcanza siquiera el grado de hidrólisis deseado.

Así pues, el aumento de temperatura activa la enzima y contribuye al despliegue de las cadenas peptídicas (desnaturalización de la proteína), lo cual implica una mayor accesibilidad del sitio activo de la enzima al enlace peptídico y, por tanto, una mayor degradación de la proteína (Van der Placken *et al.*, 2004). Simultáneamente, la temperatura aumenta la desactivación enzimática, por lo que a una temperatura suficientemente elevada la extensión de la reacción es muy baja. En las Figura 6-32-Figura 6-36 se representan las curvas de hidrólisis para los experimentos a 70 °C. En ellas se puede observar que no se alcanza el grado de hidrólisis de 0.15 y que no es posible usar la enzima en hidrólisis sucesivas. Sólo en el mayor nivel de concentración de enzima ensayado, $e_0=0.25$ g / L, se consigue un segundo uso de enzima. En estos experimentos la desnaturalización de la enzima es tan rápida que no existe apenas hidrólisis del sustrato. Por tanto, la temperatura máxima de operación está limitada por la desnaturalización de la enzima y la consiguiente pérdida de actividad. No sólo la

enzima es alterada por la temperatura, sino que el sustrato también sufre transformaciones químicas debidas a la temperatura: la desnaturalización del sustrato conlleva el colapso de la estructura secundaria de la proteína y, como anteriormente se ha discutido, una mayor facilidad para el ataque de la enzima.

Se denomina tiempo acumulado de hidrólisis de un experimento (t_n) a la suma de los tiempos de hidrólisis de cada uso de enzima.

$$t_n = \sum_{i=1}^n t_i \quad [6.9]$$

Es decir, suponiendo que la misma cantidad inicial de enzima se haya empleado n veces, el tiempo acumulado es la suma del tiempo de cada una de las n reacciones llevadas a cabo. En las Figuras 6-41 a 6-46 se representan en forma de histograma los tiempos de cada una de las n hidrólisis frente a la concentración inicial de enzima (e_0) para las diferentes temperaturas ensayadas. En estas figuras se representa cada una de las hidrólisis realizadas como una porción de las barras horizontales, siendo el número de porciones para cada concentración de enzima el número de usos de la enzima en el experimento. La longitud total de las barras es el tiempo acumulado, t_n .

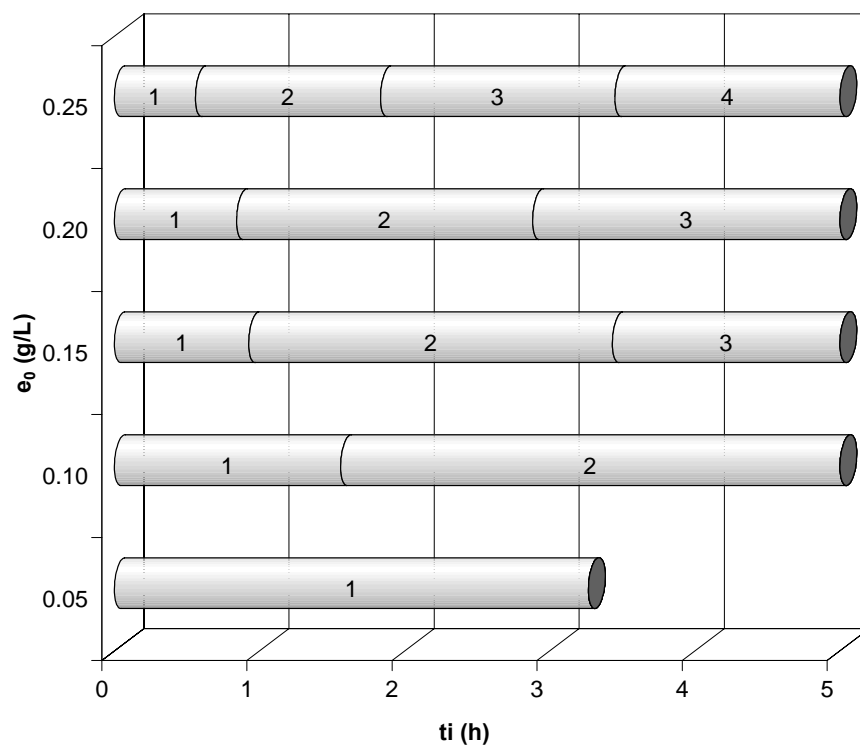


Figura 6-37. Tiempo acumulado de hidrólisis para la hidrólisis consecutiva n -ésima (t_n) frente a concentración inicial de enzima ($T=45\text{ °C}$)

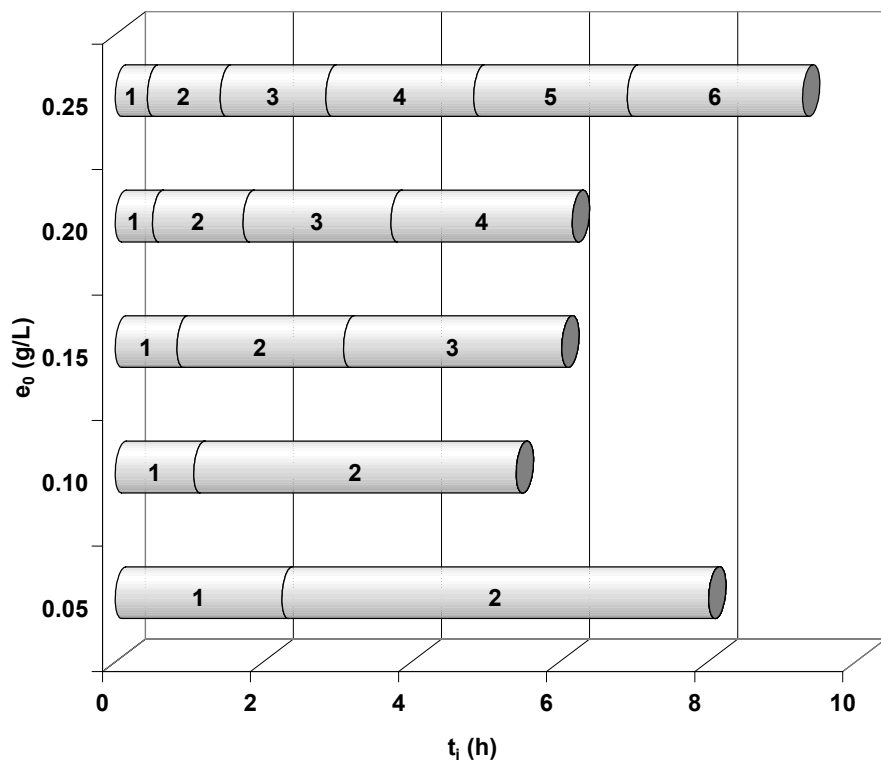


Figura 6-38. Tiempo acumulado de hidrólisis para la hidrólisis consecutivas n-ésima (t_n) frente a concentración inicial de enzima ($T=50\text{ }^\circ\text{C}$)

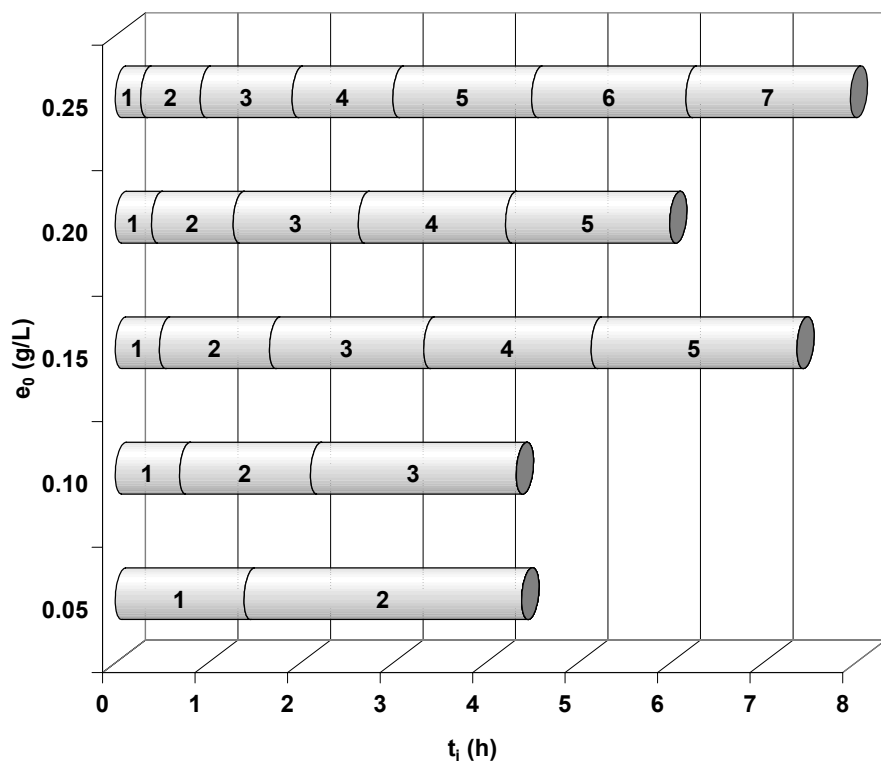


Figura 6-39. Tiempo acumulado de hidrólisis para la hidrólisis consecutivas n-ésima (t_n) frente a concentración inicial de enzima ($T=55\text{ }^\circ\text{C}$)

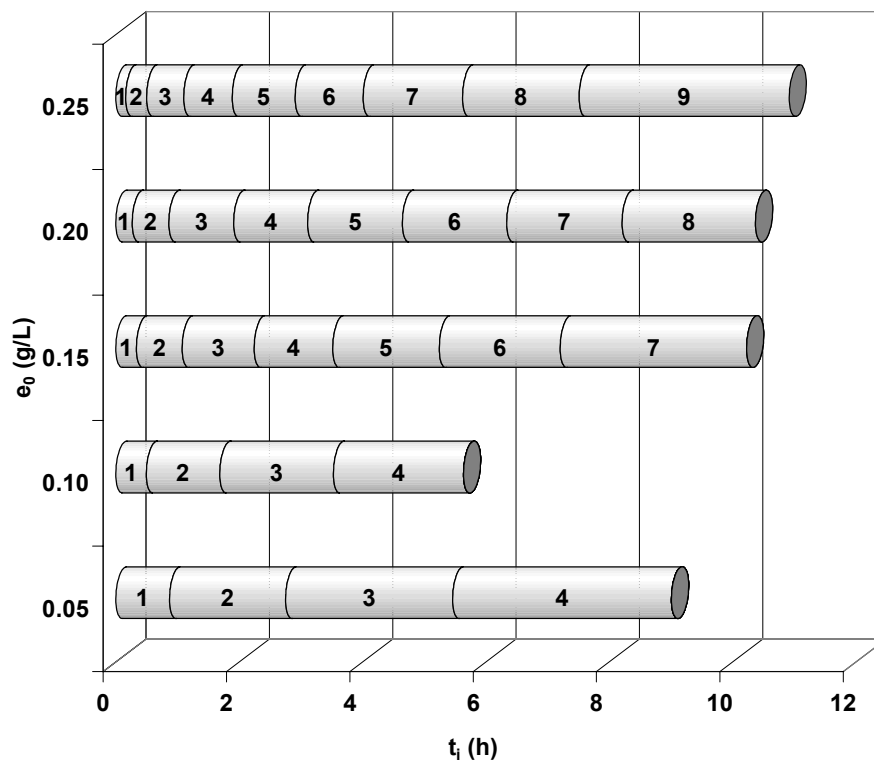


Figura 6-40. Tiempo acumulado de hidrólisis para la hidrólisis consecutivas n-ésima (t_n) frente a concentración inicial de enzima ($T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$)

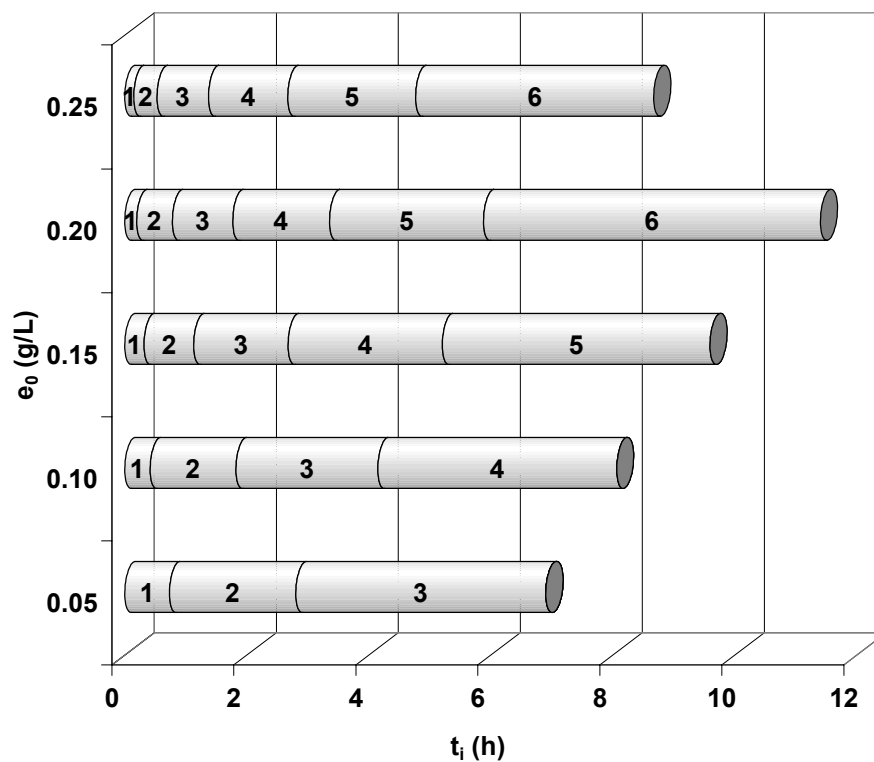


Figura 6-41. Tiempo acumulado de hidrólisis para la hidrólisis consecutivas n-ésima (t_n) frente a concentración inicial de enzima ($T=65\text{ }^{\circ}\text{C}$)

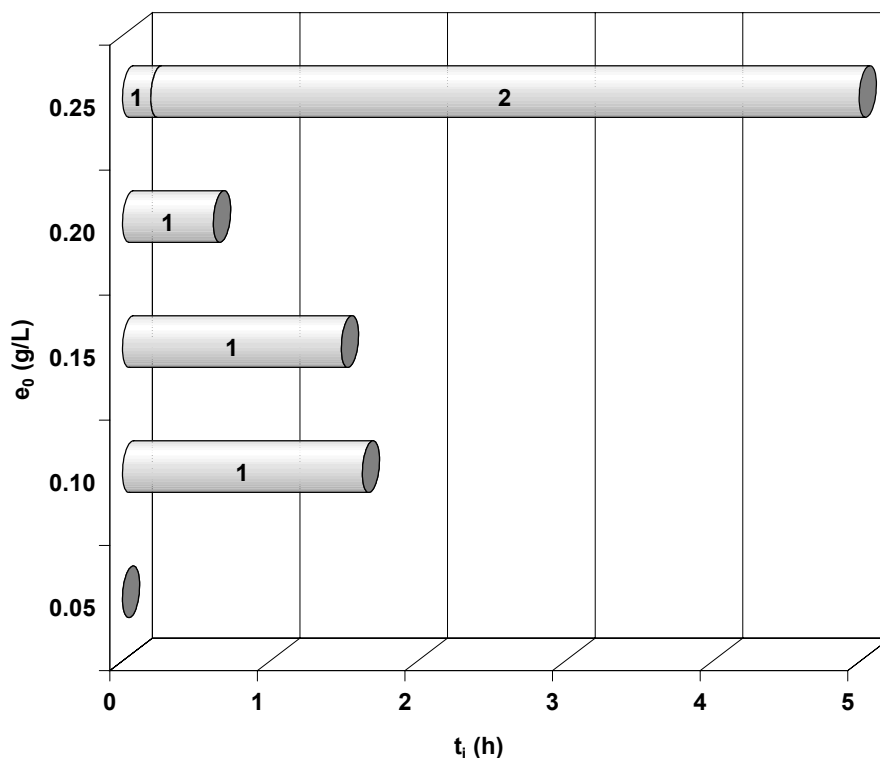


Figura 6-42. Tiempo acumulado de hidrólisis para la hidrólisis consecutivas n-ésima (t_n) frente a concentración inicial de enzima ($T=70\text{ }^\circ\text{C}$)

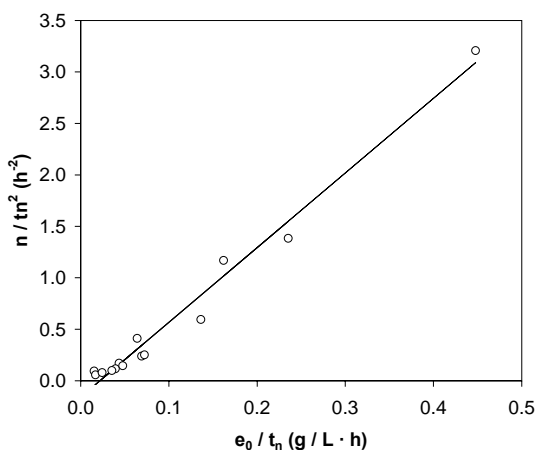
Se observa una disminución del tiempo de hidrólisis a medida que aumenta la cantidad de enzima empleada, es decir, la velocidad de reacción es mayor, como ya se había indicado anteriormente. Además, una mayor cantidad de enzima da lugar a un mayor número de utilizaciones de la enzima. A bajas concentraciones de enzima la influencia de la desactivación enzimática es mayor, de manera que la concentración de enzima activa disminuye drásticamente tras pocas hidrólisis.

En cuanto a la influencia de la temperatura, se vuelve a poner de manifiesto un aumento de la velocidad de reacción a medida que la temperatura aumenta hasta alcanzar $70\text{ }^\circ\text{C}$. Se aprecia que los tiempos de hidrólisis son cada vez menores para igual concentración de enzima (véase Figura 6-37-Figura 6-41). Para todas las temperaturas ensayadas, excepto para $70\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 6-42), se consigue un alto número de utilizaciones de enzima. Es decir, por debajo de $70\text{ }^\circ\text{C}$ y en el rango de concentraciones de enzima ensayadas, la desactivación enzimática no impide el uso sucesivo de enzima en el reactor.

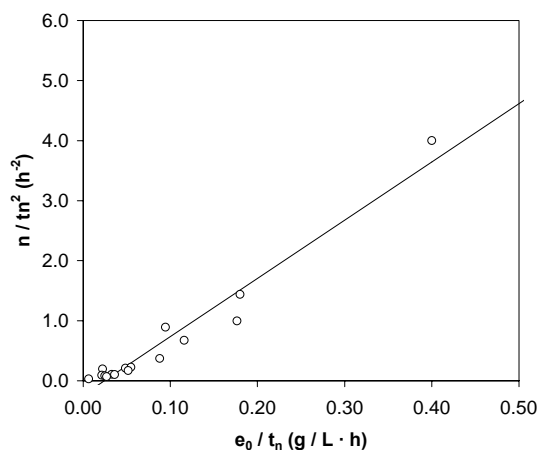
6.4 Estimación de parámetros cinéticos

Para el ajuste de los datos cinéticos se ensayaron modelos teóricos basados en la asunción de desactivación enzimática de orden cero, uno y dos (veáse capítulo 5 Aspectos teóricos). En las Figura 6-43 y Figura 6-44 se muestra la correlación existente entre los datos experimentales y el modelo teórico propuesto para desactivación de orden cero y uno, respectivamente (veáse ecuaciones [5.14] y [5.17]). En ambos casos las líneas continuas representan los valores calculados de acuerdo al modelo de desactivación de orden cero y los puntos circulares los datos experimentales.

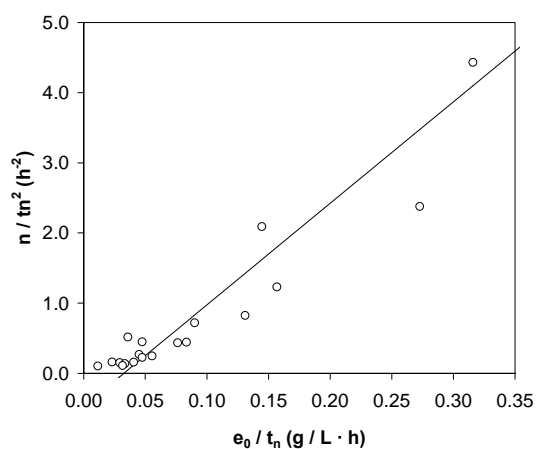
a) 45°C



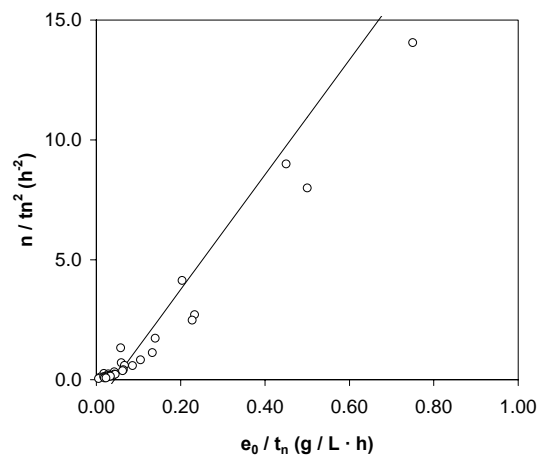
b) 50°C



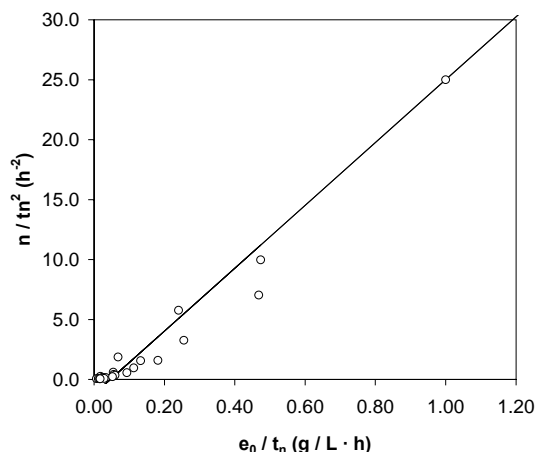
c) 55°C



d) 60°C



e) 65°C



f) 70°C

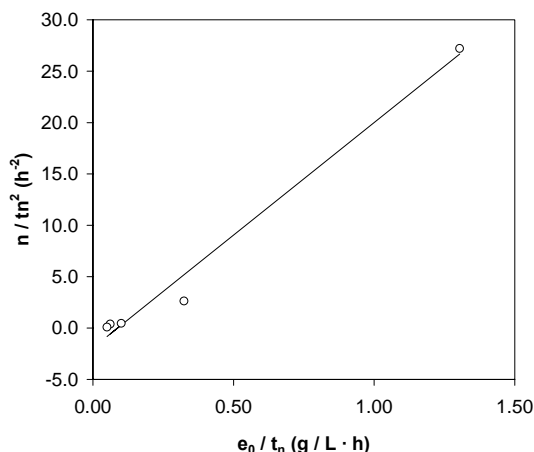
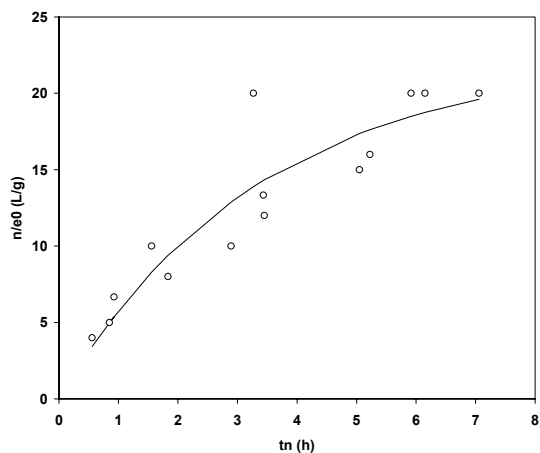


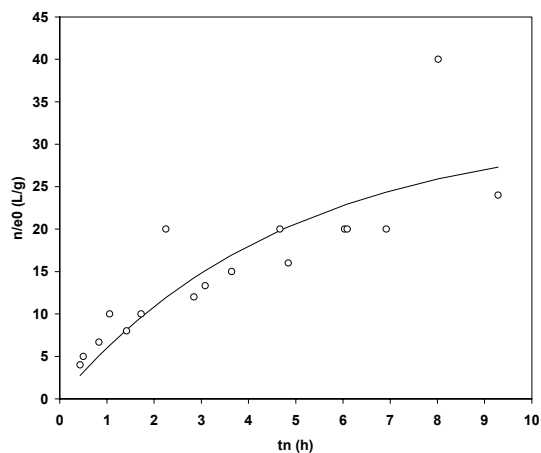
Figura 6-43. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden cero

El ajuste entre datos experimentales y modelo teórico se realiza mediante regresión por mínimos cuadrados. Como puede apreciarse en la Figura 6-43 los datos no se ajustan a una cinética de desactivación de orden cero: de hecho los valores del coeficiente de regresión r^2 obtenidos son muy bajos (véase Tabla 6-1).

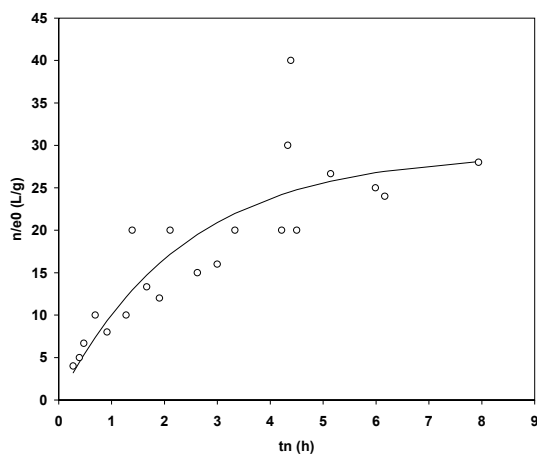
a) 45°C



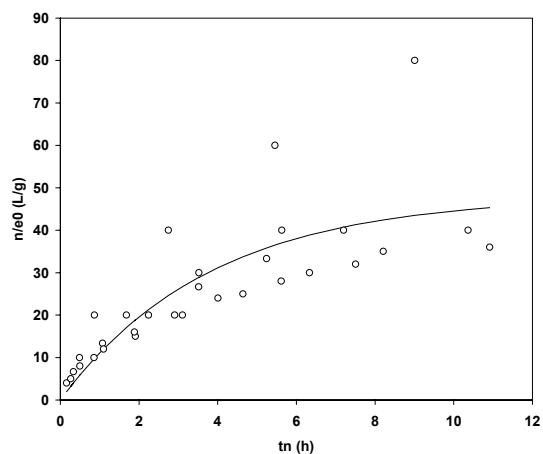
b) 50°C



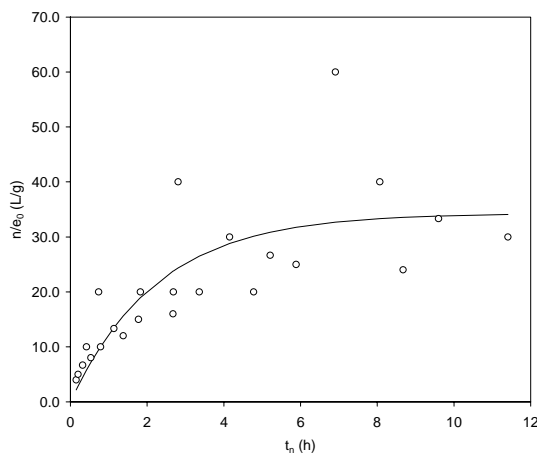
c) 55°C



d) 60°C



e) 65°C



f) 70°C

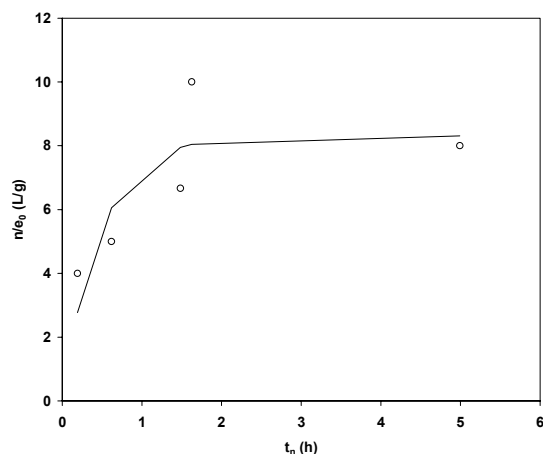


Figura 6-44. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden uno

Según los ajustes expuestos en la Figura 6-44, tampoco un modelo cinético de primer orden puede explicar los datos de desactivación térmica de la enzima (véase la Tabla 6-1 para los coeficientes de correlación obtenidos mediante ajuste por mínimos cuadrados).

Tabla 6-1. Coeficientes de correlación r^2 para los modelos de desactivación enzimática de orden cero y uno. Temperaturas entre 45 °C y 70 °C.

Temperatura (°C)	Orden 0	Orden 1
45	0.981	0.905
50	0.982	0.838
55	0.982	0.803
60	0.975	0.772
65	0.983	0.494
70	0.985	0.304

En las figuras 6-49 a 6-54 se representan los puntos experimentales ($e_0 \cdot t_n$ frente a n) y el ajuste teórico para desactivación enzimática de segundo orden (línea continua). En todos los experimentos realizados, los datos experimentales se ajustan al modelo con desactivación de segundo orden (ecuación [5.20]).

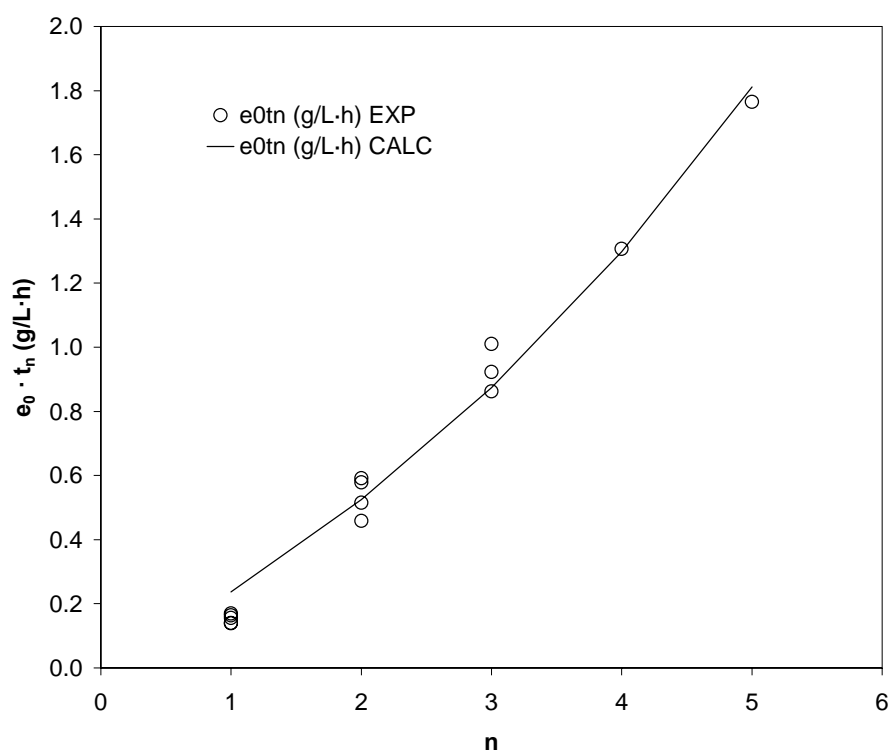


Figura 6-45. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden dos T=45 °C

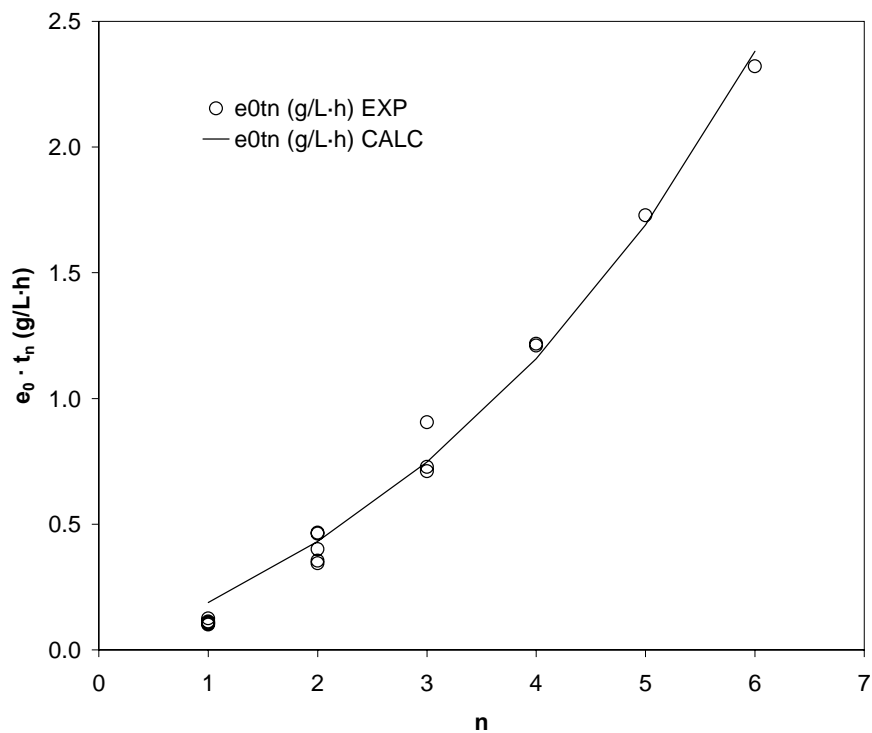


Figura 6-46. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden dos. $T=50\text{ °C}$

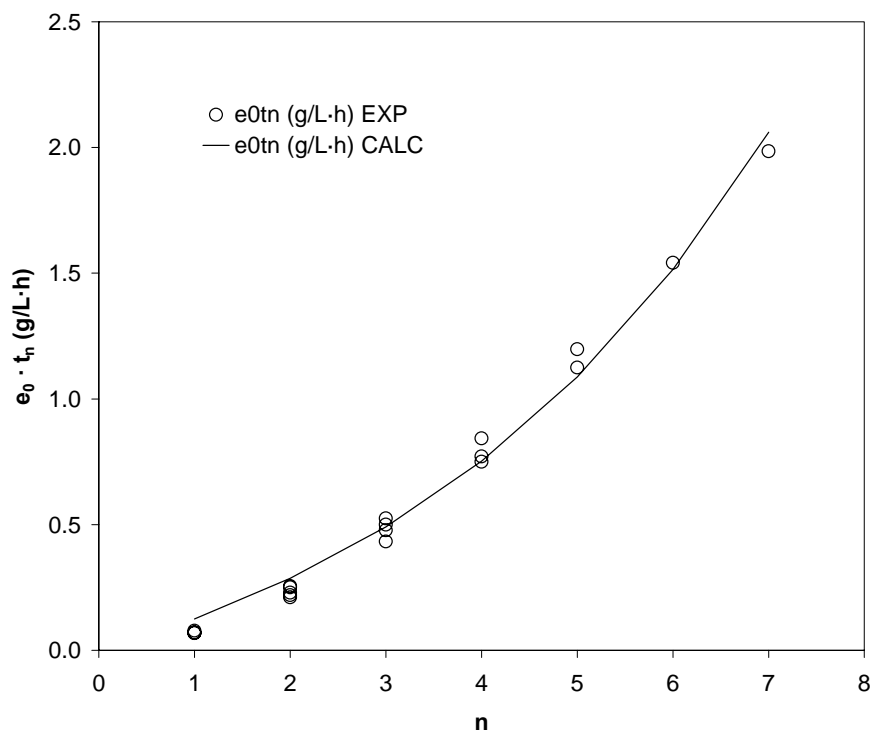


Figura 6-47. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden dos. $T=55\text{ °C}$

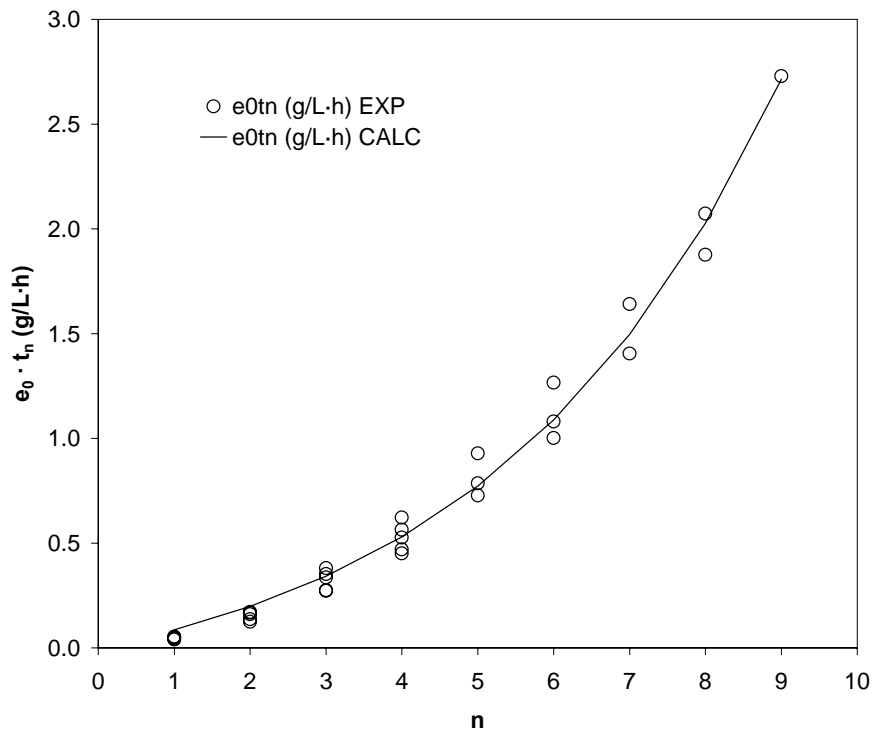


Figura 6-48. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden dos. $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$

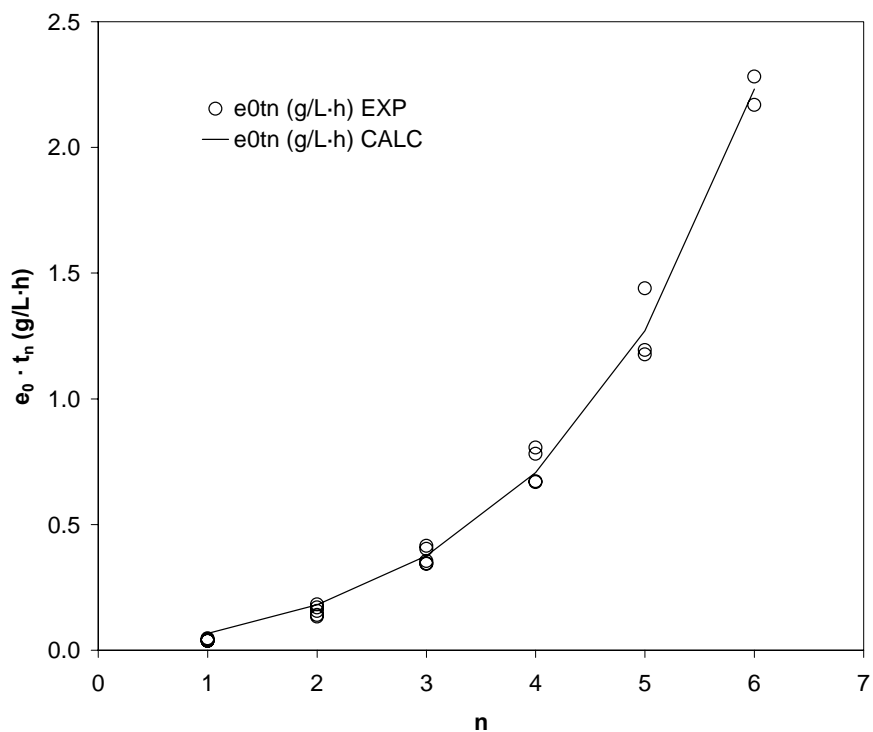


Figura 6-49. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden dos. $T=65\text{ }^{\circ}\text{C}$

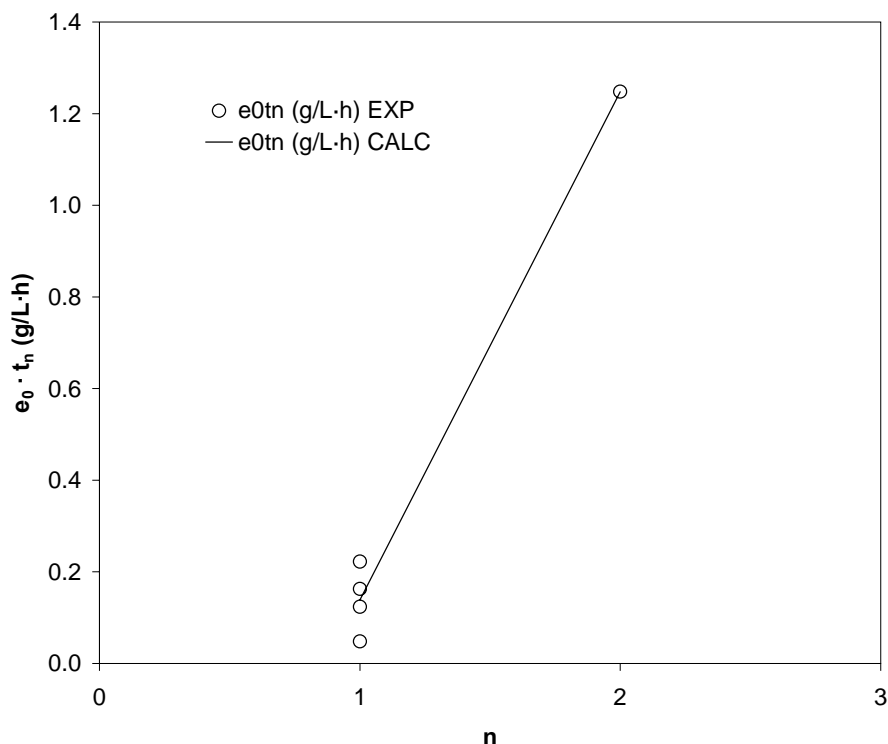


Figura 6-50. Estimación de parámetros cinéticos para un modelo de desactivación enzimática de orden dos. T=70 °C

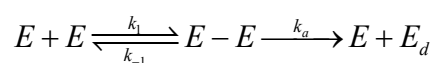
Como se ha descrito en el capítulo 5, los parámetros k_d y k_h corresponden a la constante de desactivación térmica de la enzima y la constante de reacción para la hidrólisis de WPC con subtilisinas. Estos parámetros se estiman mediante regresión no lineal y los valores obtenidos, así como el coeficiente de correlación para cada temperatura se muestran en la Tabla 6-2.

Tabla 6-2. Parámetros cinéticos en función de la temperatura y coeficiente de correlación del ajuste por regresión al modelo de desactivación de segundo orden y cinética de hidrólisis de orden cero

Temperatura (°C)	k_d (L/(g·h))	k_h (h ⁻¹)	r^2
45	0.897	3.486	0.988
50	1.581	4.557	0.993
55	2.205	6.759	0.994
60	3.459	9.974	0.992
65	10.502	14.785	0.996
70	50.186	18.126	0.992

Si se representa el logaritmo neperiano de la constante k_d frente a la inversa de la temperatura en escala Kelvin se puede observar (Figura 6-51) que los valores de k_d no se ajustan a una clásica ecuación tipo Arrhenius. Los puntos discretos corresponden a los valores obtenidos en los ajustes al modelo propuesto por regresión no lineal y mostrados en la Tabla 6-3. La curva continua corresponde a la línea de ajuste obtenida por regresión no lineal de mínimos cuadrados. Para el rango de temperatura entre 45 °C y 60 °C puede apreciarse una relación lineal entre $\ln(k_d)$ y $1/T$. Sin embargo, para las mayores temperaturas ensayadas (65 °C y 70 °C) la constante k_d crece por encima de la tasa de desactivación correspondiente al ajuste lineal.

Un cambio en el mecanismo de desactivación enzimática podría justificar este comportamiento cinético. La desactivación de segundo orden se corresponde con un mecanismo de autodigestión de la enzima: esto es, se produce una reacción bimolecular entre dos especies de baja concentración. De esta manera, una molécula de enzima actúa como sustrato mientras que otra actúa como catalizador de la reacción (Adler-Nissen, 1986), tal que:



Donde:

- E es la enzima activa, E-E es el complejo intermedio enzima-sustrato y E_d es la enzima digerida, no activa.
- k_1 y k_{-1} son las constantes cinéticas de formación del complejo enzima-sustrato y k_a es la constante cinética de autodigestión.

Según el mecanismo anterior, la autodigestión conlleva la pérdida de actividad de una molécula de enzima reaccionante. El aumento de la tasa de desactivación térmica de la enzima puede atribuirse a una contribución creciente de la autodigestión a medida que aumenta la temperatura. Así pues, la desactivación k_d crecería por encima de lo predicho por la ecuación de Arrhenius por la mayor contribución de la constante k_a , acelerándose así la desactivación térmica de la enzima. Por todo ello, la expresión matemática de la constante de desactivación enzimática incluye la contribución de los diferentes mecanismos a la desactivación, ecuación [6.10].

$$k_d = \exp\left(A_1 - \frac{E_{A1}}{T}\right) + \exp\left(A_2 - \frac{E_{A2}}{T}\right) \quad [6.10]$$

Donde:

- A_1 y E_{A1} corresponden al valor del factor pre-exponencial y la energía de activación correspondientes a la desactivación térmica.
- A_2 y E_{A2} corresponden al valor del factor pre-exponencial y la energía de activación correspondientes a la autodigestión.

La contribución de los diferentes mecanismos y el ajuste global se representa en la Figura 6-51. Puede apreciarse que la componente correspondiente a la desactivación térmica (esto es, el primer término de la ecuación [6.10]) es dominante para temperaturas inferiores a 60 °C, siendo nula la contribución de la autodigestión. Sin embargo, para temperaturas superiores a 60 °C el mecanismo de autodigestión determina la desactivación de la enzima en mayor medida que la propia desnaturalización térmica de la enzima.

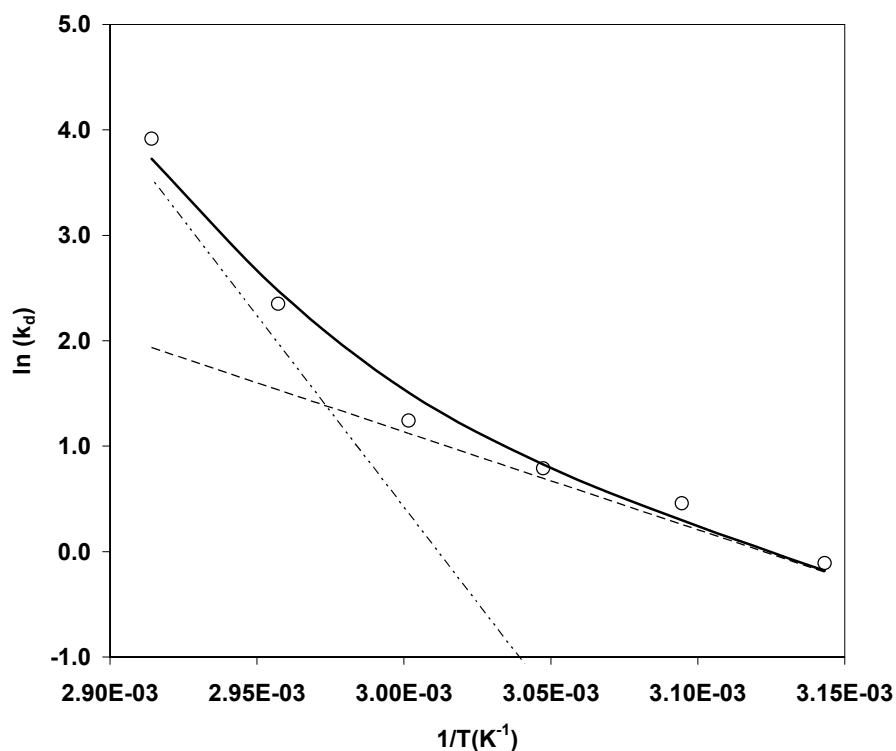


Figura 6-51. Ajuste de Arrhenius resultante (línea continua) de la contribución de la desactivación térmica (línea discontinua) y la autodigestión de la enzima (línea punteada)

Los valores de los distintos parámetros obtenidos por regresión no lineal con ajuste de mínimos cuadrados se muestran en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3. Factores pre-exponenciales y energías de activación para el ajuste global tipo Arrhenius de la constante de desactivación k_d

Desnaturalización térmica		Autodigestión	
A_1	29.02	A_2	109.33
E_{A1}	9295.16	E_{A2}	36300.10

En definitiva, la ecuación de ajuste global (es decir, incluye ambos mecanismos) queda:

$$k_d = \exp\left(29.02 - \frac{9295.16}{T}\right) + \exp\left(109.33 - \frac{36300.10}{T}\right) \quad [6.11]$$

Con un coeficiente de correlación, $r^2 = 0.97$

Por otra parte, la relación de la constante cinética de hidrólisis k_h con la temperatura de hidrólisis se ajusta a una ecuación tipo Arrhenius (Figura 6-52). La ecuación obtenida por regresión lineal de mínimos cuadrados viene dada por:

$$\ln(k_h) = 25.07 - \frac{7589.96}{T} \quad [6.12]$$

Siendo $r^2 = 0.993$.

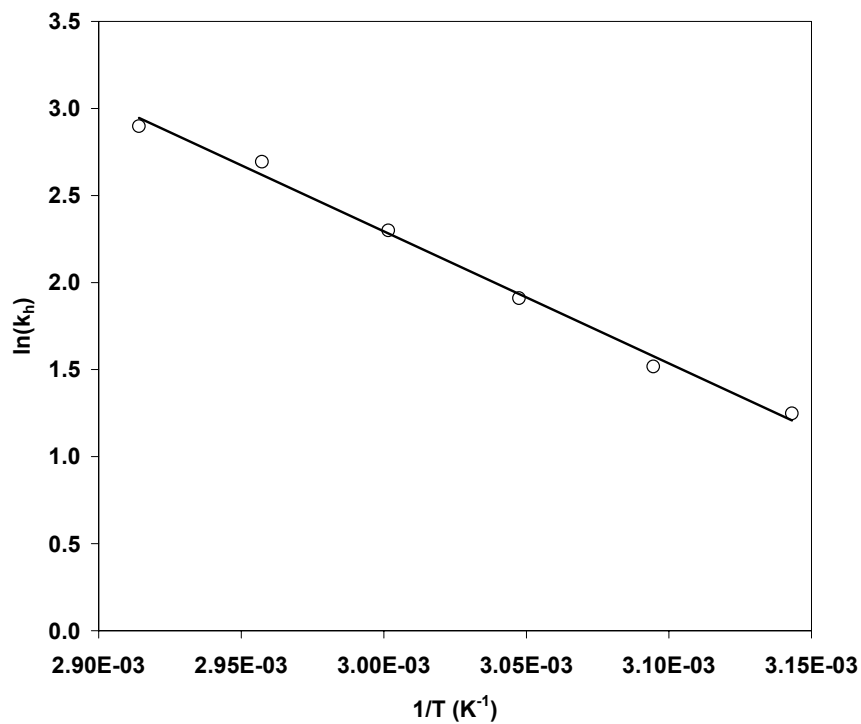


Figura 6-52. Ajuste de Arrhenius de la constante k_h . Recta de mínimos cuadrados.

Los valores de k_d y k_h estimados a partir de las ecuaciones anteriores se muestran en la Tabla 6-4.

Tabla 6-4. k_d y k_h estimados con las ecuaciones de ajuste de mínimos cuadrados

Temperatura (°C)	k_d (L/(g h))	k_h (h^{-1})
45	0.83	3.35
50	1.35	4.84
55	2.28	6.94
60	4.52	9.80
65	11.88	13.72
70	41.51	19.03

6.5 Optimización de la operación del reactor discontinuo de membrana

La optimización del reactor discontinuo de membrana se plantea como un problema de optimización multivariante. Esto es, diferentes funciones objetivo pueden plantearse (veáse el capítulo 5. Aspectos teóricos). En la Figura 6-53 se representan el valor de la función objetivo e_0/t_T y de la productividad P calculados a partir de los datos obtenidos experimentalmente. Se aprecia que la mayor parte de valores de productividad calculados a partir de los datos experimentales son inferiores 3 h^{-1} para todas las temperaturas de operación ensayadas.

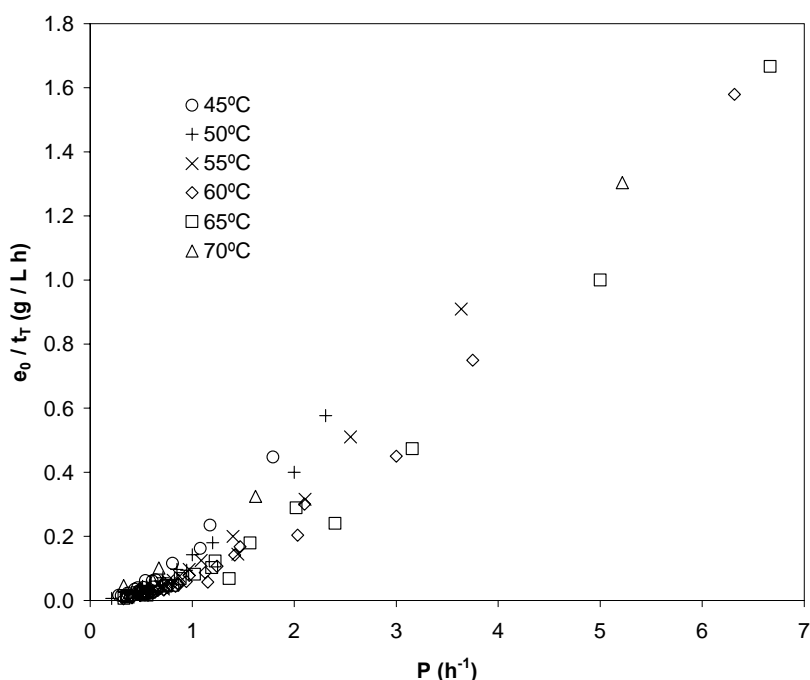


Figura 6-53. Valores de la función objetivo y la productividad para los datos experimentales

El problema de optimización puede plantearse con dos objetivos diferentes: minimizar la cantidad de enzima e_0/t_T consumida en la operación del reactor para una productividad dada. Este planteamiento supone encontrar el mejor modo de operación dentro de una línea vertical de la Figura 6-53, esto es, siendo P fijada en la operación del reactor. Por el contrario, maximizar la producción del sistema fijando un consumo de enzima determinado supone encontrar el modo de operación que proporciona la mayor P en una línea horizontal de la Figura 6-53; esto es, con una relación e_0/t_T fijada. Teniendo en cuenta que el empleo del reactor discontinuo de membrana persigue aprovechar cuanto sea posible el catalizador de la reacción, se ha determinado seguir el

primer planteamiento del problema de optimización. Es decir, dada una productividad fijada en la operación, determinar las mejores condiciones para minimizar el consumo de enzima

El reactor discontinuo de membrana permite diferentes modos de operación en función de la temperatura de las sucesivas reacciones de hidrólisis que se llevan a cabo. Es decir, podría operar:

- A temperatura fijada previamente en la operación dentro del rango de temperaturas en las que la enzima presenta actividad.
- A la temperatura constante que optimice el funcionamiento del reactor.
- A temperatura variable, es decir, cambiando la temperatura de operación en cada hidrólisis.

En cualquier caso, se ha decidido que el objetivo de la operación con el reactor discontinuo de membrana es el aprovechamiento intensivo de la enzima. En consecuencia, la cantidad total de enzima empleada por unidad de tiempo es la función objetivo a minimizar en el funcionamiento del reactor discontinuo de membrana, esto es:

$$E_T = \frac{e_0}{t_T} \quad [6.13]$$

siendo:

- e_0 , la concentración inicial de enzima añadida (g / L)
- t_T , el tiempo total de operación (h)
- E_T , la cantidad de enzima en gr consumida por litro de hidrolizado y por hora (g/L·h).

Por otra parte, se define la productividad del sistema como el número de usos de enzima por unidad de tiempo:

$$P = \frac{(n-1) \cdot R + 1}{t_T} \quad [6.14]$$

siendo:

- P, la productividad del reactor discontinuo de membrana (h^{-1})
- n, el número de usos de enzima.
- R, la razón volumen de filtrado (V_F) / volumen inicial de hidrolizado (V_0).

Según esta definición, una productividad elevada conlleva un número de usos de enzima elevado con tiempos de operación cortos. Por el contrario, una productividad pequeña se consigue con largos tiempos de operación y un corto número de usos de enzima.

El tiempo de operación, t_T incluye tanto el tiempo correspondiente a las sucesivas reacciones de hidrólisis como el tiempo necesario para las filtraciones:

$$t_T = t_n + (n-1) \cdot t_F \quad [6.15]$$

donde:

- n es el número de usos de enzima
- t_n es el suma de los tiempos de reacción para los n usos de enzima (h)
- t_F es el tiempo de filtración (h).

A continuación se describe la optimización del sistema en los diferentes modos de operación propuestos anteriormente.

6.5.1 Optimización a temperatura fijada

En este caso se trabaja en el reactor a una temperatura fijada por el operador. La función objetivo viene dada por la ecuación [6.12]. Dado que anteriormente se ha verificado la hipótesis de desactivación enzimática de segundo orden y se ha validado el modelo correspondiente, sustituyendo las expresiones para e_0 y t_T (ecuaciones [5.20] y [6.15]) queda:

$$n \cdot \frac{S_0}{k_h} \cdot x = \frac{1}{k_d} \cdot \ln \left(1 + k_d \cdot e_0 \left(\frac{(n-1) \cdot R + 1}{P} - (n-1) \cdot t_F \right) \right) \quad [6.16]$$

Si se despeja e_0 de la anterior ecuación y se sustituye en la expresión de la función objetivo E_T queda en la función objetivo (ecuación [6.13]), se obtiene

$$E_T = \frac{P \left(\exp \left(\frac{k_d \cdot n \cdot S_0 \cdot x}{k_h} \right) - 1 \right)}{k_d \cdot \left(\frac{(n-1) \cdot R + 1}{P} - t_F \cdot (n-1) \right) \cdot ((n-1) \cdot R + 1)} \quad [6.17]$$

La función objetivo, ecuación [6.17] presenta una asíntota vertical cuando el denominador de la función objetivo se hace igual a cero:

$$\frac{(n_{AS} - 1) \cdot (R + 1)}{P} - (n_{AS} - 1) \cdot t_F = 0 \quad [6.18]$$

Despejando de la ecuación anterior, queda:

$$n_{AS} = \frac{R - 1 - P \cdot t_F}{R - P \cdot t_F} \quad [6.19]$$

Lo que implica la existencia de un valor crítico $P_c = R / t_F$ según el cual se distinguen dos casos diferentes:

- En caso de $P > R / t_F$, existe un número natural que es límite superior del número de usos de enzima. El valor máximo de usos de enzima, n_{max} , corresponde a la parte entera del valor calculado según la ecuación [6.19] menos una constante δ , de valor infinitesimal, esto es:

$$n_{max} = \left\lfloor n^* - \delta \right\rfloor \quad [6.20]$$

- En el caso de $P < R/t_F$, el número de usos de enzima no está limitado.

El problema de optimización en este caso se plantea como:

- Dada una productividad, P
- Determinar el número óptimo de usos de enzima, n

- Para minimizar el consumo de enzima a emplear por unidad de tiempo, E_T .

El problema planteado responde a un planteamiento MINLP, que se resuelve mediante la técnica de enumeración (véase sección 4.8 Optimización numérica). El sistema de ecuaciones a resolver viene dado por las expresiones para E_T , $k_d = f(T)$ y $k_h = f(T)$, ecuaciones [6.17], [6.11] y [6.12]. Las variables que aparecen en las ecuaciones son: E_T , n , k_h , k_d , P , t_F y T .

Teniendo en cuenta que el número de grados de libertad es:

$$gl = \text{Variables} - \text{relaciones de diseño} \quad [6.21]$$

queda que el número de grados de libertad del modelo resultante es:

$$gl = 7 - 3 = 4 \quad [6.22]$$

Las variables independientes son: n , T , P y t_F . Dado que la temperatura de operación y la productividad son variables impuestas por el operador y que el tiempo de filtración es una constante característica de la membrana, queda como única variable a determinar n , número de usos de enzima.

La resolución por enumeración consiste en ensayar diferentes valores de n , fijando el valor de las demás variables y comparando el valor que toma la función objetivo para cada caso. El menor valor de E_T determina el óptimo número de usos de enzima.

Para todos los experimentos realizados el factor de concentración alcanzado en la ultrafiltración del hidrolizado es $R = 150/200 = 0.75$. Por otro lado, dado que las condiciones de operación del módulo de membrana se han fijado para obtener un caudal de filtrado de 7.5 mL/min (véase sección 6.2.2), el tiempo de filtración es: $t_F = 1/3$ h. A continuación se discute el funcionamiento del reactor a distintas temperaturas de operación.

- Temperatura de operación 45 °C

En las Figura 6-54 a Figura 6-63, se representa el valor que toma la función objetivo E_T (calculada según la ecuación [6.17] con operación a 45 °C) en función del número de usos de enzima en el reactor para diferentes valores de productividad.

En la Figura 6-54 se muestra el caso de productividad mayor que R/t_F , concretamente $P = 3 \text{ h}^{-1}$. En dicha figura se observa que el número de usos de enzima para el cual es mínima la función E_T es 1 y que la función objetivo está definida hasta un valor máximo de usos de enzima de 4. Este valor máximo viene dado por la asíntota vertical de la función E_T que se comentó anteriormente.

El parámetro n_{\max} determina el mayor valor posible para el número de usos de enzima a una temperatura dada, es decir, la región del dominio de n para el cual existe la función E_T . No obstante, esto no significa que necesariamente el número óptimo de usos de enzima sea ese valor máximo. Por ejemplo, en la Figura 6-54 se representa la función objetivo E_T frente al número de usos de enzima y se aprecia que la función está definida para $n \leq 4$ y presenta un mínimo para $n = 1$. Es decir, el menor consumo de enzima (menor E_T) corresponde a una sola utilización de la enzima.

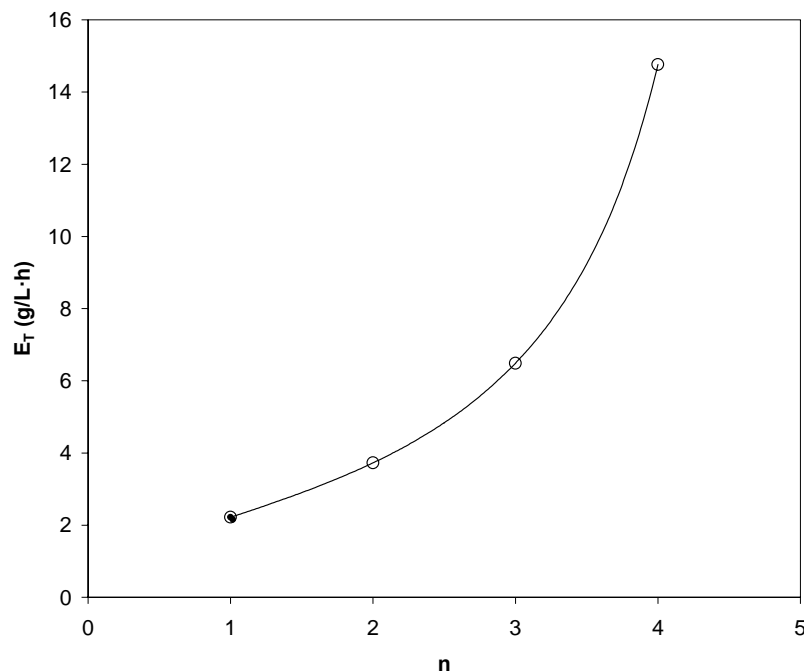


Figura 6-54. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 3 \text{ h}^{-1}$. $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$

La existencia de óptimos y puntos de inflexión se determina mediante el análisis de la primera y segunda derivadas de la función E_T frente al número de usos de enzima. Ambas derivadas se representan conjuntamente en la Figura 6-55. Se observa que las representaciones de la primera y la segunda derivada son mayores de cero en todo el

dominio de la función E_T y, por tanto, no existen mínimos ni puntos de inflexión en la función objetivo.

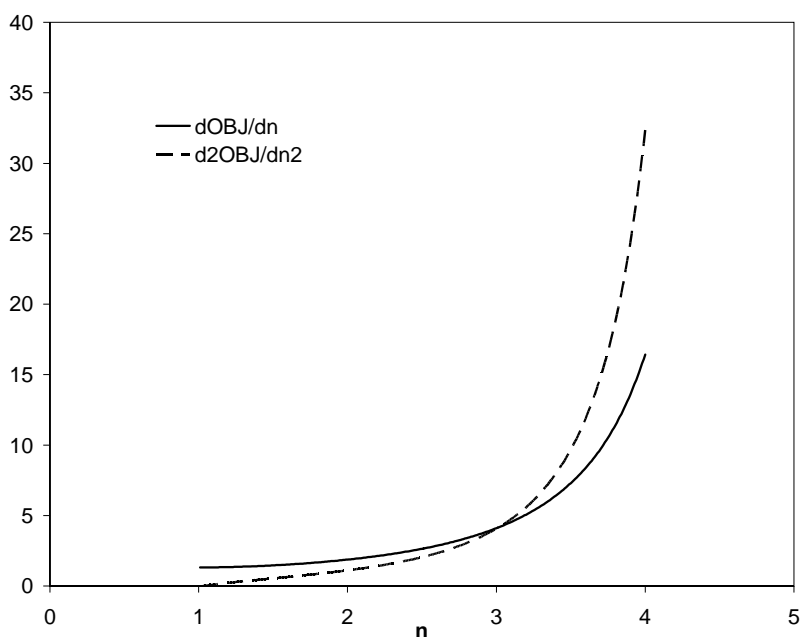


Figura 6-55. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=3 \text{ h}^{-1}$. $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$.

El valor de la función objetivo para productividad igual a 2 h^{-1} se representa en la Figura 6-56. En primer lugar se observa que no existe asíntota vertical en el rango de n estudiado (entre 1 y 10). De hecho, el valor numérico calculado según la ecuación [6.19] es inferior a cero, lo cual quiere decir que la función E_T existe en todo el dominio estudiado, valores enteros mayores que 1. Por otra parte, se observa que el mínimo para la función E_T viene dado por $n=1$, al igual que en el caso de productividad 3 h^{-1} . En la Figura 6-57 se comprueba, mediante el análisis de la primera derivada de la función E_T , que no existen mínimos locales. Sí existe un punto de inflexión próxima a $n = 4$, como puede deducirse del estudio de la segunda derivada. Si se compara la forma que toma la función objetivo en el caso de $P=2 \text{ h}^{-1}$ frente a $P=3 \text{ h}^{-1}$, se puede apreciar que la primera presenta un punto de inflexión mientras que la segunda es convexa en todo su dominio. Ambas curvas tienen en común que el número óptimo de usos de enzima es 1, por lo que estos valores de P , suponen producir el hidrolizado de forma rápida a costa de grandes concentraciones iniciales de enzima, esto es, sin reutilizar la enzima.

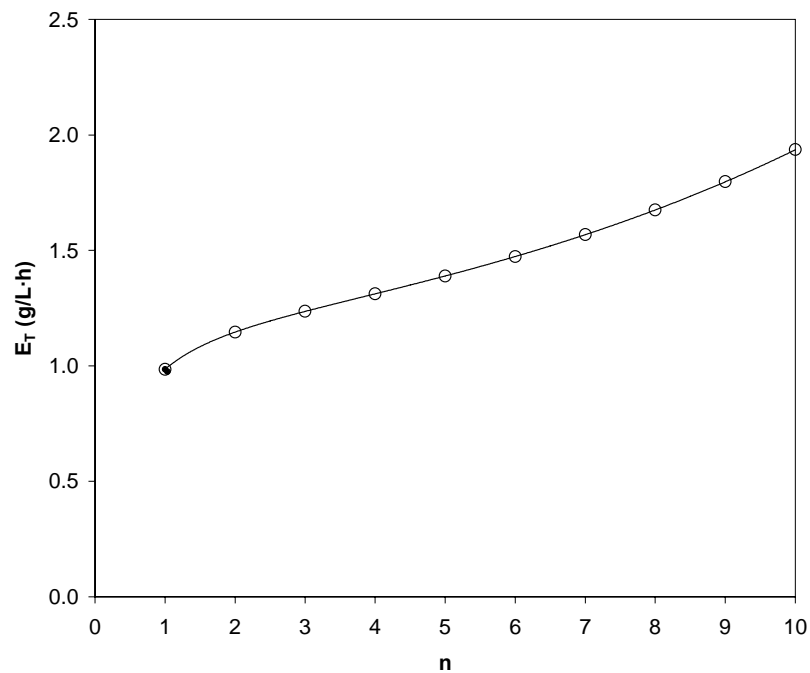


Figura 6-56. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P=2 \text{ h}^{-1}$. $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$

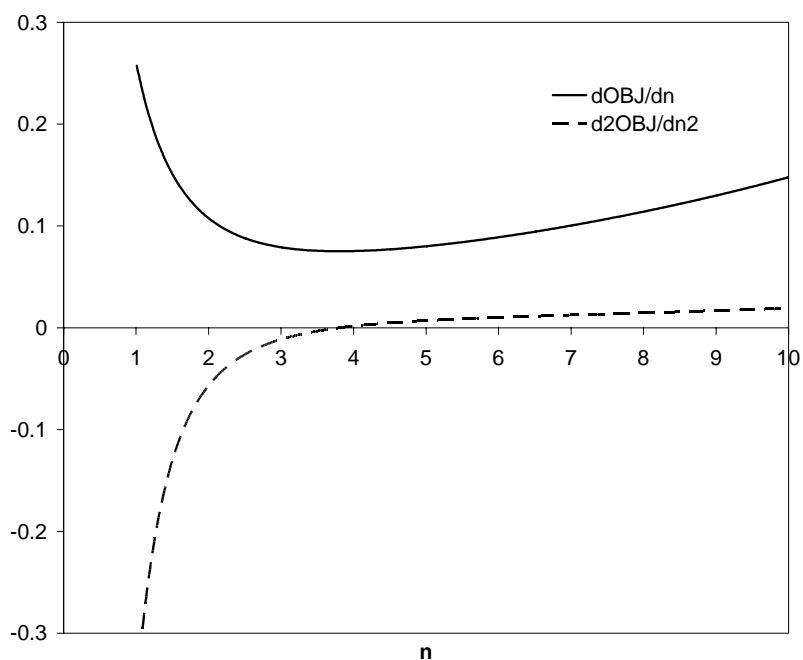


Figura 6-57. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=2 \text{ h}^{-1}$. $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$.

En el caso de productividad 1.5 h^{-1} , la curva E_T frente a n se representa en la Figura 6-58. En este caso tampoco existe asíntota vertical en el dominio estudiado y por lo

tanto, tampoco existe un número máximo de usos de enzima. Esta curva presenta un mínimo global para $n = 5$ y un mínimo local en $n = 1$.

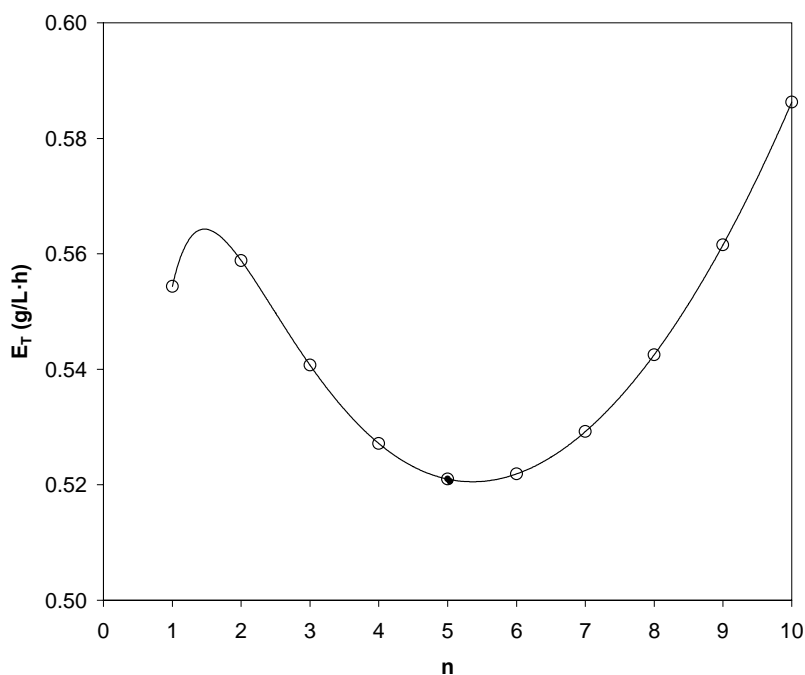


Figura 6-58. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.5 \text{ h}^{-1}$. $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$

En este caso, la función objetivo presenta un máximo local para $n=2$. En cuanto a los puntos de inflexión, puede observarse un cambio en la concavidad de la curva E_T vs. n (Figura 6-58) para valores cercanos a $n=2$.

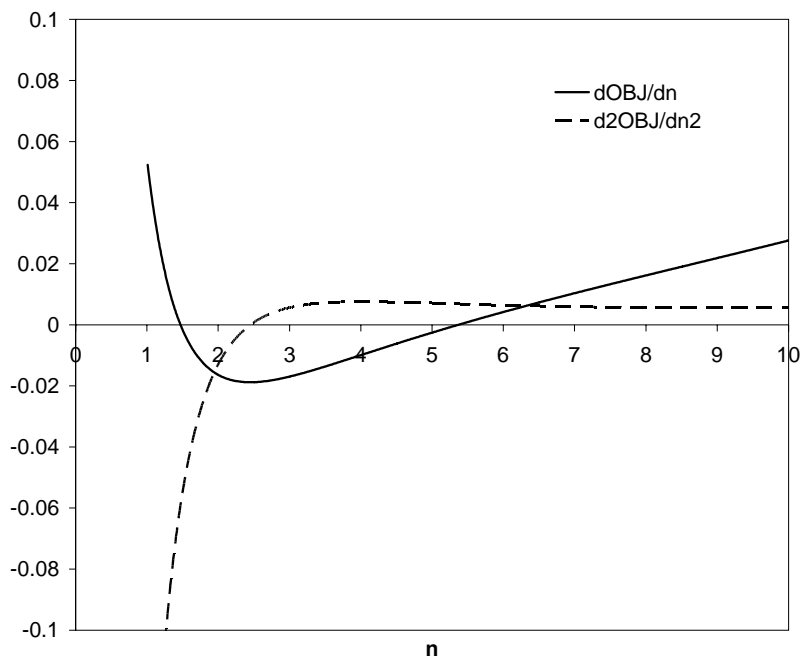


Figura 6-59. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=1.5 \text{ h}^{-1}$. $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$.

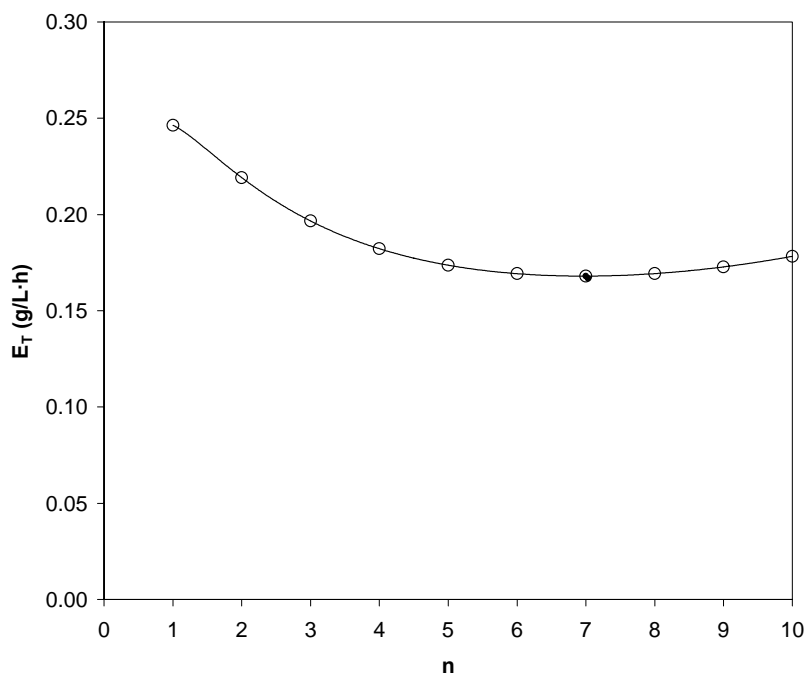


Figura 6-60. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$

En la Figura 6-60 se representan los resultados obtenidos para $P=1 \text{ h}^{-1}$. En este caso la función objetivo presenta un valor mínimo para $n=7$ y un punto de inflexión entre $n=1$

y $n=2$. Finalmente, para un valor de productividad de 0.1 h^{-1} , la curva E_T vs n presenta un mínimo para $n=8$ y no presenta puntos de inflexión (Figura 6-62), como puede deducirse a partir de la Figura 6-63.

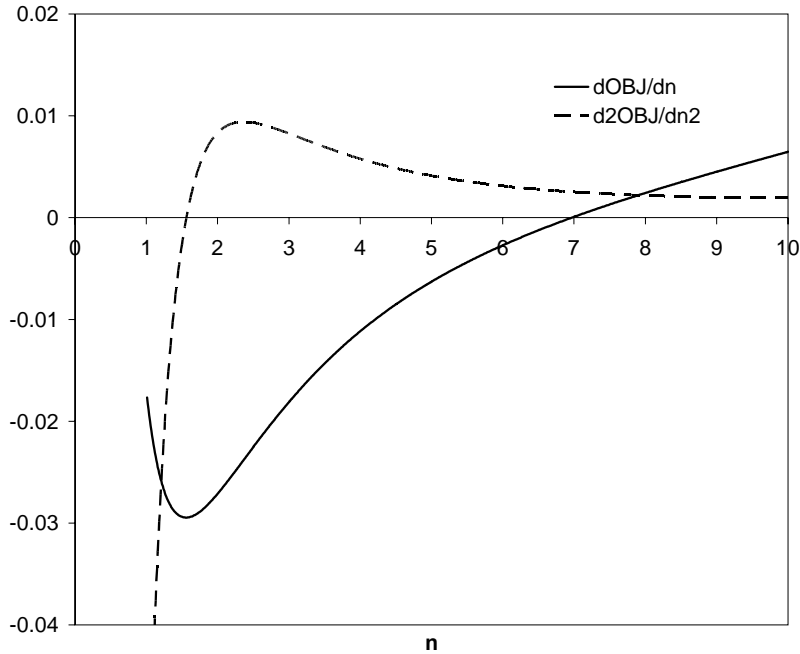


Figura 6-61. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$

Si se comparan las Figura 6-54, Figura 6-56, Figura 6-58, Figura 6-60 y Figura 6-62, se aprecia que la forma que toma la curva E_T frente al número de usos de enzima varía a medida que lo hace la productividad del reactor. Así pues, en función de la productividad pueden distinguirse cinco tipos de curvas.

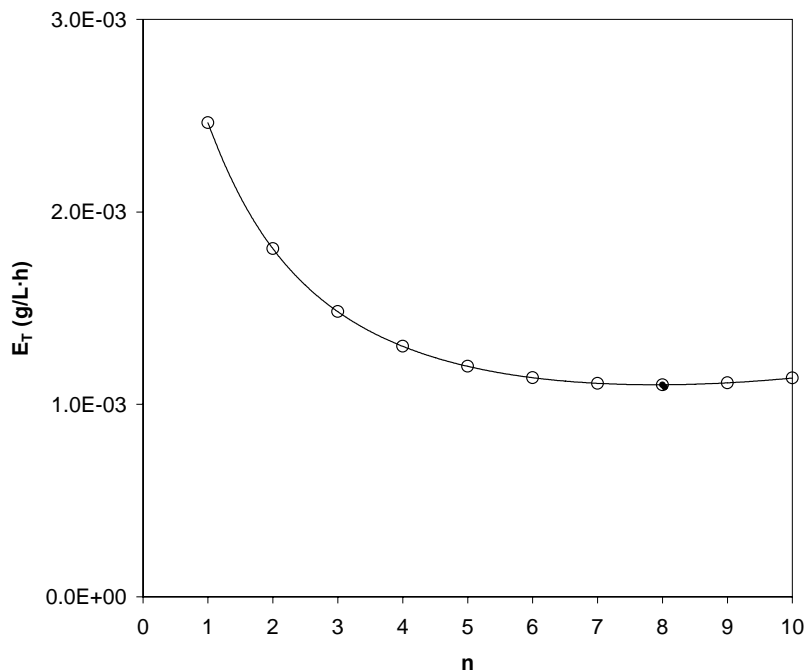


Figura 6-62. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 0.1 \text{ h}^{-1}$. $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$

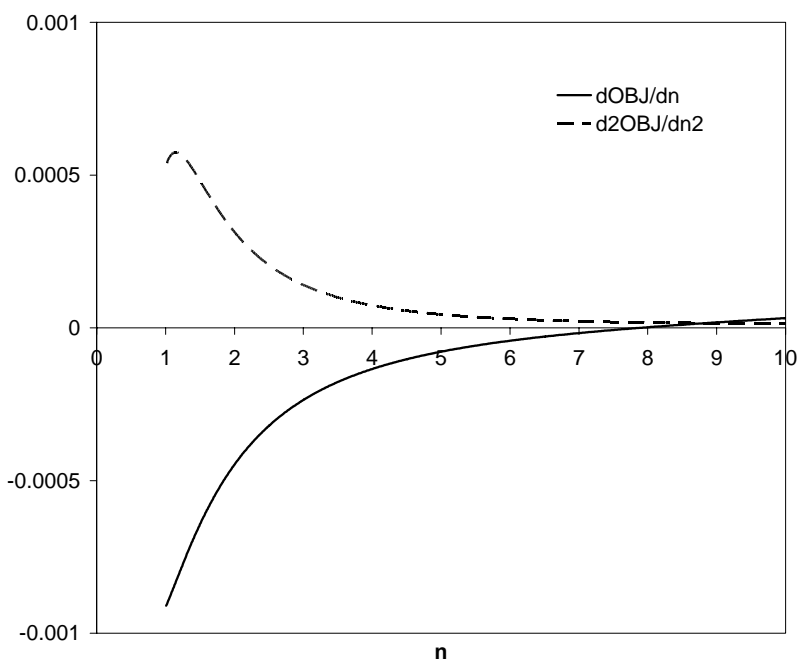


Figura 6-63. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P = 0.1 \text{ h}^{-1}$. $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$

En la Tabla 6-5 se resumen los tipos de curvas. Para productividades pequeñas, como el ejemplo de $P = 0.1 \text{ h}^{-1}$, la curva presenta un óptimo para valores de n superiores a la unidad. Para valores de productividad mayores (por ejemplo $P = 2 \text{ h}^{-1}$ y $P = 3 \text{ h}^{-1}$) la

función objetivo es estrictamente creciente, por lo que el mínimo se obtiene para $n=1$. Para los valores más altos, $P=3 \text{ h}^{-1}$, además, no existe ningún punto de inflexión en el dominio de la función.

Tabla 6-5. Tipos de curvas de consumo de enzima vs. número de usos de enzima. T=45 °C. Localización de óptimos en función de la productividad

Productividad	Mínimo	Máximo	Punto de inflexión
0.1	1	0	0
1.0	1	0	1
1.5	1	1	1
2.0	0	0	1
3.0	0	0	0

La localización del número óptimo de usos de enzima en función de la productividad se muestra en la Figura 6-64. En la Figura 6-64 se muestra la localización del óptimo para valores de productividad $0.5-1.6 \text{ h}^{-1}$. Se observa que el valor de la función E_T es mayor cuanto mayor es la productividad. Esto implica que cuanto menor es el tiempo total de operación mayor es el consumo de enzima para alcanzar igual productividad. Cuando menor es la productividad del reactor mayor es el número óptimo de usos de enzima, hasta alcanzar un máximo de 8 para la operación a 45 °C y valores de $P \leq 1.0$. Para el límite inferior representado en esta gráfica $P=0.5 \text{ h}^{-1}$, el número óptimo de usos de enzima es 8. La disminución en el valor de n_{opt} no es uniforme, sino que existe un salto brusco desde $n_{opt}=5$ a $n_{opt}=1$, sin pasar por los valores $n_{opt}=2,3$ y 4 . Para valores superiores a $P=1.59 \text{ h}^{-1}$, Tabla 6-6, la función E_T es mínima para $n=1$.

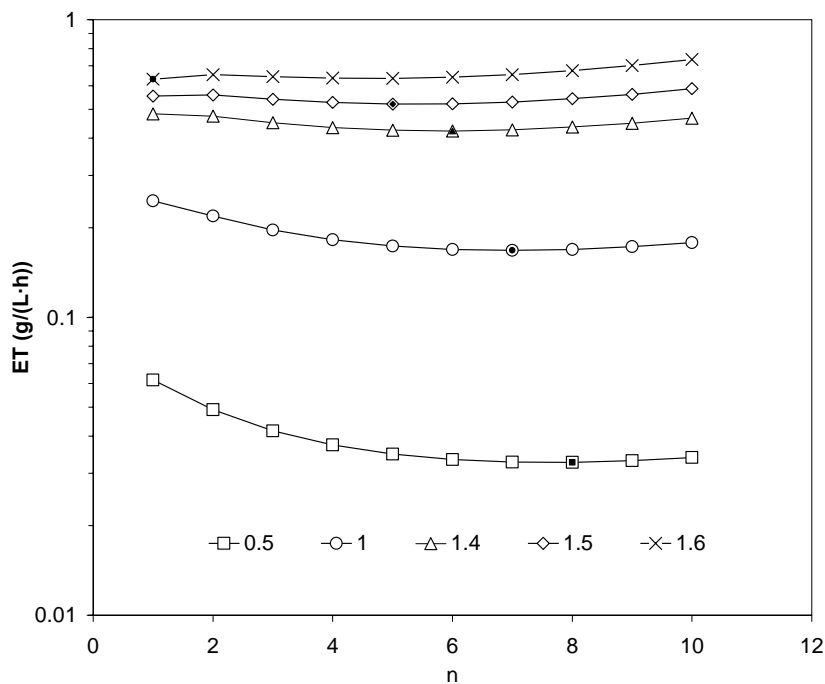


Figura 6-64. Consumo de enzima en función del número de usos de enzima (línea continua) y número óptimo de usos de enzima (●) en función de la productividad. T=45°C.

Los límites de productividad para los cuales existe un cambio en el número óptimo de usos de enzima se muestran en la Tabla 6-6. Si $P < 0.614 \text{ h}^{-1}$, el número óptimo de usos de enzima es 8 en todo caso, mientras que para $P > 1.614 \text{ h}^{-1}$, $n_{\text{opt}} = 1$. Si se comparan los valores de productividad correspondientes a los datos experimentales obtenidos (véase Figura 6-53), se observa que sólo en un punto se ha operado a productividad superior al límite de 1.591 h^{-1} , estando los puntos experimentales dentro de los límites de productividad que dan $n_{\text{opt}} > 1$.

Tabla 6-6. Límite de productividad para los que se da un cambio de n_{opt}

Productividad (h^{-1})	Cambio de n_{opt}
0.614	8-7
1.212	7-6
1.476	6-5
1.591	5-1

En la Figura 6-65 se representa en función de la productividad, el número óptimo de usos de enzima y el valor que toma la función objetivo para su n_{opt} correspondiente,

que se denota como E_{Tmin} . Se aprecia que el valor de E_{Tmin} aumenta progresivamente a medida que aumenta la productividad. También se pone claramente de manifiesto cómo la elección de la productividad del sistema determina el modo de operación óptimo para producir un hidrolizado. Es decir, en el caso de fijarse una productividad alta se requieren tiempos de operación cortos y, por consiguiente, una concentración de enzima elevada para alcanzar el grado de hidrólisis deseado de manera rápida. Empleando este modo de operación se consume mayor cantidad de enzima que si las productividades fijadas son menores. En estos casos, la cantidad de enzima a emplear es menor, a costa de necesitar un tiempo total de operación mayor para producir igual cantidad de hidrolizado. Es decir, el sistema permite operar con gran flexibilidad, puesto que en función de las necesidades de cada momento puede adaptarse su funcionamiento con el objetivo de acelerar la producción (valores de P altos) o bien minimizar el consumo (valores de P bajos).

Por otra parte, de acuerdo con la ecuación [6.19] existe un valor máximo de usos de enzima para cada temperatura. Ese valor máximo se representa en función de P y a 45 °C junto al número óptimo de usos de enzima en la Figura 6-66. Dicho máximo corresponde a la asíntota vertical que presenta la función E_T en su dominio y que depende de la productividad, tal como se describe en la ecuación [6.19]. Finalmente, cabe destacar que dicho valor máximo de usos de enzima llega a tomar el valor 1 para todo valor de productividad superior a 5.25 h^{-1} . Esto significa que no hay posibilidad de llevar a cabo un hidrólisis si se requiere tal productividad.

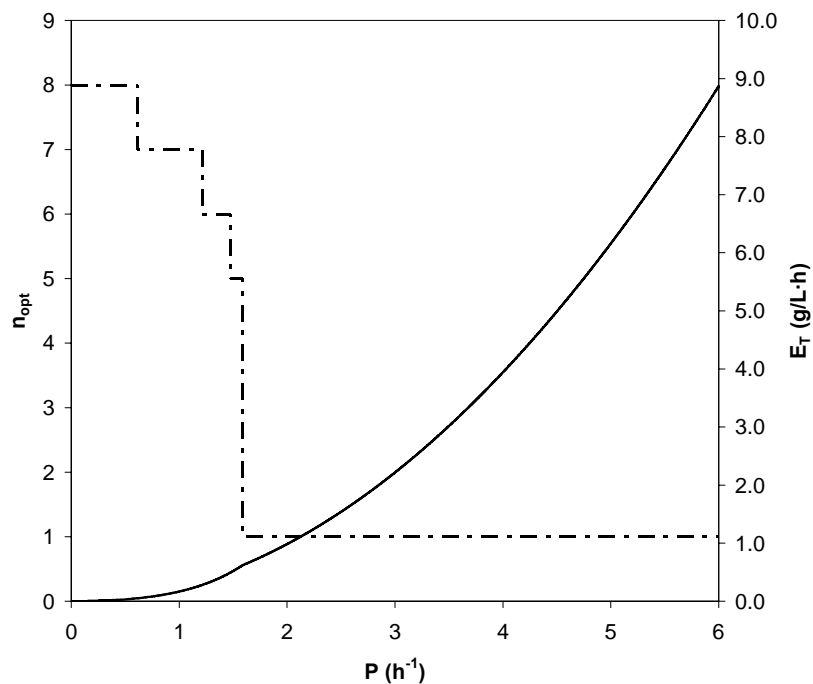


Figura 6-65. Número óptimo de usos de enzima (línea discontinua) y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$

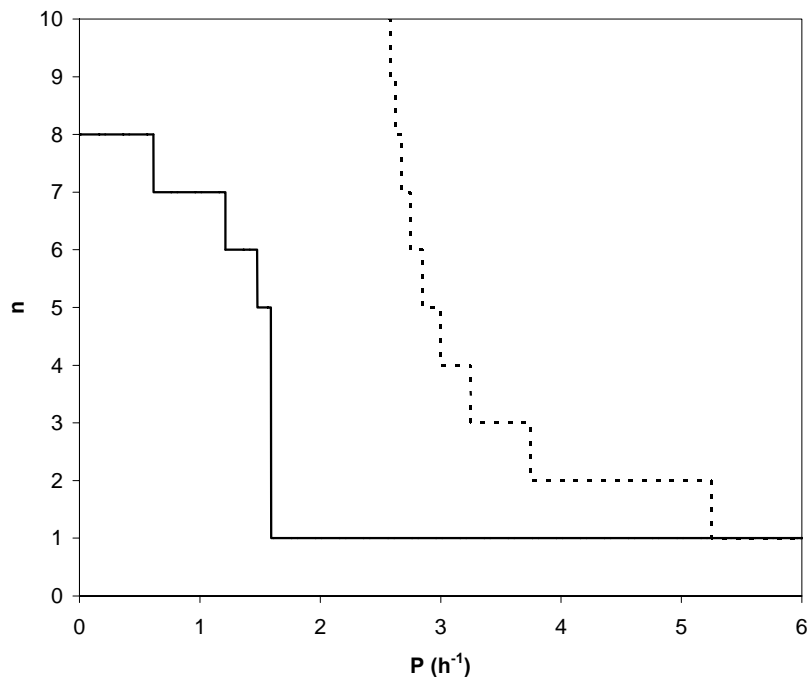


Figura 6-66. Número óptimo de usos de enzima (línea continua) y número máximo de usos de enzima (línea discontinua) en función de la productividad. $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$

Hasta el momento se ha descrito la operación del reactor discontinuo de membrana a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en función de la productividad pedida al reactor. Sin embargo, se debe establecer

un criterio objetivo para comparar el rendimiento de diferentes modos de operación. Así pues, se define el ahorro de enzima (AE) como:

$$AE = 1 - \frac{(E_T)_{n=n_{opt}}}{(E_T)_{n=1}} \quad [6.23]$$

Siendo:

- $(E_T)_{n=n_{opt}}$ el valor de la función objetivo para el número óptimo de usos de enzima a un valor de P dado.
- $(E_T)_{n=1}$ el valor de la función objetivo para un número de usos de enzima igual a 1.

El parámetro AE relaciona la cantidad de enzima ahorrada cuando se opera con el número óptimo de usos de enzima frente a la operación con un solo uso de enzima, es decir sin reutilización.

En la Figura 6-67 se representa el AE para la operación a 45 °C. Coherentemente con lo expuesto anteriormente, solamente se ahorra enzima en aquellos modos de operación dados por $n_{opt} > 1$. El ahorro máximo de enzima se obtiene a valores de $P < 0.614 \text{ h}^{-1}$, donde $n_{opt}=8$ y el ahorro de enzima llega al 58 %. Se puede apreciar que a medida que aumenta la productividad el AE disminuye hasta que el ahorro es nulo para $P > 1.591 \text{ h}^{-1}$.

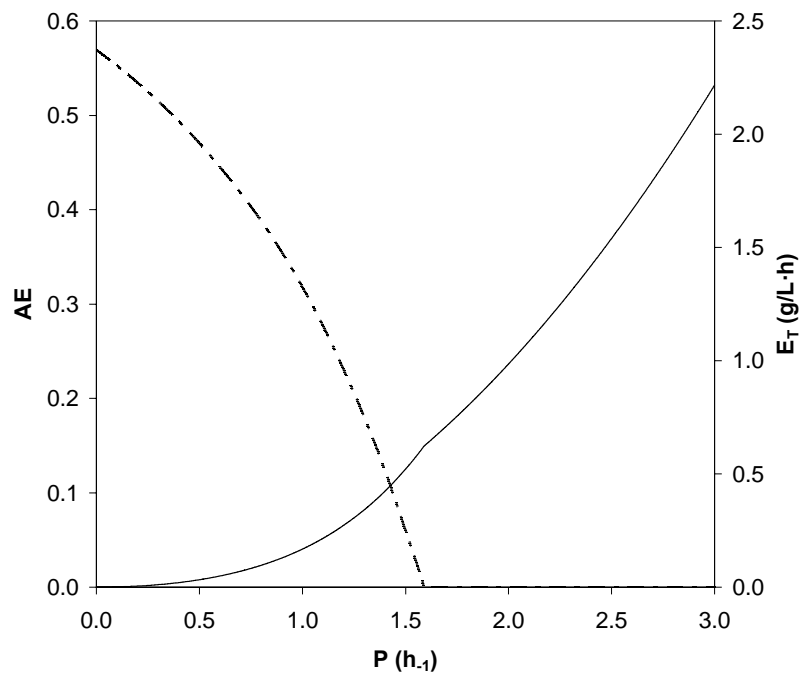


Figura 6-67. Ahorro de enzima (línea discontinua) frente a la operación por lotes y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. T=45 °C

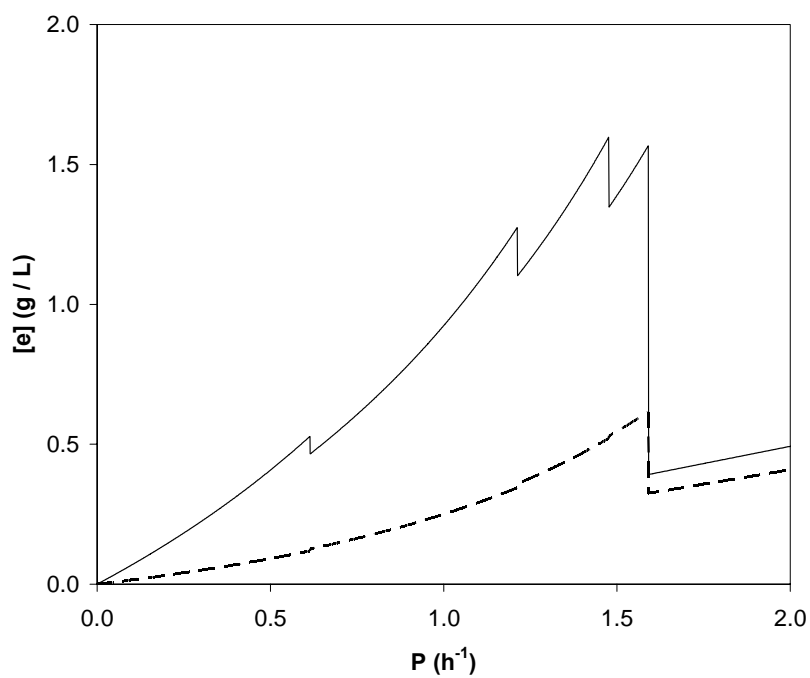


Figura 6-68. e₀, concentración inicial (línea continua) y e_n, concentración de enzima activa al final de la n-ésima hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. T=45 °C

Dado que la operación del sistema de reacción a diferentes productividades conlleva diferentes valores de E_T , esto es, del consumo de enzima; para cada valor de P existe una cantidad inicial de enzima a añadir. En la Figura 6-68 se representa la concentración inicial de enzima, e_0 y la concentración de enzima activa al final de la operación a 45 °C en función de la productividad. En la Figura 6-68 se aprecia que un aumento de productividad se consigue añadiendo una mayor cantidad de enzima al inicio de la operación. Para $P=1.591 \text{ h}^{-1}$ existe una discontinuidad en la relación entre e_0 y P . Dicha discontinuidad corresponde al cambio entre $n=2$ y $n=1$. En cuanto a la enzima activa al final de la operación (e_n) existen discontinuidades para valores de P que conllevan un cambio de n . Más ilustrativo que los valores de e_0 y e_n aislados es la relación entre ellos.

Así pues, se define la enzima sobrante como el cociente e_n/e_0 , es decir, la relación entre la concentración de enzima activa al final de las sucesivas hidrólisis, e_n , y la concentración de enzima inicial, e_0 . En la Figura 6-69 se representa la enzima sobrante al final de la operación del reactor a 45 °C. En dicha figura se aprecia que para valores de $P > 1.591 \text{ h}^{-1}$ ($n_{\text{opt}} = 1$) la enzima sobrante es 0.83, es decir, por cada gramo de enzima por litro de hidrolizado añadido al inicio de la operación, 0.83 g / L son desaprovechados. Un mayor número de utilizaciones de enzima siempre conlleva un mejor aprovechamiento de la enzima inicial añadida, por consiguiente, a medida que disminuye la productividad también lo hace la cantidad de enzima sobrante. No obstante, existe un valor límite coincidente con la existencia de un valor máximo de usos de enzima. En el caso de la operación a 45 °C, este máximo es 8 y la enzima sobrante para este caso es 0.22. Esta enzima activa al final de la operación debe eliminarse o desnaturalizarse térmicamente para que no permanezca activa en el producto.

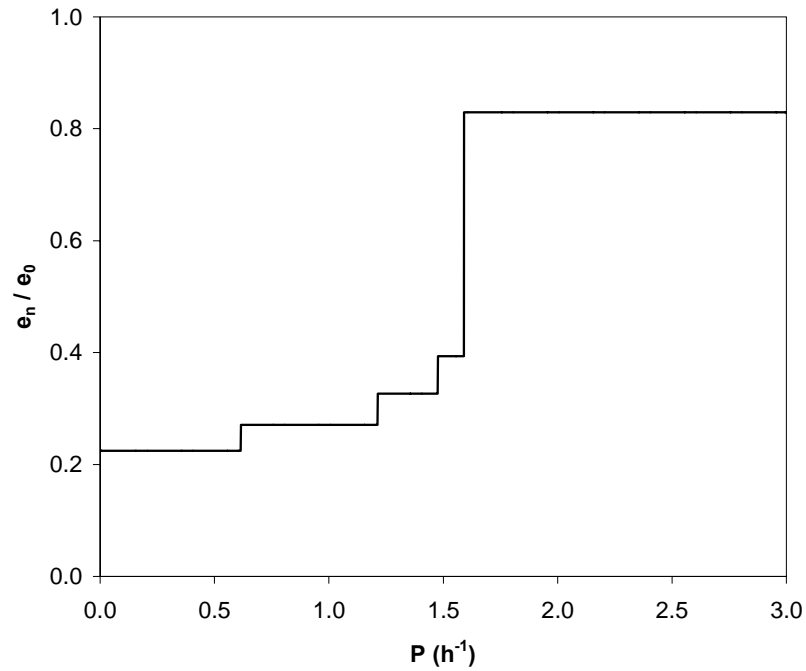


Figura 6-69. Enzima sobrante en función de la productividad. $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$

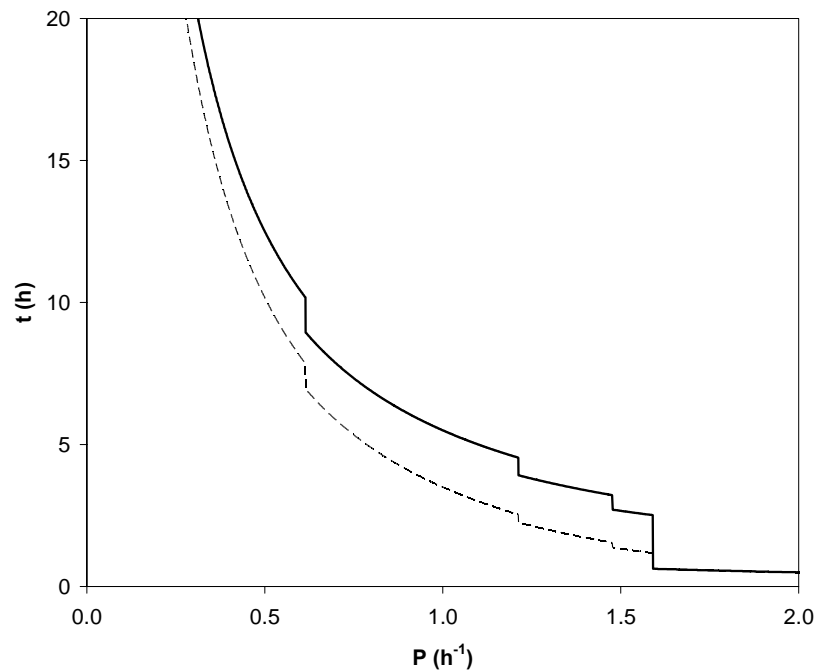


Figura 6-70. t_T , evolución del tiempo de operación (línea continua) y t_n , tiempo total de hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. $T=45^{\circ}\text{C}$.

También la distribución de los tiempos de operación está determinada por la productividad del reactor. Así, en la Figura 6-70 se representa la evolución del tiempo total de operación (t_T) y el tiempo de hidrólisis de n reacciones (t_n). Para valores de P

que conllevan el uso sucesivo de la enzima parte del tiempo de operación se consume en las filtraciones para la recuperación de la enzima, es por ello que si $P < 1.591 \text{ h}^{-1}$, entonces la curva de t_T frente a P no coincide con la curva de t_n frente a P .

En cuanto al tiempo de operación, en la Figura 6-71 se representa la relación t_n / t_T frente a la productividad. Este cociente equivale a la proporción que representa el tiempo de hidrólisis, t_n , sobre el tiempo total de operación, t_T .

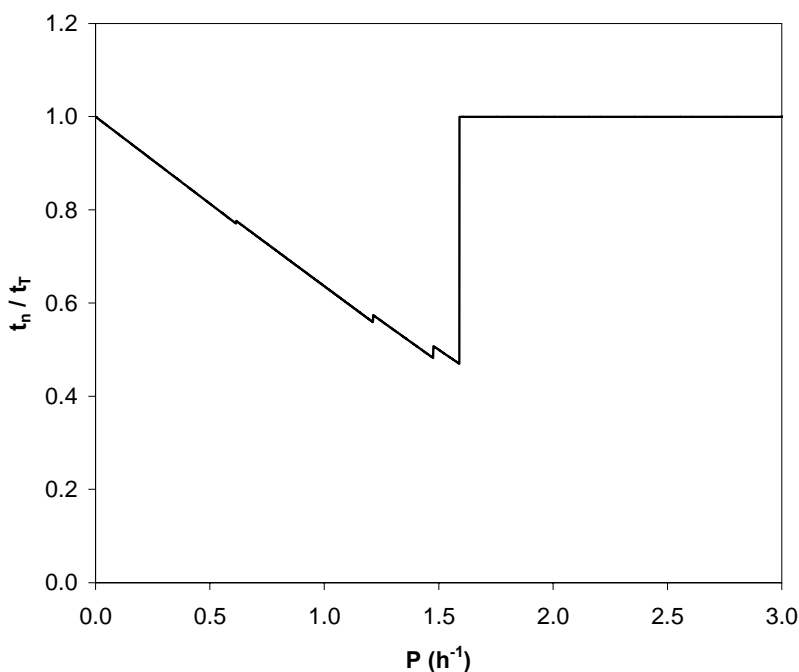


Figura 6-71. Relación entre tiempo total de hidrólisis y tiempo total de operación en función de la productividad. $T=45 \text{ }^\circ\text{C}$

Para $P > 1.591 \text{ h}^{-1}$, $t_n = t_T$. A valores de productividad cercanos a 1.5 se obtiene que la relación t_n / t_T es mínima, tomando un valor de 0.46. Si el reactor opera con productividad $< 1.5 \text{ h}^{-1}$, la proporción de tiempo dedicado a la hidrólisis aumenta considerablemente hasta llegar al límite: $\lim_{P \rightarrow 0} t_n / t_T = 1$.

Por último se puede concluir, según lo discutido para la operación a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, que el valor de productividad determina el modo de operación adecuado para el reactor discontinuo de membrana.

- Temperatura de operación 50°C.

El funcionamiento isoterma con una temperatura fijada a 50 °C se discute de forma análoga a lo visto para la operación a 45 °C. En la Figura 6-72, Figura 6-74, Figura 6-76, Figura 6-78 y Figura 6-80 se representa para distintos valores de P, el valor de la función objetivo frente al número de usos de enzima. Por otra parte, en las Figura 6-73, Figura 6-75, Figura 6-77, Figura 6-79 y Figura 6-81 se muestra la primera y segunda derivadas de E_T respecto a n.

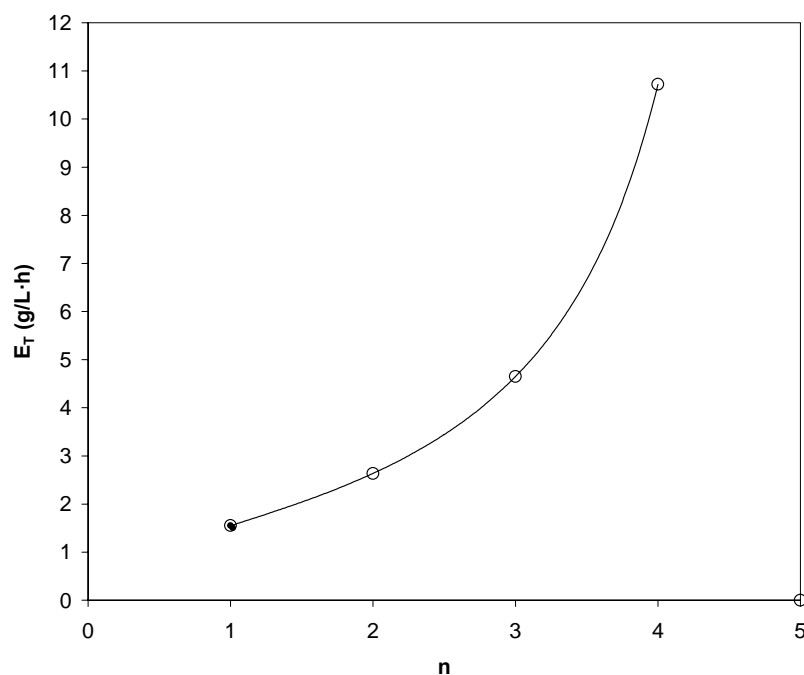


Figura 6-72. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 3 \text{ h}^{-1}$. $T = 50 \text{ °C}$

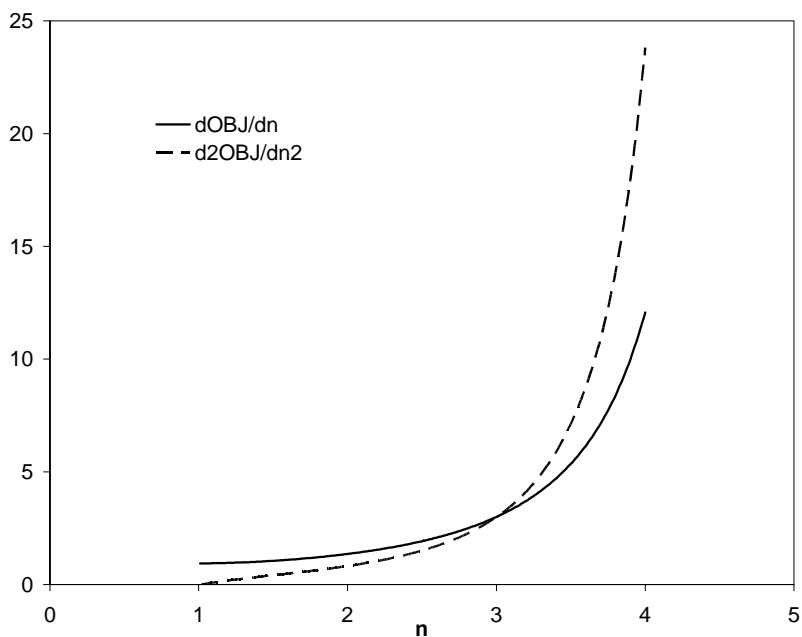


Figura 6-73. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=3 \text{ h}^{-1}$. $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$.

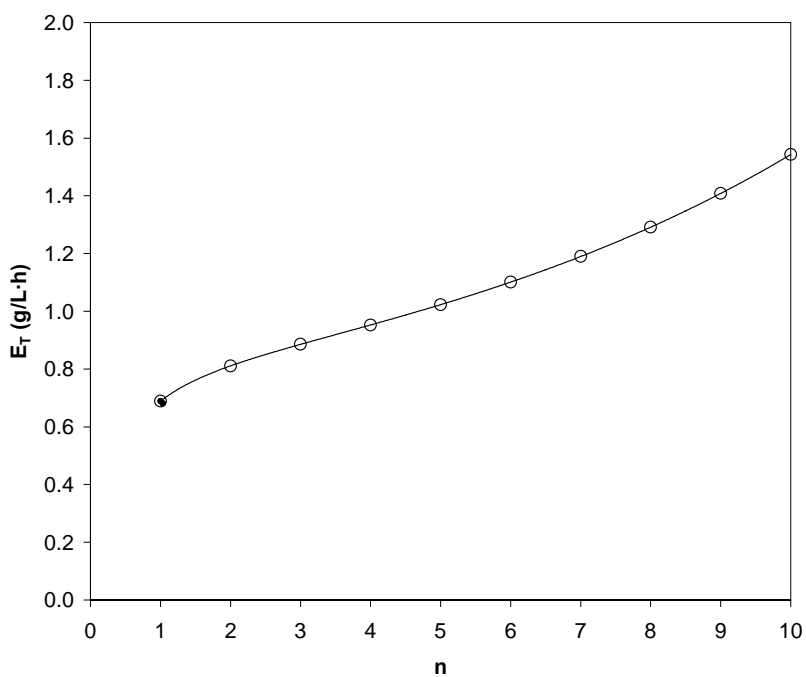


Figura 6-74. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 2 \text{ h}^{-1}$. $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$

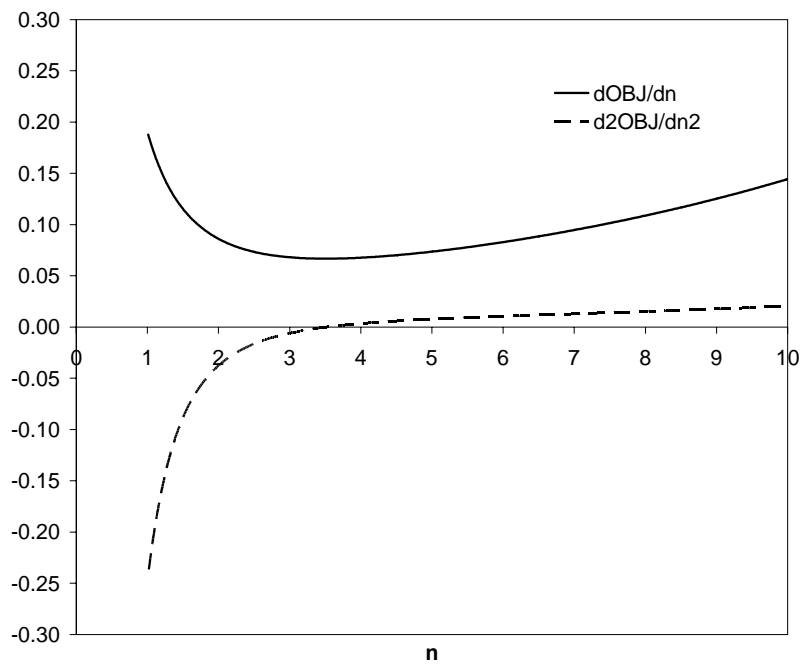


Figura 6-75. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. T=50 °C.

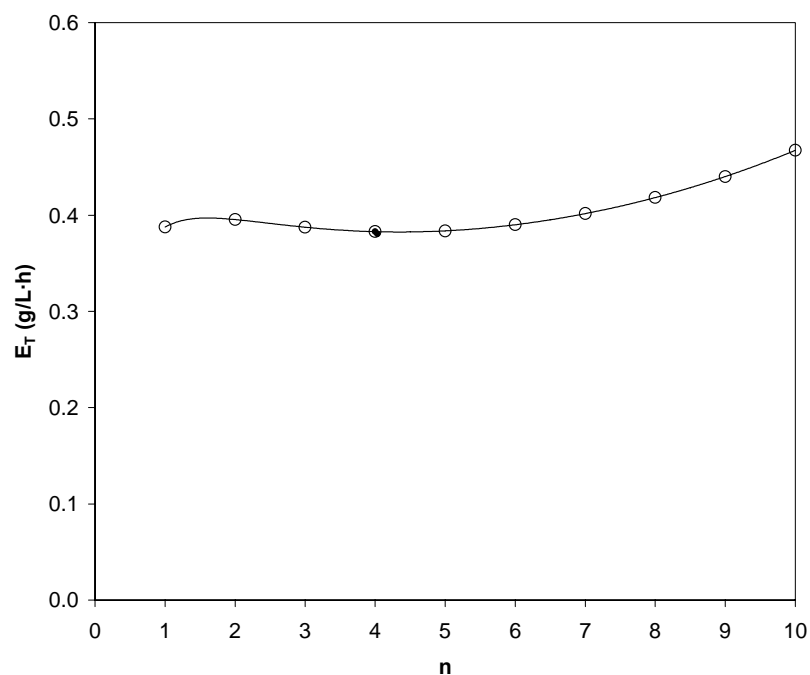


Figura 6-76. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. P =1.5 h⁻¹. T=50 °C

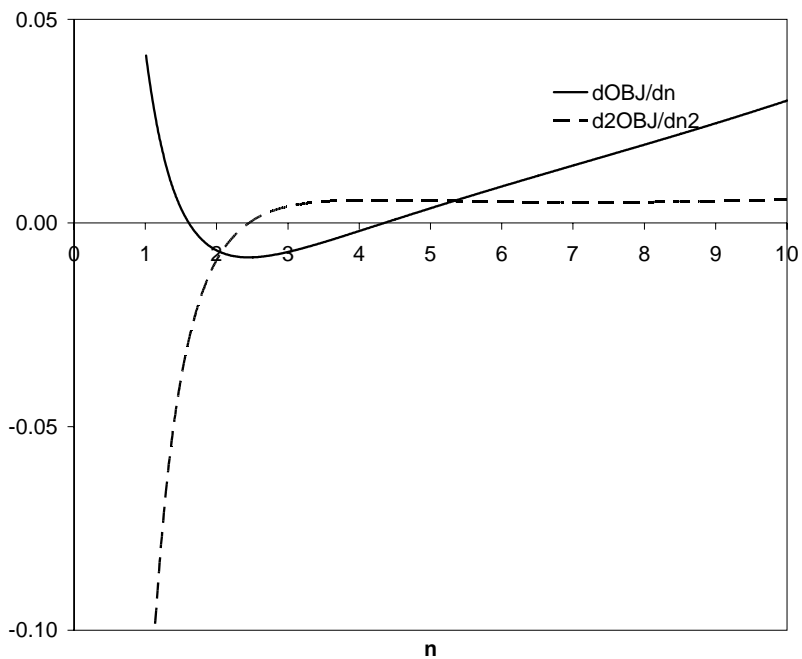


Figura 6-77. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=1.5 \text{ h}^{-1}$. $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$.

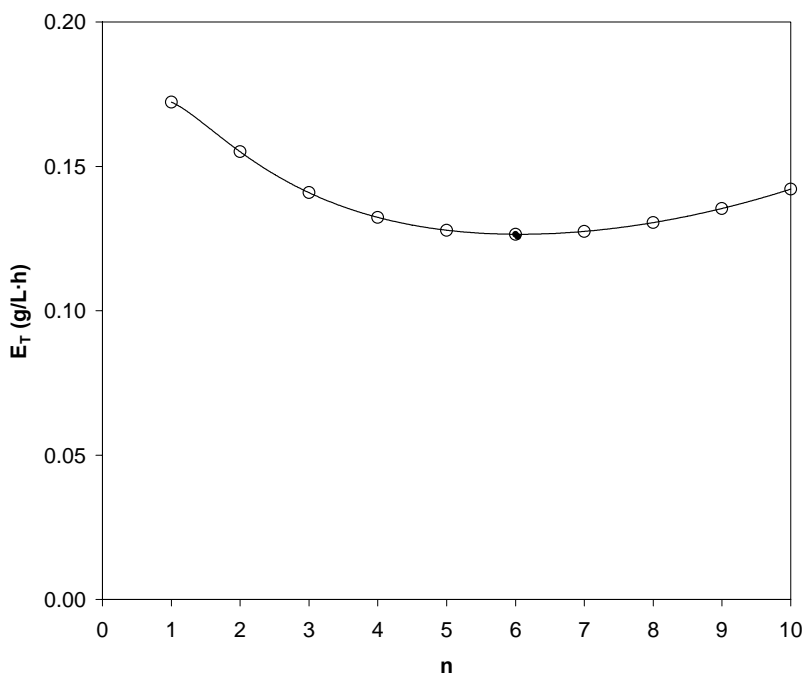


Figura 6-78. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$

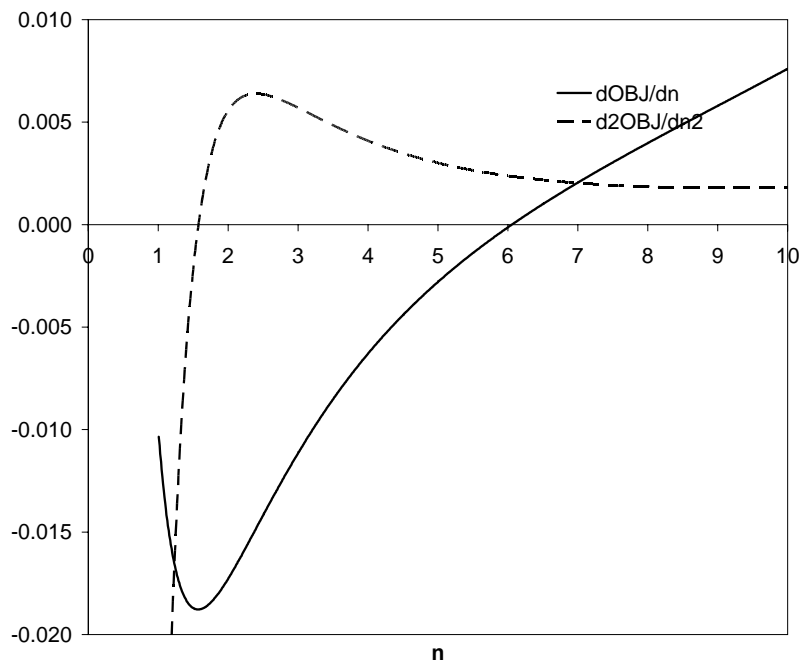


Figura 6-79. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$.

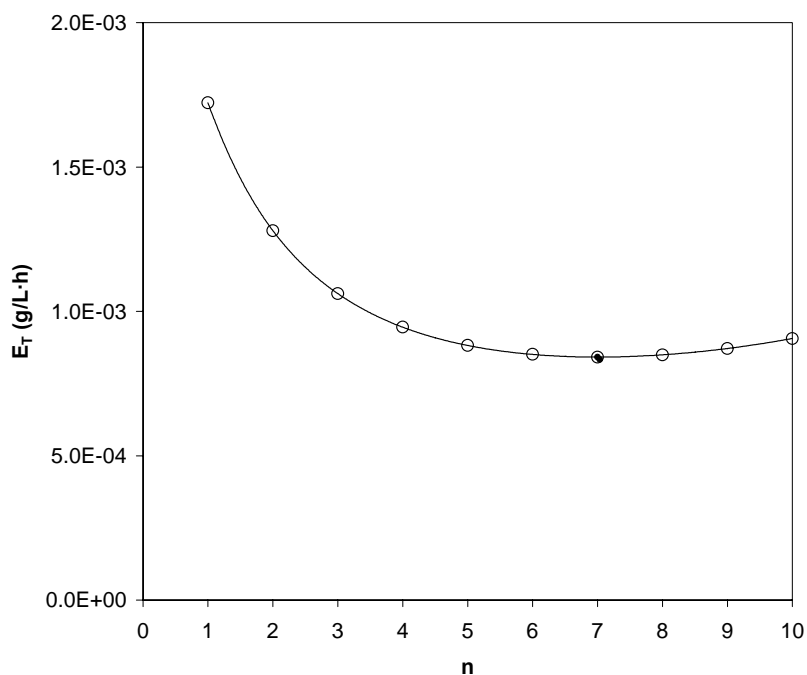


Figura 6-80. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P=0.1 \text{ h}^{-1}$. $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$

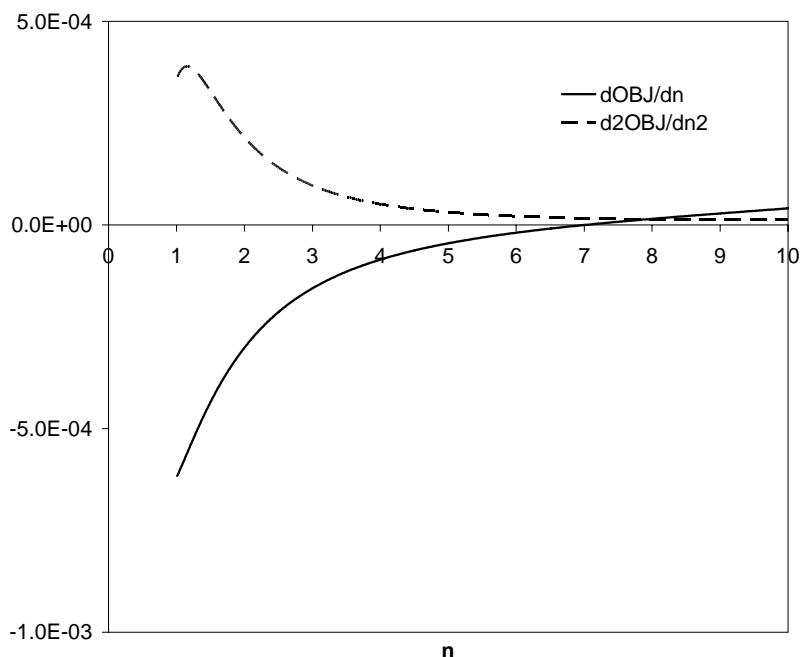


Figura 6-81. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=0.1 \text{ h}^{-1}$. $T=50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para $P = 3 \text{ h}^{-1}$, Figura 6-72, la función E_T está definida para valores de n en el intervalo 1-4 y no existen óptimos locales ni puntos de inflexión en el dominio de E_T (como puede verse en su correspondiente representación de las derivadas de E_T respecto a n , Figura 6-73). El número óptimo de usos de enzima para la operación a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y $P=3 \text{ h}^{-1}$ es 1.

A medida que disminuye la productividad del sistema se aprecia que la forma de la curva E_T frente a n cambia. Este cambio implica la existencia de óptimos en la función (por tanto, $n_{opt}>1$) y de puntos de inflexión. Así, para $P=2 \text{ h}^{-1}$ (Figura 6-74) se aprecia un cambio en la concavidad de la función, confirmado por la derivada segunda que se hace igual a cero para $n=3$ (Figura 6-75). La primera derivada de E_T respecto a n no se anula y toma valores positivos en todo el dominio, por lo que la función objetivo es estrictamente creciente y por tanto el modo óptimo de operación viene dado por $n_{opt}=1$. En el caso de $P=1.5 \text{ h}^{-1}$ (Figura 6-76 y Figura 6-77), existe un número óptimo de usos de enzima mayor de 1, en particular, $n_{opt}=4$. La existencia de este mínimo se confirma en el estudio de la primera derivada Figura 6-77, ya que esta se anula para $n=4$. En este caso, la primera derivada también se anula en el intervalo de n 1-2, sin embargo, se trata de un máximo local y no de un óptimo de producción. Además, en el intervalo de

n 2-3 se confirma un cambio en la tendencia de la función E_T dado por un punto de inflexión (segunda derivada igual a cero, Figura 6-77).

En la operación con productividad entre $0.1-1.5 \text{ h}^{-1}$ existe un mínimo con $n_{\text{opt}} > 1$, la función E_T presenta máximo local y puntos de inflexión. En el caso de $P=0.1 \text{ h}^{-1}$, el número óptimo de usos de enzima que se obtiene es 7. A modo de resumen, en la Tabla 6-7 se muestra la evolución de la función E_T frente a n con los diferentes tipos de curvas E_T / n para diferentes valores de productividad en la operación a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla 6-7. Tipos de curvas de consumo de enzima vs. número de usos de enzima. T=50 °C. Localización de óptimos en función de la productividad

Productividad	Mínimo	Máximo	Punto de inflexión
0.1	1	0	0
1.0	1	0	1
1.5	1	1	1
2.0	0	0	1
3.0	0	0	0

En la Figura 6-82 se representa conjuntamente la variación del número de usos de enzima y E_T a medida que lo hace la productividad en diferentes rangos de P . Se puede comprobar que para valores de productividad menores de 1.6 h^{-1} existe un valor $n_{\text{opt}} > 1$, mientras que por encima, la función E_T es creciente en todo el dominio, por lo que $n_{\text{opt}} = 1$.

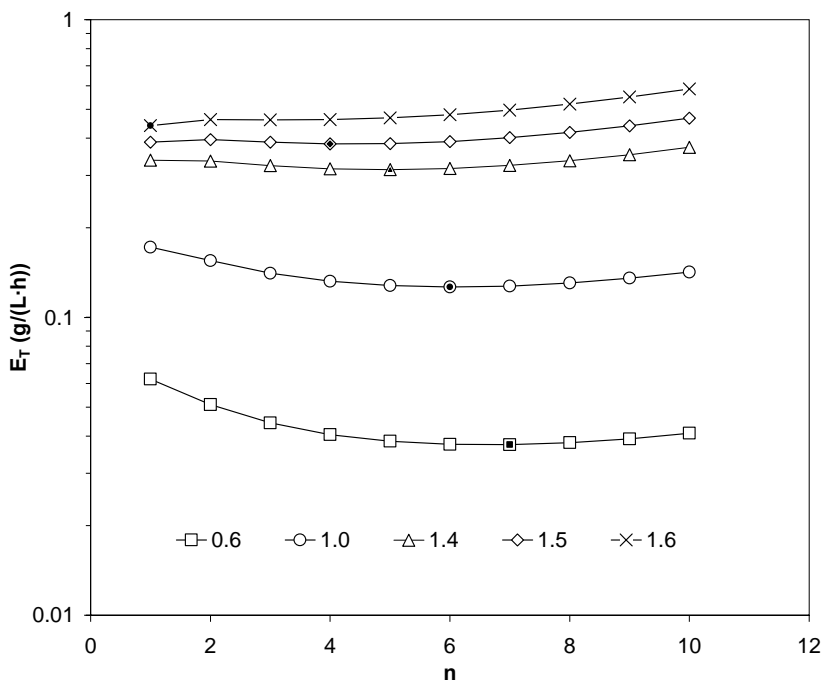


Figura 6-82. Consumo de enzima en función del número de usos de enzima (línea continua) y número óptimo de usos de enzima (●) en función de la productividad. T=50 °C

En cuanto al consumo de enzima en cada operación, éste viene dado por el valor de E_T en gramos de enzima añadida por litro de hidrolizado y hora de operación, que aumenta considerablemente a medida que crece la productividad. Por ejemplo, para un número de usos de enzima de 3 la productividad aumenta de 0.04 hasta 0.14. Para valores más altos de productividad el consumo de enzima dado por E_T es elevadísimo, de hecho, para una operación a 50 °C con $P = 4 \text{ h}^{-1}$ y $n_{op\ t} = 1$, se obtiene que $E_T = 2.76 \text{ g/(L·h)}$ en un tiempo total de operación de 0.29 h. Esto supone una concentración inicial de enzima de 0.69 g/L, elevada en comparación con las concentraciones habitualmente empleadas en la hidrólisis de proteínas.

Los resultados obtenidos a 50 °C se sintetizan en la Figura 6-83, donde se representa el n_{opt} y el valor de la función E_T en ese punto (E_{Tmin}) frente a la productividad del reactor. Se observa claramente cómo la elección de la productividad determina el modo de operación óptimo. Por otra parte, de acuerdo con la ecuación [6.19] existe un valor máximo de número de usos de enzima para cada temperatura. Ese valor máximo para 50 °C se representa en función de P junto al número óptimo de usos de enzima en la Figura 6-84. Dicho máximo corresponde a la asíntota vertical que presenta la

función E_T en su dominio y que depende de la productividad del reactor, tal como se describe en la ecuación [6.19]. Al igual que para la temperatura de 45 °C, por encima de la $P_c = 2.25 \text{ h}^{-1}$, existe un número máximo de usos de enzima, mientras que por debajo de dicho límite no existe dicho máximo. También de manera análoga a la operación a 45 °C, a una $P > 5.25 \text{ h}^{-1}$, $n_{\max} = 1$. Por otra parte, para todos los valores de P menores de 0.704 h^{-1} no existe un número óptimo de usos de enzima mayor de 1 (Tabla 6-8) y, de acuerdo a la Figura 6-83, se obtiene un número de usos de enzima de 7 para valores de $P < 1.52 \text{ h}^{-1}$.

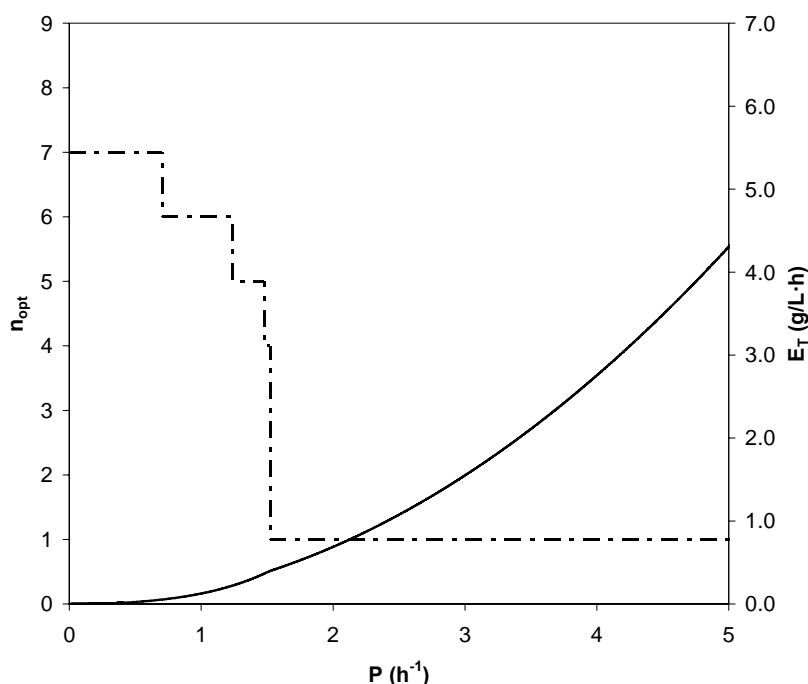


Figura 6-83. Número óptimo de usos de enzima (línea discontinua) y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad $T=50 \text{ °C}$

Tabla 6-8. Límite de productividad para los que se da un cambio de n_{opt} . $T=50 \text{ °C}$

Productividad (h^{-1})	Cambio de n_{opt}
1.522	7-6
1.477	6-5
1.238	5-4
0.704	4-1

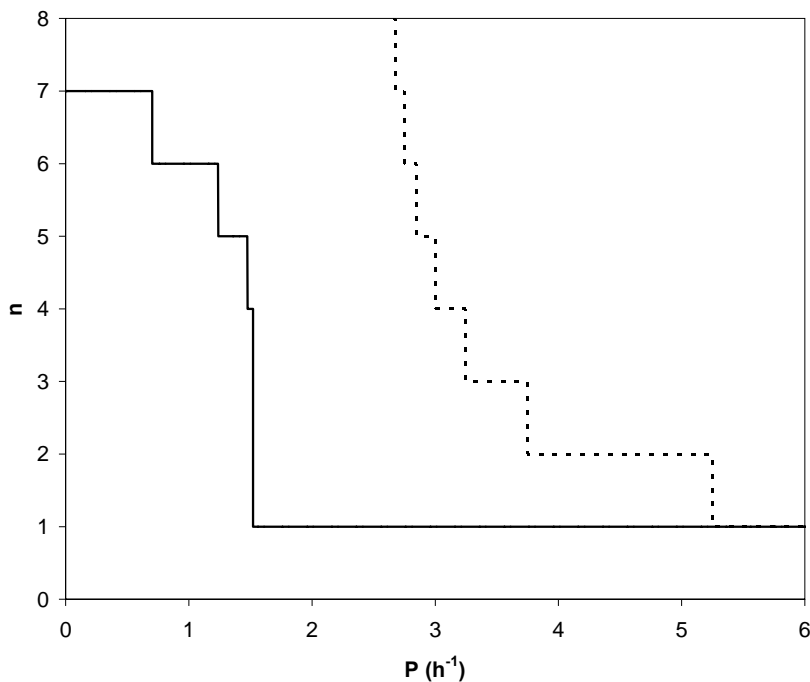


Figura 6-84. Número óptimo de usos de enzima (línea continua) y número máximo de usos de enzima (línea discontinua) en función de la productividad. T=50 °C

En cuanto al ahorro de enzima del sistema respecto a la operación de un reactor tanque agitado por cargas, existe un ahorro mayor de cero para valores de productividad menores de 1.52. Para $P > 1.522 \text{ h}^{-1}$, el número óptimo de usos de enzima es 1 y, por consiguiente, no existe ahorro. En la Figura 6-85 se representa el ahorro de enzima del sistema en función de su productividad. En el límite: $\lim_{P \rightarrow 0} AE = 0.52$. Este es el máximo ahorro posible. En este caso, el ahorro de enzima logrado en la operación del reactor a 50 °C es menor que en el caso de 45 °C (0.52 frente a 0.58, respectivamente). No obstante, esto no permite concluir que la operación a 45 °C supone mejorar la operación frente a 50 °C: sólo la comparación de la función E_T a igual productividad para ambas temperaturas es concluyente.

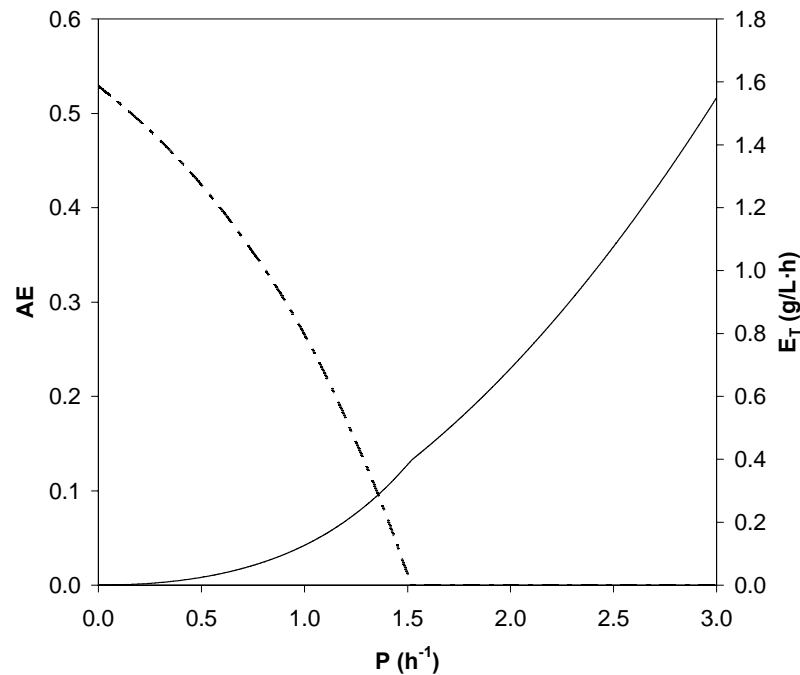


Figura 6-85. Ahorro de enzima (línea discontinua) frente a la operación por lotes y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. $T=50^{\circ}C$

En la Figura 6-86 se representan los valores de concentración inicial y final de enzima en función de productividad. Para e_n se aprecian similares discontinuidades que para $45^{\circ}C$, aunque a valores de P diferentes. En la Figura 6-87 se representa el porcentaje de enzima activa en función de la productividad. Los valores de enzima sobrante varían entre 0.21 y 0.80. El primer caso corresponde a $P < 0.33 h^{-1}$, para el que $n_{opt}=7$ (máximo número óptimo de usos de enzima). Por el contrario, el valor 0.80 se corresponde al funcionamiento con $n_{opt}=1$.

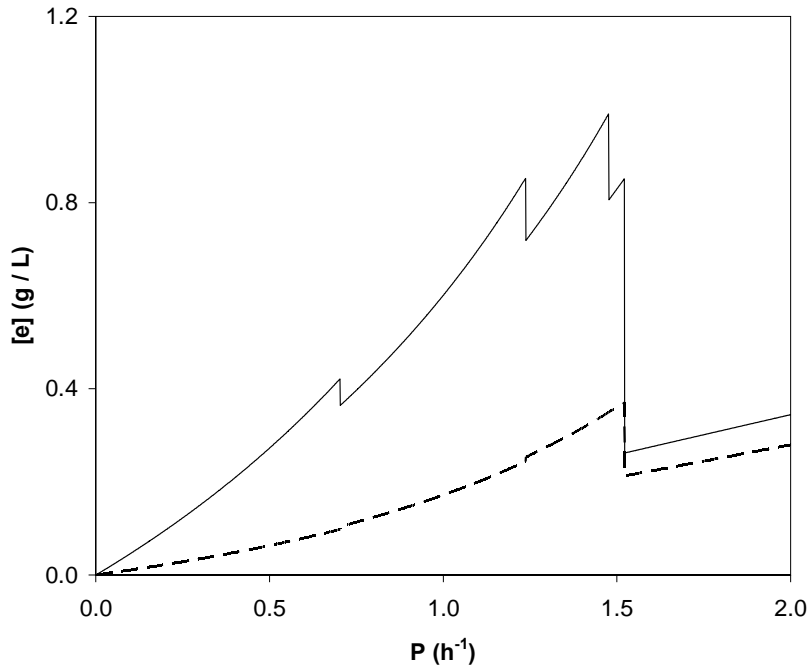


Figura 6-86. e_0 , concentración inicial (línea continua) y e_n , final de enzima (línea discontinua) en función de la productividad. $T=50\text{ }^\circ\text{C}$

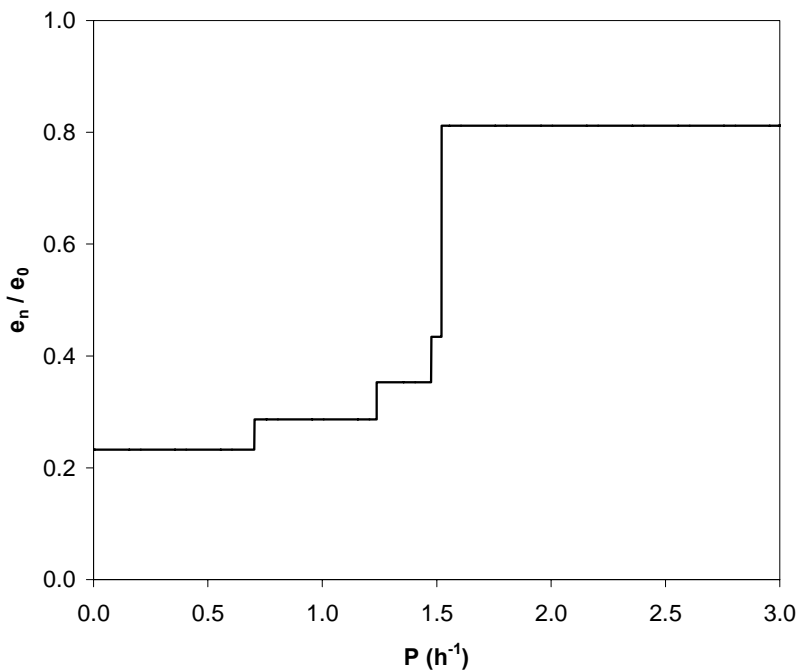


Figura 6-87. Enzima sobrante (e_n/e_0) en función de la productividad. $T=50\text{ }^\circ\text{C}$

En cuanto al tiempo de operación, en las Figura 6-88 y Figura 6-89 se representan la evolución de los tiempos de operación (total y de hidrólisis) y la relación t_n/t_T . En la primera de ellas puede observarse que el tiempo empleado en hidrólisis es menor en el

reactor cuanto menor es el número de usos de enzima, es decir, cuanto menor es P . Este comportamiento es análogo al de la operación a 45 °C.

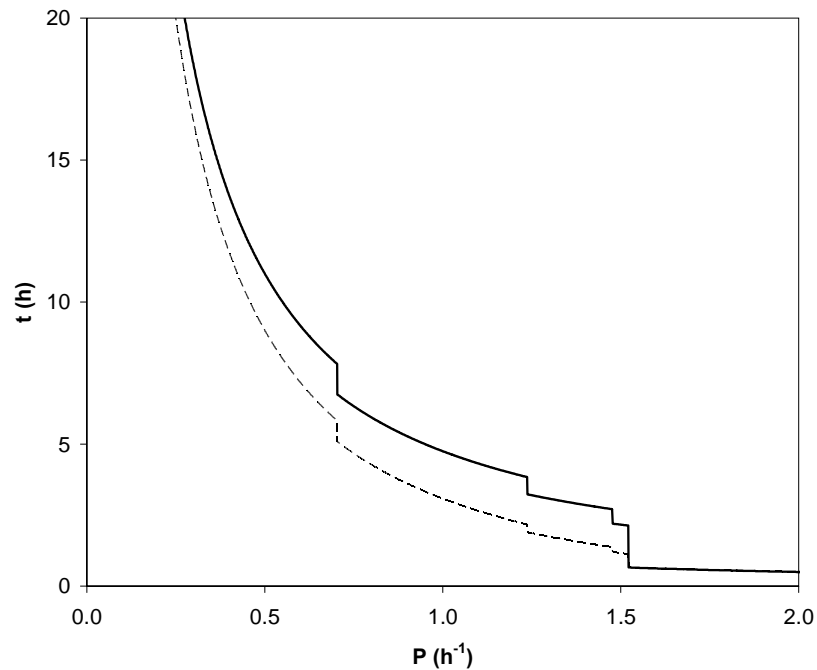


Figura 6-88. t_T , evolución del tiempo de operación (línea continua) y t_n , tiempo total de hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. $T=50$ °C.

Por último, en la Figura 6-89 se representa la relación t_n / t_T frente a la productividad. Como ya se ha indicado, este cociente equivale a la proporción que representa el tiempo de hidrólisis, t_n , sobre el tiempo total de operación, t_T . Para valores de $P > 1.522$ h^{-1} el cociente toma el valor 1, puesto que en este caso, $n_{opt}=1$, y no se recupera la enzima mediante ultrafiltración. Para valores de productividad cercanos a 1.48 se obtiene que la relación t_n / t_T es mínima, tomando un valor de 0.51. Si el sistema opera con productividad < 1.522 h^{-1} , la proporción de tiempo dedicado a la hidrólisis aumenta considerablemente con un límite: $\lim_{P \rightarrow 0} t_n / t_T = 1$. Es decir, cuando P tiende a cero el tiempo de hidrólisis, t_n , aumenta. En definitiva, el cociente t_n / t_T tiende a 1 sin llegar a alcanzar este valor, puesto que se debe considerar el tiempo de las $n-1$ filtraciones incluidas en la operación del reactor.

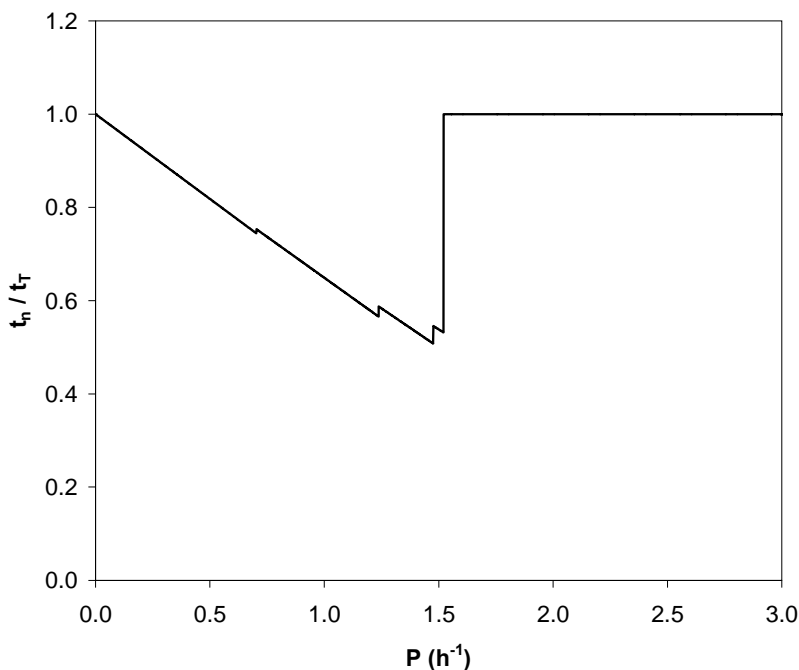


Figura 6-89. Relación entre tiempo total de hidrólisis y tiempo total de operación en función de la productividad. T=50 °C

- Temperatura de operación 55°C

Los resultados obtenidos en el funcionamiento del reactor a 55 °C se muestran a continuación en las Figura 6-90-Figura 6-107. Dado que las tendencias generales son similares a las observadas para la operación a 45 °C y 50 °C, se comentarán estos resultados con mayor brevedad. Tras la exposición del resto de temperaturas de operación se procederá a comparar los resultados más destacados de cada una de ellas.

En las Figura 6-90, Figura 6-92, Figura 6-94, Figura 6-96 y Figura 6-98 se representa el valor de la función objetivo frente al número de usos de enzima. En dichas figuras se aprecia que la forma de la curva E_T frente a n es similar a los tipos de curvas obtenidos para 45 °C y 50 °C (véanse Tabla 6-5 y Tabla 6-5). Por otra parte, en las Figura 6-91, Figura 6-93, Figura 6-95, Figura 6-97 y Figura 6-99 se representa la primera y segunda derivadas de E_T respecto a n .

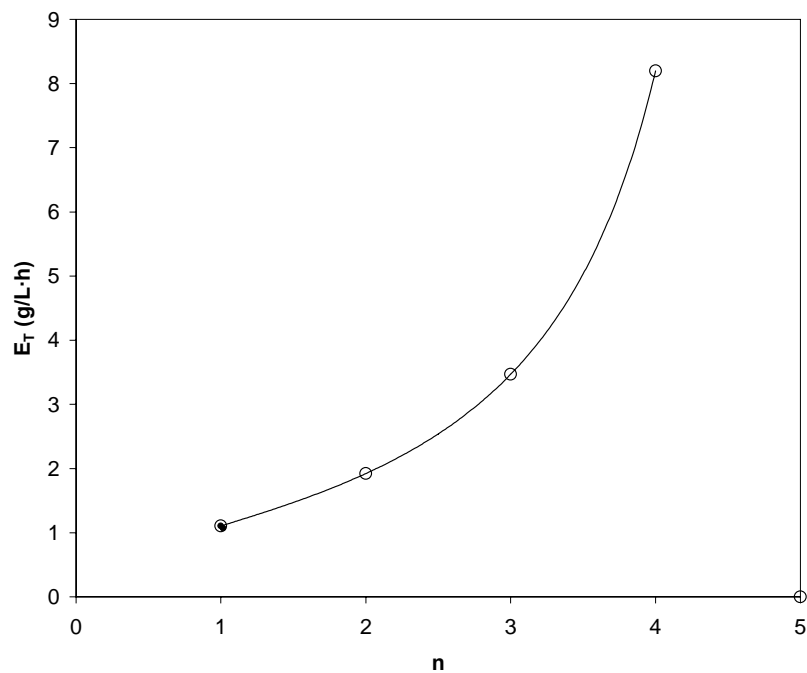


Figura 6-90. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 3 \text{ h}^{-1}$. $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$

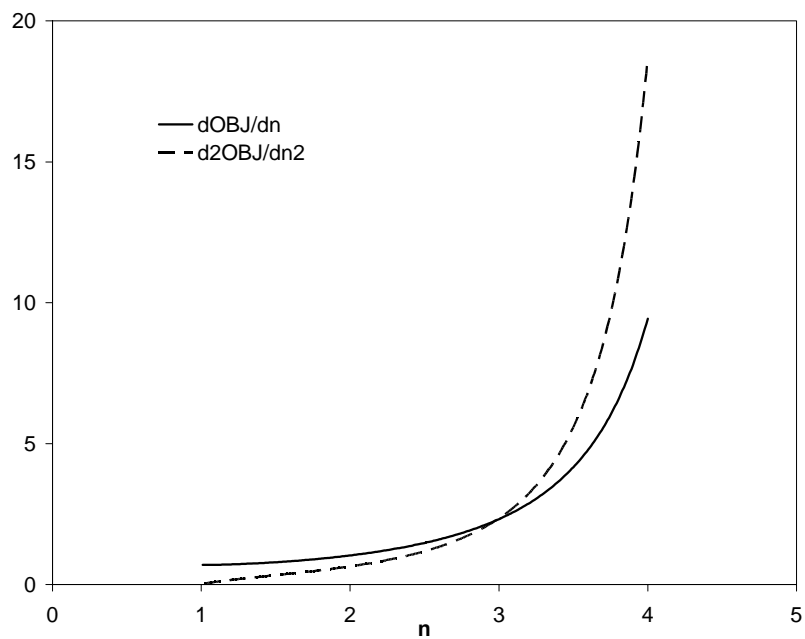


Figura 6-91. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P = 3 \text{ h}^{-1}$. $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.

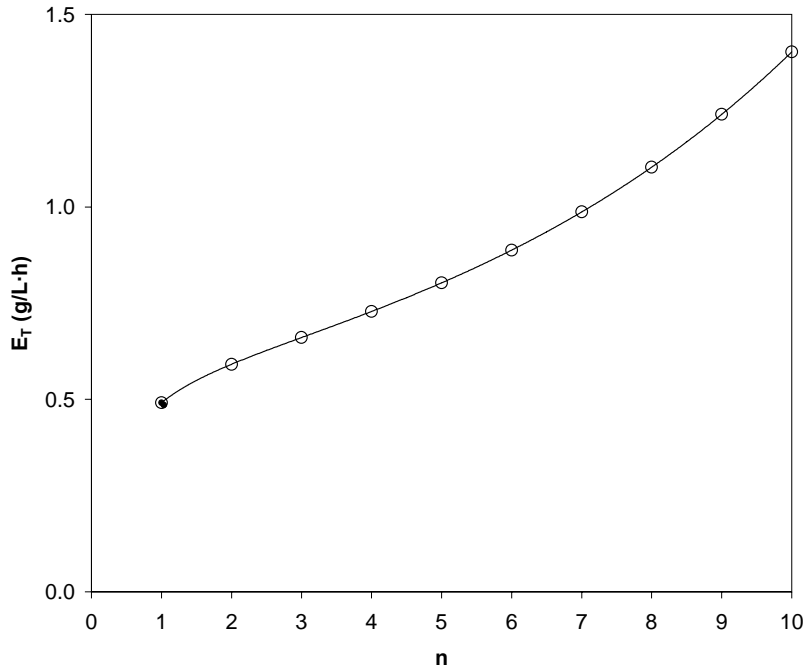


Figura 6-92. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 2 \text{ h}^{-1}$. $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$

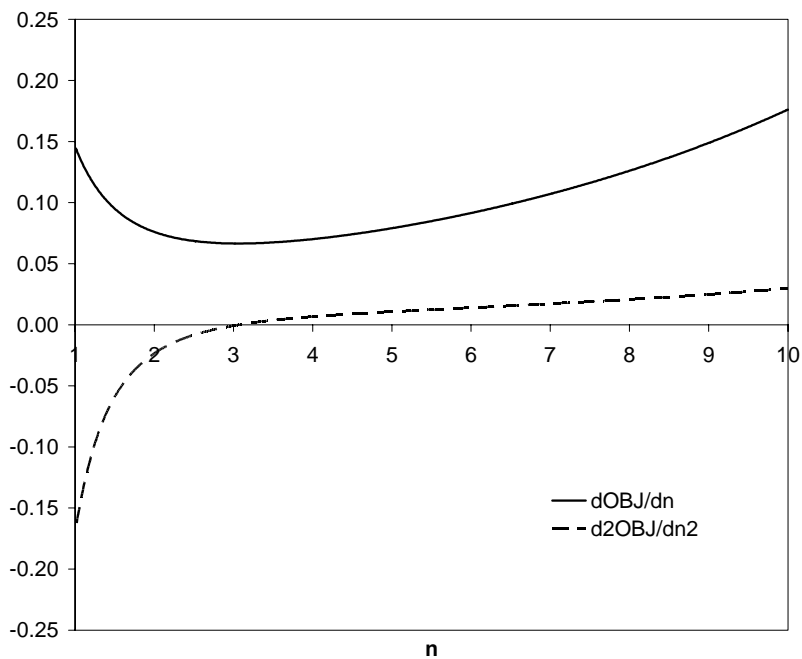


Figura 6-93. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P = 2 \text{ h}^{-1}$. $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.

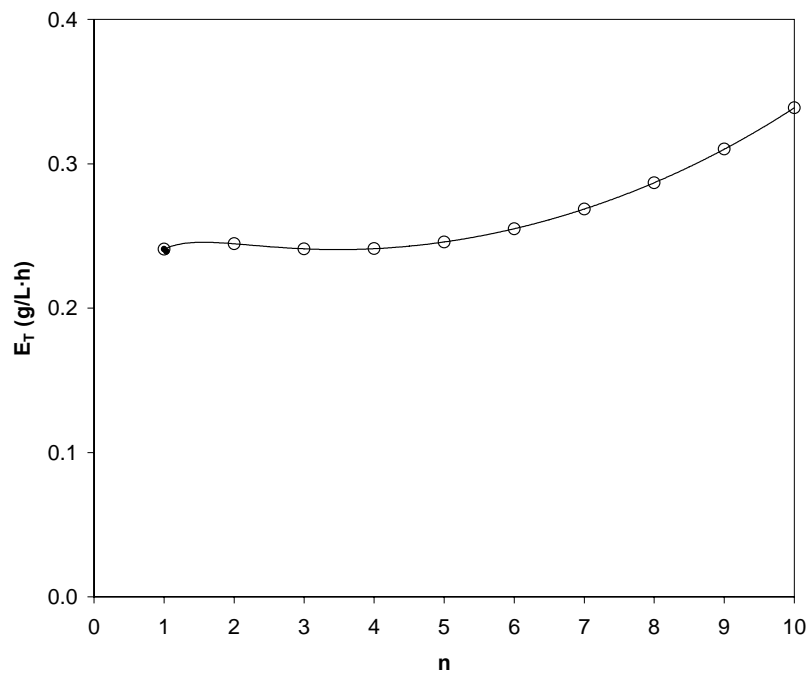


Figura 6-94. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.4 \text{ h}^{-1}$. $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$

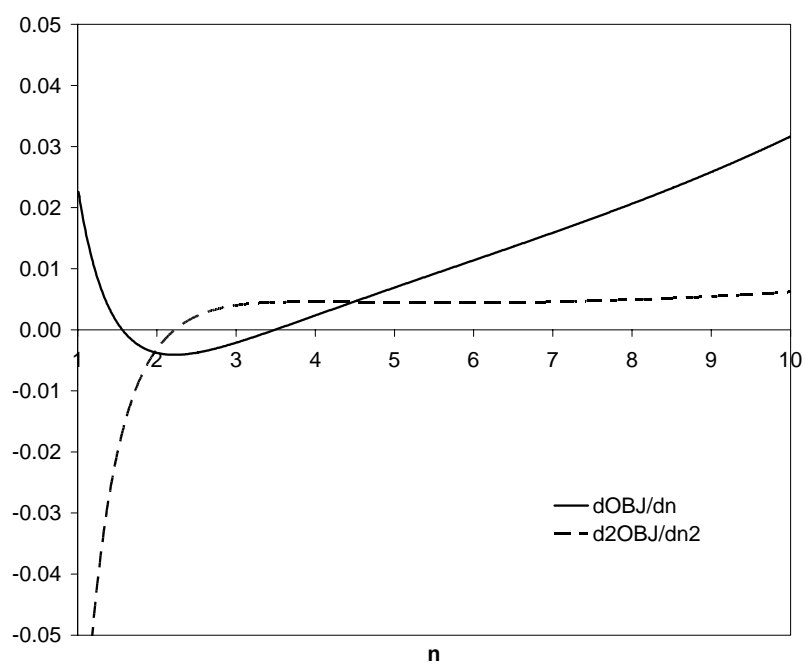


Figura 6-95. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P = 1.4 \text{ h}^{-1}$. $T = 55^\circ\text{C}$.

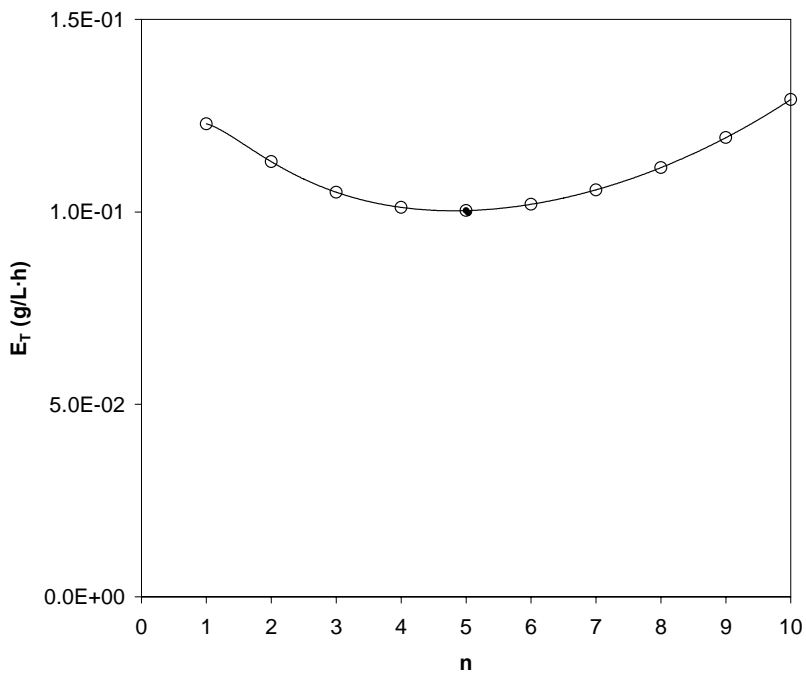


Figura 6-96. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.0 \text{ h}^{-1}$. $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$

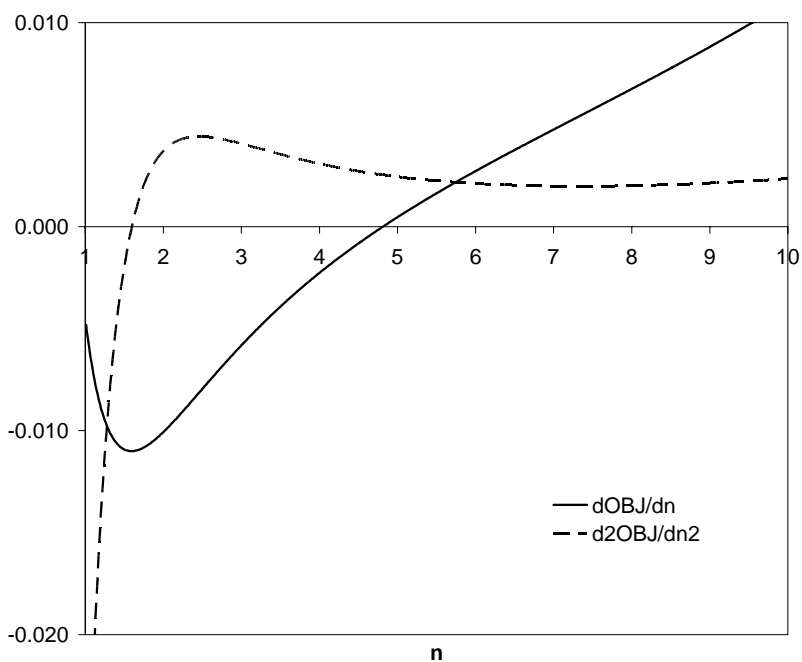


Figura 6-97. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P = 1.0 \text{ h}^{-1}$. $T = 55^\circ\text{C}$.

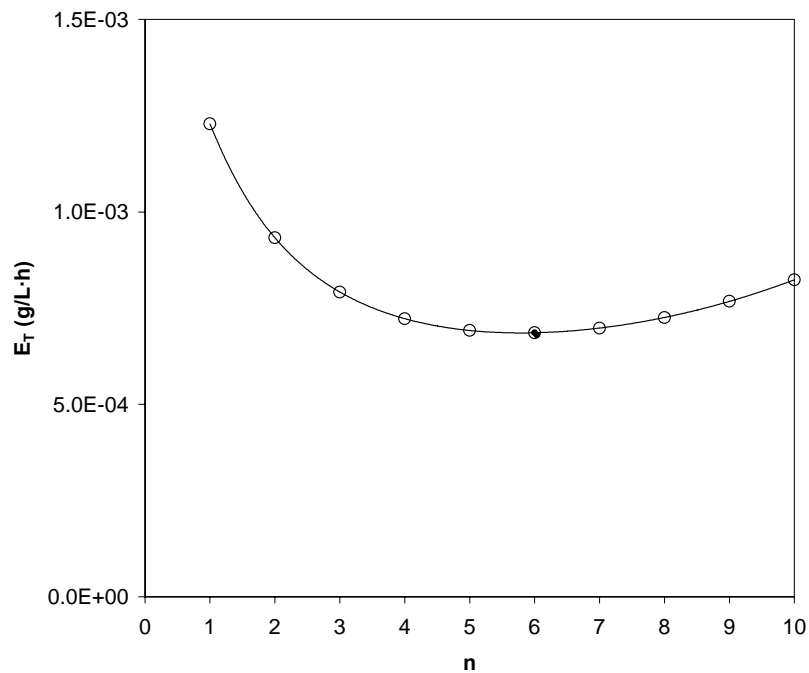


Figura 6-98. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 0.1 \text{ h}^{-1}$. $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$

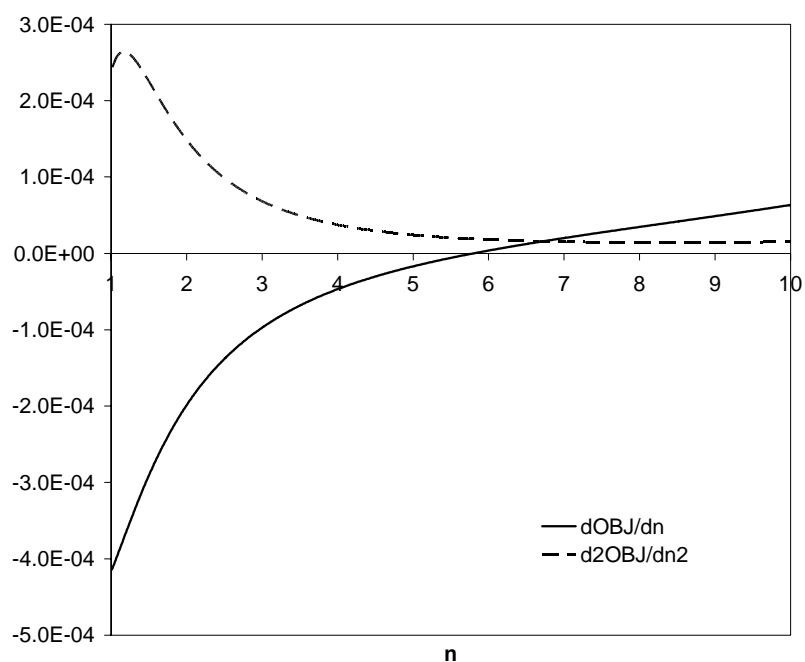


Figura 6-99. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P = 0.1 \text{ h}^{-1}$. $T = 55^\circ\text{C}$.

Como puede observarse, para $P = 3 \text{ h}^{-1}$ (figura 6-94), la función E_T está definida para valores de n en el intervalo 1-4 y no existen óptimos locales ni puntos de inflexión en

el dominio de la función E_T (como puede verse en su correspondiente representación de las derivadas de E_T respecto a n , Figura 6-91). El número óptimo de usos de enzima para la operación a 55°C y $P=3\text{ h}^{-1}$ es 1.

El análisis de la continuidad de la función E_T y la existencia de puntos de inflexión y óptimos locales respecto a P es análogo a la operación a otras temperaturas, asumiendo que estos puntos singulares en la curva E_T se obtienen a diferentes productividades. En cuanto a los valores absolutos la función objetivo, operaciones de igual P y 55°C comportan menores valores de E_T en comparación con la operación a 45°C y 50°C . En la Tabla 6-9 se muestra la localización de los puntos singulares de la curva en función de la productividad.

Tabla 6-9. Tipos de curvas de consumo de enzima vs. número de usos de enzima. $T=55^\circ\text{C}$. Localización de óptimos en función de la productividad

Productividad	Mínimo	Máximo	Punto de inflexión
0.1	1	0	0
1.0	1	0	1
1.4	1	1	1
2.0	0	0	1
3.0	0	0	0

En la Figura 6-100 se representa conjuntamente la variación del número óptimo de usos de enzima y E_T a medida que lo hace la productividad en diferentes rangos de P . Se puede comprobar que para valores de productividad menores de 1.5 h^{-1} existe un valor $n_{\text{opt}} > 1$, mientras que por encima, la función E_T es creciente en todo el dominio, por lo que $n_{\text{opt}} = 1$. En cuanto al consumo de enzima en cada operación, éste viene dado por el valor de E_T , éste aumenta considerablemente a medida que crece la productividad, al igual que para otras temperaturas de operación ensayadas.

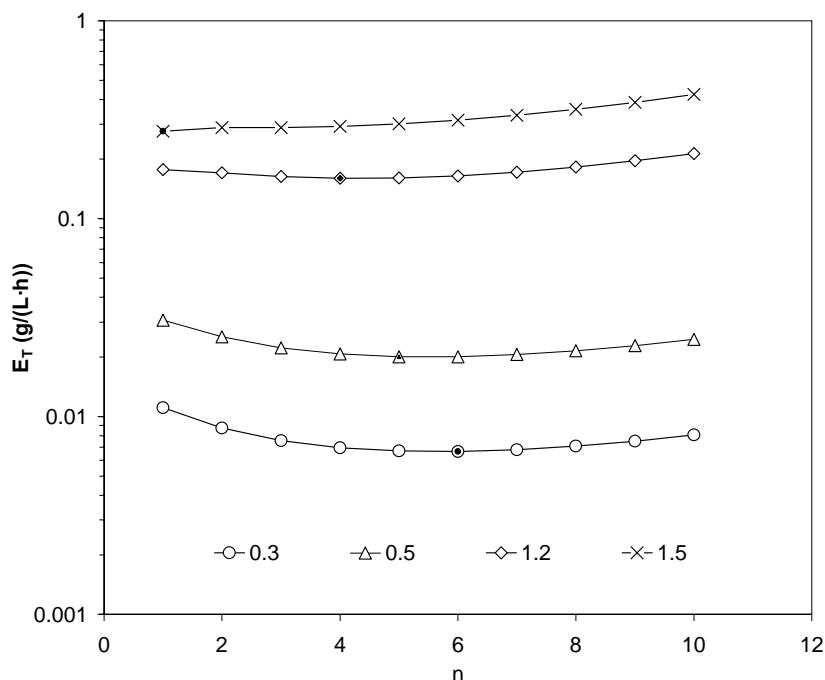


Figura 6-100. Consumo de enzima en función del número de usos de enzima (línea continua) y número óptimo de usos de enzima (●) en función de la productividad. T=55 °C

En la Figura 6-101 se representa el valor mínimo de la función E_T y el número óptimo de usos de enzima frente a la productividad del reactor. Se puede apreciar que el valor de $E_{T_{\min}}$ aumenta progresivamente a medida que aumenta la productividad. En cuanto al valor máximo de número de usos de enzima para cada temperatura, se representa en función de P y a 55 °C junto al número óptimo de usos de enzima en la Figura 6-102. Para todos los valores de P mayores de 5.25 h^{-1} hay número máximo de usos de enzima igual a 1. Esto significa que a partir de ese valor sólo es posible operar con $n=1$. En cuanto al valor límite de productividad a partir del se obtiene un óptimo de operación con reutilización, si $P < 1.398 \text{ h}^{-1}$ existe $n_{\text{opt}} > 1$. En la Tabla 6-10 se muestran los límites de productividad que conllevan un cambio en el número óptimo de usos de enzima. Puede apreciarse que sólo los modos óptimos incluyen 4, 5 o 6 usos de enzima, pero existe un salto desde 4 a 1 sin pasar por los valores intermedios.

Tabla 6-10. Límite de productividad para los que se da un cambio de n_{opt} . $T=55\text{ °C}$

Productividad (h^{-1})	Cambio de n_{opt}
0.498	6-5
1.140	5-4
1.398	4-1

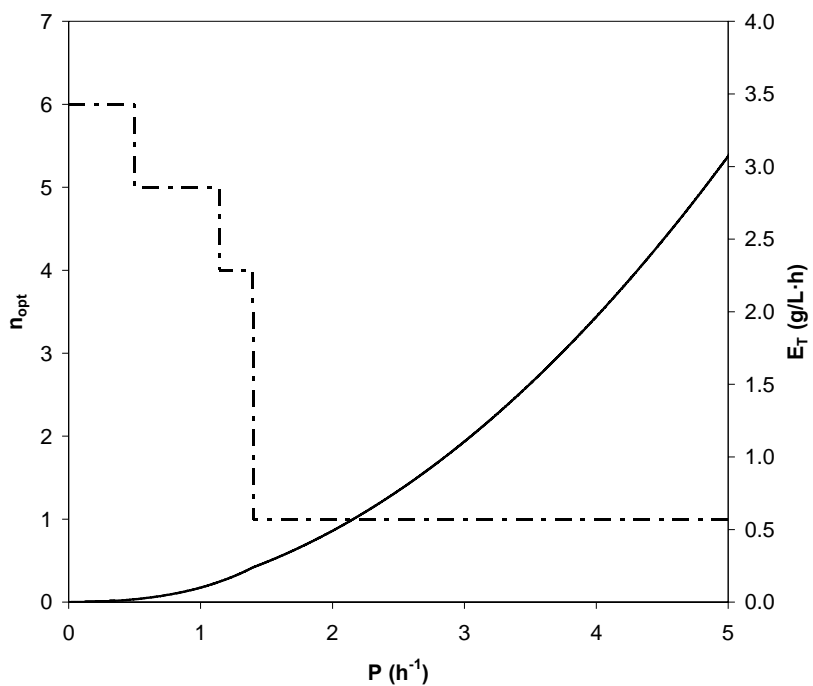


Figura 6-101. Número óptimo de usos de enzima (línea discontinua) y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. $T=55\text{ °C}$

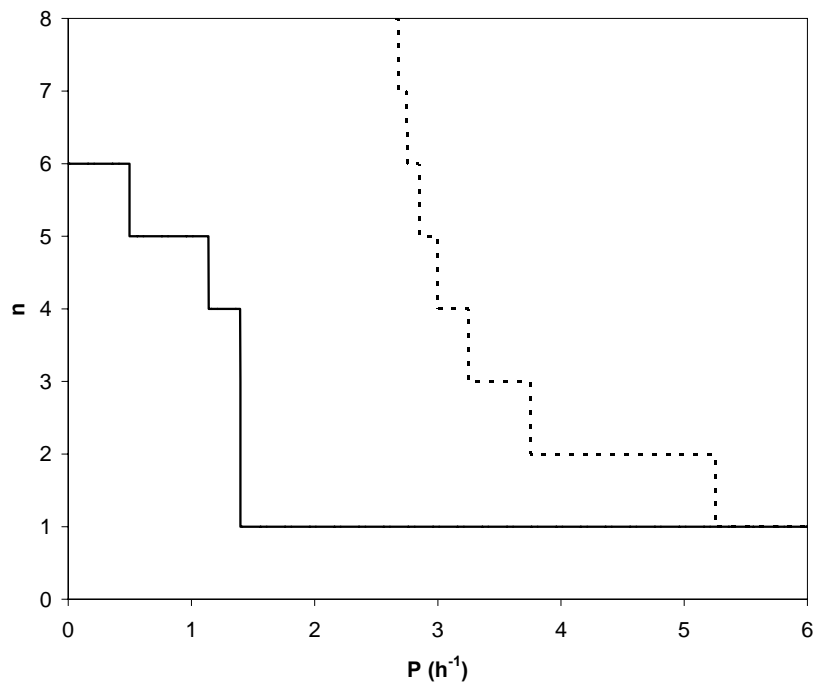


Figura 6-102. Número óptimo de usos de enzima (línea continua) y número máximo de usos de enzima (línea discontinua) en función de la productividad. $T=55^{\circ}\text{C}$

En cuanto al ahorro de enzima del sistema respecto a la operación de un reactor tanque agitado por cargas, existe un ahorro mayor de cero para valores de productividad menores de 1.398 h^{-1} . Por el contrario, para $P > 1.398\text{ h}^{-1}$, no existe ahorro. En la Figura 6-103 se representa el ahorro de enzima del sistema en función de la productividad del reactor. El ahorro de enzima máximo para la operación a 55°C sigue la misma tendencia observada hasta ahora, siendo menor que en el caso de 45°C y 50°C (0.45 frente a 0.58 y 0.52, respectivamente).

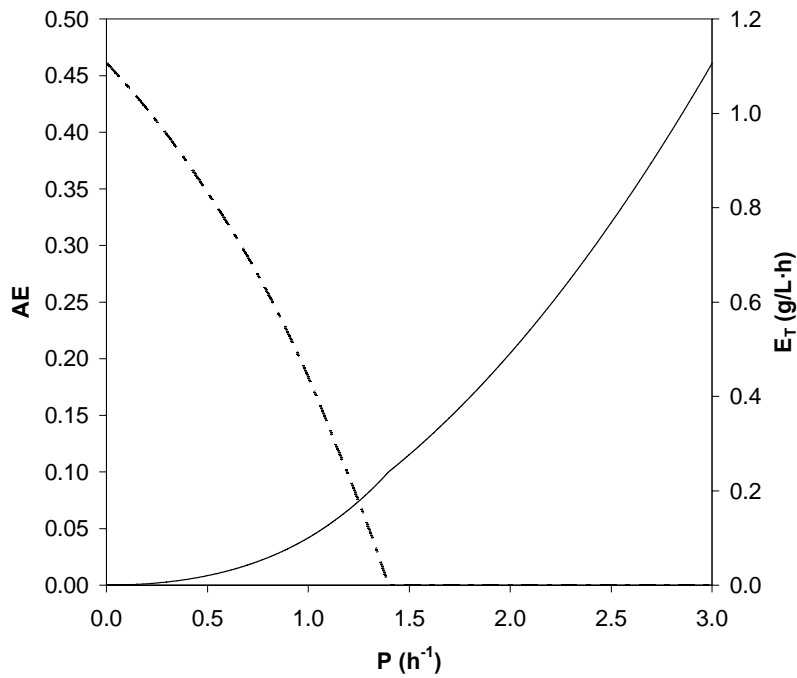


Figura 6-103. Ahorro de enzima (línea discontinua) frente a la operación por lotes y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. $T=55^{\circ}C$

En la Figura 6-104 se representan las concentraciones e_0 y e_n frente a P . La relación entre ambas magnitudes, enzima sobrante en la operación reactor discontinuo de membrana frente a P , se representa en la Figura 6-105. Los valores de enzima sobrante varían entre valores extremos de 0.21 y 0.78 (el primero para el mayor óptimo de usos de enzima y el segundo para $n_{opt}=1$). Es decir, se debe destacar que en el caso de $55^{\circ}C$, sólo sobran 0.21 g enzima / g enzima añadida.

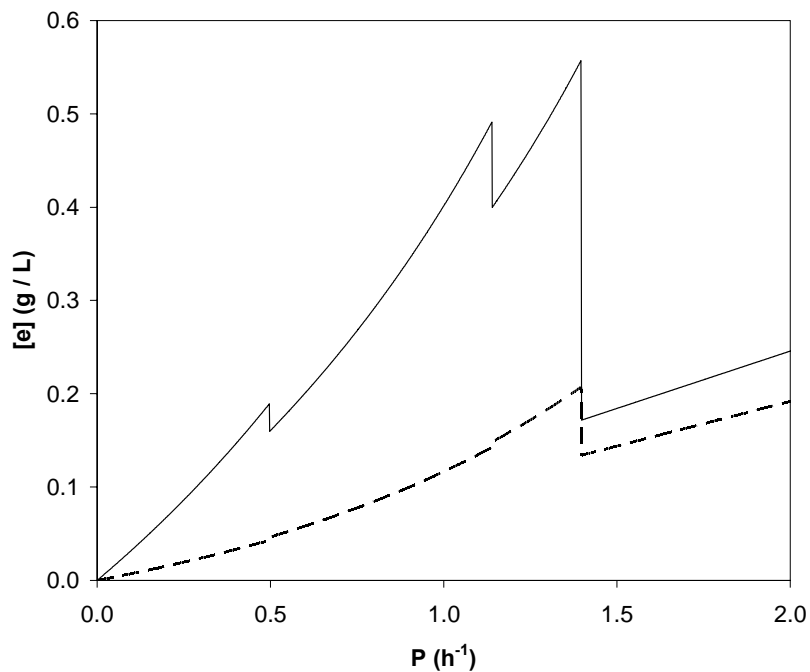


Figura 6-104. e_0 , concentración inicial (línea continua) y e_n , final de enzima (línea discontinua) en función de la productividad. T=55 °C

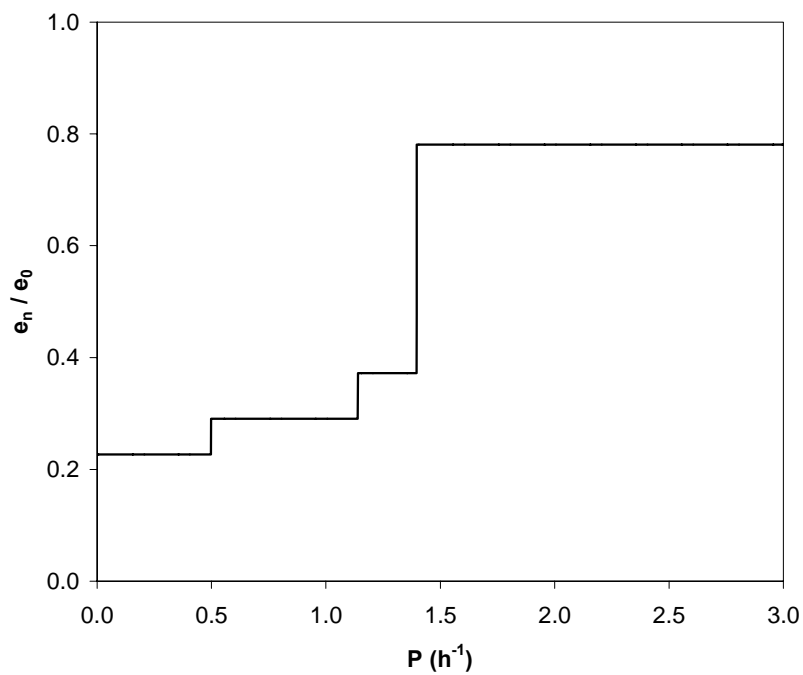


Figura 6-105. Enzima sobrante (e_n/e_0) en función de la productividad. T=55°C

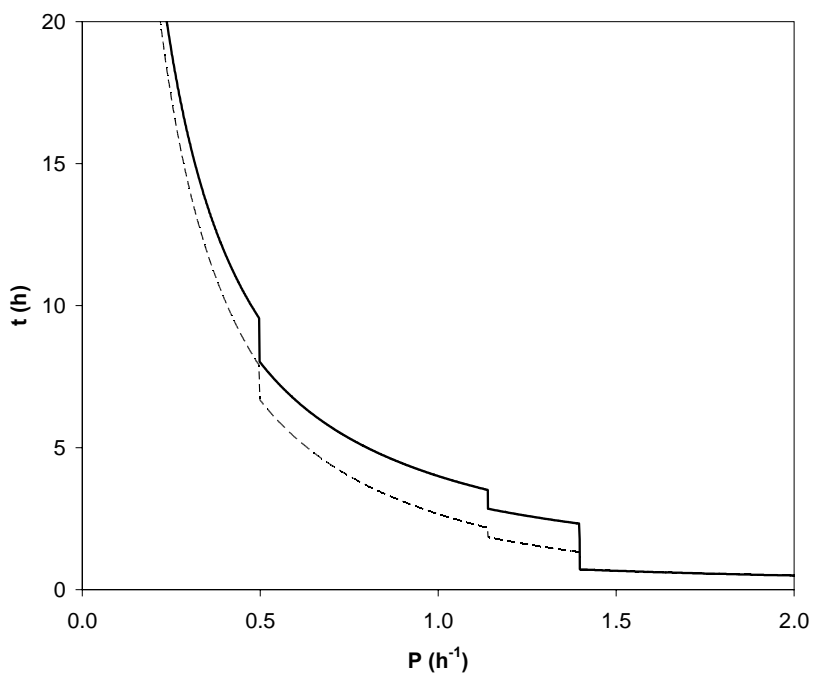


Figura 6-106. t_T , evolución del tiempo de operación (línea continua) y t_n , tiempo total de hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. $T=55^{\circ}C$.

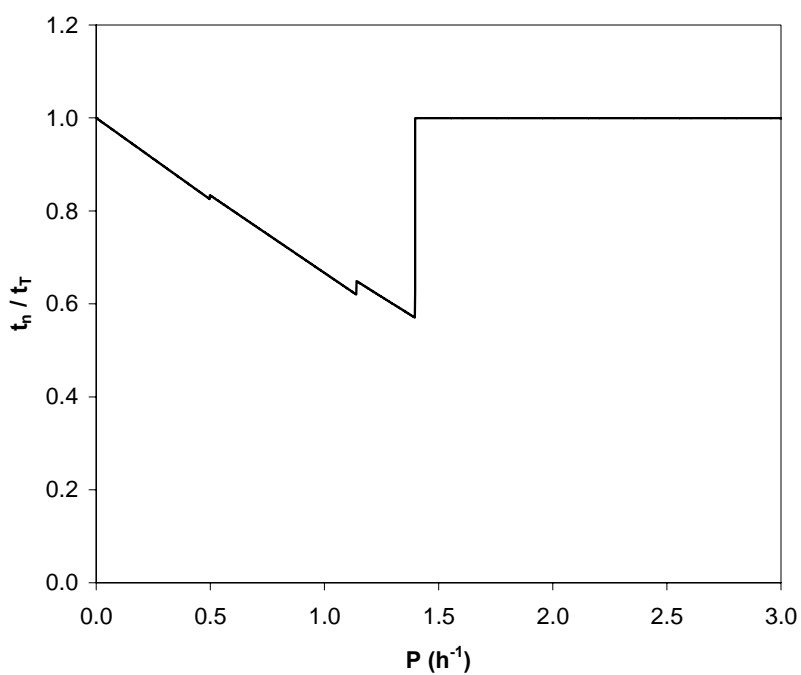


Figura 6-107. Relación entre tiempo total de hidrólisis y tiempo total de operación en función de la productividad. $T=55^{\circ}C$

En cuanto al tiempo de operación, en la Figura 6-106 y Figura 6-107 se representan las curvas de evolución de t_T y t_n así como la relación t_n / t_T frente a la productividad. Este cociente equivale a la proporción que representa el tiempo de hidrólisis, t_n sobre el tiempo total de operación, t_T . El mínimo t_n / t_T es 0.58. En definitiva, el cociente t_n / t_T tiende a 1 sin llegar a alcanzar este valor, puesto que se debe considerar el tiempo de las $n-1$ filtraciones incluidas en la operación del sistema de reacción.

- Temperatura de operación 60 °C.

El análisis de la función objetivo frente a la productividad se efectúa de igual manera que para otros valores de temperatura, mediante el estudio de la curvatura de E_T y de su primera y segunda derivadas (Figura 6-108-Figura 6-116).

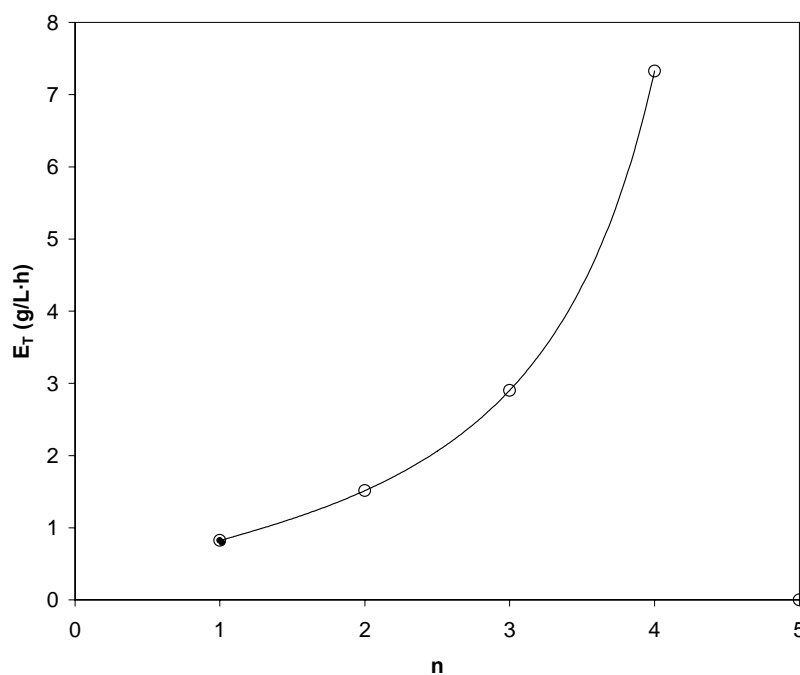


Figura 6-108. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 3.0 \text{ h}^{-1}$. $T = 60 \text{ °C}$

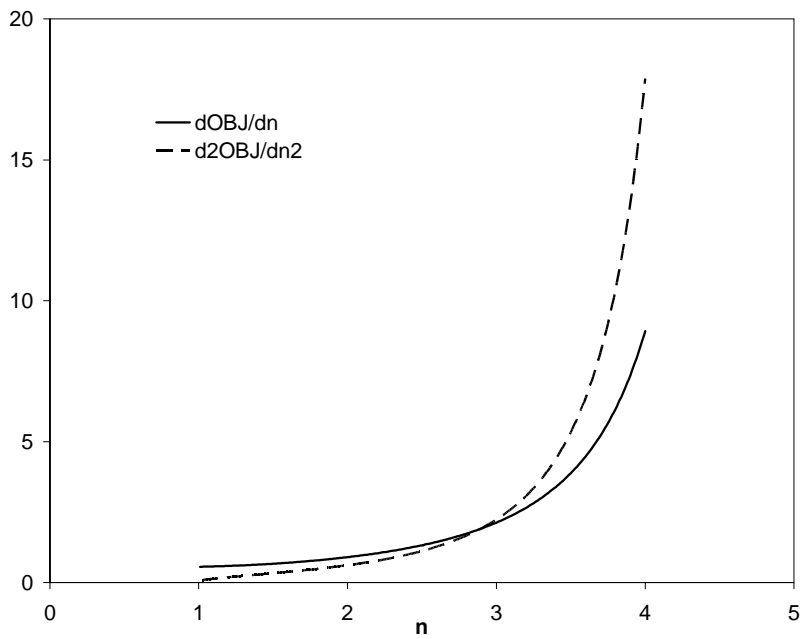


Figura 6-109. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=3.0 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

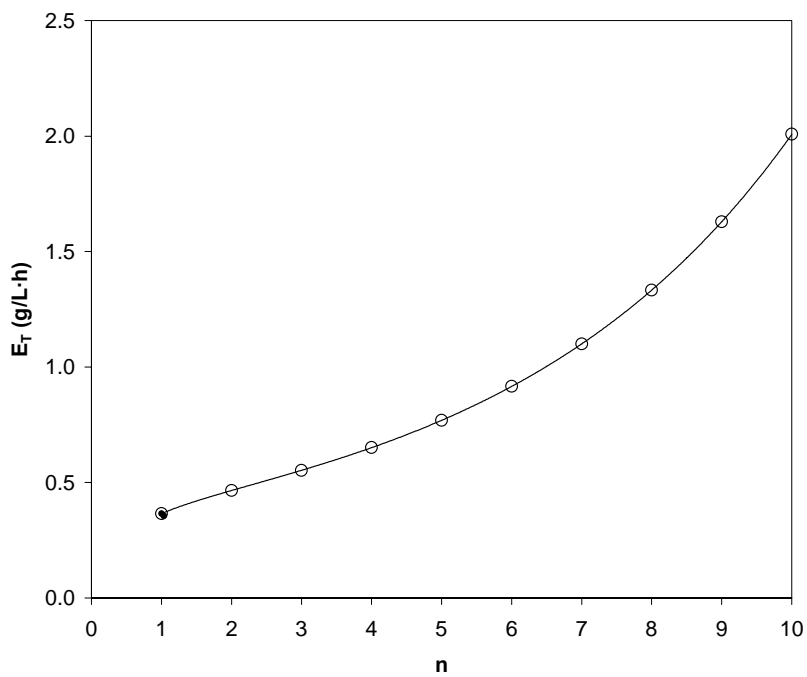


Figura 6-110. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 2.0 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

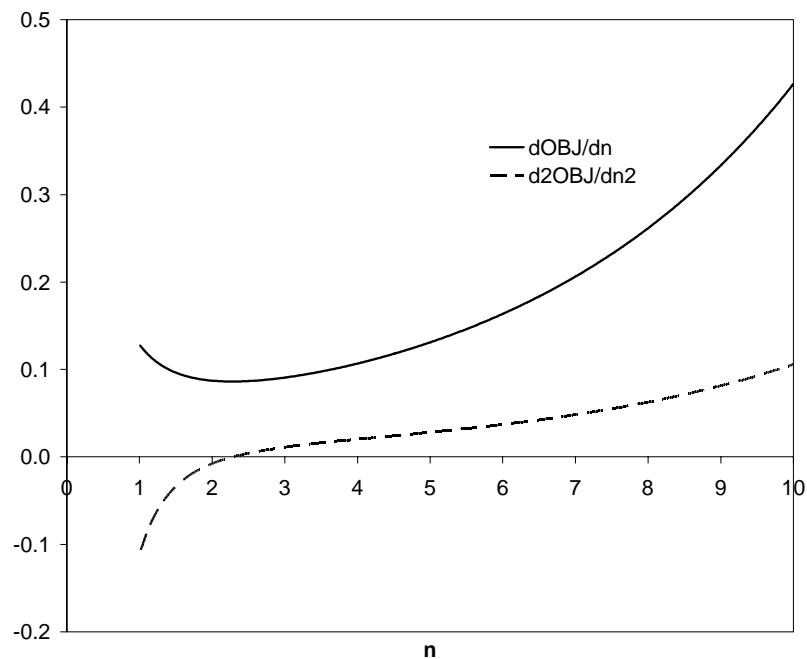


Figura 6-111. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=2.0 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

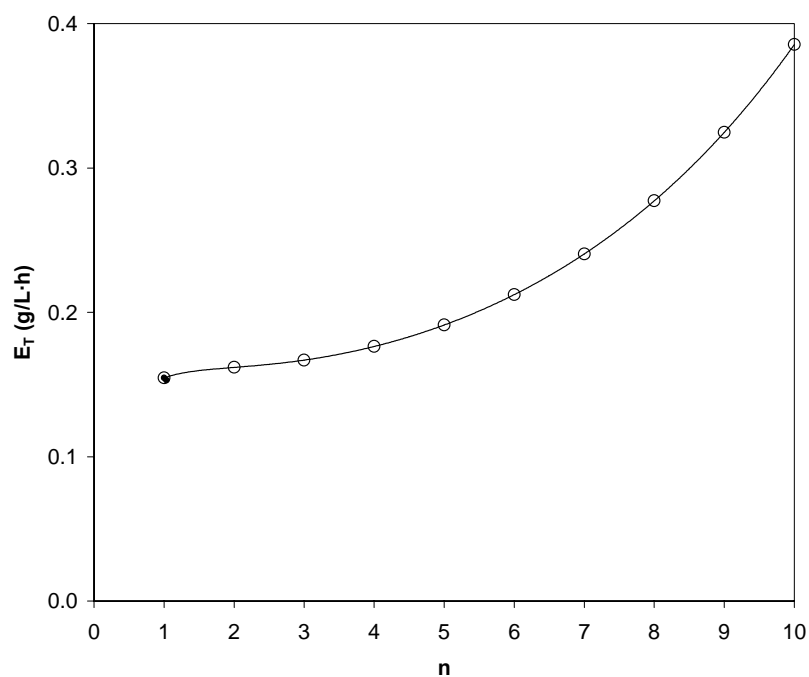


Figura 6-112. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.3 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

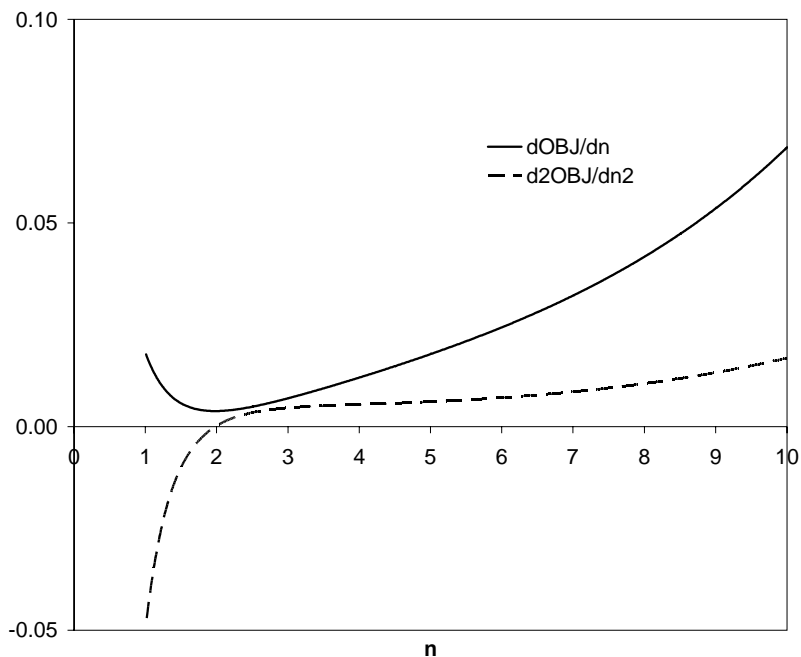


Figura 6-113. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=1.3 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

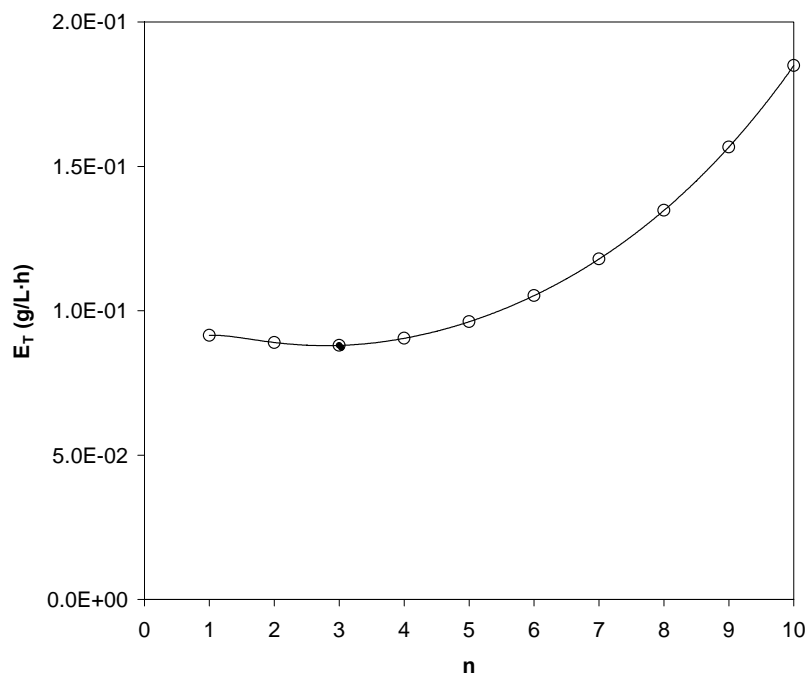


Figura 6-114. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

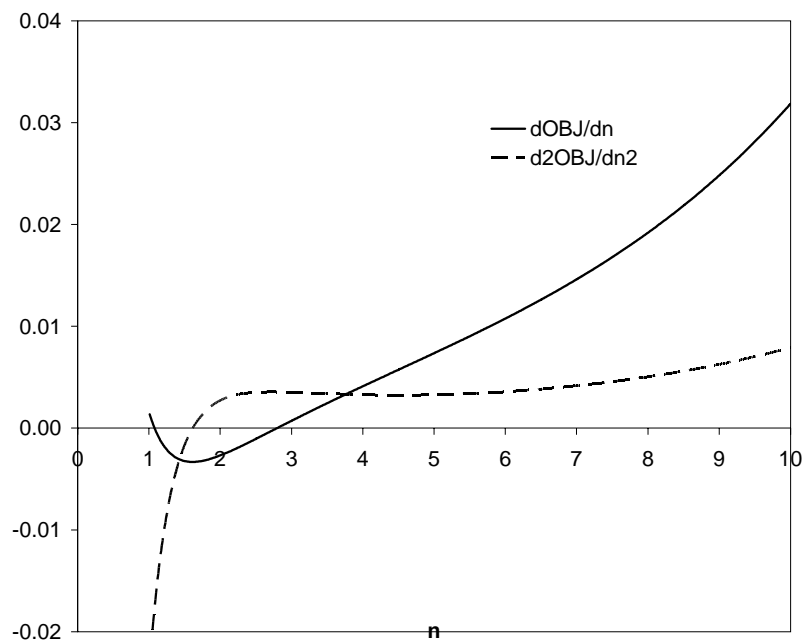


Figura 6-115. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

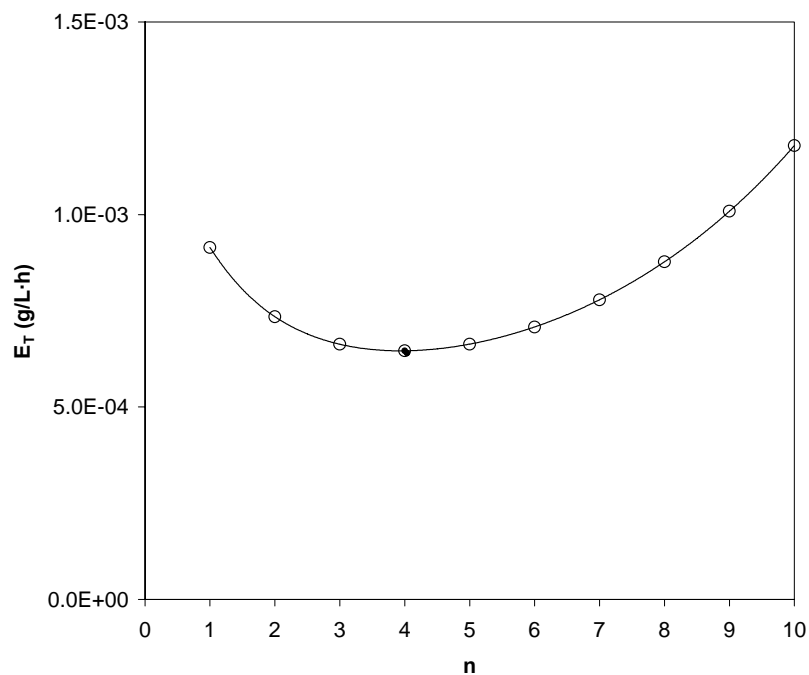


Figura 6-116. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P=0.1 \text{ h}^{-1}$. $T=60^\circ\text{C}$

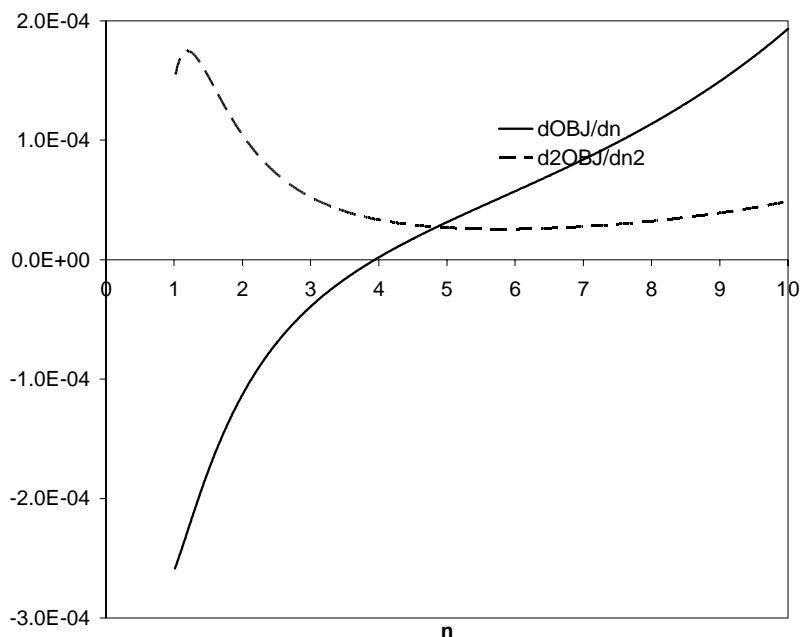


Figura 6-117. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=0.1 \text{ h}^{-1}$. $T=60 \text{ }^\circ\text{C}$

A modo de resumen, en la Tabla 6-11 se muestra la evolución de la función E_T frente a n para diferentes valores de productividad en la operación a 60°C .

Tabla 6-11. Tipos de curvas de consumo de enzima vs. número de usos de enzima. $T=60 \text{ }^\circ\text{C}$. Localización de óptimos en función de la productividad

Productividad	Mínimo	Máximo	Punto de inflexión
0.1	1	0	0
1.0	1	0	1
1.3	0	1	1
2.0	0	0	1
3.0	0	0	0

En la Figura 6-118 se representa conjuntamente la variación del número óptimo de usos de enzima y E_T en diferentes rangos de P .

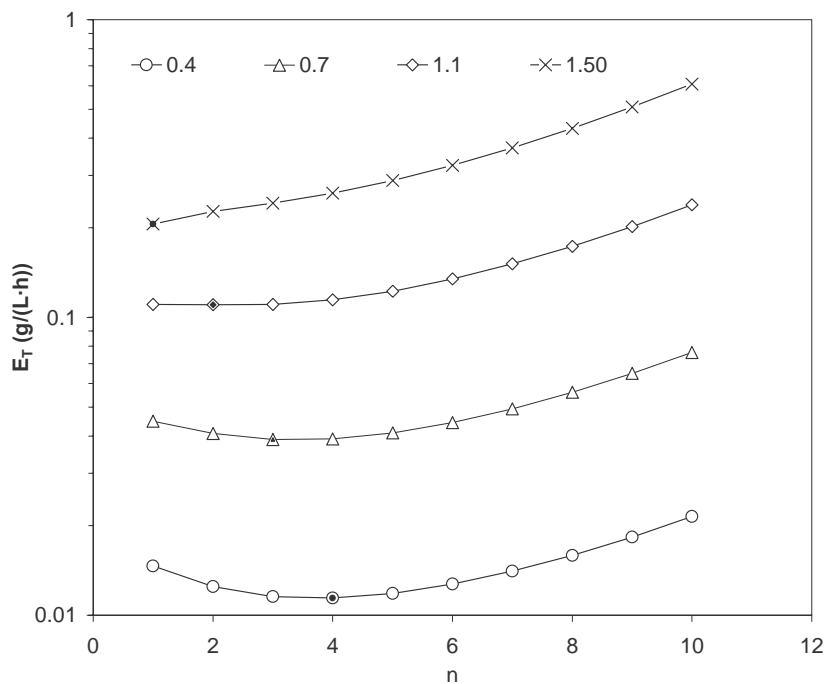


Figura 6-118. Consumo de enzima en función del número de usos de enzima (línea continua) y número óptimo de usos de enzima (●) en función de la productividad. T=60 °C

En la Figura 6-119 se representa el valor mínimo de la función E_T y el número óptimo de usos de enzima frente a la productividad del reactor. Se puede apreciar que el valor del óptimo dado por el mínimo consumo de enzima, E_{Tmin} , aumenta progresivamente a medida que aumenta la productividad. Por otra parte, para 60 °C el mayor n_{opt} alcanzado es 4. Nótese la disminución de dicho valor a medida que aumenta la temperatura, desde $n_{opt} = 8$ para 45 °C hasta el caso de 60 °C.

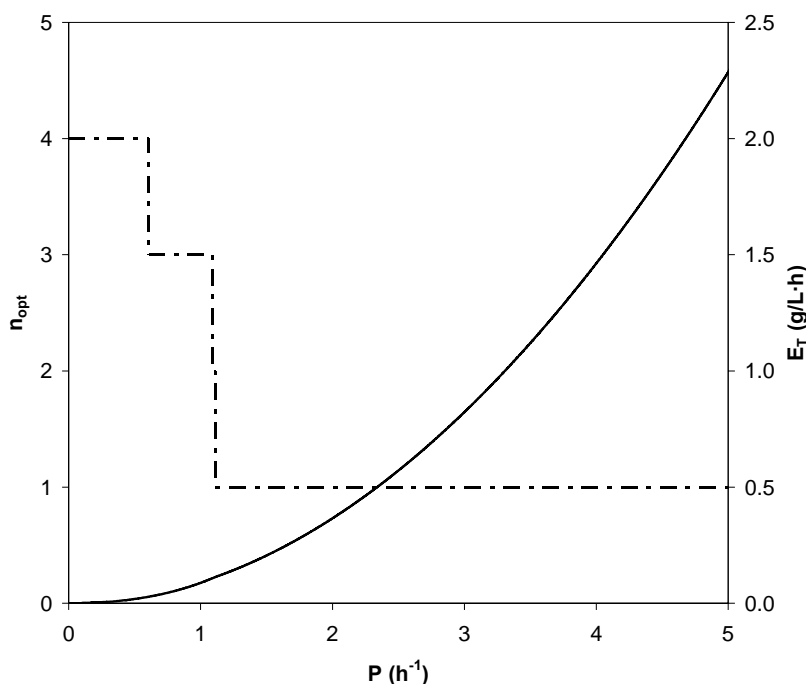


Figura 6-119. Número óptimo de usos de enzima (línea discontinua) y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. T=60°C

Tabla 6-12. Límite de productividad para los que se da un cambio de n_{opt} . T=60°C

Productividad (h^{-1})	Cambio de n_{opt}
0.607	4-3
1.088	3-2
1.114	2-1

El valor máximo de número óptimo de usos de enzima para cada temperatura se representa en función de P y a 60 °C junto al número óptimo de usos de enzima en la Figura 6-120. Nuevamente existe un límite en el número máximo de usos de enzima dado por la asíntota vertical de la función objetivo, como se ha explicado con anterioridad. Además, si se supera el valor de productividad $5.25 h^{-1}$ dicho número máximo de usos se hace igual a uno. En lo que respecta al número óptimo de usos de enzima, existe $n_{opt} > 1$ para todo valor de productividad inferior a $1.114 h^{-1}$. Dicho valor corresponde al paso de operaciones con $n_{opt} = 2$ a $n_{opt} = 1$ (Tabla 2-1). En el caso de la operación a 60 °C, se obtiene que el mayor óptimo de usos de enzima (cuatro usos) viene dado por productividades menores de $0.607 h^{-1}$, variando dicho óptimo entre 4, 3, 2 y 1 uso de enzima.

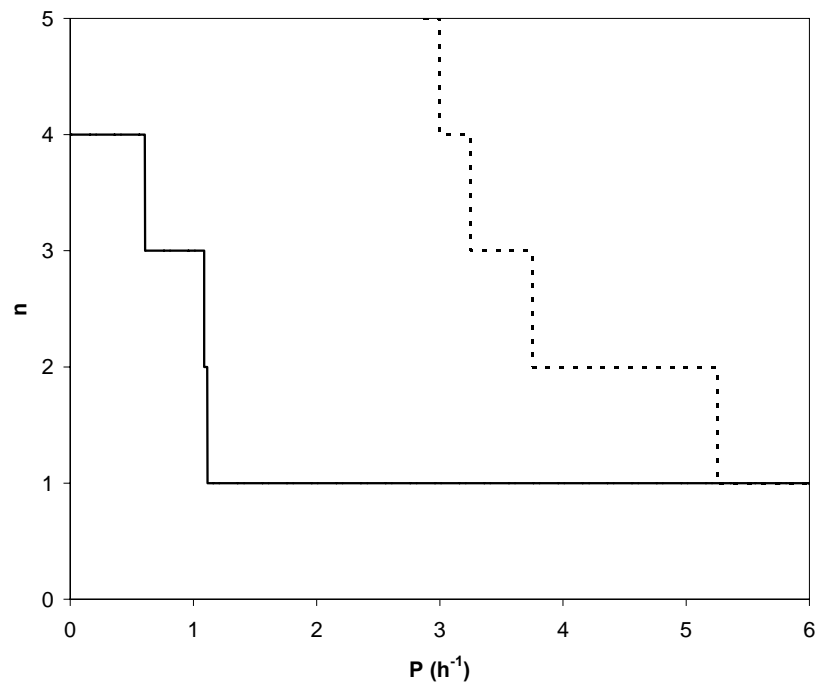


Figura 6-120. Número óptimo de usos de enzima (línea continua) y número máximo de usos de enzima (línea discontinua) en función de la productividad. T=60°C

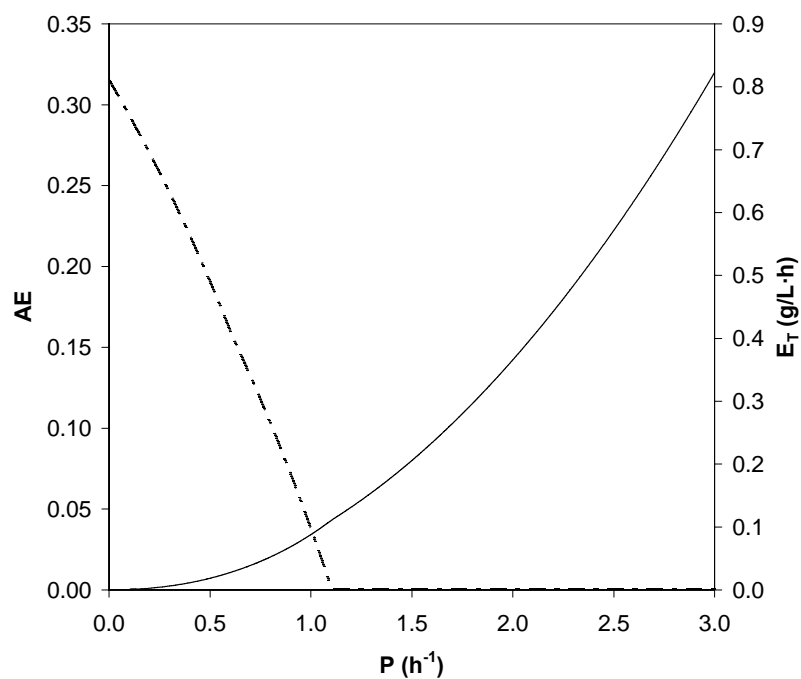


Figura 6-121. Ahorro de enzima (línea discontinua) frente a la operación por lotes y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. T=60°C

En cuanto al ahorro de enzima del reactor discontinuo de membran respecto a la operación de un reactor tanque agitado por cargas, éste se representa en la Figura 6-121. Existe un ahorro mayor de cero para valores de productividad menores de 1.114 h⁻¹. El máximo valor de ahorro posible de obtener es 0.31 frente a 0.46, 0.53 y 0.57 para 45 °C, 50 °C y 55 °C, respectivamente).

En la Figura 6-122 se representan las curvas de e₀ y e_n frente a P y la enzima sobrante en la operación del reactor frente a P se representa en la Figura 6-123. Los valores de enzima sobrante varían entre valores de 0.25 y 0.71 (mínimo y máximo). Esto quiere decir que la cantidad de enzima remanente al final de la operación del sistema con reutilización es menor al caso de operación por lotes convencional.

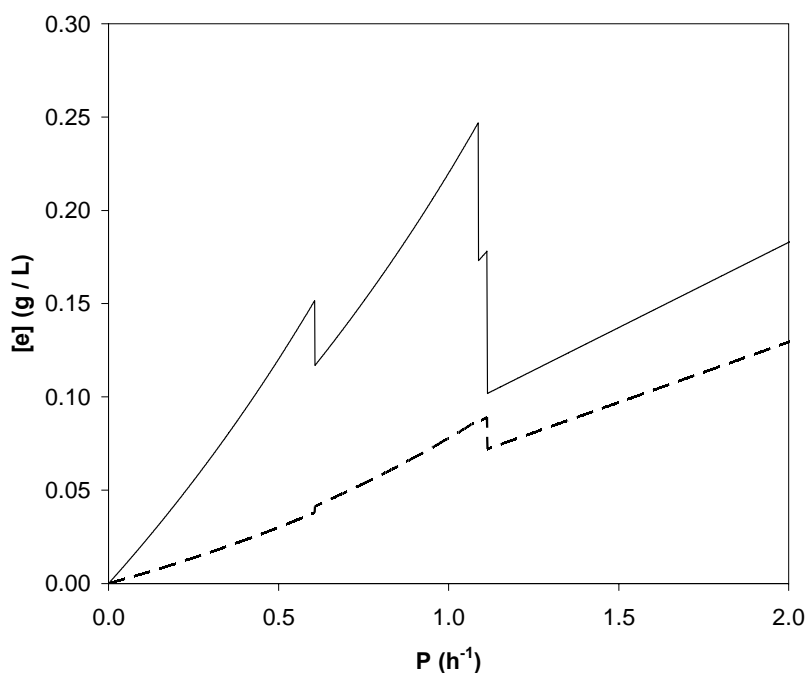


Figura 6-122. e₀, concentración inicial (línea continua) y e_n, concentración de enzima activa al final de la n-ésima hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. T=60°C

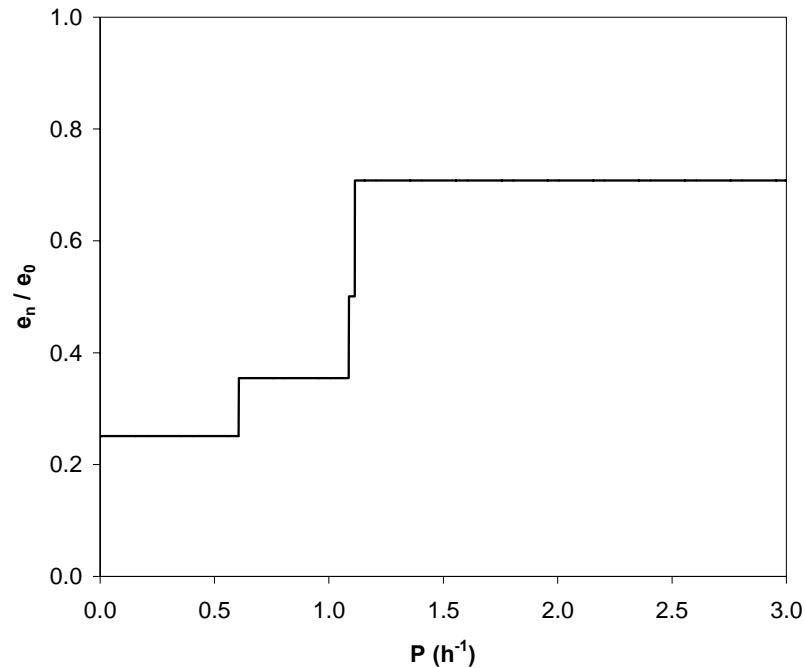


Figura 6-123. Enzima sobrante en función de la productividad. $T=60^{\circ}C$

En la Figura 6-124 y la Figura 6-125 se representan las curvas de tiempos y la relación t_n / t_T frente a la productividad. Este cociente equivale a la proporción que representa el tiempo de hidrólisis, t_n sobre el tiempo total de operación, t_T . Como se ha descrito para otras temperaturas de operación, la relación entre tiempo de hidrólisis y tiempo total es 1 para la operación sin reutilización ya que no se filtra, mientras que es distinto de 1 para todos los posibles casos con reutilización. La relación alcanza un valor mínimo (ver Figura 6-125) a valores de productividad cercanos a $1.11 h^{-1}$, y tiende a crecer a medida que la productividad requerida disminuye. Es decir, para el caso más extremo con $n_{opt} = 2$ (en el que se requiere la mayor productividad y por tanto, la mayor rapidez de producción) es cuando el tiempo de hidrólisis debe ser más pequeño respecto al total. Como también se ha discutido anteriormente, dicha rapidez se consigue a costa de aumentar la cantidad de enzima a emplear.

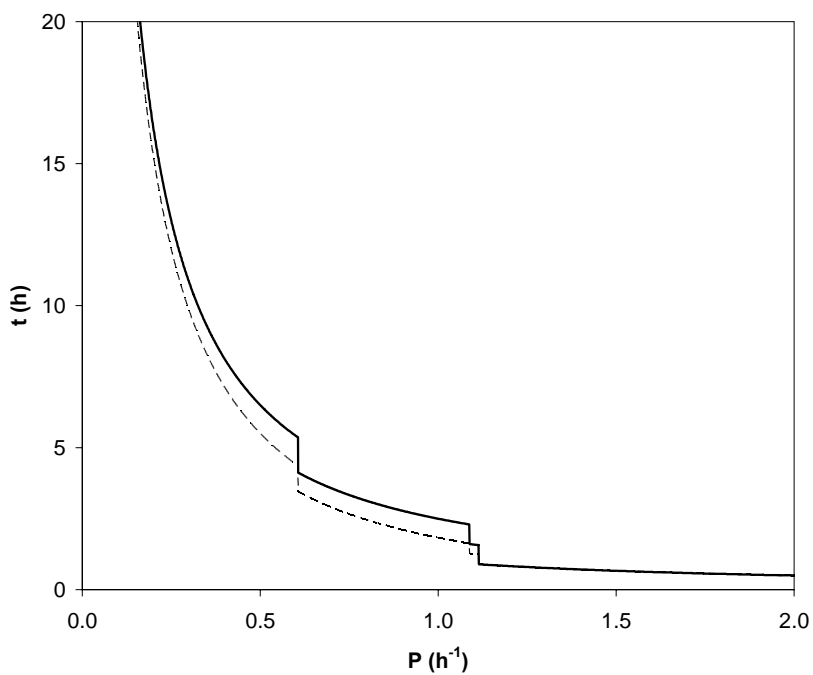


Figura 6-124. Evolución del tiempo de operación (t_T) y el tiempo total de hidrólisis (t_n) en función de la productividad del RDM. $T=60^\circ\text{C}$.

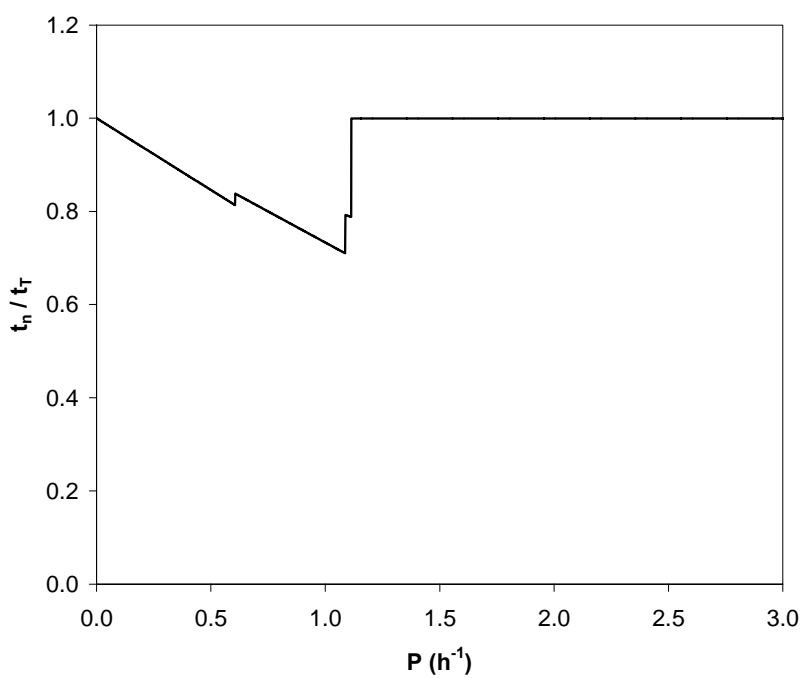


Figura 6-125. t_T , evolución del tiempo de operación (línea continua) y t_n , tiempo total de hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. $T=60^\circ\text{C}$

- Temperatura de operación 65 °C

Por último, se presentan los resultados para la temperatura de 65 °C. En las Figura 6-126, Figura 6-128, Figura 6-130, Figura 6-132 y Figura 6-134 se representa el valor de la función objetivo frente al número de usos de enzima para la operación isoterma del reactor fijada la temperatura a 65 °C. Por otra parte, en las Figura 6-127, Figura 6-129, Figura 6-131, Figura 6-133 y Figura 6-135, se representa la primera y segunda derivadas de E_T respecto a n .

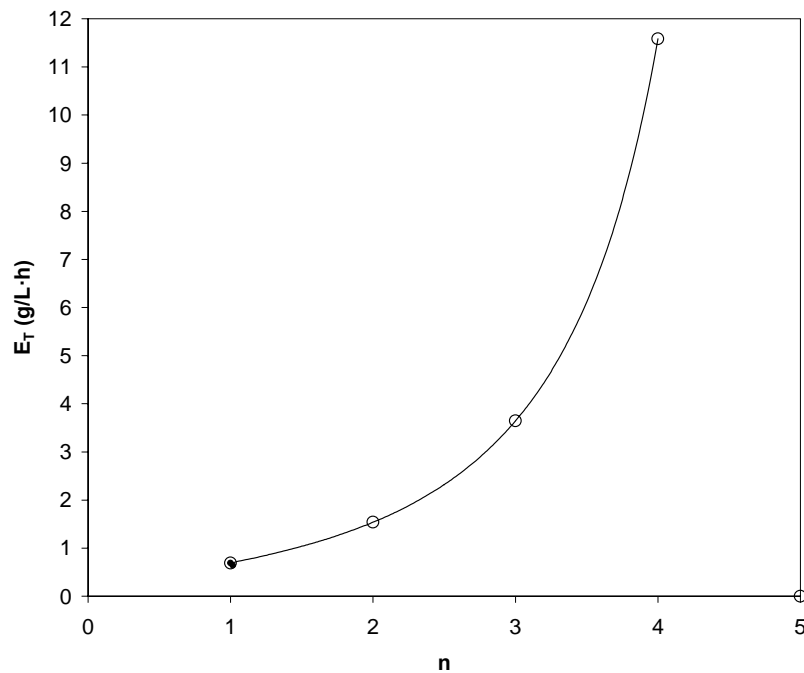


Figura 6-126. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 3.0 \text{ h}^{-1}$. $T = 65 \text{ °C}$

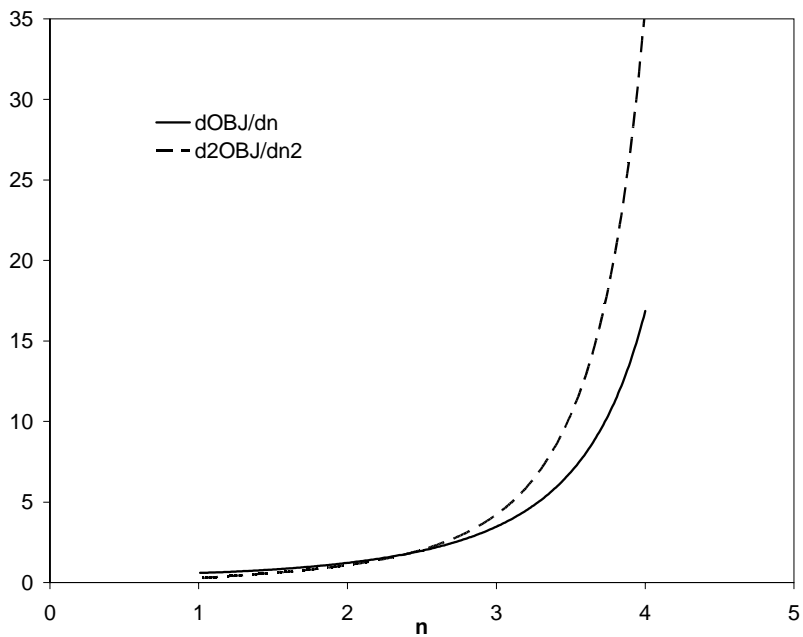


Figura 6-127. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=3.0 \text{ h}^{-1}$. $T=65 \text{ }^\circ\text{C}$

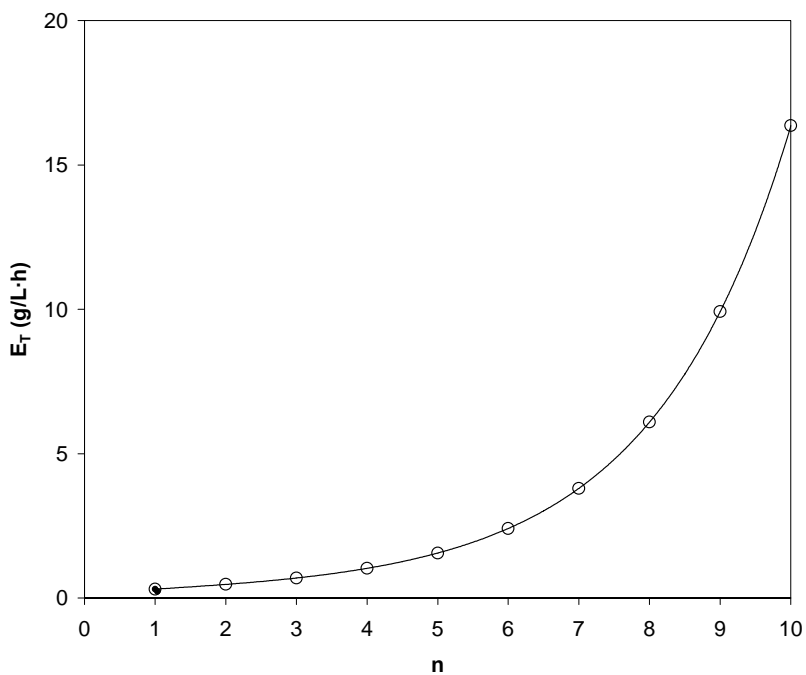


Figura 6-128. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 2.0 \text{ h}^{-1}$. $T=65 \text{ }^\circ\text{C}$

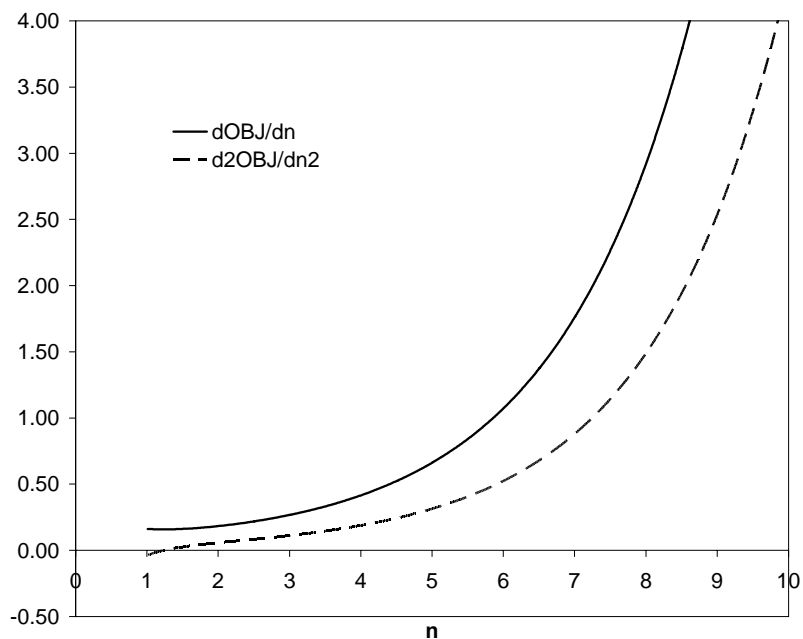


Figura 6-129. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=2.0 \text{ h}^{-1}$. $T=65^\circ\text{C}$

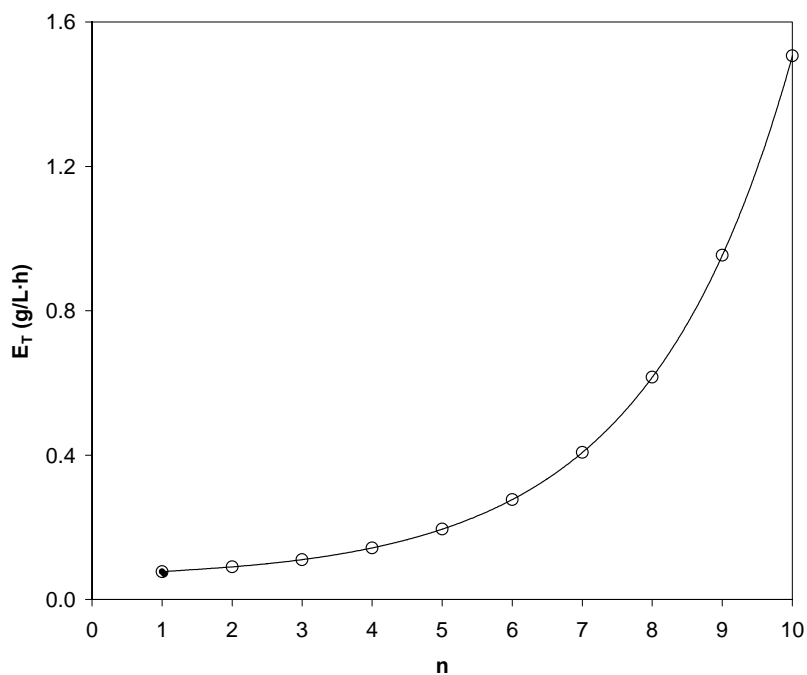


Figura 6-130. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=65^\circ\text{C}$

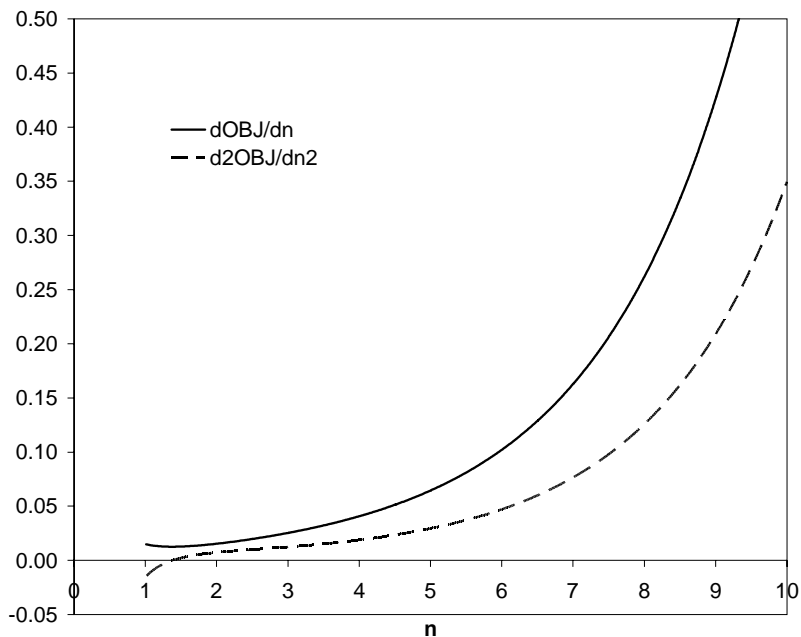


Figura 6-131. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=1.0 \text{ h}^{-1}$. $T=65 \text{ }^\circ\text{C}$

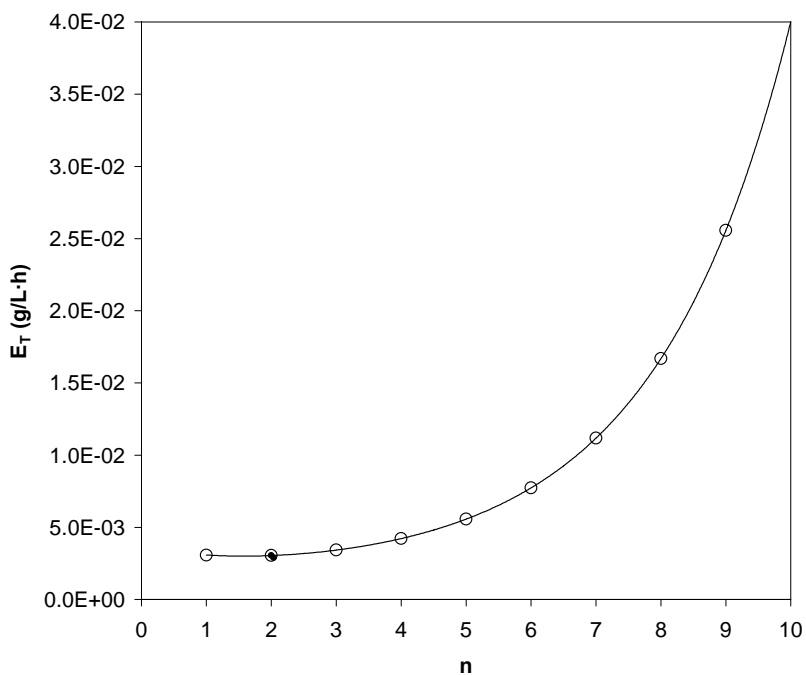


Figura 6-132. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 0.2 \text{ h}^{-1}$. $T=65 \text{ }^\circ\text{C}$

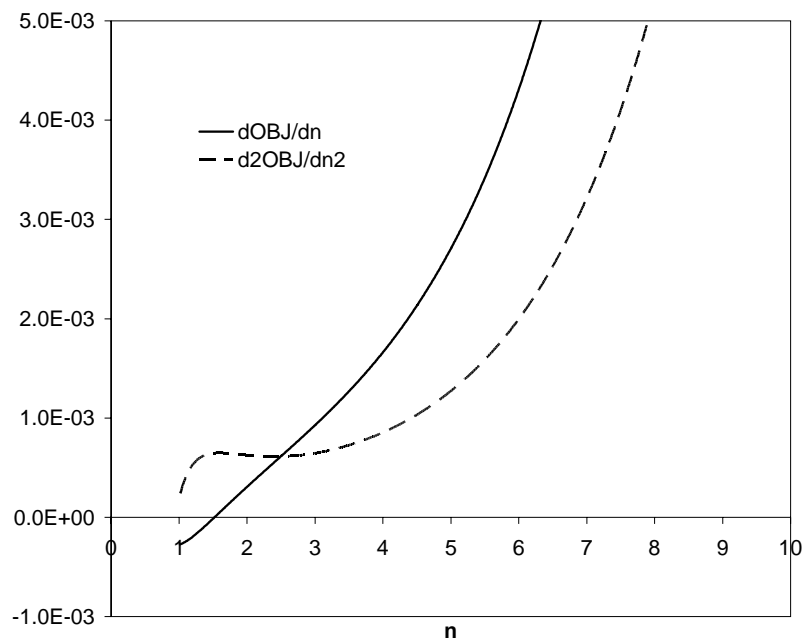


Figura 6-133. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=0.2 \text{ h}^{-1}$. $T=65^\circ\text{C}$

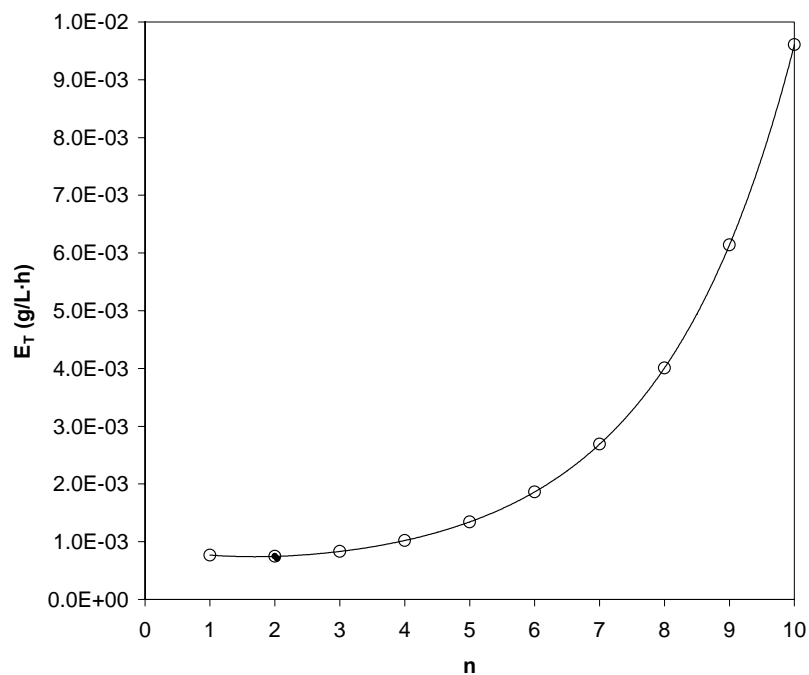


Figura 6-134. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P=0.1 \text{ h}^{-1}$. $T=65^\circ\text{C}$

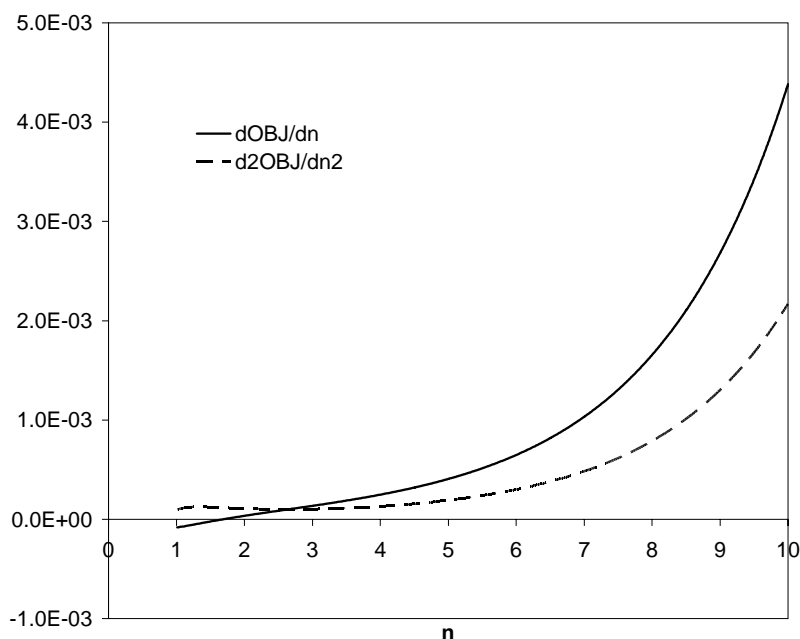


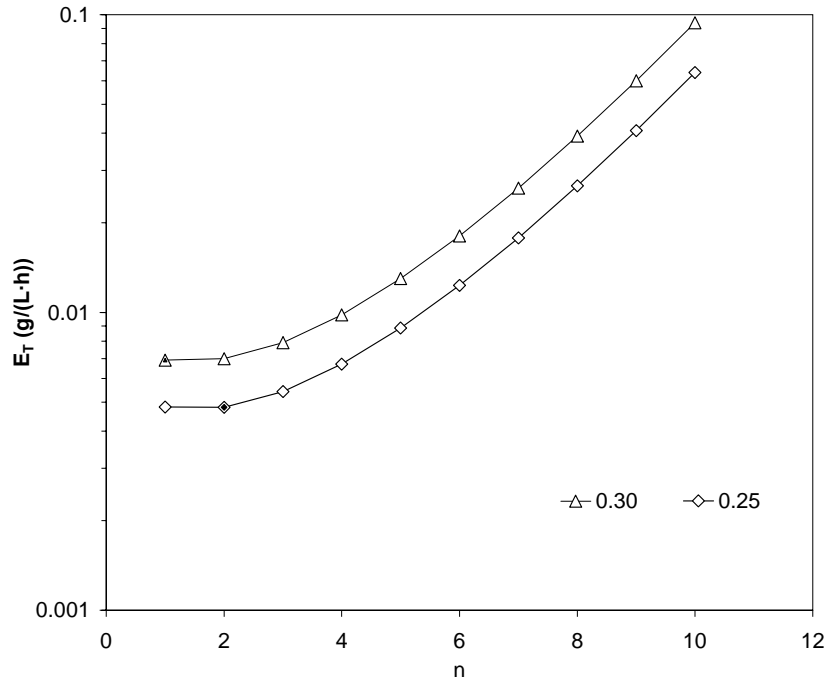
Figura 6-135. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P=0.1 \text{ h}^{-1}$. $T=65 \text{ }^\circ\text{C}$

Las curvas anteriores presentan algunas particularidades con respecto a las obtenidas para la operación a temperaturas inferiores (veáse Tabla 6-13): no existen máximos locales en la función E_T y sólo existen mínimos para los valores de productividad más bajos.

Tabla 6-13. Tipos de curvas de consumo de enzima vs. número de usos de enzima. $T=65 \text{ }^\circ\text{C}$. Localización de óptimos en función de la productividad

Productividad	Mínimo	Máximo	Punto de inflexión
0.1	1	0	0
0.2	1	0	0
1.0	0	0	1
2.0	0	0	1
3.0	0	0	0

En la Figura 6-136 se representa conjuntamente la variación del número óptimo de usos de enzima y E_T a medida que lo hace la productividad en diferentes rangos de P . El número óptimo de usos de enzima sólo alcanza 2 usos para este caso, a diferencia de otras temperaturas inferiores para las que podía reutilizar la enzima en sucesivas reacciones.



**Figura 6-136. Consumo de enzima en función del número de usos de enzima (línea continua) y número óptimo de usos de enzima (●) en función de la productividad.
T=65°C**

En la Figura 6-137 se representa el valor mínimo de la función E_T y el número óptimo de usos de enzima frente a la productividad.

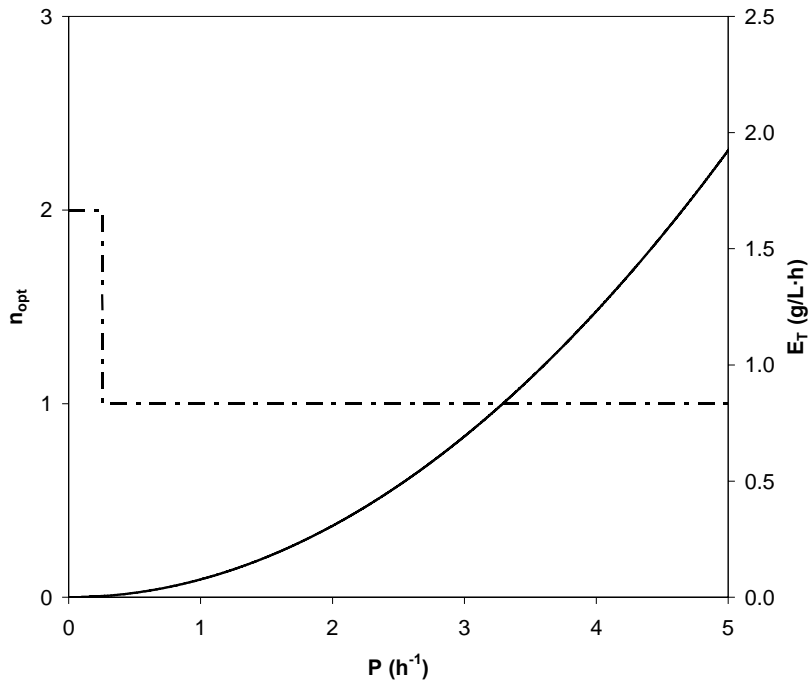


Figura 6-137. Número óptimo de usos de enzima (línea discontinua) y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. T=65°C

En la representación del número óptimo de usos de enzima en función de la productividad se aprecia nuevamente que sólo se alcanzan 2 usos de enzima en la operación con productividad inferior a Figura 6-137. En la Figura 6-138 se muestran los valores máximos y óptimos de n en función de P , donde existe un valor de productividad donde ambas curvas se superponen ($> 5.25 h^{-1}$).

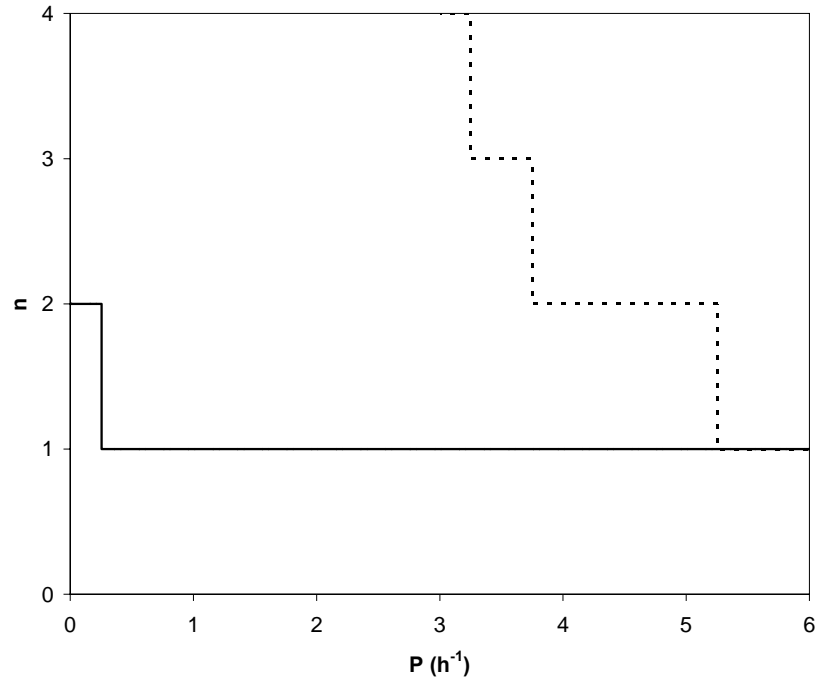


Figura 6-138. Número óptimo de usos de enzima (línea continua) y número máximo de usos de enzima (línea discontinua) en función de la productividad. T=65°C

En la Figura 6-139 se representa el ahorro de enzima del sistema en función de la productividad del reactor. En el límite: $\lim_{P \rightarrow 0} SE = 0.05$. Puede observarse que el ahorro de enzima logrado en la operación del reactor discontinuo de membrana a 65°C es menor que en el caso de temperaturas menores (0.05 frente a 0.32, 0.46, 0.53 y 0.57 para 60 °C, 55 °C, 50 °C y 45 °C, respectivamente).

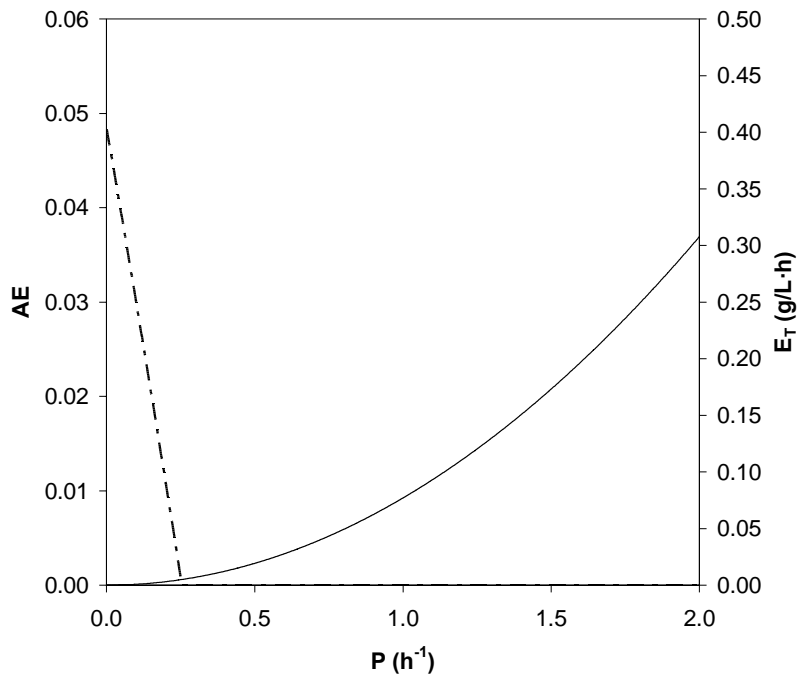


Figura 6-139. Ahorro de enzima (línea discontinua) frente a la operación por lotes y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. $T=65^\circ\text{C}$

Las concentraciones e_0 y e_n , y la enzima sobrante (e_n/e_0) en la operación del sistema frente a la productividad se representan en las Figura 6-140 y Figura 6-141, respectivamente. El valor de enzima sobrante en la operación óptima con 2 usos de enzima (esto es, $P < 0.25 \text{ h}^{-1}$) alcanza 0.27 gramos de enzima final por gramo de enzima añadida al comienzo de la operación, mientras que para la operación por lotes este valor es de 0.52.

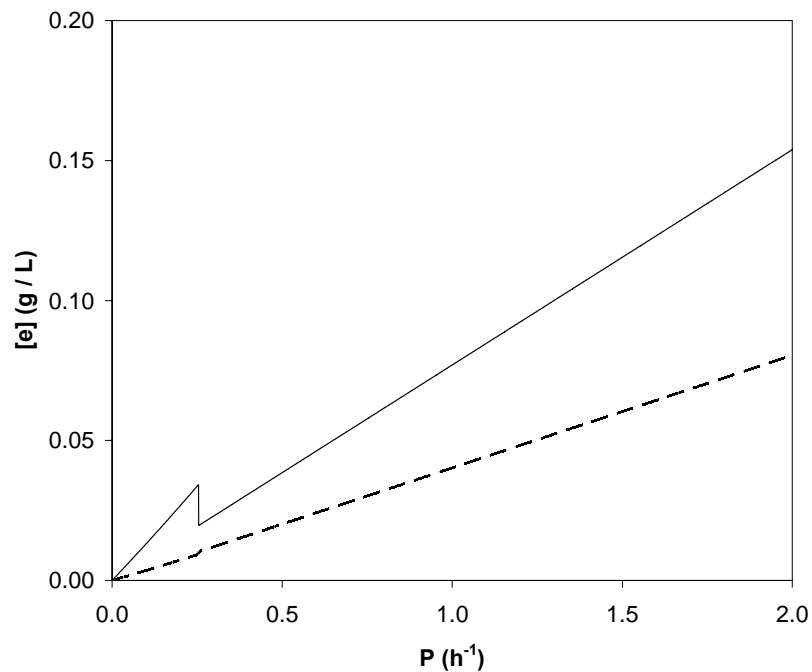


Figura 6-140. e_0 , concentración inicial (línea continua) y e_n , concentración de enzima activa al final de la n -ésima hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. $T=65^\circ C$

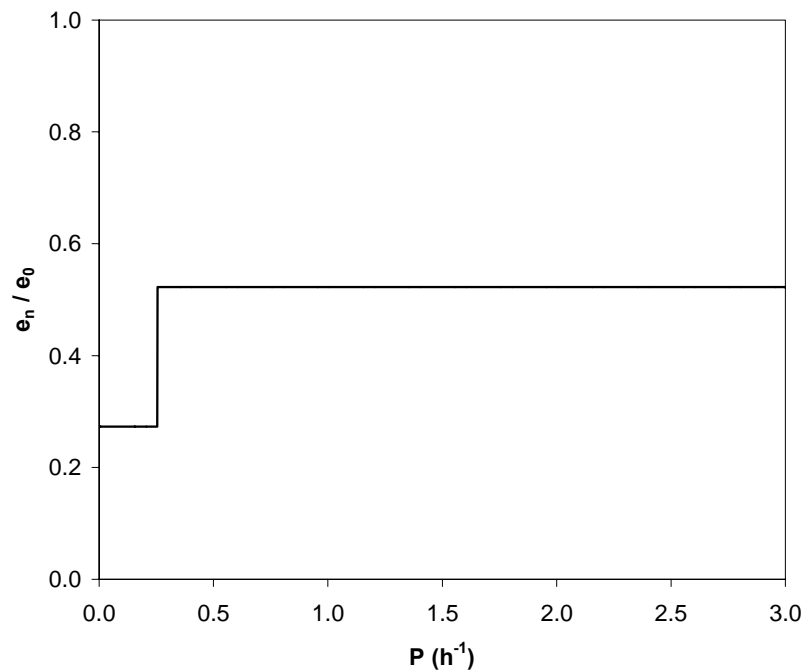


Figura 6-141. Enzima sobrante en función de la productividad. $T=65^\circ C$

En la Figura 6-142 y Figura 6-143 se representan las curvas de t_T y t_n , así como la relación t_n / t_T frente a la productividad. Para valores de productividad cercanos a 0.25 se obtiene que la relación t_n / t_T es mínima, tomando un valor de 0.95.

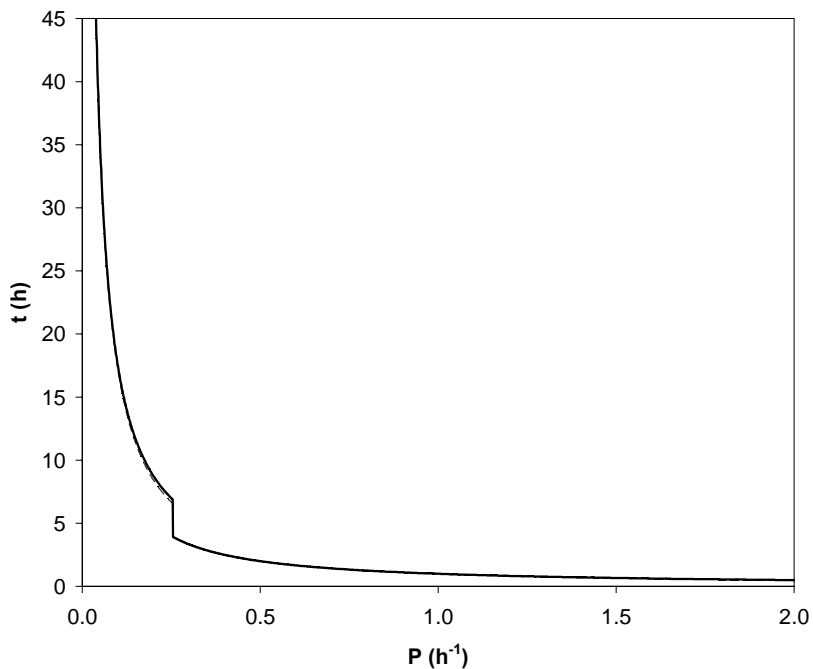


Figura 6-142. t_T , evolución del tiempo de operación (línea continua) y t_n , tiempo total de hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad. $T=65^{\circ}C$.

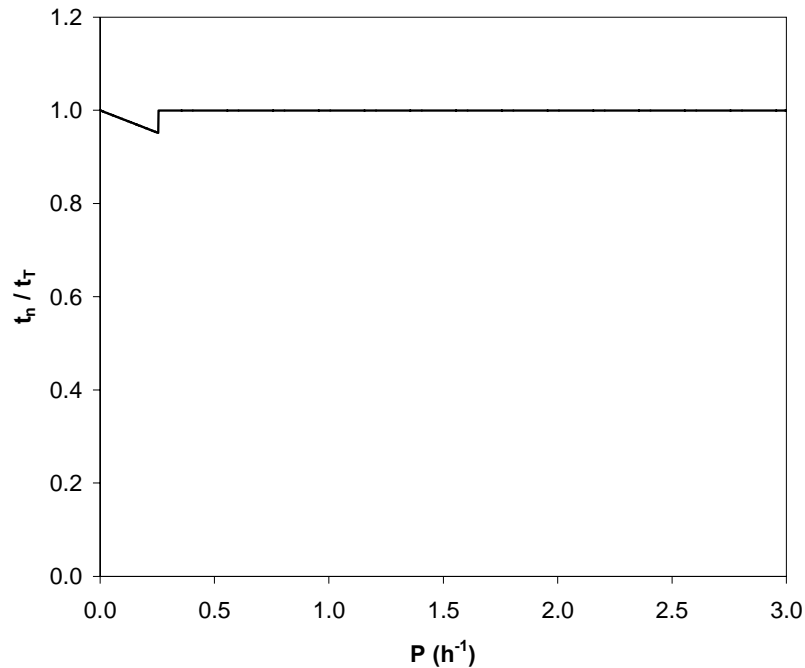


Figura 6-143. Relación entre tiempo total de hidrólisis y tiempo total de operación en función de la productividad del RDM. T=65°C

- Temperatura de operación 70°C

En la Figura 6-144 se muestra el valor de la función objetivo E_T en función del número de usos de enzima para una productividad tan baja como 0.01 h^{-1} . El valor óptimo corresponde a $n = 1$, es decir, no se debe reutilizar la enzima. En la Figura 6-145 se aprecia que tanto la primera como la segunda derivada de la función E_T son estrictamente crecientes con n y no se igualan a cero en ningún caso por lo que se deduce que no existen mínimos ni puntos de inflexión en E_T . En la Figura 6-146 se representa el valor de E_T y el número óptimo de usos de enzima frente a la productividad: a diferencia de los casos de temperaturas más bajas, a 70 °C $n_{\text{opt}} = 1$ para todo P . Es decir, para esta temperatura la operación discontinua mejora la operación con reutilización de enzima. La gráfica Figura 6-147 muestra el valor máximo de n frente a P . En cuanto a la relación t_n/t_T , en este caso toma el valor de 1 para todo P puesto que todo el tiempo de operación corresponde a reacciones de hidrólisis y no hay filtración.

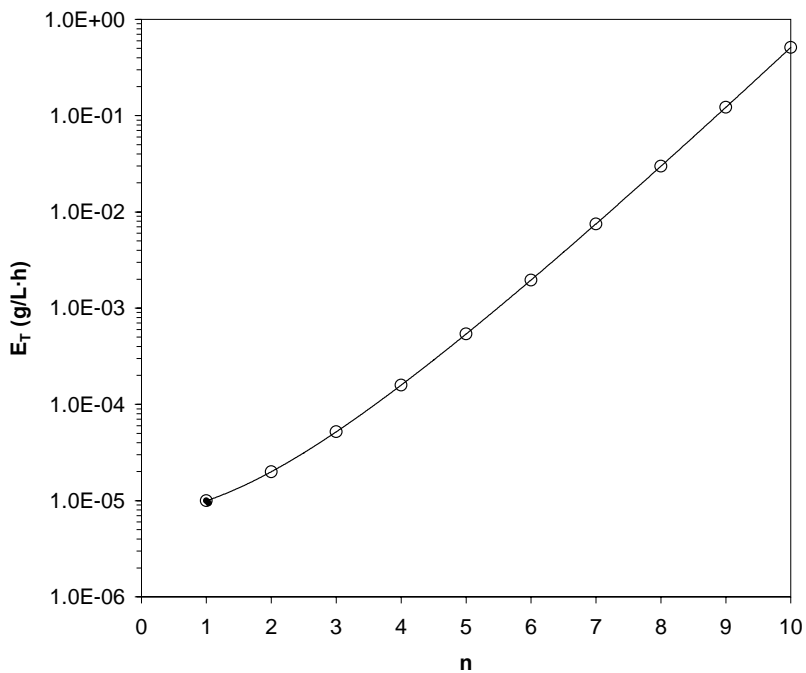


Figura 6-144. Evolución del consumo de enzima en función del número de usos de enzima. $P = 0.01 \text{ h}^{-1}$. $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$

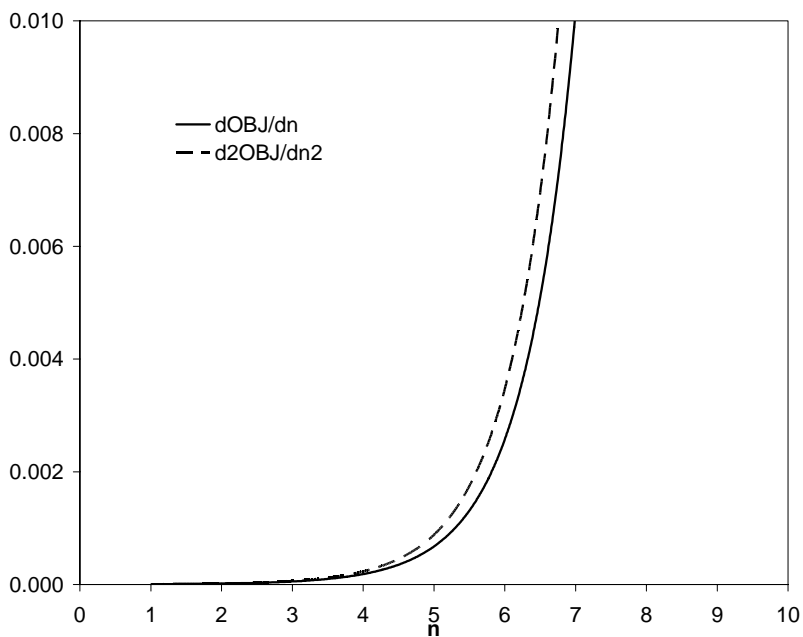


Figura 6-145. Estudio de derivabilidad de la función objetivo. Localización de óptimos y puntos de inflexión. $P = 0.01 \text{ h}^{-1}$. $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$

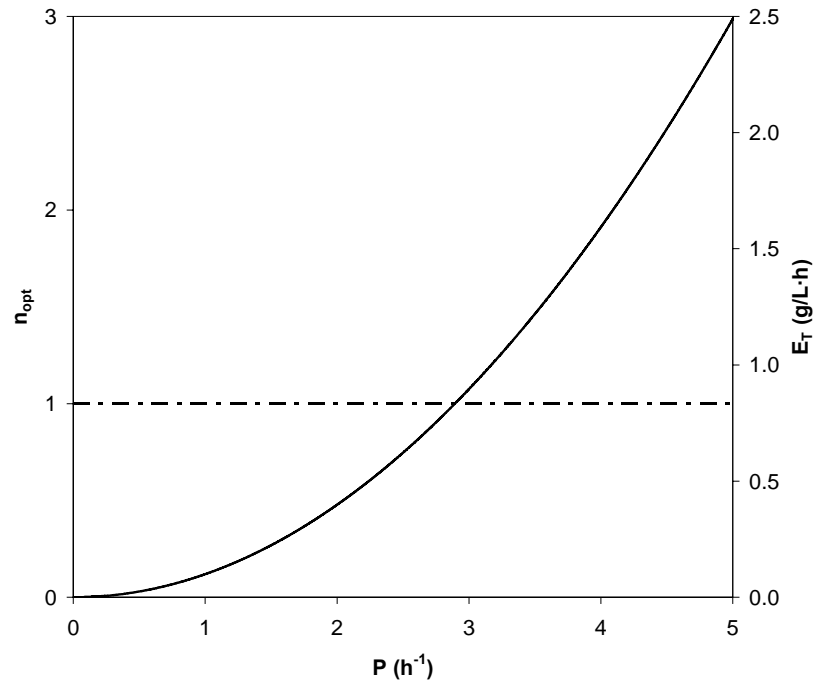


Figura 6-146. Consumo de enzima en función del número de usos de enzima (línea continua) y número óptimo de usos de enzima (●) en función de la productividad. $T=70^{\circ}C$.

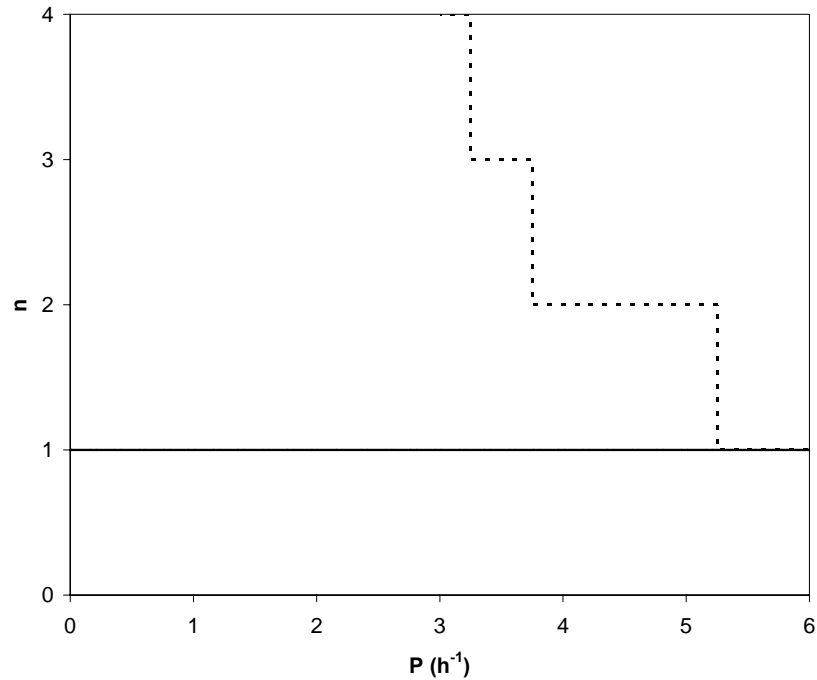


Figura 6-147. Número óptimo de usos de enzima (línea discontinua) y valor de la función objetivo (línea continua) en función de la productividad. $T=70^{\circ}C$

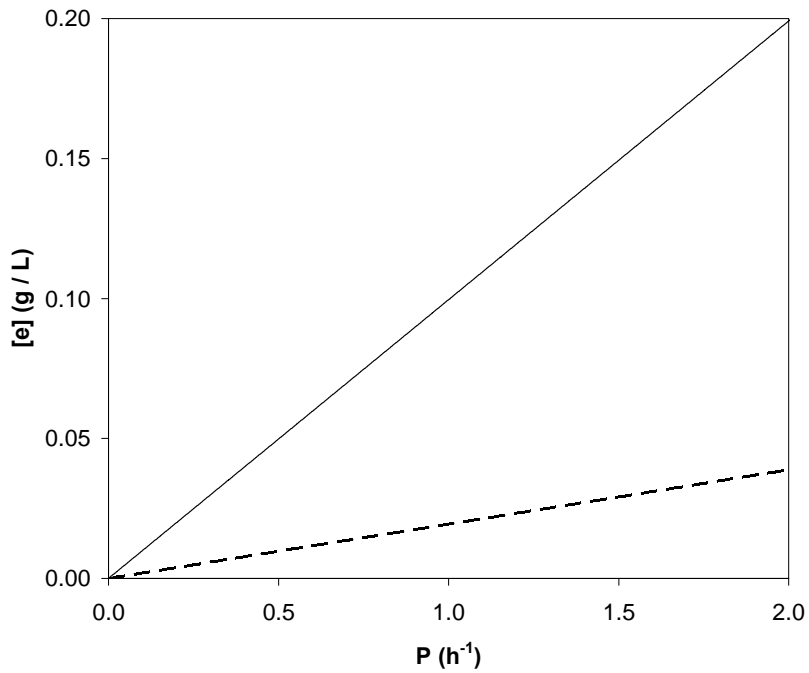


Figura 6-148. e_0 , concentración inicial (línea continua) y e_n , concentración de enzima activa al final de la n -ésima hidrólisis (línea discontinua) en función de la productividad.
T=70°C

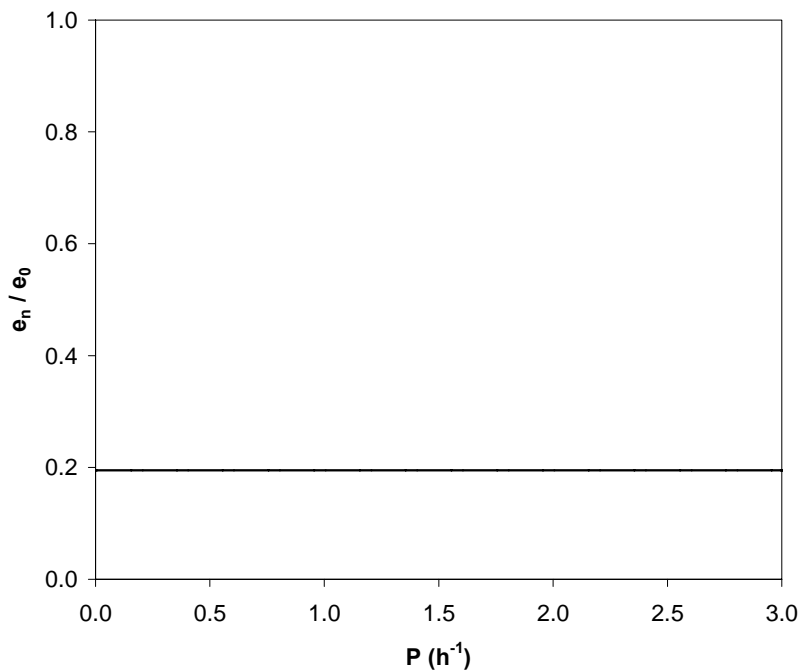


Figura 6-149. Enzima sobrante en función de la productividad. T=70°C

En las Figura 6-148 y Figura 6-149 se representan las concentraciones de enzima activa inicial y final y la enzima sobrante en función de la productividad. Ambas

concentraciones, e_0 y e_n aumentan linealmente con la productividad y la enzima sobrante es constante, dado que la operación óptima corresponde a $n = 1$ para todo valor de P . Por último, si se considera la definición matemática del ahorro de enzima y teniendo en cuenta que $n_{opt}=1$ para $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se concluye fácilmente que dicho ahorro es nulo.

Finalmente, en la Tabla 6-14 se resume el número óptimo de usos de enzima, el ahorro de enzima, la enzima sobrante y el valor de P por encima del cual no existe ahorro de enzima para las diferentes temperaturas ensayadas

Tabla 6-14. Número óptimo de usos de enzima, productividad para la cual no existe ahorro, ahorro de enzima y enzima sobrante en función de la temperatura de operación del reactor

T ($^{\circ}\text{C}$)	n_{opt} ($P > 0$)	P_{AE}	$(e_n/e_0)_{n=1}$	$(e_n/e_0)_{n=n_{opt}}$	AE ($P > 0$)
45	8	1.591	0.83	0.22	0.57
50	7	1.521	0.81	0.23	0.53
55	6	1.398	0.78	0.23	0.46
60	4	1.114	0.71	0.25	0.32
65	2	0.255	0.52	0.27	0.05
70	1	0.000	0.20	0.20	0.00

En primer lugar, debe hacerse notar que para todas las temperaturas ensayadas existe un modo de operación óptimo con reciclado de enzima (entre 8 y 2 para los extremos de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $65\text{ }^{\circ}\text{C}$), esto es, el sistema con reutilización permite ahorrar enzima frente al reactor por lotes. Sólo en el caso de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ no existe un ahorro de enzima. A $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ la desactivación enzimática es tan considerable que se debe trabajar con cantidades de catalizador elevadas. Por otra parte, si se considera la operación del sistema temperatura por temperatura, destaca el hecho de que el número óptimo de usos de enzima es menor a medida que aumenta la temperatura.

En segundo lugar, tal como se ha comprobado anteriormente, existe un valor límite de productividad ($P_{critica}$) por encima del cual no se obtiene ahorro de enzima (esto es $n_{opt}=1$ independientemente de las condiciones de operación). Dicho valor viene dado por el cociente $P = R/t_F = 2.25$. Además de este valor crítico teórico, la productividad

para la cual n_{opt} pasa de ser igual a 2 para ser 1 supone un límite práctico inferior a la $P_{crítica}$. Este valor límite oscila entre $P=1.591 \text{ h}^{-1}$ y 0.255 h^{-1} para 45 °C y 65 °C , disminuyendo a medida que aumenta la temperatura del sistema. Por tanto, cuanto menor es la temperatura de operación más amplio es el rango de productividad para el cual $n_{opt}>1$. La necesidad de operar con productividades menores de la $P_{2 \rightarrow 1}$ se justifica por el hecho de que no existe ahorro si $n_{opt}=1$ (como ocurre a 70 °C).

En cuanto a la enzima sobrante, existe un valor máximo de enzima sobrante dado por la operación $n = 1$, sin reutilización de la enzima. Es decir, operando con un reactor tanque agitado por lotes la cantidad de enzima cuya actividad catalítica no es empleada llega hasta el 83 % del total de enzima añadida para la operación a 45 °C . Este máximo desaprovechamiento de enzima disminuye con la temperatura, de manera que a 65 °C la enzima sobrante máxima es el 52 % de la inicial. Este hecho se debe a que mayores temperaturas de reacción conllevan mayor actividad de la enzima y paralelamente mayor desactivación térmica. Por el contrario, como consecuencia de la operación del sistema con un número óptimo de usos de enzima y, por tanto, productividades menores al límite $P_{n-1 \rightarrow n}$; se obtiene un mínimo de enzima sobrante al final de la operación. A diferencia de otras magnitudes características de la operación del reactor, este valor es prácticamente constante con la temperatura de operación, variando ligeramente entre 0.22-0.27. Es decir, sólo un 22-27 % de enzima se desaprovecha en la operación óptima del reactor discontinuo de membrana. Aprovechar este resto de enzima con etapas sucesivas de ultrafiltración y posterior reacción conllevaría un consumo mayor de enzima.

Por último, el ahorro máximo conseguido varía entre 0.58 para operación a 45 °C y 0.05 para 65 °C , disminuyendo a medida que la temperatura aumenta. También el rango de productividad para el cual hay ahorro es más estrecho a 65 °C frente a temperaturas inferiores. En apariencia estos resultados invitan a pensar que es más ventajoso trabajar a 45 °C que a temperaturas superiores. Esto no es cierto debido a que el ahorro de enzima compara la operación del sistema a una temperatura dada frente al reactor por lotes a igual temperatura, pero no aporta ninguna información acerca del balance entre diferentes temperaturas. Por tanto, para aseverar a qué temperatura debe operarse el sistema se debe optimizar conjuntamente la temperatura y el número de usos de enzima.

6.5.2 Optimización a temperatura constante

Los resultados obtenidos en el funcionamiento isoterma del reactor en el rango de temperaturas fijadas, 45°-70 °C, ponen de manifiesto la influencia de la temperatura en su operación. En la optimización de la operación del sistema para una temperatura fijada previamente se ha determinado que para un valor dado de productividad existe un número de usos de enzima que minimiza la cantidad total de enzima a emplear. Como se ha puesto de manifiesto, el número óptimo de usos de enzima, n_{opt} , es diferente para cada temperatura ensayada. Así pues, con el objeto de cotejar modos de operación del sistema discontinuo de membrana a diferentes temperaturas debe compararse el valor de la función objetivo E_T para valores de productividad dados. Es decir, debe optimizarse conjuntamente la temperatura de operación y el número de usos de enzima. Esto es, dado un valor de productividad P , determinar n y T para minimizar el consumo de enzima E_T . En este caso, la temperatura óptima obtenida se mantiene durante todas las n hidrólisis que se llevan a cabo.

Dicho problema de optimización es equivalente al planteado en la sección 6.5.1, ahora bien, en este caso la temperatura de operación no se considera una variable impuesta sino que es un grado de libertad más en el problema. Por ello, el número de grados de libertad es 2 (n y T). El problema de optimización mixta con variables enteras y programación no lineal se resuelve por enumeración, es decir, calculando las posibles soluciones si se fija una variable. La comparación entre los valores obtenidos de la función objetivo permite descartar valores no óptimos y calcular el mejor modo de operación. Siguiendo este enfoque, en las Figura 6-150, Figura 6-151 y Figura 6-152 se muestra el valor que toma la función objetivo para diferentes temperaturas de operación considerando varias productividades. En cada figura se representan los valores que toma el consumo de enzima en función de la temperatura para el modo óptimo de operación dado por n . Es decir, estas figuras representan todos los posibles modos de operación del sistema de reacción. Cada curva corresponde a un valor de n (n crecientes se representan de izquierda a derecha de las figuras).

En primer lugar, debe destacarse que para las curvas correspondientes a $n = 1$, es decir sin reutilización de la enzima, puede apreciarse que el mínimo obtenido es 65.7 °C. Por tanto, el modelo propuesto para el reactor discontinuo de membrana permite optimizar también el funcionamiento del reactor tipo *batch* convencional, ya que éste es un caso

particular con $n = 1$. Así pues, no sólo existe un óptimo de producción para el reactor con reutilización de enzima, sino también para el reactor batch. Como se ha demostrado previamente, el efecto contrapuesto de la velocidad de hidrólisis (dado por k_h) y la desactivación térmica de la enzima (dada por k_d) hace prever la existencia de una temperatura óptima que balancea ambos fenómenos. Así ocurre para cada productividad requerida. Por otra parte, en cada curva se representa el mínimo valor de la función objetivo para un número dado de usos de enzima (marcado por círculos blancos). La comparación del valor mínimo para cada curva permite determinar el óptimo global para cada valor de productividad, aquel valor que conlleve un consumo de enzima menor (círculos negros en las figuras).

A continuación se presentan tres valores de productividad para los que se obtienen diferentes valores de n_{opt} : 0.5, 0.6 y 1 h^{-1} . En el caso de productividad 0.5 h^{-1} (Figura 6-150) el mejor valor entre los mínimos locales viene dado por una temperatura de 59.4 °C y $n_{opt} = 4$. Como se ha comentado previamente este valor corresponde al menor entre los mínimos locales para cada curva de n . Previamente se definió el ahorro de enzima conseguido por el reactor para cada temperatura como el cociente entre el consumo en el modo de operación óptimo a esa temperatura fijada respecto al consumo para el caso de $n = 1$ a esa misma temperatura. Es decir, se calculaba el óptimo de operación para una temperatura dada y se comparaba con la operación del reactor batch cuya operación no era optimizada.

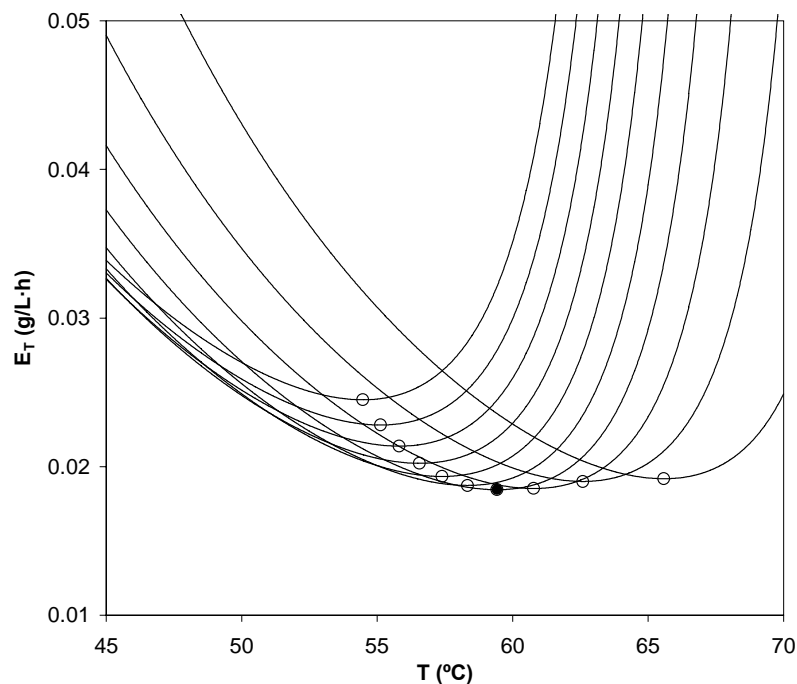
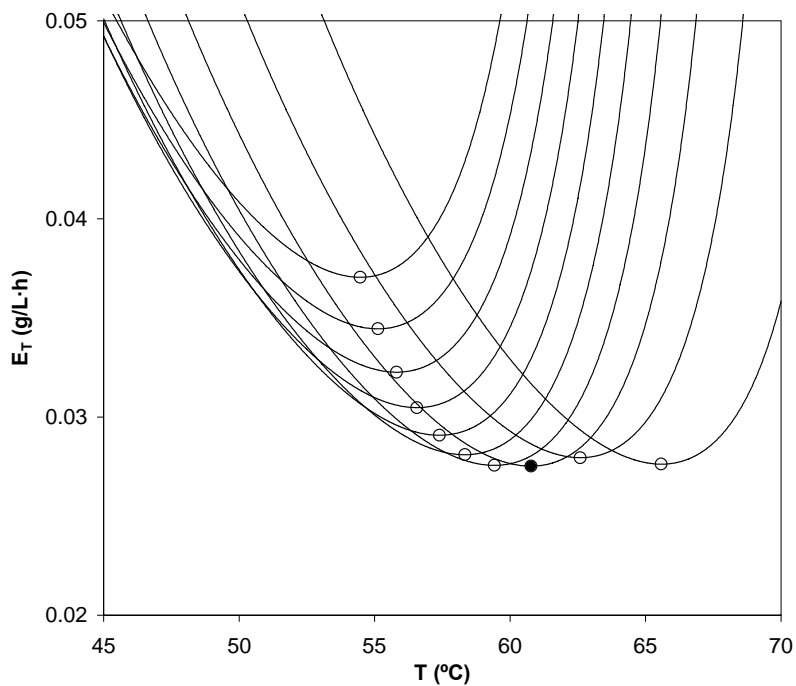


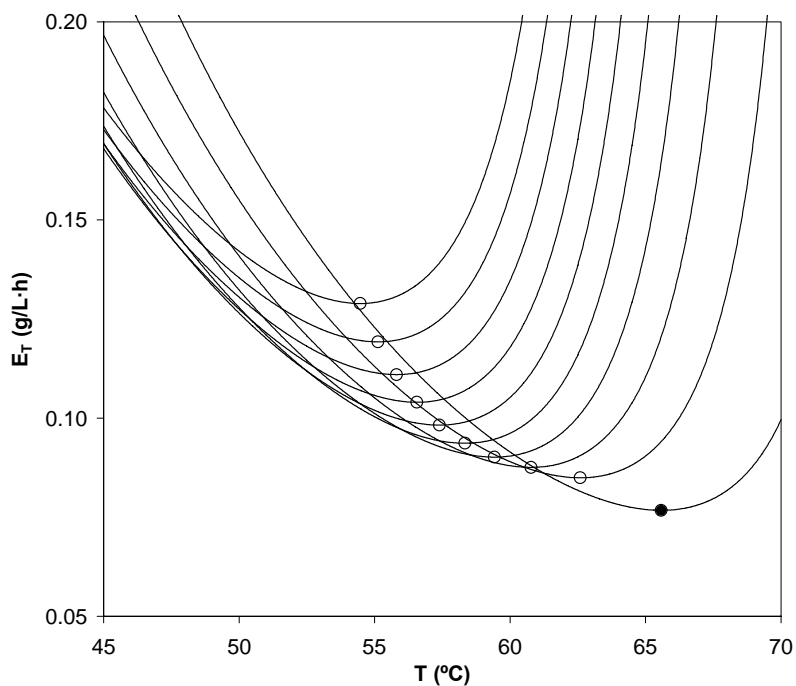
Figura 6-150. Consumo de enzima en función de la temperatura de operación para diferente número de usos de enzima (línea continua) y mínimo consumo de enzima (●). $P=0.5 \text{ h}^{-1}$

En el caso de la optimización de T y n del reactor discontinuo de membrana, el ahorro de enzima debe calcularse comparando la mejor operación del sistema frente a la mejor operación del reactor batch, aunque se trate de temperaturas de operación diferentes en ambos casos. Por consiguiente, el ahorro de enzima se define ahora como el cociente entre el consumo de enzima a la temperatura óptima (es decir, el mejor modo de operación con reutilización entre todos los posibles) y el consumo de enzima para la mejor temperatura con $n_{\text{opt}} = 1$ (en este caso $65.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$, es decir, el modo óptimo para la operación sin reutilización de enzima). En este caso, el ahorro logrado es 3.9% .

Para una productividad de 0.6 h^{-1} , la temperatura óptima es $60.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $n_{\text{opt}}=3$ y el ahorro conseguido respecto a la mejor operación del reactor batch es sólo del 0.4% (Figura 6-151). Para mayores valores de productividad, no se obtiene ahorro alguno puesto que el mejor modo de operación es el del reactor sin reutilización de enzima: por ejemplo, para $P = 1.0 \text{ h}^{-1}$, Figura 6-152; puede observarse claramente que el óptimo global corresponde a $n = 1$ y temperatura mayor de $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$.



**Figura 6-151. Consumo de enzima en función de la temperatura de operación para diferente número de usos de enzima (línea continua) y mínimo consumo de enzima (●).
P=0.6 h⁻¹**



**Figura 6-152. Consumo de enzima en función de la temperatura de operación para diferente número de usos de enzima (línea continua) y mínimo consumo de enzima (●).
P=1.0 h⁻¹**

En la Figura 6-153 se representan simultáneamente el mínimo consumo de enzima entre todos los posibles modos de operación y, por tanto, el número óptimo de usos de enzima correspondiente a dichos mínimos en función de la productividad. Cada número óptimo de usos de enzima corresponde también a una temperatura óptima de operación. En dicha figura se aprecia que no hay ningún modo de operación tal que n_{opt} sea igual a 2, sino que de n_{opt} pasa de 3 a 1. Por otra parte, nuevamente el consumo de enzima es mayor cuanto mayor sea la productividad requerida. Los cambios en el valor de n_{opt} en función de P se resumen en la Tabla 6-15. De dicha tabla puede deducirse que sólo existe ahorro de enzima para la operación a la temperatura óptima si $P < 0.58 \text{ h}^{-1}$.

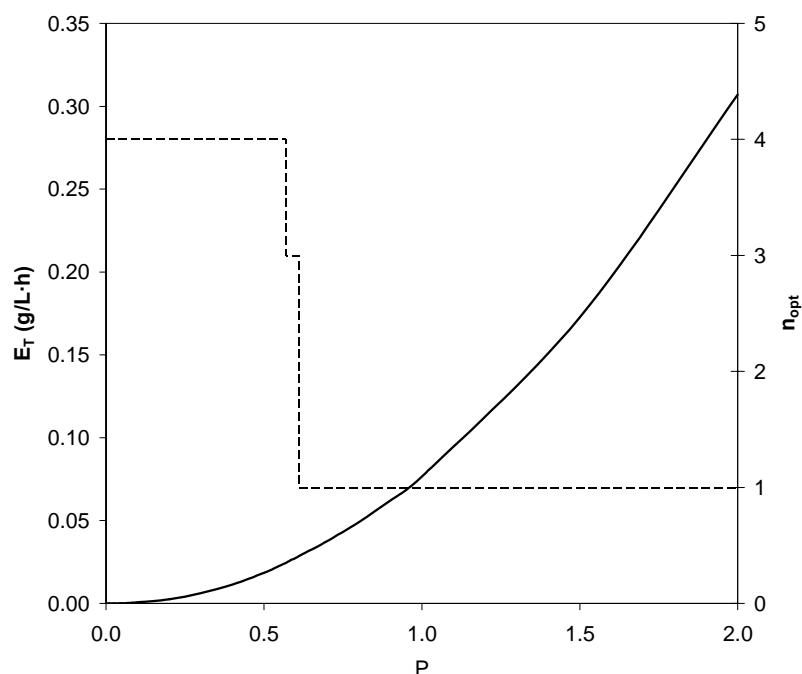


Figura 6-153. Consumo de enzima y número óptimo de usos de enzima frente a la productividad para temperaturas de operación óptimas

En principio, cabría pensar que las parejas de valores n - T que minimizan E_T para diferentes productividades pueden ser muy variadas. Por ejemplo, serían posibles soluciones que dieran igual n pero diferentes temperaturas óptimas si se imponen productividades diferentes. Sin embargo, no ocurre así sino que la temperatura de operación se asocia íntimamente al número óptimo de usos de enzima calculado. Es decir, para cada valor de n_{opt} existe una y sólo una temperatura óptima, siempre la misma independientemente de la productividad. Dichos valores de temperatura se

muestran en la Figura 6-154: para cualquier productividad que conlleve $n_{opt}=4$, la temperatura de operación es siempre 59.4 °C. Los cambios en el valor de n_{opt} y T_{opt} en función de P se resumen en la Tabla 6-15. De dicha tabla puede deducirse que sólo existe ahorro de enzima para la operación a la temperatura óptima si $P < 0.62 \text{ h}^{-1}$ y que para todos los valores de P que den un n_{opt} concreto, la T_{opt} es igual.

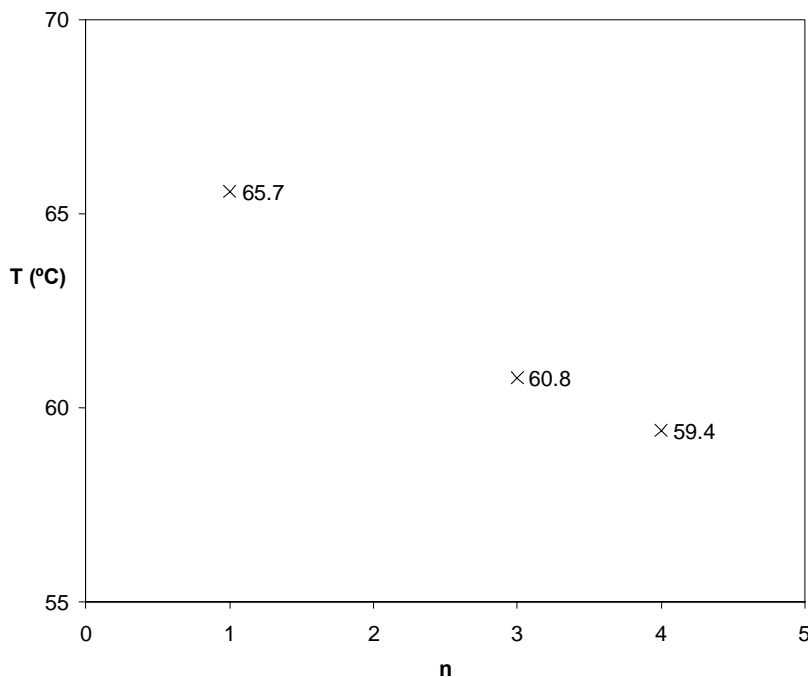


Figura 6-154. Temperaturas de operación óptimas en función del número óptimo de usos de enzima

Tabla 6-15. Cambios de número óptimo de usos de enzima frente a productividad

P (h ⁻¹)	n _{opt}	T _{opt} (°C)
> 0.62	1	65.7
0.61-0.58	3	60.8
< 0.58	4	59.4

Por último, en la Figura 6-155 se representa el ahorro de enzima en función de la productividad del reactor. Para la operación a temperatura constante el ahorro de enzima se define de manera análoga al caso de temperatura fijada, ecuación [6.22]. Sin embargo, debe destacarse que en el caso de temperatura constante, el valor de la función objetivo cuando $n=n_{opt}$ corresponde a una temperatura de 59.4 °C mientras que la temperatura si $n=1$ es 65.7 °C.

$$AE = 1 - \frac{(E_T)_{n=nopt}}{(E_T)_{n=1}}$$

Al igual que en las temperaturas ensayadas (45 – 70 °C), el máximo valor de ahorro se obtiene en el límite $P \rightarrow 0$. En este caso, el ahorro máximo es 18.6 % para 59.4 °C y $n_{opt}=4$. A medida que aumenta la productividad, el ahorro obtenido es menor, hasta llegar a valores de ahorro nulo si $P > 0.62 \text{ h}^{-1}$.

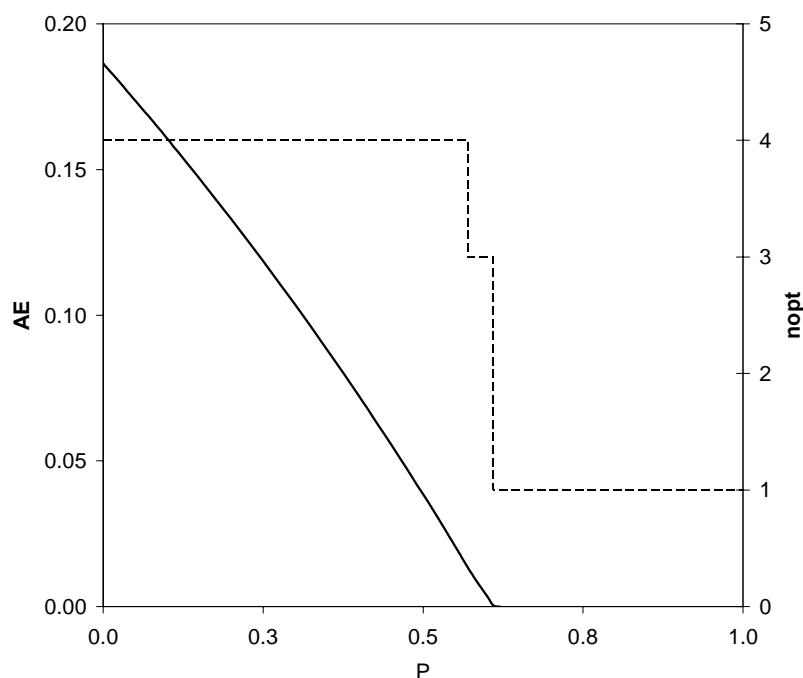


Figura 6-155. Ahorro de enzima (línea continua) y número óptimo de usos de enzima (línea discontinua) frente a productividad para la operación óptima del reactor a temperatura constante

De acuerdo a estos resultados se deduce cómo la elección de la productividad determina el modo de operación óptimo para producir un hidrolizado. Es decir, en el caso de fijarse una productividad alta se requieren tiempos de operación cortos y, por consiguiente, una concentración de enzima elevada para alcanzar el grado de hidrólisis deseado de manera rápida, sin que exista reutilización de la enzima en sucesivas hidrólisis. Empleando este modo de operación se consume mayor cantidad de enzima en comparación con productividades menores. En definitiva, el sistema propuesto permite operar con gran flexibilidad, puesto que en función de las necesidades de cada momento puede adaptarse su funcionamiento con el objetivo de acelerar la producción (valores de P altos) o bien minimizar el consumo (valores de P bajos).

6.5.3 Optimización a temperatura variable

En la optimización conjunta del número de usos de enzima y la temperatura, se define una progresión óptima de temperatura como el modo de operación que minimiza la cantidad de enzima a emplear siendo la temperatura variable en cada una de las utilizaciones de la enzima. Se trata pues de determinar el número óptimo de utilizaciones de enzima a emplear durante el ciclo de operación y la temperatura óptima de cada hidrólisis. Esto es, optimizar conjuntamente n y la progresión de temperaturas de operación que minimizan la cantidad total de enzima empleada en el proceso.

Al igual que en el caso de optimización a temperatura constante, la función objetivo es la cantidad de enzima a emplear: $E_T = \frac{e_0}{t_T}$, ecuación [6.13]. De igual manera, el tiempo

total de operación incluye el tiempo de hidrólisis más los tiempos de las filtraciones llevadas a cabo: $t_T = t_n + (n-1) \cdot t_f$, ecuación [6.15]. Por último, la productividad se

define como: $P = \frac{(n-1) \cdot R + 1}{t_T}$, ecuación [6.14] Aún siendo similares las deficiones de

la función objetivo, el tiempo total de operación t_T y la productividad P para operación a temperatura constante y variable, los parámetros del modelo que son función de la temperatura deben modificarse para la optimización conjunta de número de usos de enzima más temperatura. Dado que la temperatura de operación puede variar en cada hidrólisis, los valores de las constantes k_h y k_d no son necesariamente iguales en cada reacción. Es decir: $k_{h1} \neq k_{h2} \neq \dots \neq k_{hn}$ y $k_{d1} \neq k_{d2} \neq \dots \neq k_{dn}$.

La ecuación [5.20] para la hidrólisis i -ésima operando a temperatura variable queda:

$$\frac{x \cdot S_0}{k_{h_i}} = \frac{1}{k_{d_i}} \cdot \log(1 + k_{d_i} e_{i-1} (t_i - t_{i-1}))$$

$$i = 1, 2, \dots, n$$
[6.24]

La dependencia de k_h con la temperatura viene dada por una expresión de tipo Arrhenius:

$$k_{h_i} = A_h \cdot \exp\left(\frac{-E}{R T_i}\right)$$
[6.25]

Para cada utilización se define una constante de desactivación enzimática, ecuación [6.26]:

$$k_{di} = \exp\left(A_1 - \frac{E_{A1}}{T_i}\right) + \exp\left(A_2 - \frac{E_{A2}}{T_i}\right) \quad [6.26]$$

Por último, la concentración de enzima en cada utilización de enzima viene dada por la ecuación [6.27]:

$$e_i = \frac{1}{\frac{1}{e_{i-1}} + k_{di} \cdot (t_i - t_{i-1})} \quad [6.27]$$

El conjunto de las ecuaciones [6.12]-[6.14] y [6.23]-[6.26] define la operación del reactor discontinuo de membrana con temperatura variable. Dicho conjunto de ecuaciones constituye un sistema de tres ecuaciones no lineales con tres incógnitas, por tanto, la resolución analítica de este conjunto de ecuaciones no es posible y sólo puede resolverse numéricamente. El problema de optimización corresponde a un caso de programación mixta (con variables enteras y problemas de programación no lineal, esto es, MINLP) que se resuelve empleando la técnica de enumeración (Smith, 1996). En esta técnica se resuelve el problema planteado (cálculo del consumo de enzima total a emplear) para cada uno de los posibles casos (diferente número de usos de enzima) y el óptimo es el caso para el que el valor de la función objetivo E_T es mínimo.

Las variables del sistema son las siguientes: E_T , n , P , t_F , t_T , e_0 , t_i , e_i , k_{di} , k_{hi} , T_i con $i=1, \dots, n$. Esto es, $5 \cdot n + 6$.

El número de ecuaciones del modelo es: $4 \cdot n + 3$. Teniendo en cuenta que, tanto t_F como P son variables impuestas, el número de grados de libertad es $n+1$. Por tanto, las variables a optimizar son n y la temperatura de las sucesivas hidrólisis, T_i . La resolución por enumeración incluye la resolución de un problema NLP por cada valor de n y P . En las Figura 6-156 y Figura 6-157 se muestran las soluciones al problema de optimización para diferentes valores de productividad.

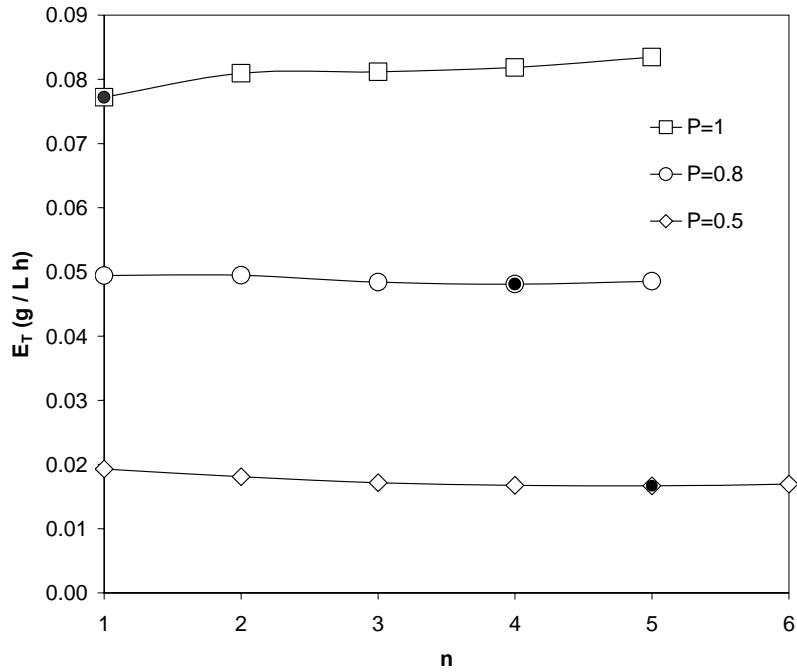


Figura 6-156. Consumo de enzima frente al número de usos de enzima para diferentes productividades (línea continua) con operación a temperatura variable y número óptimo de usos de enzima (círculos negros) $P \in [0.5-1.0]$

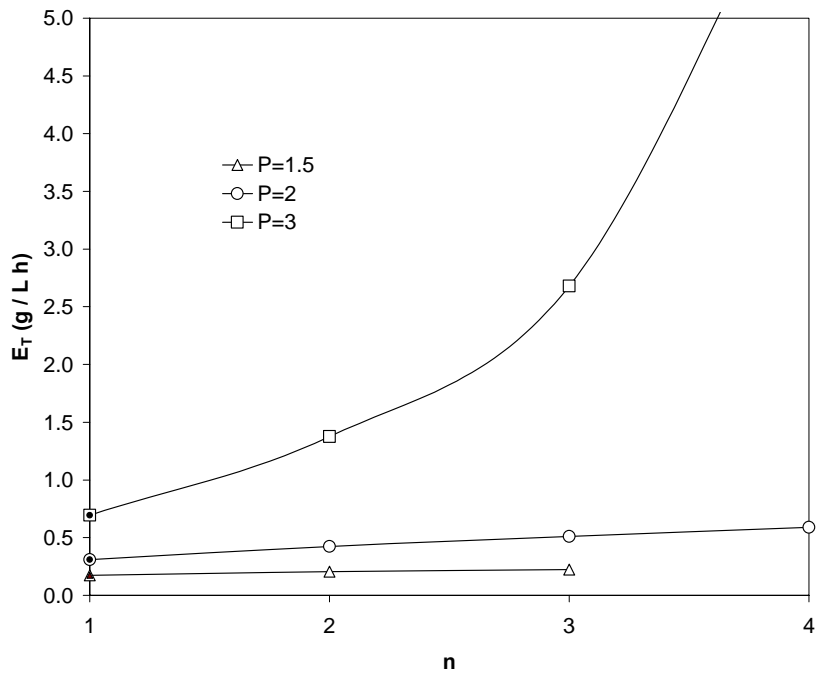


Figura 6-157. Consumo de enzima frente al número de usos de enzima para diferentes productividades (línea continua) con operación a temperatura variable y número óptimo de usos de enzima (círculos negros). $P \in [1.5-3.0]$

Para valores de productividad menores de 1.0 (Figura 6-156) existe un número óptimo de usos de enzima mayor que 1 que minimiza el consumo de enzima dado por E_T , siendo $n_{opt}=5$ para $P=0.5$ y $n_{opt}=4$ para $P=0.8$; mientras que para $P=1.0$, $n_{opt}=1$. Para valores de productividad mayores de 1.0 (Figura 6-157) se aprecia que la función E_T es estrictamente creciente en todo el dominio de n , por lo que la operación óptima del sistema es aquella dada por $n_{opt}=1$. Por otra parte, al igual que en la operación a temperatura constante, una exigencia de mayor productividad conlleva un mayor valor de la función E_T .

A diferencia de la operación con temperatura constante y de acuerdo con los resultados de las Figura 6-156 y Figura 6-157 el número óptimo de usos de enzima varía entre 1-5 (en el caso de temperatura constante, según la temperatura de operación, y la productividad, n_{opt} podía alcanzar hasta un valor de 8 para la operación a 45 °C).

En la resolución del problema de optimización para temperatura variable se obtiene que aquellas productividades que dan un modo óptimo determinado por una misma n , la progresión de temperaturas para las sucesivas hidrólisis es siempre igual. La diferencia entre operaciones dadas por igual n pero diferente P es la duración de las sucesivas hidrólisis. Así pues, en la Figura 6-158 se representa la temperatura de las sucesivas hidrólisis, T_1, T_2, \dots, T_n frente al tiempo acumulado de hidrólisis, (esto es, t_n ; suma de los sucesivos tiempos de hidrólisis, $t_1 + t_2$ si $n=2$, $t_1 + t_2 + t_3$ si $n=3$ y así sucesivamente) para una productividad de 0.58 h^{-1} .

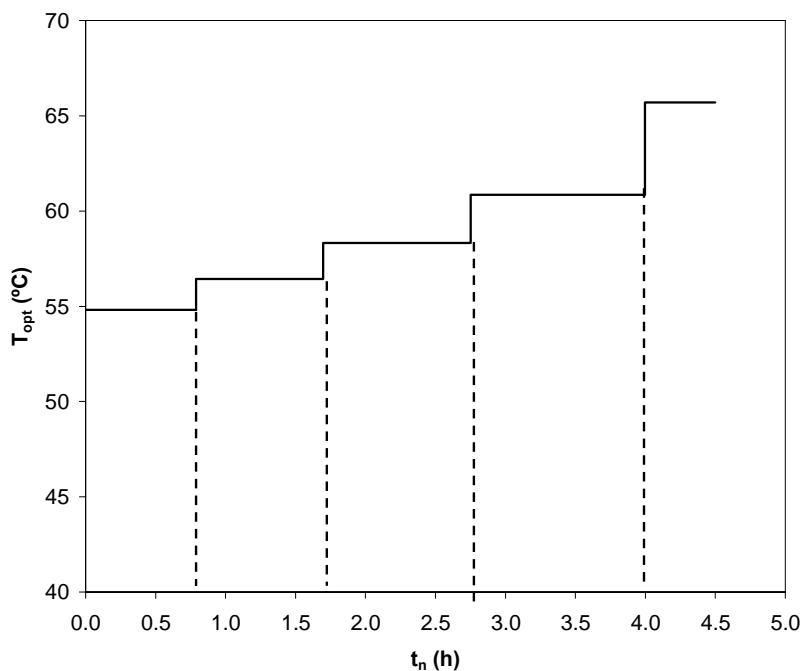


Figura 6-158. Progresión de temperatura con $n_{opt}=5$. $P=0.58 \text{ h}^{-1}$

En este caso el número óptimo de usos de enzima es 5. Las temperaturas de operación de todas las hidrólisis son superiores a 55 °C e inferiores a 66 °C. La operación se mueve en este rango de temperaturas, comenzando desde la temperatura inferior para la hidrólisis 1 y terminando a 65.7 °C en las etapas finales. Las líneas discontinuas verticales delimitan cada una de las hidrólisis. En cuanto al tiempo de hidrólisis, la duración de cada reacción viene dada por dos variables: la concentración de enzima activa en el medio de reacción y la temperatura en el reactor.

La concentración de enzima activa al final de una reacción depende de la temperatura de operación. Así pues, una temperatura inicial de operación baja permite conservar la enzima activa para sucesivas hidrólisis. A medida que la operación se prolonga con varias filtraciones y reutilizaciones de enzima, debe compensarse la desactivación de la enzima con una mayor temperatura de operación para alcanzar el grado de hidrólisis fijado. Por ello a partir de la segunda hidrólisis se aumenta la temperatura de operación y disminuyen los tiempos de hidrólisis con respecto a la primera. Finalmente, la temperatura sube al máximo de 66 °C (hidrólisis número 5), aunque se observa que el tiempo de hidrólisis aumenta irremisiblemente, debido a que la concentración de enzima activa se reduce cada vez más.

En la Figura 6-159 se representa la progresión óptima de temperatura para una productividad de 0.89 h^{-1} , siendo el número óptimo de usos de enzima igual a 4. En este caso el perfil de temperaturas de las sucesivas reacciones es similar al caso de $n_{\text{opt}}=5$: la primera hidrólisis se realiza a una temperatura inferior, aumentando la temperatura de operación hasta alcanzar $65.7 \text{ }^\circ\text{C}$ en la última hidrólisis. También la duración de las sucesivas hidrólisis presenta igual progresión: la temperatura baja con un tiempo t_1 alto conlleva una desactivación térmica moderada y el aumento final de temperatura con menores tiempos de hidrólisis permite aprovechar al máximo la cantidad de enzima residual.

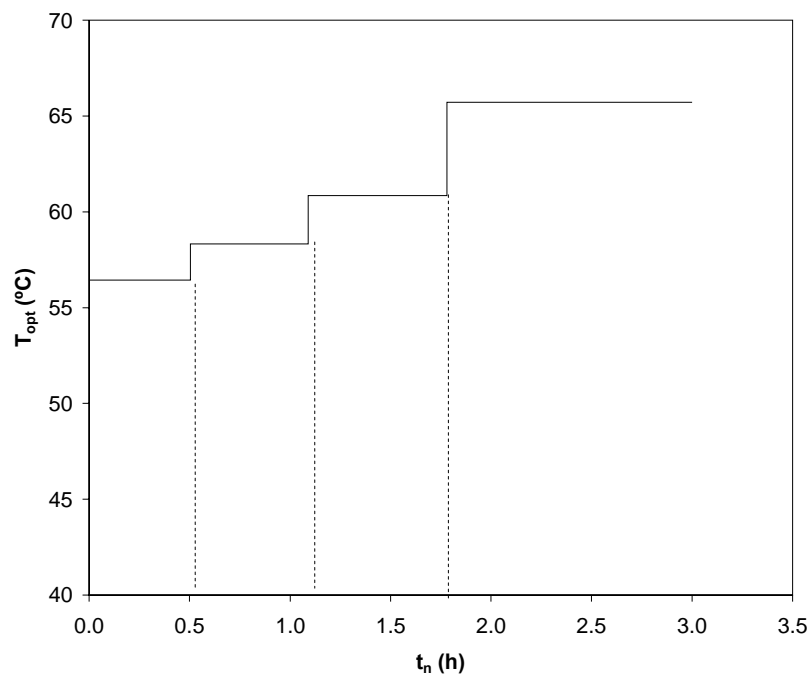


Figura 6-159. Progresión de temperatura con $n_{\text{opt}}=4$. $P=0.89 \text{ h}^{-1}$

En el caso de operación a temperatura variable no existe un valor de P al que corresponda $n_{\text{opt}}=2$ ni $n_{\text{opt}}=3$. Por el contrario, se pasa de $n_{\text{opt}}=4$ a 1 en un estrecho rango de productividad. Por último, para una productividad de 1.2 h^{-1} , el número óptimo de usos de enzima es 1 y la temperatura de operación $65.7 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 6-160). En estos dos últimos casos, es evidente que no existe diferencia entre el modo de operación a temperatura constante de $65.7 \text{ }^\circ\text{C}$ y temperatura variable. Es decir, la resolución del problema de optimización conjunta de número de usos de enzima y temperatura demuestra que el óptimo viene dado por la operación a temperatura constante de $65.7 \text{ }^\circ\text{C}$.

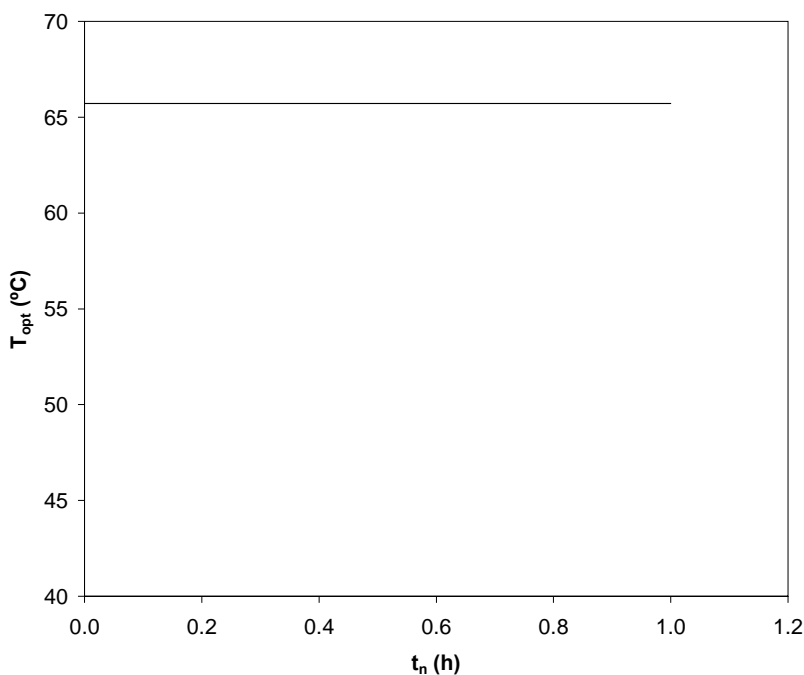


Figura 6-160. Progresión de temperatura con $n_{opt}=1$. $P=1.0 h^{-1}$

Las temperaturas para las sucesivas hidrólisis se muestran en la Tabla 6-16. Puede apreciarse que, independientemente de la productividad, las temperaturas de operación son siempre las mismas para todos los modos de producción dados por un mismo valor de n_{opt} .

Tabla 6-16. Perfil de temperatura en función del número óptimo de usos de enzima

	$n_{opt}=5$	$n_{opt}=4$	$n_{opt}=1$
n	T ($^{\circ}C$)	T ($^{\circ}C$)	T ($^{\circ}C$)
1	54.8	56.4	65.7
2	56.4	58.3	-
3	58.3	60.9	-
4	60.9	65.7	-
5	65.7	-	-

Según se aprecia en la Tabla 6-16, la variación de la temperatura de reacción en las sucesivas hidrólisis es de creciente. El incremento es de 1.6, 1.9, 2.5 y 4.9 °C desde $n_{opt}=1$ hasta $n_{opt}=5$.

La evolución de la concentración de enzima activa en el medio de reacción frente a la productividad se muestra en la Figura 6-161. Cada una de las series representadas

corresponde a la concentración de enzima en cada hidrólisis, así pues, e_i con $i=1, \dots, n$ corresponde a la concentración de enzima al final de la primera, \dots , n -ésima hidrólisis, respectivamente. Se denomina e_0 a la cantidad de enzima añadida al inicio del ciclo de producción. Consecuentemente con la cinética de desactivación de la enzima, $e_0 > e_1, \dots, e_{n-1} > e_n$.

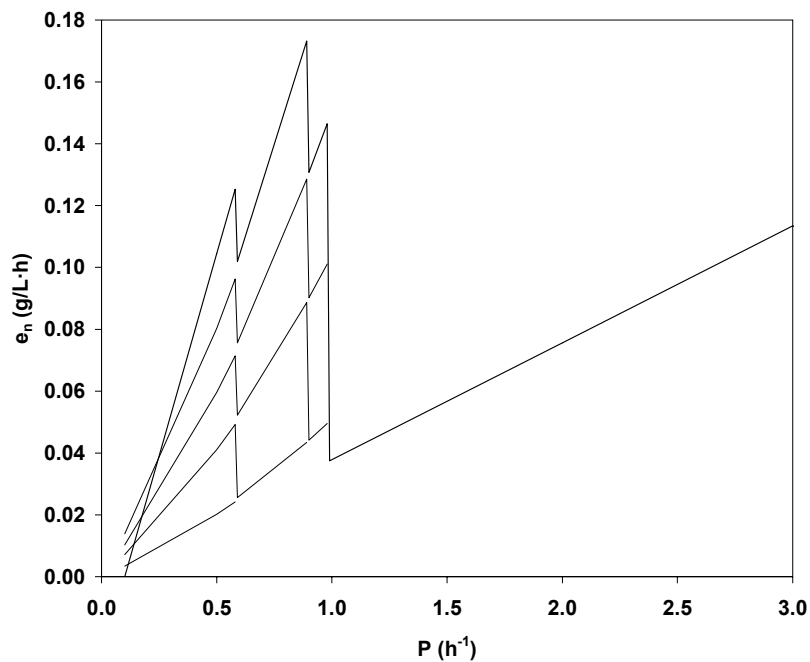


Figura 6-161. Concentración de enzima activa en la n -ésima hidrólisis en función de la productividad. Operación con temperatura variable

Para productividad menor de 0.58 h^{-1} existen curvas desde e_0 hasta e_5 , puesto que el modo de operación óptimo viene dado por $n_{\text{opt}}=5$. Por el contrario, para productividad mayor de 1.0 h^{-1} , sólo existe la curva de e_0 y e_1 , puesto que $n_{\text{opt}}=1$. Sin embargo, la existencia de las curvas e_i se encuentra limitada por los valores de productividad que determinan el correspondiente n_{opt} . A medida que la productividad es mayor la concentración de enzima inicial e_0 es más elevada. Las discontinuidades de concentración de enzima se corresponden con el límite de productividad para el cuál existe un resultado diferente del problema de optimización. Es decir, el valor de n_{opt} cambia. De esta manera, para los valores límite de P mostrados en la Tabla 6-17 se aprecian cambios bruscos en la tendencia de las curvas de concentración de enzima. Si bien la concentración inicial de enzima disminuye bruscamente al cambiar el modo de operación, debe tenerse en cuenta que la función objetivo E_T no presenta

discontinuidades de este tipo, sino que es continua en todo su dominio. Esto puede deducirse a partir de la definición de la función E_T , ecuación [6.13]. La discontinuidad en e_0 se ve compensada por el cambio similar en el tiempo total de operación, que disminuye proporcionalmente puesto que se realiza un uso menos de la enzima para estos valores límite de productividad.

La diferencia existente entre las curvas de concentración de la Figura 6-161 corresponde a la cantidad de enzima desactivada durante la hidrólisis. Es decir, para un determinado valor de P , la diferencia $e_n - e_{n-1}$ corresponde a la enzima desactivada térmicamente durante la hidrólisis n -ésima. Por otra parte, el cociente entre la cantidad de enzima en la hidrólisis n -ésima y la cantidad inicial de enzima, e_0 , corresponde a la enzima sobrante al final de la operación del sistema a temperatura variable.

El parámetro de enzima sobrante se definió para los anteriores modos de operación del reactor discontinuo de membrana. De igual manera, para la operación a temperatura variable la enzima sobrante es el cociente e_n/e_0 , es decir, la relación entre la concentración de enzima activa al final de las sucesivas hidrólisis, e_n , y la concentración de enzima inicial, e_0 . Como anteriormente se expuso, la enzima sobrante al final de la operación no se reutiliza en otras hidrólisis por lo que esa cantidad de enzima sobrante es completamente desaprovechada. En la Figura 6-162 se representa la enzima sobrante en la operación con temperatura variable frente a la productividad del reactor. Al igual que en la operación a temperatura constante, a medida que la productividad aumenta, la cantidad de enzima sobrante es mayor. Este aumento no es lineal sino que presenta una distribución discreta, es decir, para cada valor de n_{opt} , (que varía entre 1 y 5 para temperatura variable) existe un valor de enzima sobrante. Esto explica la forma de la curva enzima sobrante vs productividad. El menor valor de enzima sobrante (esto es, la operación en la que se aprovecha mayor cantidad de enzima) se obtiene para $P < 0.58 \text{ h}^{-1}$, ya que en este rango de P , $n_{opt}=5$. Si se compara con los valores de la relación e_n/e_0 para la operación a temperatura constante puede apreciarse que para toda productividad, la progresión variable de temperaturas permite agotar la enzima empleada durante la hidrólisis en mayor medida que a temperatura constante. En el mejor de los casos, cuando P tiende a cero, el valor de enzima sobrante e_n/e_0 es 0.23 para temperatura constante frente a 0.15 para temperatura variable.

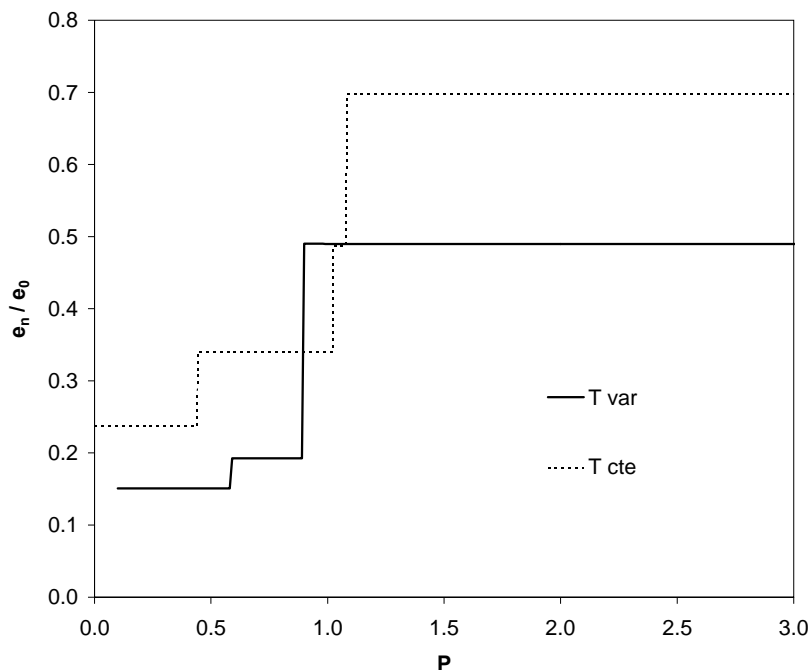


Figura 6-162. Enzima sobrante en la operación a temperatura variable frente a temperatura constante

Como resumen, en la Tabla 6-17 se muestra el valor de enzima sobrante en función del número de usos de enzima y el intervalo de productividad para cada valor de enzima sobrante.

Tabla 6-17. Enzima sobrante en la operación del reactor discontinuo de membrana a temperatura variable

n_{opt}	Rango productividad (h^{-1})	$(e_n/e_0)n_{opt}$
1	>0.99	0.49
4	0.58-0.99	0.19
5	<0.58	0.15

Según los resultados mostrados en la Tabla 6-17, para valores de productividades menores de 0.58 sólo un 15% de enzima sobra al final de la operación, de manera que el 85% restante se emplea como catalizador durante la hidrólisis. En el extremo contrario, para valores de productividad mayores de 0.99, hasta el 51% de enzima sobra, es decir, sólo un 49% de enzima actúa como catalizador. El resto queda intacto al final de la operación y debe desnaturalizarse térmicamente para no quedar activa en el hidrolizado final. Para la operación a temperatura constante, este valor es de 0.70.

Finalmente, el ahorro de enzima se define en la operación a temperatura variable respecto a la operación a temperatura constante. Es decir, se compara la mejor operación con progresión de temperatura variable frente a la mejor operación con temperatura constante. Así pues, se comparan dos modos de operación óptimos:

$$AE = 1 - \frac{(E_T)_{nopt\ T\ var}}{(E_T)_{nopt\ T\ cte}} \quad [6.28]$$

Dicha ecuación ofrece información acerca del ahorro adicional que se obtiene en la operación de temperatura adicional sobre el la operación óptima a temperatura constante. La representación gráfica de este ahorro adicional de enzima (Figura 6-163) presenta tres regiones diferenciadas: a) para $P < 0.59\ h^{-1}$, la operación a temperatura variable consigue un ahorro adicional de enzima entre 9-11 % frente a la operación a temperatura constante; b) entre $0.59-0.89\ h^{-1}$ el ahorro adicional de enzima disminuye de manera apreciable, desde 0.09 hasta hacerse 0 y; c) $P > 0.89\ h^{-1}$ para cuyo caso no existe ventaja de un modo de operación frente a otro.

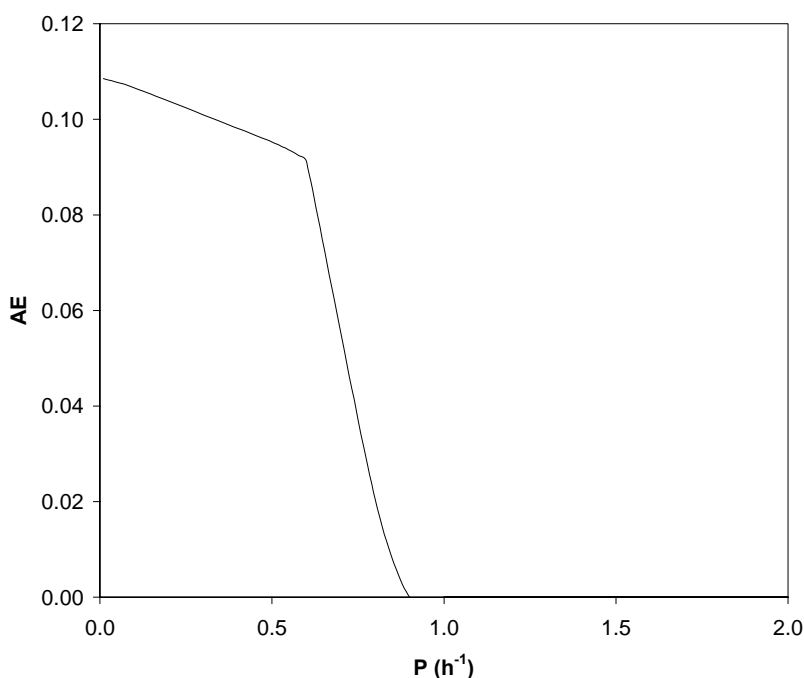


Figura 6-163. Ahorro adicional de enzima para la operación a temperatura variable frente a la operación a temperatura constante.

Finalmente, en la Figura 6-164 se representa la relación entre el tiempo de hidrólisis y tiempo total de operación frente a la productividad del sistema. Al igual que otros

parámetros para la operación del reactor, esta relación depende de la productividad del reactor.

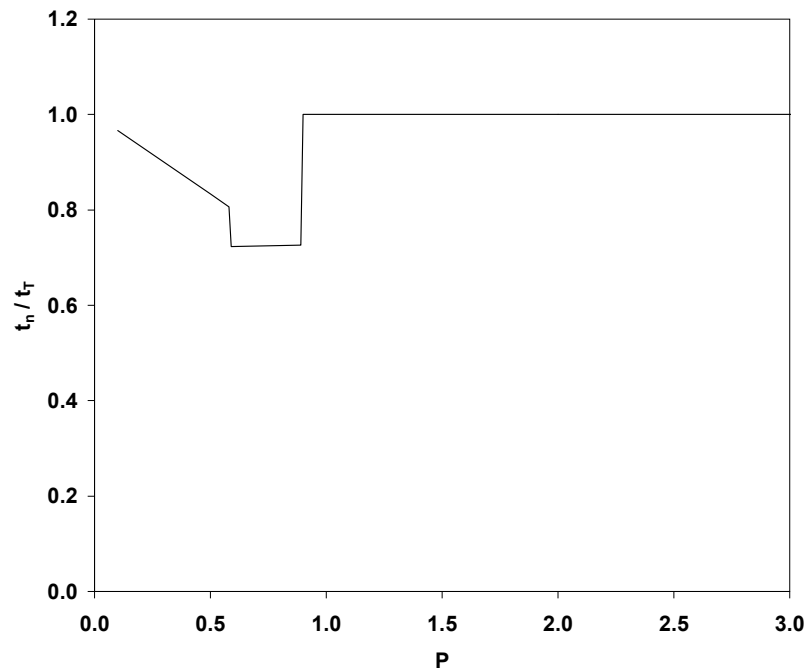


Figura 6-164. Relación tiempo de hidrólisis (t_n) / tiempo total de operación (t_T) en función de la productividad. Operación a temperatura variable

Como se estableció para la operación a temperatura fija, el cociente t_n/t_T corresponde al tiempo de hidrólisis sobre el total de tiempo de operación. Las curvas de relación de tiempos frente a productividad (Figura 6-164) se corresponden a los intervalos de productividad para los diferentes valores de n_{opt} (Tabla 6-17). Para valores de productividad mayores de 0.99, todo el tiempo de operación se dedica a hidrólisis, es decir no hay recuperación de enzima mediante filtración ($n_{opt}=1$). La relación t_n/t_T es prácticamente constante entre $P = 0.98$ y 0.59 ($n_{opt} = 4$), tomando un valor de 0.72; es decir, un 72 % del tiempo de operación se dedica a la hidrólisis. Finalmente, para productividades menores de 0.58, donde $n_{opt} = 5$, la relación de tiempos aumenta con la productividad. A medida que la productividad requerida es menor, la duración de la hidrólisis es mayor, por lo que la reacción t_n/t_T aumenta hasta alcanzar su mínimo cuando P tiende a cero. El valor de la relación de tiempos tiende a 1 sin llegar a alcanzarlo, puesto que cuando P tiende a cero, $n_{opt}=5$ y se llevan a cabo cuatro filtraciones para poder usar la enzima en cuatro ocasiones.

7. CONCLUSIONES

- Para las proteínas del lactosuero bovino (WPC) se ha correlacionado el factor de reducción de antigenicidad (AR) con el grado de hidrólisis mediante ensayos ELISA. Para lograr una reducción de antigenicidad de 10^3 respecto a la proteína nativa es necesario alcanzar un grado de hidrólisis de 0.15.
- Se ha determinado la distribución media de pesos moleculares para WPC nativo e hidrolizado con 0.15 grado de hidrólisis mediante SE-HPLC. El hidrolizado está constituido en un 98 % por péptidos de tamaño inferior a 8000 Da. La longitud de cadena media PCL es de 6.66 aminoácidos. Por tanto, una membrana con un tamaño de corte de 8000 Da asegura la transmisión total de los enlaces peptídicos a través de la membrana y la retención de la enzima. Además, se ha comprobado que el filtrado no presenta actividad hidrolítica, lo que asegura que no existe paso de enzima a través de la membrana.
- Se ha correlacionado el caudal de hidrolizado filtrado con la presión transmembrana aplicada. Con el objeto de minimizar la colmatación de la membrana se ha establecido la presión transmembrana de operación en 85 kPa. Para dicha presión, el flujo de filtrado es de $90 \text{ L}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$ y se mantiene constante durante la ultrafiltración.
- En el rango de temperaturas ($45^\circ\text{-}70^\circ\text{C}$) y relaciones enzima/sustrato (1–5 %) ensayado en la operación del reactor los datos experimentales se ajustan a una desactivación de segundo orden y cinética de hidrólisis de orden cero. Se han obtenido los parámetros cinéticos característicos del modelo propuesto: k_d (constante de desactivación térmica de la enzima), y k_h (constante cinética de hidrólisis). La dependencia de ambas constantes con la temperatura de hidrólisis se ajusta a las siguientes expresiones:

$$k_d = \exp\left(29.02 - \frac{9295.16}{T}\right) + \exp\left(109.33 - \frac{36300.10}{T}\right), \text{ con } r^2=0.97$$

$$\ln(k_h) = 25.07 - \frac{7589.96}{T}, \text{ con } r^2=0.993$$

▪ A partir del modelo cinético se ha optimizado la operación isoterma del sistema que minimiza la cantidad de enzima total a emplear, E_T . Los valores de los principales parámetros obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 7-1. Número óptimo de usos de enzima, productividad límite, enzima sobrante y ahorro de enzima en función de la temperatura de operación del reactor

T (°C)	$n_{opt} (P \rightarrow 0)$	$P_{2 \rightarrow 1}$	$(e_n/e_0)_{m\acute{a}x}$	$(e_n/e_0)_{m\acute{i}n}$	AE (P->0)
45	8	1.591	0.83	0.22	0.57
50	7	1.521	0.81	0.23	0.53
55	6	1.398	0.78	0.23	0.46
60	4	1.114	0.71	0.25	0.32
65	2	0.250	0.52	0.27	0.05

Para cada temperatura de operación el valor de E_T sólo es función de la productividad P exigida al reactor y existe un número óptimo de usos de enzima que minimiza el valor de E_T . En cada nivel de temperatura existe una productividad límite por debajo de la cual el reactor discontinuo de membrana permite obtener ahorro de enzima frente a la operación por lotes. Para cada una de las temperaturas de operación existe un valor de enzima sobrante máximo - $(e_n/e_0)_{m\acute{a}x}$ - dado por la operación por lotes convencional y un valor de enzima sobrante mínimo - $(e_n/e_0)_{m\acute{i}n}$ - dado por el modo de operación óptimo. En todos los casos existe un ahorro de enzima obtenido con el sistema de reacción frente a la operación por lotes que varía entre 0.56 y 0.05 para 45 °C y 65 °C, respectivamente.

▪ En el caso de operación constante del reactor, se optimizado conjuntamente la temperatura y número de usos de enzima del reactor. Para $P > 0.62 \text{ h}^{-1}$, $n_{opt} = 1$ y $T_{opt} = 65.7 \text{ °C}$. Para $P < 0.62 \text{ h}^{-1}$, $n_{opt} = 4$ y $T_{opt} = 59.4 \text{ °C}$. En estas condiciones existe un ahorro máximo de enzima respecto a la mejor operación batch del 18 %.

▪ Se ha optimizado la operación del sistema a temperatura variable. La progresión óptima de temperaturas sólo es función del número de usos de enzima, y en última instancia de la productividad. Los valores de los parámetros más relevantes de la operación se resumen a continuación:

Tabla 7-2. Progresión de temperatura de las sucesivas hidrólisis. Operación con temperatura variable lote a lote

$n_{opt}=5$		$n_{opt}=4$		$n_{opt}=1$	
n	T (°C)	n	T (°C)	n	T (°C)
1	54.8	1	56.4	1	65.7
2	56.4	2	58.3	2	-
3	58.3	3	60.9	3	-
4	60.9	4	65.7	4	-
5	65.7	5	-	5	-

Tabla 7-3. Enzima sobrante en la operación a temperatura variable en función de la productividad requerida al reactor

n_{opt}	Rango productividad	Enzima sobrante
1	> 0.99	0.49
4	0.59-0.98	0.19
5	0-0.58	0.15

Sólo para valores de $P < 0.99 \text{ h}^{-1}$ el sistema con operación a temperatura variable se diferencia de la operación isoterma (en caso contrario se obtiene $n = 1$). Para $P < 0.58 \text{ h}^{-1}$ $n_{opt} = 5$ y se consigue el mayor aprovechamiento de la enzima, obteniéndose un ahorro máximo del 85 %.

Finalmente se ha calculado el ahorro adicional obtenido operando el reactor a temperatura variable frente a la operación óptima a temperatura constante. El ahorro adicional máximo obtenido alcanza un 11 %.

8. NOMENCLATURA

α	Grado de disociación de proteína	
A_0	Absorbancia a 450 nm de referencia	
AE	Ahorro de enzima	
A_{muestra}	Absorbancia a 450 nm de hidrolizado	
AR	Reducción de antigenicidad	
DH	Grado de hidrólisis	
e	Concentración de enzima activa	g / L
e_i	Concentración de enzima activa para la hidrólisis i-ésima	g / L
e_0	Concentración inicial de enzima	g / L
e_n	Concentración de enzima activa a tiempo t_n de reacción	g / L
k_d	Constante cinética de hidrólisis	h^{-1}
k_{di}	Constante cinética de hidrólisis para la reacción i-ésima	h^{-1}
f_n	Factor de conversión Kjeldahl	Adimensional
gl	Grados de libertad	
h	enlaces peptídicos rotos por gramo de proteína	Eq / g proteína
h_{tot}	total de enlaces peptídicos por gramo en la proteína nativa	Eq / proteína
I	Porcentaje de inhibición ELISA	%
J_{H_2O}	Caudal de filtrado de agua	mL / min
J_{hid}	Caudal de filtrado de hidrolizado	mL / min

k_d	Constante de desactivación enzimática	$L / g \cdot h$
k_{di}	Constante de desactivación enzimática para la hidrólisis i-ésima	$L / g \cdot h$
M_P	Masa de proteína	g
n	Número de usos de enzima (valor entero)	
n^*	Número de usos de enzima (valor real)	
N_B	Concentración de base	Eq / L
n_{max}	Número máximo de usos de enzima	
E_T	Consumo de enzima	$g / L \cdot h$
$(E_T)_{n=1}$	Consumo de enzima para el número de usos de enzima igual a 1	$g / L \cdot h$
$(E_T)_{min}$	Consumo de enzima para el número óptimo de usos de enzima	$g / L \cdot h$
$(E_T)_{Tvar}$	ET con operación a temperatura variable	$g / L \cdot h$
$(E_T)_{Tcte}$	ET para la operación óptima a temperatura constante.	$g / L \cdot h$
P	Productividad	h^{-1}
$P_{critica}$	Productividad crítica	h^{-1}
P_0	Número de enlaces peptídicos en la proteína nativa	
PCL	Longitud media de cadena peptídica	
PCL_0	Longitud media de cadena peptídico de la proteína nativa	
P_M	Peso molecular	g / mol
P_T	Presión transmembrana	kPa

r	Velocidad de reacción	g / h
R	Factor de concentración de la membrana	
R_F	Resistencia de “fouling”	$\text{kPa} \cdot \text{mL} / \text{min}$
R_G	Resistencia de la capa de polarización por concentración en la superficie	$\text{kPa} \cdot \text{mL} / \text{min}$
R_m	Resistencia intrínseca de la membrana	$\text{kPa} \cdot \text{mL} / \text{min}$
S_0	Concentración inicial de sustrato	g / L
S	Concentración de sustrato	g / L
t	Tiempo de reacción	h
t_0	Tiempo inicial	h
t_F	Tiempo de filtración	h
t_i	Tiempo de reacción hidrólisis i -ésima	h
t_n	Tiempo acumulado de hidrólisis	h
t_R	Tiempo de retención cromatográfica	min
t_T	Tiempo total de operación	h
T	Temperatura	K
V_B	volumen de base consumida en pH-estado	mL
V_F	Volumen de filtrado	mL
V_0	Volumen inicial de hidrolizado	mL

9. BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nissen J. *Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 24, 1090-1093. 1976.

Adler-Nissen J. and Olsen H. S. *The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymically modified soy protein*. ACS Symposium Series. 92 [Funct. Protein Struct.], 125-46. 1979.

Adler-Nissen J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London. 1986. ISBN 0-85334-386-1.

Alarcón F.J, Moyano F.J. and Díaz M. *Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes*. JOURNAL. (9) 3, 255-267. 2001.

Alarcón F.J, Moyano F.J. and Díaz M. *Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system*. JOURNAL (82) 7, 697-704. 2002.

Annan W.D. and Manson W. *The production of lysinoalanine and related substances during processing of proteins*. Food Chemistry. 6, 255-261. 1981.

Bacchin P., Espinasse B. and Aimar P. *Distributions of critical flux: modelling, experimental analysis and consequences for cross-flow membrane filtration*. Journal of Membrane Science. 250, 223–234. 2005.

Baro L., Guadix E. M., Martinez-Augustin O., Boza J. J. and Gil A. *Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymic protein hydrolyzate-based diets*. Biology of the Neonate. 68 [1], 55-61. 1995.

Barros R. M. and Malcata F. X. *A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from Cynara cardunculus*. Food Chemistry. 88 [3], 351-359. 2004.

Benkhelifa H., Bengoa C., Larre C., Guibal E., Popineau Y. and Legrand J. *Casein hydrolysis by immobilized enzymes in a torus reactor*. Process Biochemistry (Oxford, United Kingdom). 40 [1], 461-467. 2005.

Bertelli L., Torreggiani D. and Bertolo G. *Non-enzymatic browning in hydrolysed concentrated cheese whey permeate*. Food Chemistry. 55 [4], 353-358. 1996.

Biegler L. T., Grossmann I. E. and Westerberg A.W. *Systematic methods of chemical process design*. Prentice Hall, New Jersey, 1997.

Biegler L. T. and Grossmann I. E. *Retrospective on optimization*. Computers & Chemical Engineering. 28, 1169-1192. 2004.

Bombara N., Anon M. C. and Pilosof A. M. R. *Functional Properties of Protease Modified Wheat Flours*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 30 [5], 441-447. 1997.

Boza J. J., Martinez-Augustin O., Baro L., Suarez M. D. and Gil A. *Protein v. enzymic protein hydrolyzates. Nitrogen utilization in starved rats*. British Journal of Nutrition. 73 [1], 65-71. 1995.

Boza J. J., Martinez-Augustin O. and Gil A. *Nutritional and Antigenic Characterization of an Enzymic Whey Protein Hydrolyzate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43 [4], 872-5. 1995.

Burton H. *Reviews of the progress of Dairy Science: The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150 °C*. Journal of Dairy Research. 51, 341-363. 1984.

Camacho F., González-Tello P., Páez-Dueñas M. P., Guadix E. M. and Guadix A. *Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis*. The Journal Of Dairy Research. 68 [2]. 251-265. 2001.

Casella M. A. and Whitaker J. R. *Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional properties*. Journal of. Food Biochemistry. [14]. 453-464. 1990.

Chataud J., Desreumaux S. and Cartwright T. *Protein hydrolyzates, and enteral nutrient compositions containing them, and a method for their purification*. Fr. (Laboratoire Roger Bellon S. A.) FR. 2608050.

Cheison S. C., Wang Z. and Xu S. *Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor*. Journal of Food Engineering [80]. 4. 1134–1145. 2007.

Cheison S. C., Wang Z. and Xu S. *Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis*. Journal of Membrane Science. 283. [1-2]. 45–56. 2006

Cheison S. C., Wang Z. and Xu S. *Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor II. Characterisation for the fate of the enzyme by multivariate data analysis*. Journal of Membrane Science. 286. [1-2]. 322-332. 2006

Cheryan M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. CRC Press. 1998. ISBN 1566765986.

Chiang W. D., Shih C. J. and Chu Y. H. *Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system*. Food Chemistry. 65 [2], 189-194. 1999.

Chiang W. D., Tsou M. J., Tsai Z.Y. and Tsai T. C. *Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor*. Food Chemistry. 98 [4]. 725-732. 2006.

Chobert J. M., Bertrand-Harb C., Dalgalarondo M. and Nicolas M. G. *Solubility and emulsifying properties of β -casein modified enzymically by trypsin*. Journal of Food Biochemistry. 13 [5], 335-52. 1989.

Choi J.-H., Byun H.-G. and Kim S.-K. *Hydrolysis of fish protein concentration in an ultrafiltration membrane reactor*. Membrane. 10 [2], 83-91. 2000.

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 [5], 757-767. 2004.

Clemente A. *Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition*. Trends in Food Science & Technology. 11, 254-262. 2000.

Dakin, R. J. *A tree search algorithm for mixed-integer programming problems*. Computer Journal, 8, 250–255. 1965.

Deeslie W. D. and Cheryan M. *A CSTR-hollow fiber system for continuous hydrolysis*

of proteins. Performance and kinetics. Biotechnology and Bioengineering. 23 [10], 2257-71. 1981.

Deeslie W. D. and Cheryan M. *A CSTR-hollow-fiber system for continuous hydrolysis of proteins. Factors affecting long-term stability of the reactor.* Biotechnology and Bioengineering. 24 [1], 69-82. 1982.

Deqing S., Zhimin H. and Wei Q. *Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin.* Process Biochemistry. 40 [5],1943-1949. 2005.

Dixon M. and Webb E. C. *Enzymes.* 3rd ed. Longman, London. United Kingdom. 1979

Edens L. and De Roos A. L. *Casein hydrolysis for inclusion in casein hydrolyzate-whey protein milk-like composition.* Neth. (DSM N.V.) WO. 2003007730.

El-Zahar K., Sitohy M., Choiset Y., Metro F., Haertle T. and Chobert J.-M. *Peptic hydrolysis of ovine [beta]-lactoglobulin and [alpha]-lactalbumin Exceptional susceptibility of native ovine [beta]-lactoglobulin to pepsinolysis.* International Dairy Journal. 15 [1], 17-27. 2005.

Ferreira I.M.P.L.V.O., Pinho O., Mota M.V.T., Tavares P., Pereira A., Goncalves M.P., Oliveira M.B.P., Torres D., Rocha C.,and Teixeira J.A. *Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates.* International Dairy Journal 17. 481–487. 2007.

Fitzpatrick J., Engler C. and Rosenau J. *Process modelling considerations for the production of lactate from whey using membrane recycle bioreactors operated in continuous and cyclic batch modes.* Journal of Food Engineering. 26 [1], 97-111. 1995.

Foegeding E. A., Davis J. P., Doucet D. and McGuffey M. K. *Advances in modifying and understanding whey protein functionality.* Trends in Food Science & Technology. 13 [5], 151-159. 2002.

Franzen K., R.K. Singh and M.R. Okos. *Kinetics of nonenzymatic browning in dried skim milk.* Journal of Food Engineering. 11, 225-239. 1990.

Gauthier S. F., Pouliot Y. and Saint-Sauveur D. *Immunomodulatory peptides obtained*
244

- by the enzymatic hydrolysis of whey proteins*. International Dairy Journal. 16. 1315–1323. 2006.
- Gbogouri G. A., Linder M., Fanni J. and Parmentier M. *Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates*. Journal of Food Science. 69 [8], 615-622. 2004.
- Gea S.-J., Bai H., Yuan H.-S. and Zhang L.-X. *Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor*. Journal of Biotechnology. 50 [2-3], 161-170. 1996.
- Gonzalez-Tello P., Camacho F., Jurado E., Paez M. P. and Guadix E. M. *Enzymic hydrolysis of whey proteins. I. Kinetic models*. Biotechnology and Bioengineering. 44 [4], 523-528. 1994.
- Gonzalez-Tello P., Camacho F., Jurado E., Paez M. P. and Guadix E. M. *Enzymic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range*. Biotechnology and Bioengineering. 44 [4], 529-32. 1994.
- Grossmann I. E. *Review of Nonlinear Mixed-Integer and Disjunctive Programming Techniques*. Optimization and Engineering. 3, 227–252. 2002.
- Guadix A., Guadix E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P. and Camacho F. *Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas*. Ars Pharmaceutica, 41 [1], 79-89. 2000.
- Guadix A. *Producción en reactores de membrana de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 2001.
- Guadix A., Camacho F and Guadix E. M. *Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor*. Journal of Food Engineering, 72 [4]. 398-405. 2006.
- Guan X., Yao H., Chen Z., Shan L. and Zhang M. *Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin*. Food Chemistry. In Press, Corrected Proof. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-4JDMVDB->

8/2/b4fac6ef5b0e8fdc9de68e2bceaea1e8

Guerard F., Guimas L. and Binet A. *Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. [19-20], 489-498. 2002.

Gupta O. K. and Ravindran V. *Branch and bound experiments in convex nonlinear integer programming*. Management Science, 31 [12]. 1533–1546. 1985.

Halling P J. *Protein-stabilized foams and emulsions*. Critical Review in Food Science and Nutrition. [15], 155-170. 1981.

Hamm D. J. CPC International European Patent Application No. EP 0495390 AI: 1992.

Hernandez-Ledesma B., Recio I., Ramos M., and Amigo L. *Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin*. International Dairy Journal 12 (10), pp. 805-812. 2002.

Hernandez-Ledesma B., Amigo L., Ramos M. and Recio I. *Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion*. Journal of Chromatography A. 1049. (1-2) pp. 107-114. 2004.

Hernandez-Ledesma B., Ramos M., Recio I. and Amigo L. *Effect of [β]-lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides*. Journal of Chromatography A 1116 (1-2) pp. 31-37. 2006

Howell J.A. *Sub-critical flux operation of microfiltration*. Journal of Membrane Science. 107, 165-171. 1995

Hung N. D., Vas M., Cheke E. and Bolsci S.Z.A. *Relative tryptic digestion rates of food proteins*. Journal of Food Science. 49, 1535-1542. 1984.

In M.-J., Jeong Chae H. and Oh N.-S. *Process development for heme-enriched peptide* 246

by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. Bioresource Technology. 84 [1], 63-68. 2002.

Ju Z. Y., Otte J., Madsen J. S. and Qvist K. B. *Effects of limited proteolysis on gelation and gel properties of whey protein isolate*. Journal of Dairy Science. 78 [10], 2119-28. 1995.

Kammoun R., Bejar S. and Ellouz R. *Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrased(R)*. Bioresource Technology. 90 [3], 249-254. 2003.

Kapel R., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Fertin-Bazus A., Grado de hidrólisisulster P. and Guillochon D. *Continuous production of a peptidic fraction containing the intermediate opioid peptide LVV-haemorphin-7 (LVVh-7) by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in a continuous membrane reactor*. Biotechnology and Applied Biochemistry. 37 [3], 317-324. 2003.

Kapel R., Chabeau A., Lesage J., Riviere G., Ravallec-Ple R., Lecouturier D., Wartelle M., Guillochon D. and Grado de hidrólisisulster P. *Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities*. Food Chemistry. 98 [1]. 120-126. 2006.

Kapitskii Yu. E. *Whey protein hydrolyzate food product manufactured by using protosubtilin*. (Russia). RU. 2222962.

Knights R. J. *Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates*. Nutrition for station needs in infancy. Protein hydrolysates (Lisshlpz F, ed.). Marcel Dekker. New York. 105-115. 1985.

Kong X., Zhou H. and Qian H. *Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates*. Food Chemistry. In Press, Corrected Prof. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-4JN2KMR-1/2/22e4925c1e40d9db35ac96155b103db8>

Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P. and Tupasela T. *The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods*. Agriculture and Food Science in Finland. 7, 283-296. 1998.

Korhonen H. and Pihlanto A. *Bioactive peptides: novel applications for milk proteins*. Applied Biotechnology, Food Science and Policy. 1 [3], 133-144. 2003.

Korhonen H. and Pihlanto A. *Bioactive peptides: Production and functionality*. International Dairy Journal. 16 [9]. 945-960. 2006.

Kristinsson H. G. and Rasco B. A. *Fish protein hydrolyzates and their potential use in the food industry*. Recent Advances in Marine Biotechnology. 7 [Seafood Safety and Human Health], 157-181. 2002.

Kristinsson H. G. and Rasco B. A. *Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture*. Process Biochemistry (Oxford). 36 [1-2], 131-139. 2000.

Kumagai H., Seto H., Norimatsu Y., Ishii K. and Kumagai H. *Changes in activity coefficient gw of water and the foaming capacity of protein during hydrolysis*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 66 [7], 1455-1461. 2002.

Kwon S.S., Marsico M.A. and Vadehra D. V. Societé des Produits Nestlé S.A. European Patent Application EP 0505733 AI: 1992.

Larre C., Huchet B., Berot S. and Popineau Y. *Functional properties of peptides derived from wheat storage proteins by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration*. Special Publication - Royal Society of Chemistry. 258 [Food Colloids], 262-271. 2001.

Lasch J., Koelsch R. and Kretschmer K. *Continuous production of protein hydrolyzates in immobilized enzyme reactors*. Acta Biotechnologica. 7 [3], 227-35. 1987.

Lebrun F., Bazus A., Grado de hidrólisisulster P. and Guillochon D. *Influence of molecular interactions on ultrafiltration of a bovine hemoglobin hydrolyzate with an organic membrane*. Journal of Membrane Science . 146 [1], 113-124. 1998.

Li S., Zheng D. and Kong B. *Study on function and characteristics of corn protein hydrolyzates*. Shipin Gongye Keji. 23 [11], 42-45. 2002.

Lin H., Xue C., Ye M., Li Z. and Wang H. *Process for preparing low molecular-*
248

weight chitosan and membrane type enzyme bioreactor. Peop. Rep. China (Qingdao Oceanography Univ.) CN. 1339605.

Liu L. *Effects of limited enzymic hydrolysis on emulsifying properties of soy protein isolate*. Zhongguo Liangyou Xuebao. 15 [1], 26-29. 2000.

Liu L. *Study on enzymatic limited hydrolysis of soy protein isolate*. Shipin Kexue (Beijing). 22 [4], 36-39. 2001.

Lysberg M., Storroe I., Svendsen H., Winnberg A., Eide O. and Oterholm B. *Continuous membrane reactor for fermn. of microorganism or protein hydrolyzates*. Norway (Norske Meierier.) WO. 9315182.

Mahmoud M. I., Malone W. T. and Cordle C. T. *Enzymic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties*. Journal of Food Science. 57 [5], 1223-9. 1992.

Margot A., Flaschel E. and Renken A. *Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis*. Process Biochemistry. 32 [3], 217-223. 1997.

Marriot J. I. *Detailed modelling and optimal design of membrane separation systems*. PhD Thesis. University College. London. United Kingdom. 2001.

Mehaia M. A. and Cheryan M. *Distribution of glyco-k-casein in bovine casein micelles: a study using soluble and immobilized proteases*. Journal of Dairy Science. 66 [12], 2474-81. 1983.

Mercier A., Gauthier S.F. and Fliss I. *Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests*. International Dairy Journal. 14 [3]. 175-183. 2004.

Millipore Corporation. 2002.

<http://www.millipore.com/techpublications/tech1/pf1402en00>.

Mokrane H., Belhocine D. and Mameri N. *Comparison and efficiency of two membranes (modified MF and UF) during enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a membrane birreactor*. Journal of Membrane Science. 281 [1-2]. 170-176. 2006.

Moore S. and Stein W.H. *Photometric ninhydrin method for use in the*

chromatography of amino acids. Journal of Biological Chemistry. 176. 367-388. 1948.

Mota M.V.T., Ferreira I.M.P.L.V.O., Oliveira M.B.P., Rocha C., Teixeira J.A., Torres D. and Goncalves M.P. *Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: Characterization using multivariate data analysis*. Food Chemistry. 94 [2]. 278-286. 2006.

Moyano F J and Savoie L. *Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes*. Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology. 128. 2. 359-368. 2001

Nakamura T., Sado H. and Syukunobe Y. *Production of low antigenic whey protein hydrolyzates by enzymic hydrolysis and denaturation with high pressure*. Milchwissenschaft. 48 [3], 141-5. 1993.

Nakamura T., Sado H., Syukunobe Y. and Hirota T. *Antigenicity of whey protein hydrolyzates prepared by combination of two proteases*. Milchwissenschaft. 48 [12], 667-70. 1993.

Nielsen P. M. *Enzyme technology for production of protein based flavours*. Lecture presented at the FIE Conference, London. Food Ingredients Europe Conference Proceedings. Maarsen: Process Press Europe, 106-110. 1994.

Nielsen P. M. *Production of milk protein hydrolyzate using Bacillus and Aspergillus proteases for use as mother's milk substitutes and in dietetic foods*. Denmark. (Novo Nordisk A/s.) WO. 9613174. 1996.

Nielsen P. M. *Functionality of proteina hydrolysates*. In: Damoradan S and Paraf A. (eds). *Food Proteins and their applications*. Marcel Dekker. New York, 443-472. 1997.

Nielsen P. M. and Olsen H. S. *Enzymes in food technology. Chapter 6: Enzymic Modification of food protein*. Sheffield Academic Press. Sheffield (UK). 2002.

Nilsang S., Lertsiri S., Suphantharika M. and Assavanig A. *Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases*. Journal of Food Engineering. 70. 571-578. 2005.

- O'Callaghan D. M. and Donnelly W. J. *Hypoallergenic whey hydrolysate for use in infant formulae and dietetic foods*. Agriculture and Food Development authority Ire. (TEAGASC.) WO. 9304593. .
- Otani H. and Hosono A. *Immunological properties of pepsin, trypsin and/or chymotrypsin digests of bovine as1-casein*. Nippon Chikusan Gakkaiho. 60 [12], 1143-50. 1989.
- Otte J., Zakora M., Qvist K. B., Olsen C. E. and Barkholt V. *Hydrolysis of bovine b-lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides*. International Dairy Journal. 7 [12], 835-848. 1998.
- Pastoriza L., Sampedro G., Cabo M. L., Herrera J. J. R. and Bernardez M. *Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 84 [1], 83-88. 2004.
- Paulsen S., Ward L. S., Bastian E. D., Petersen B. and Oommen B. *Whey protein compositions and methods of making and using such compositions*. (USA). US. 2004156969.
- Pedroche J., Yust M. M., Giron-Calle J., Vioque J., Alaiz M. and Millan F. *Plant protein hydrolysates and tailor-made foods*. EJEAFChe, Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2 [1], No pp. given. 2003.
- Péllisier J. P. *Protéolyse des caséines*. Sci. Aliments. 4. 1-35. 1984.
- Peñas E., Snel H., Floris R., Prestamo G. and Gomez R. *High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates*. International Dairy Journal. 16. 969-975. 2006.
- Perea A. and Ugalde U. *Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor*. Enzyme and Microbial Technology. 18 [1], 29-34. 1996.
- Periago Ma. J., Vidal Ma. L., Ros G., Rincon F., Martinez C., Lopez G., Rodrigo J. and Martinez I. *Influence of enzymic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour*. Food Chemistry. 63 [1], 71-78. 1998.
- Postolache C. and Oncescu T. *Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed*

by *alcalase*. *Revue Roumaine de Chimie*. 34, 581-584. 1989.

Poulin J.F., Amiot J. and Bazinet L. *Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electrodialysis with ultrafiltration membrane*. *Journal of Biotechnology*. In Press, Corrected Proof.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3C-4J2KT4G-1/2/f012374691492079a45e102c503ea9ce>

Prata-Vidal M., Bouhallab S., Henry G. and Aimar P. *An experimental study of caseinomacropetide hydrolysis by trypsin in a continuous membrane reactor*. *Biochemical Engineering Journal*. 8 [3], 195-202. 2001.

Prazeres D. M. F. and Cabral J. M. S. *Enzymatic membrane bioreactors and their applications*. *Enzyme and Microbial Technology*. 16 [9], 738-750. 1994

Prazeres D. M. F., Lemos, F. and Cabral, J. M. S. *Modeling of membrane bioreactors*. *NATO ASI Series, Series E: Applied Sciences*. 305, 191-200. 1996.

Prevot-D'Alvise N., Lesueur-Lambert C., Fertin-Bazus A., Fertin B., Grado de hidrólisisulster P. and Guillochon D. *Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor*. *Enzyme and Microbial Technology*. 34 [5], 380-391. 2004.

Resende M. M., Sousa R. Jr., Tardioli P. W., Giordano R. L. C. and Giordano R. C. *Enzymatic tailor-made proteolysis of whey in a vortex flow reactor*. *AIChE Journal*. 51 [1], 314-322. 2005.

Richter W. V., Jacob B. and Schwandt P. *Molecular weight determination of peptides by high performance gel chromatography*. *Analytical Biochemistry*. [133], 288-291. 1983

Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D. and Sanchez J. *Progress in enzymatic membrane reactors - a review*. *Journal of Membrane Science*. 242 [1-2], 189-196. 2004.

Rupley J A. *Susceptibility to attack by proteolytic enzymes*. *Methods Enzymol*. 11, 905-917. 1967
252

- Sado H., Yadonobe Y. and Nakamura T. *Allergens-low whey protein and its preparation*. Japan (Snow Brand Milk Prod Co Ltd.) JP. 05209000.
- Sado H., Yadonobe Y., Nakamura T., Takahashi N., Shimatani M., Hirano K. and Ito H. *Manufacture of nonallergenic milk whey protein hydrolyzates with protease*. Japan (Snow Brand Milk Prod Co Ltd and Amano Pharma Co Ltd). JP. 05103595.
- Sinha R., Ragrado de hidrólisis C., Prakash J. and Kaul P. *Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation*. Food Chemistry. 101.1484–1491. 2007
- Labuza T.P. and Saltmarch M. *Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and non steady state storage conditions*. Journal of Food Science. 47, 92-96. 1981.
- Sannier F., Piot J.-M., Grado de hidrólisisulster P. and Guillochon D. *Stability of a mineral membrane ultrafiltration reactor for peptic hydrolysis of hemoglobin*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 61 [1], 43-7. 1994.
- Sawhill J. W. *Production of whey protein hydrolyzates using fungal proteases*. (USA). US. 6787168.
- Schaefer C. and Waesche A. *Bioactive whey protein hydrolyzates and peptide fractions obtained by hydrolysis with proteases*. Germany (Fraunhofer-Gesellschaft zur Foerderung der Angewandten Forschung E.V.) WO. 2003059083.
- Schlimme E and Buchheim W. *La leche y sus componentes: propiedades químicas y físicas*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 2002. I.S.B.N.:84-200-0992-X.
- Shimatani M., Uchida Y., Sado H., Matsunaga M. and Nakano H. *Preparation of a-lactalbumins from whey proteins*. Japan (Snow Brand Milk Prod Co Ltd. JP.) 05268879.
- Singh A. M. and Dalgleish D. G. *The emulsifying properties of hydrolyzates of whey proteins*. Journal of Dairy Science. 81 [4], 918-924. 1998.
- Sithole R., McDaniel M.R. and Meunier Goddik L. *Rate of Maillard browning in sweet whey powder*. Journal of Dairy Science. 88. 1636-1645. 2005.

Smith E. M. B. *On the optimal design of continuous processes*. PhD thesis. Imperial College. London. United Kingdom. 1996.

Sorensen T. L., Madkor S. A. and Mims S. *Whey protein hydrolysate*. Den. (Novozymes A/S.) US. 2003224096.

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

Spiegel M. R. *Estadística. Segunda edición*. Serie Schaum. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España. 1997.

Srikantia S.G. *The use of biological value of a protein in evaluating its quality for human requirements*. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements. Rome. 1981

Steinhardt J. and Beychock S. *Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules*. Proteins II: 139-304. 1964.

Svendesen I. *Chemical modifications of the subtilisins with special reference to the binding of large substrates. A Review*. Carlsberg Research Communications. 41. 237-291. 1976.

Surowka K., Zmudzinski D. and Surowka J. *Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components*. Trends in Food Science & Technology. 15 [3-4], 153-160. 2004.

Svenning C., Brynhildsvold J., Molland T., Langsrud T. and Elisabeth Vegarud G. *Antigenic response of whey proteins and genetic variants of [beta]-lactoglobulin -- the effect of proteolysis and processing*. International Dairy Journal. 10 [10], 699-711. 2000.

Szczesna M. and Galas E. *Protein hydrolysis by immobilised Bacillus subtilis cells*. Progress in Biotechnology. 17 [Food Biotechnology], 177-185. 2000.

Tamura Y., Miyagawa H. and Ochi H. *Whey protein hydrolyzates and their*
254

manufacture. Ltd. Japan (Morinaga Milk Industry Co. JP. 2003339326. 2003339326.

Tardioli P. W., Pedroche J., Giordano R. L. C., Fernandez-Lafuente R. and Guisan J. M. *Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose*. *Biotechnology Progress*. 19 [2], 352-360. 2003.

Ticu E.-L., Vercaigne-Marko D., Huma A., Artenie V., Toma O. and Guillochon D. *A kinetic study of bovine haemoglobin hydrolysis by pepsin immobilized on a functionalized alumina to prepare hydrolysates containing bioactive peptides*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 39 [2], 199-208. 2004.

Tuncturk Y. and Zorba O. *The effects of enzymatic hydrolysis of casein on apparent yield stress and some emulsion properties: Part Special issue: WCFS Food Summit*. *Food Hydrocolloids*. 20 [4], 475-482. 2006

Van der Plancken I., Delattre M., Indrawati, Van. Loey A. and Hendrickx M. E. G. *Kinetic study on the changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis induced by heat and high hydrostatic pressure pre-treatment*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 [18], 5621-5626. 2004.

Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D. B. A. and Voragen A. G. J. *Emulsion Properties of Casein and Whey Protein Hydrolysates and the Relation with Other Hydrolysate Characteristics*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 [10], 5005-5012. 2001.

Vioque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J. and Millan F. *Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77 [4], 447-450. 2000.

Vorob'ev M.M., Levicheva I.Y. and Belikov V.M. *Kinetics of the initial stage of milk protein hydrolysis by chymotrypsin*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 32. 219-222. 1996.

Wroblewska B., Karamac M., Amarowicz R., Szymkiewicz A., Troszynska A. and Kubicka E. *Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis*. *International Journal of Food Science and Technology*. 39 [8], 839-850. 2004.

Wu D., Howell J.A. and Field R.W. *Critical Flux measurement for model colloids*. Journal of Membrane Science. 152, 89-98. 1999.

D. Wu, J.A. Howell, R.W. Field, Pulsatile flow filtration of yeast cell debris: influence of preincubation on performance. Biotechnology and Bioengineering. 41, 998-1002. 1993.

Yamaguchi M., Kume H., Mizumoto K. and Sasaki H. *Milk protein hydrolyzates for inhibition of production of inflammatory cytokine and for manufacturing therapeutic diets*. Co. Ltd. Japan (Meiji Milk Products) JP. 2004155751. 2004.

10. APÉNDICE: DATOS EXPERIMENTALES

Todos los datos experimentales corresponden a $S_0 = 5 \text{ g / L}$ y $\text{pH} = 8.5$.

10.1 Volumen de base frente a tiempo de reacción. $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$.

- $e_0 = 0.05 \text{ g/L}$

t (h)	$n=1$ V_B (mL)
0.000	0
0.017	0.152
0.033	0.204
0.050	0.248
0.067	0.286
0.083	0.328
0.100	0.358
0.200	0.560
0.300	0.668
0.400	0.728
0.500	0.764
0.600	0.810
0.700	0.848
0.800	0.882
0.900	0.912
1.000	0.938
1.100	0.962
1.200	0.984
1.300	0.998
1.400	1.018
1.500	1.038
1.600	1.058
1.700	1.076
1.800	1.094
1.900	1.110
2.000	1.128
2.100	1.144
2.200	1.160
2.300	1.176
2.400	1.190
2.500	1.204
2.600	1.218
2.700	1.232
2.800	1.246
2.900	1.260
3.000	1.268
3.100	1.276
3.200	1.284
3.258	1.288

- $e_0=0.10$ g/L

t (h)	n=1 VB (mL)	n=2 VB (mL)
0	0	0
0.008	0.056	0.074
0.017	0.130	0.114
0.025	0.206	0.144
0.033	0.244	0.172
0.042	0.282	0.202
0.050	0.318	0.224
0.058	0.352	0.250
0.067	0.386	0.274
0.075	0.416	0.296
0.083	0.446	0.316
0.092	0.476	0.336
0.100	0.500	0.358
0.200	0.726	0.532
0.300	0.850	0.636
0.400	0.930	0.704
0.500	0.988	0.752
0.600	1.034	0.788
0.700	1.072	0.820
0.800	1.104	0.846
0.900	1.132	0.868
1.000	1.158	0.890
1.100	1.180	0.910
1.200	1.198	0.928
1.300	1.218	0.946
1.400	1.234	0.960
1.500	1.252	0.972
1.558	1.260	0.980
1.600		0.984
1.700		0.998
1.800		1.010
1.900		1.022
2.000		1.036
2.100		1.048
2.200		1.062
2.300		1.074
2.400		1.084
2.500		1.094
2.600		1.104
2.700		1.114
2.800		1.122
2.900		1.130
3.000		1.136
3.100		1.144
3.200		1.154
3.300		1.164
3.400		1.172
3.500		1.182
3.600		1.192
3.700		1.204
3.800		1.212

3.900	1.220
4.000	1.228
4.100	1.238
4.200	1.244
4.300	1.254
4.358	1.260

- $e_0=0.15$ g/L

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml
0	0	0	0
0.008	0.148	0.104	0.076
0.017	0.230	0.154	0.116
0.025	0.292	0.196	0.156
0.033	0.346	0.232	0.186
0.042	0.396	0.266	0.214
0.050	0.438	0.304	0.246
0.058	0.490	0.330	0.270
0.067	0.528	0.362	0.298
0.075	0.564	0.388	0.318
0.083	0.596	0.414	0.340
0.092	0.626	0.438	0.364
0.100	0.656	0.460	0.384
0.200	0.880	0.646	0.562
0.300	0.990	0.742	0.664
0.400	1.062	0.804	0.730
0.500	1.116	0.852	0.776
0.600	1.158	0.892	0.816
0.700	1.194	0.926	0.850
0.800	1.226	0.954	0.878
0.900	1.254	0.980	0.904
0.925	1.260	0.986	0.912
1.000		1.004	0.930
1.100		1.028	0.952
1.200		1.050	0.974
1.300		1.070	0.994
1.400		1.090	1.014
1.500		1.110	1.034
1.600		1.128	1.052
1.700		1.144	1.072
1.800		1.160	1.090
1.900		1.176	1.108
2.000		1.192	1.128
2.100		1.206	1.146
2.200		1.220	1.166
2.300		1.234	1.186
2.400		1.246	1.202
2.500		1.260	1.220
2.600			1.240
2.700			1.258
2.708			1.260

- $e_0=0.20$ g/L

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml
0.000	0.000	0.000	0.000
0.008	0.146	0.146	0.076
0.017	0.178	0.200	0.146
0.025	0.276	0.252	0.188
0.033	0.376	0.300	0.228
0.042	0.448	0.346	0.264
0.050	0.502	0.382	0.302
0.058	0.550	0.418	0.332
0.067	0.594	0.452	0.360
0.075	0.634	0.482	0.390
0.083	0.668	0.508	0.414
0.092	0.700	0.538	0.438
0.100	0.728	0.556	0.462
0.200	0.930	0.734	0.644
0.300	1.030	0.818	0.740
0.400	1.096	0.874	0.804
0.500	1.146	0.916	0.854
0.600	1.186	0.950	0.894
0.700	1.220	0.978	0.932
0.800	1.250	1.002	0.964
0.858	1.264	1.014	0.980
0.900		1.026	0.992
1.000		1.052	1.022
1.100		1.074	1.046
1.200		1.096	1.072
1.300		1.120	1.094
1.400		1.142	1.116
1.500		1.160	1.138
1.600		1.178	1.158
1.700		1.198	1.178
1.800		1.220	1.196
1.900		1.236	1.214
2.000		1.252	1.232
2.042		1.260	1.240
2.158			1.260

- $e_0=0.25$ g/L

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml	n=5 V/ml
0	0	0	0	0	0
0.008	0.176	0.146	0.132	0.146	0.074
0.017	0.284	0.240	0.198	0.210	0.110
0.025	0.376	0.302	0.252	0.256	0.146
0.033	0.456	0.360	0.304	0.298	0.172
0.042	0.528	0.410	0.348	0.334	0.198
0.050	0.588	0.456	0.388	0.370	0.224
0.058	0.640	0.494	0.426	0.400	0.254
0.067	0.688	0.530	0.460	0.432	0.276
0.075	0.730	0.564	0.490	0.458	0.304
0.083	0.770	0.592	0.516	0.480	0.326
0.092	0.798	0.620	0.542	0.508	0.346
0.100	0.828	0.644	0.566	0.530	0.364
0.200	1.018	0.814	0.738	0.698	0.560
0.300	1.116	0.900	0.824	0.784	0.684
0.400	1.182	0.962	0.888	0.844	0.776
0.500	1.234	1.008	0.938	0.892	0.842
0.558	1.258	1.034	0.964	0.918	0.876
0.600		1.050	0.984	0.934	0.898
0.700		1.086	1.020	0.972	0.944
0.800		1.142	1.054	1.006	0.978
0.900		1.172	1.084	1.038	1.014
1.000		1.198	1.112	1.064	1.052
1.100		1.222	1.140	1.092	1.082
1.200		1.244	1.164	1.120	1.110
1.258		1.258	1.180	1.132	1.130
1.300			1.190	1.144	1.142
1.400			1.212	1.170	1.168
1.500			1.234	1.194	1.196
1.600			1.256	1.218	1.220
1.617			1.258	1.222	1.228
1.700				1.240	1.242
1.775				1.258	1.254
1.800					1.256
1.833					1.258

10.2 Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 50 °C.

- $e_0=0.05$ g/L

t (h)	n=1 V (ml)	n=2 V/ml
0	0	0
0.008	0.048	0.058
0.017	0.098	0.080
0.025	0.122	0.106
0.033	0.142	0.122
0.042	0.178	0.140
0.050	0.210	0.160
0.058	0.266	0.176
0.067	0.290	0.192
0.075	0.312	0.206
0.083	0.334	0.222
0.092	0.358	0.238
0.100	0.380	0.252
0.200	0.602	0.406
0.300	0.744	0.510
0.400	0.836	0.586
0.500	0.902	0.644
0.600	0.956	0.684
0.700	0.994	0.722
0.800	1.024	0.754
0.900	1.054	0.780
1.000	1.076	0.802
1.100	1.098	0.824
1.200	1.116	0.842
1.300	1.132	0.860
1.400	1.150	0.878
1.500	1.168	0.894
1.600	1.186	0.910
1.700	1.200	0.922
1.800	1.214	0.936
1.900	1.230	0.948
2.000	1.242	0.960
2.100	1.256	0.972
2.200	1.268	0.982
2.300		0.990
2.400		0.998
2.500		1.010
2.600		1.020
2.700		1.028
2.800		1.040
2.900		1.050
3.000		1.058
3.100		1.068
3.200		1.076
3.300		1.086
3.400		1.096
3.500		1.104
3.600		1.112

3.700	1.122
3.800	1.130
3.900	1.136
4.000	1.146
4.100	1.154
4.200	1.160
4.300	1.170
4.400	1.178
4.500	1.184
4.600	1.190
4.700	1.198
4.800	1.206
4.900	1.214
5.000	1.222
5.100	1.228
5.200	1.234
5.300	1.240
5.400	1.246
5.500	1.256
5.600	1.264
5.700	1.268
5.767	1.272

- $e_0=0.10$ g/L

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml
0	0	0
0.008	0.098	0.098
0.017	0.178	0.140
0.025	0.228	0.178
0.033	0.278	0.212
0.042	0.312	0.244
0.050	0.352	0.280
0.058	0.384	0.308
0.067	0.405	0.338
0.075	0.444	0.366
0.083	0.528	0.390
0.167	0.786	0.414
0.250	0.914	0.438
0.333	0.994	0.456
0.417	1.052	0.478
0.500	1.096	0.494
0.600	1.142	0.544
0.700	1.176	0.676
0.800	1.208	0.754
0.900	1.234	0.816
1.000	1.260	0.854
1.050	1.272	0.872
1.100		0.888
1.200		0.916
1.300		0.942
1.400		0.964
1.500		0.984
1.600		1.004
1.700		1.024
1.800		1.040
1.900		1.058
2.000		1.072
2.100		1.088
2.200		1.102
2.300		1.114
2.400		1.128
2.500		1.142
2.600		1.150
2.700		1.162
2.800		1.170
2.900		1.178
3.000		1.186
3.100		1.198
3.200		1.202
3.300		1.212
3.400		1.220
3.500		1.226
3.600		1.238
3.700		1.244
3.800		1.252
3.900		1.260

4.000	1.268
4.025	1.272

▪ $e_0=0.15$ g/L

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml
0	0	0	0
0.008	0.124	0.118	0.130
0.017	0.222	0.184	0.176
0.025	0.300	0.238	0.220
0.033	0.314	0.286	0.266
0.042	0.434	0.338	0.298
0.050	0.544	0.378	0.336
0.058	0.586	0.418	0.370
0.067	0.630	0.458	0.400
0.075	0.672	0.490	0.428
0.083	0.702	0.518	0.452
0.092	0.738	0.542	0.478
0.100	0.762	0.568	0.500
0.200	0.954	0.754	0.672
0.300	1.036	0.832	0.758
0.400	1.082	0.884	0.816
0.500	1.144	0.922	0.858
0.600	1.192	0.954	0.892
0.700	1.232	0.972	0.920
0.800	1.264	0.990	0.944
0.833	1.272	0.998	0.954
0.900		1.010	0.968
1.000		1.038	0.990
1.100		1.066	1.010
1.200		1.092	1.028
1.300		1.114	1.048
1.400		1.138	1.062
1.500		1.154	1.080
1.600		1.176	1.098
1.700		1.194	1.110
1.800		1.210	1.124
1.900		1.226	1.138
2.000		1.242	1.152
2.100		1.254	1.166
2.200		1.268	1.178
2.225		1.272	1.184
2.300			1.194
2.400			1.206
2.500			1.220
2.600			1.230
2.700			1.242
2.800			1.254
2.900			1.264
2.942			1.268

- $e_0=0.20$ g/L

t (h)	n=1 VB (mL)	n=2 VB (mL)	n=3 VB (mL)	n=4 VB (mL)
0	0	0	0	0
0.008	0.194	0.146	0.204	0.128
0.017	0.370	0.288	0.364	0.172
0.025	0.454	0.356	0.464	0.212
0.033	0.534	0.416	0.504	0.252
0.042	0.600	0.470	0.528	0.290
0.050	0.664	0.520	0.552	0.330
0.058	0.712	0.560	0.574	0.362
0.067	0.754	0.598	0.594	0.392
0.075	0.790	0.632	0.614	0.422
0.083	0.826	0.662	0.630	0.450
0.092	0.856	0.690	0.650	0.470
0.100	0.878	0.710	0.664	0.496
0.200	1.062	0.872	0.786	0.678
0.300	1.154	0.948	0.856	0.758
0.400	1.220	1.002	0.908	0.796
0.500	1.272	1.048	0.948	0.826
0.600		1.088	0.986	0.850
0.700		1.124	1.012	0.876
0.800		1.156	1.038	0.900
0.900		1.188	1.064	0.922
1.000		1.214	1.088	0.944
1.100		1.240	1.112	0.964
1.200		1.266	1.134	0.984
1.225		1.272	1.136	0.988
1.300			1.156	1.002
1.400			1.176	1.022
1.500			1.196	1.036
1.600			1.216	1.056
1.700			1.234	1.076
1.800			1.252	1.098
1.900			1.268	1.122
1.916			1.272	1.124
2.000				1.142
2.100				1.172
2.200				1.196
2.300				1.226
2.400				1.254
2.450				1.272

- $e_0=0.25$ g/L

t (h)	n=1 VB (mL)	n=2 VB (mL)	n=3 VB (mL)	n=4 VB (mL)	n=5 VB (mL)	n=6 VB (mL)
0	0	0	0	0.000	0	0
0.008	0.224	0.184	0.168	0.150	0.148	0.128
0.017	0.404	0.340	0.254	0.238	0.218	0.166
0.025	0.508	0.420	0.320	0.294	0.268	0.202
0.033	0.588	0.482	0.378	0.344	0.312	0.242
0.042	0.668	0.538	0.428	0.388	0.350	0.272
0.050	0.728	0.586	0.474	0.420	0.386	0.306
0.058	0.782	0.636	0.516	0.466	0.418	0.334
0.067	0.820	0.672	0.558	0.502	0.448	0.368
0.075	0.860	0.696	0.590	0.534	0.480	0.390
0.083	0.892	0.724	0.618	0.562	0.508	0.416
0.092	0.922	0.750	0.650	0.590	0.532	0.440
0.100	0.944	0.768	0.672	0.610	0.556	0.464
0.200	1.106	0.916	0.840	0.796	0.754	0.652
0.300	1.196	0.998	0.926	0.888	0.850	0.758
0.400	1.254	1.060	0.982	0.946	0.910	0.826
0.433	1.272	1.074	1.000	0.964	0.928	0.844
0.500		1.108	1.026	0.990	0.956	0.876
0.600		1.154	1.070	1.030	0.990	0.918
0.700		1.186	1.102	1.060	1.024	0.952
0.800		1.218	1.132	1.092	1.050	0.980
0.900		1.248	1.160	1.116	1.074	1.010
0.983		1.272	1.180	1.136	1.092	1.032
1.000			1.184	1.140	1.098	1.036
1.100			1.208	1.162	1.116	1.060
1.200			1.232	1.182	1.132	1.084
1.300			1.252	1.202	1.152	1.104
1.400			1.268	1.218	1.166	1.124
1.425			1.272	1.222	1.170	1.130
1.500				1.226	1.180	1.144
1.600				1.234	1.198	1.164
1.700				1.242	1.212	1.180
1.800				1.252	1.230	1.200
1.808				1.254	1.236	1.200
1.900				1.262	1.246	1.214
2.000				1.272	1.264	1.226
2.100						1.238
2.200						1.252
2.300						1.266
2.342						1.272

10.3 Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 55 °C.

- $e_0 = 0.05 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V _B (mL)	n=2 V _B (mL)
0.000	0	0
0.008	0.14	0.062
0.017	0.198	0.096
0.025	0.258	0.126
0.033	0.306	0.152
0.042	0.35	0.176
0.050	0.392	0.2
0.058	0.434	0.224
0.067	0.468	0.246
0.075	0.498	0.268
0.083	0.532	0.288
0.092	0.558	0.308
0.100	0.586	0.328
0.200	0.78	0.512
0.300	0.878	0.634
0.400	0.944	0.716
0.500	0.996	0.776
0.600	1.04	0.824
0.700	1.082	0.864
0.800	1.118	0.896
0.900	1.15	0.924
1.000	1.184	0.952
1.100	1.21	0.978
1.200	1.238	1
1.300	1.266	1.022
1.391	1.286	1.042
1.400		1.044
1.499		1.064
1.599		1.084
1.698		1.102
1.798		1.12
1.897		1.138
1.997		1.154
2.096		1.17
2.196		1.184
2.304		1.198
2.403		1.21
2.503		1.22
2.602		1.232
2.702		1.244
2.801		1.256
2.901		1.266
3.000		1.278
3.100		1.288

- $e_0 = 0.10 \text{ g / L}$

	n=1	n=2	n=3	n=4
	V/ml	V/ml	V/ml	V/ml
0.000	0	0	0	0
0.008	0.148	0.14	0.116	0.092
0.017	0.248	0.198	0.162	0.14
0.025	0.32	0.258	0.206	0.18
0.033	0.384	0.306	0.244	0.21
0.042	0.444	0.35	0.284	0.246
0.050	0.498	0.392	0.32	0.282
0.058	0.548	0.434	0.354	0.306
0.067	0.594	0.468	0.386	0.338
0.075	0.636	0.498	0.412	0.362
0.083	0.674	0.532	0.438	0.39
0.092	0.71	0.558	0.466	0.414
0.100	0.744	0.586	0.486	0.438
0.200	0.976	0.78	0.666	0.636
0.300	1.074	0.878	0.77	0.734
0.400	1.13	0.944	0.834	0.808
0.500	1.188	0.996	0.884	0.864
0.600	1.238	1.04	0.924	0.91
0.683	1.282	1.074	0.954	0.94
0.700		1.082	0.958	0.946
0.800		1.118	0.99	0.982
0.900		1.15	1.018	1.014
1.000		1.184	1.046	1.042
1.100		1.21	1.072	1.07
1.200		1.238	1.096	1.096
1.300		1.266	1.118	1.118
1.392		1.286	1.142	1.14
1.400			1.144	1.142
1.500			1.174	1.164
1.600			1.198	1.186
1.700			1.212	1.206
1.800			1.23	1.228
1.900			1.254	1.246
2.000			1.274	1.266
2.100			1.288	1.282
2.150				1.288

▪ $e_0 = 0.15 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml
0.000	0	0	0	0
0.008	0.186	0.184	0.138	0.124
0.017	0.304	0.268	0.21	0.184
0.025	0.402	0.344	0.27	0.236
0.033	0.49	0.408	0.33	0.282
0.042	0.568	0.462	0.376	0.33
0.050	0.636	0.506	0.418	0.372
0.058	0.692	0.552	0.46	0.406
0.067	0.742	0.59	0.496	0.44
0.075	0.786	0.624	0.526	0.474
0.083	0.82	0.654	0.554	0.502
0.092	0.858	0.678	0.578	0.53
0.100	0.886	0.7	0.604	0.552
0.200	1.08	0.86	0.778	0.74
0.300	1.18	0.944	0.868	0.832
0.400	1.248	1.006	0.928	0.896
0.475	1.286	1.046	0.968	0.936
0.500		1.058	0.98	0.948
0.600		1.102	1.022	0.99
0.700		1.14	1.058	1.026
0.800		1.174	1.09	1.062
0.900		1.2	1.118	1.092
1.000		1.228	1.144	1.116
1.100		1.256	1.17	1.142
1.192		1.286	1.19	1.166
1.200			1.192	1.17
1.300			1.214	1.19
1.400			1.236	1.212
1.500			1.256	1.232
1.600			1.276	1.252
1.642			1.286	1.262
1.700				1.274
1.775				1.286

▪ $e_0 = 0.20 \text{ g / L}$

	n=1 V (mL)	n=2 V (mL)	n=3 V (mL)	n=4 V (mL)	n=5 V (mL)
0.000	0	0	0	0	0
0.008	0.234	0.218	0.196	0.196	0.128
0.017	0.374	0.322	0.306	0.336	0.198
0.025	0.492	0.408	0.404	0.402	0.26
0.033	0.59	0.48	0.47	0.46	0.316
0.042	0.678	0.538	0.524	0.51	0.362
0.050	0.744	0.592	0.576	0.56	0.41
0.058	0.802	0.636	0.616	0.596	0.448
0.067	0.844	0.67	0.65	0.628	0.48
0.075	0.89	0.704	0.68	0.658	0.512
0.083	0.924	0.73	0.706	0.684	0.544
0.092	0.952	0.75	0.728	0.708	0.568
0.100	0.972	0.772	0.748	0.726	0.592
0.200	1.148	0.884	0.874	0.864	0.764
0.300	1.24	0.96	0.946	0.934	0.848
0.392	1.282	1.044	1.01	0.978	0.902
0.400		1.05	1.014	0.98	0.906
0.500		1.116	1.068	1.02	0.952
0.600		1.2	1.116	1.06	0.994
0.700		1.23	1.16	1.09	1.03
0.800		1.26	1.188	1.116	1.062
0.900			1.214	1.142	1.092
1.000			1.228	1.168	1.12
1.100			1.242	1.188	1.146
1.200			1.258	1.212	1.17
1.300			1.272	1.23	1.192
1.350			1.282	1.244	1.202
1.400				1.25	1.214
1.500				1.27	1.234
1.592				1.284	1.252
1.600					1.254
1.700					1.274
1.750					1.284

▪ $e_0 = 0.25 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V (mL)	n=2 V (mL)	n=3 V (mL)	n=4 V (mL)	n=5 V (mL)
0.000	0	0	0	0	0
0.008	0.288	0.342	0.196	0.196	0.19
0.017	0.448	0.53	0.3	0.29	0.28
0.025	0.572	0.598	0.39	0.378	0.346
0.033	0.688	0.66	0.466	0.44	0.404
0.042	0.764	0.708	0.522	0.504	0.454
0.050	0.836	0.754	0.576	0.548	0.498
0.058	0.892	0.78	0.618	0.6	0.542
0.067	0.932	0.814	0.656	0.628	0.588
0.075	0.976	0.834	0.688	0.668	0.626
0.083	0.996	0.86	0.718	0.69	0.652
0.092	1.028	0.874	0.738	0.716	0.676
0.100	1.052	0.888	0.758	0.736	0.696
0.200	1.216	1.014	0.896	0.888	0.856
0.266	1.284	1.072	0.954	0.946	0.914
0.300		1.096	0.978	0.97	0.938
0.400		1.164	1.042	1.028	1.008
0.500		1.216	1.094	1.08	1.052
0.600		1.264	1.146	1.128	1.068
0.641		1.284	1.16	1.142	1.08
0.700			1.186	1.166	1.098
0.800			1.224	1.2	1.124
0.900			1.262	1.232	1.148
0.991			1.284	1.258	1.17
1.000				1.26	1.172
1.083				1.284	1.19
1.100					1.194
1.200					1.216
1.300					1.24
1.400					1.262
1.500					1.284

10.4 Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 60 °C.

$$\blacksquare e_0 = 0.05 \text{ g / L}$$

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml
0	0	0	0	0
0.008	0.254	0.12	0	0
0.033	0.324	0.154	0	0.056
0.042	0.376	0.192	0.002	0.078
0.050	0.414	0.22	0.126	0.098
0.058	0.452	0.25	0.144	0.118
0.067	0.518	0.278	0.17	0.134
0.075	0.548	0.302	0.198	0.152
0.083	0.58	0.324	0.22	0.17
0.092	0.612	0.354	0.238	0.182
0.100	0.64	0.38	0.26	0.198
0.200	0.876	0.592	0.466	0.346
0.300	0.992	0.726	0.592	0.458
0.400	1.082	0.812	0.686	0.546
0.500	1.14	0.874	0.758	0.618
0.600	1.192	0.92	0.816	0.68
0.700	1.236	0.964	0.86	0.732
0.800	1.272	1.004	0.896	0.774
0.866	1.296	1.026	0.918	0.802
0.900		1.036	0.928	0.812
1.000		1.07	0.956	0.844
1.100		1.1	0.988	0.874
1.200		1.128	1.014	0.902
1.300		1.152	1.034	0.926
1.400		1.178	1.056	0.948
1.500		1.204	1.078	0.972
1.600		1.226	1.102	0.99
1.700		1.25	1.12	1.012
1.800		1.272	1.14	1.028
1.875		1.286	1.152	1.042
2.000			1.176	1.066
2.100			1.19	1.084
2.200			1.208	1.098
2.300			1.224	1.114
2.400			1.242	1.128
2.500			1.258	1.144
2.600			1.27	1.158
2.700			1.284	1.176
2.708			1.288	1.176
2.800				1.188
2.900				1.204
3.000				1.218
3.100				1.232
3.200				1.246
3.300				1.26
3.400				1.272
3.500				1.282
3.541				1.288

▪ $e_0 = 0.10 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml
0.000	0	0	0	0
0.008	0.208	0.146	0.146	0.114
0.017	0.38	0.22	0.188	0.142
0.025	0.452	0.282	0.226	0.174
0.033	0.514	0.338	0.264	0.204
0.042	0.572	0.398	0.304	0.226
0.050	0.622	0.444	0.34	0.256
0.058	0.67	0.488	0.38	0.28
0.067	0.712	0.526	0.408	0.312
0.075	0.75	0.564	0.434	0.336
0.083	0.782	0.596	0.464	0.362
0.092	0.816	0.624	0.488	0.382
0.100	0.844	0.654	0.514	0.4
0.200	1.04	0.852	0.712	0.596
0.300	1.15	0.944	0.814	0.72
0.400	1.232	1.01	0.878	0.798
0.475	1.274	1.052	0.916	0.844
0.500	1.292	1.064	0.928	0.86
0.600		1.112	0.97	0.902
0.700		1.15	1.008	0.942
0.800		1.188	1.044	0.976
0.900		1.22	1.078	1.006
1.000		1.254	1.104	1.036
1.100		1.28	1.13	1.064
1.150		1.294	1.142	1.076
1.200			1.154	1.088
1.300			1.178	1.112
1.400			1.2	1.136
1.500			1.222	1.16
1.600			1.24	1.182
1.700			1.262	1.202
1.800			1.278	1.224
1.817			1.282	1.23
1.900				1.246
2.000				1.268
2.083				1.286

▪ $e_0 = 0.15 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml	n=5 V/ml	n=6 V/ml	n=7 V/ml
0	0	0	0	0	0	0	0
0.008	0.228	0	0	0.162	0	0.084	0.002
0.017	0.442	0	0	0.224	0	0.122	0.108
0.025	0.542	0	0	0.28	0	0.156	0.134
0.033	0.62	0.196	0.214	0.334	0.116	0.19	0.156
0.042	0.692	0.31	0.284	0.382	0.166	0.22	0.178
0.050	0.752	0.394	0.346	0.426	0.208	0.248	0.198
0.058	0.802	0.474	0.4	0.466	0.25	0.272	0.22
0.067	0.848	0.538	0.452	0.504	0.288	0.302	0.236
0.075	0.882	0.594	0.504	0.538	0.33	0.326	0.256
0.083	0.918	0.642	0.54	0.57	0.358	0.348	0.274
0.092	0.944	0.682	0.574	0.594	0.39	0.374	0.296
0.100	0.966	0.716	0.606	0.622	0.418	0.396	0.31
0.200	1.152	0.934	0.822	0.816	0.652	0.6	0.474
0.300	1.266	1.048	0.922	0.906	0.784	0.726	0.596
0.342	1.294	1.078	0.95	0.934	0.818	0.768	0.636
0.400		1.12	0.988	0.974	0.864	0.814	0.688
0.500		1.182	1.046	1.03	0.922	0.878	0.756
0.600		1.232	1.096	1.076	0.972	0.928	0.814
0.700		1.278	1.134	1.118	1.016	0.968	0.85
0.742		1.296	1.152	1.134	1.028	0.984	0.862
0.800			1.172	1.156	1.054	1.006	0.874
0.900			1.208	1.192	1.088	1.038	0.898
1.000			1.236	1.224	1.114	1.07	0.916
1.100			1.268	1.256	1.148	1.1	0.938
1.150			1.29	1.27	1.162	1.114	0.948
1.200				1.282	1.174	1.126	0.958
1.250				1.296	1.188	1.142	0.968
1.300					1.202	1.152	0.98
1.400					1.224	1.178	1
1.500					1.25	1.202	1.022
1.600					1.266	1.224	1.046
1.700					1.29	1.244	1.064
1.725					1.294	1.25	1.068
1.800						1.264	1.086
1.900						1.288	1.106
1.933						1.294	1.11
2.000							1.124
2.100							1.142
2.200							1.16
2.300							1.178
2.400							1.196
2.500							1.212
2.600							1.226
2.700							1.246
2.800							1.264
2.900							1.282
3.000							1.296

▪ $e_0 = 0.20 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 VB	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml	n=5 V/ml	n=6 V/ml	n=7 V/ml	n=8 V/ml
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.008	0.256	0.222	0.17	0.146	0.116	0.098	0.098	0.134
0.017	0.426	0.398	0.264	0.272	0.226	0.2	0.194	0.174
0.025	0.56	0.506	0.34	0.346	0.264	0.246	0.234	0.21
0.033	0.676	0.588	0.418	0.412	0.322	0.3	0.276	0.248
0.042	0.756	0.654	0.496	0.462	0.358	0.342	0.316	0.276
0.050	0.832	0.776	0.568	0.516	0.392	0.382	0.354	0.304
0.058	0.902	0.876	0.626	0.576	0.428	0.422	0.388	0.344
0.067	0.952	0.916	0.662	0.624	0.462	0.458	0.416	0.372
0.075	0.988	0.954	0.694	0.658	0.506	0.498	0.444	0.396
0.083	1.018	0.99	0.716	0.686	0.55	0.54	0.474	0.424
0.092	1.04	1.016	0.738	0.708	0.582	0.572	0.504	0.436
0.100	1.06	1.036	0.772	0.726	0.61	0.6	0.534	0.462
0.200	1.224	1.166	0.91	0.882	0.768	0.76	0.71	0.656
0.267	1.294	1.23	0.978	0.956	0.842	0.836	0.778	0.736
0.300		1.256	1.004	0.982	0.87	0.864	0.808	0.772
0.350		1.292	1.032	1.014	0.922	0.906	0.844	0.812
0.400			1.064	1.04	0.948	0.94	0.88	0.85
0.500			1.106	1.084	1.008	0.988	0.938	0.898
0.600			1.146	1.122	1.046	1.028	0.976	0.942
0.700			1.182	1.156	1.076	1.056	1.006	0.978
0.800			1.218	1.19	1.102	1.09	1.034	1.01
0.900			1.25	1.218	1.132	1.118	1.056	1.042
1.000			1.28	1.246	1.164	1.14	1.086	1.074
1.050			1.294	1.258	1.178	1.152	1.1	1.084
1.100				1.27	1.192	1.164	1.11	1.098
1.200				1.294	1.216	1.188	1.136	1.12
1.300					1.242	1.214	1.16	1.14
1.400					1.264	1.234	1.174	1.158
1.500					1.288	1.254	1.192	1.176
1.525					1.294	1.262	1.198	1.18
1.600						1.276	1.212	1.196
1.700							1.232	1.218
1.800							1.264	1.236
1.875							1.292	1.25
1.900								1.256
2.000								1.272
2.100								1.292
2.150								1.298

▪ $e_0 = 0.25 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml	n=5 V/ml	n=6 V/ml	n=7 V/ml	n=8 V/ml	n=9 V
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.025	0.06	0.346	0.26	0.182	0.002	0.108	0.132	0.074	0.036
0.033	0.474	0.496	0.384	0.272	0.202	0.188	0.178	0.11	0.15
0.042	0.666	0.612	0.486	0.354	0.266	0.252	0.224	0.146	0.176
0.050	0.798	0.716	0.556	0.418	0.328	0.302	0.266	0.172	0.192
0.058	0.904	0.758	0.62	0.486	0.374	0.34	0.298	0.198	0.216
0.067	0.966	0.814	0.666	0.538	0.428	0.38	0.332	0.224	0.23
0.075	1.022	0.854	0.714	0.586	0.472	0.426	0.362	0.254	0.25
0.083	1.076	0.884	0.744	0.628	0.516	0.462	0.4	0.276	0.262
0.092	1.11	0.924	0.782	0.668	0.546	0.49	0.426	0.304	0.28
0.100	1.146	0.942	0.804	0.704	0.586	0.522	0.458	0.326	0.296
0.158	1.294	1.062	0.934	0.854	0.756	0.694	0.604	0.458	0.39
0.200		1.122	0.99	0.912	0.828	0.774	0.686	0.534	0.448
0.300		1.248	1.098	1.018	0.936	0.894	0.816	0.67	0.572
0.333		1.290	1.13	1.044	0.966	0.922	0.85	0.702	0.608
0.400			1.174	1.094	1.014	0.968	0.898	0.76	0.666
0.500			1.242	1.156	1.072	1.028	0.956	0.834	0.738
0.592			1.296	1.21	1.118	1.078	0.992	0.886	0.786
0.600				1.21	1.13	1.084	0.998	0.89	0.79
0.700				1.26	1.17	1.134	1.032	0.936	0.828
0.775				1.294	1.206	1.162	1.058	0.964	0.854
0.800					1.212	1.174	1.066	0.976	0.86
0.900					1.254	1.218	1.1	1.01	0.878
1.000					1.286	1.254	1.136	1.042	0.892
1.025					1.296	1.258	1.146	1.052	0.894
1.092						1.292	1.162	1.074	0.904
1.100							1.168	1.076	0.904
1.200							1.194	1.108	0.924
1.300							1.22	1.136	0.944
1.400							1.244	1.164	0.966
1.500							1.266	1.192	0.988
1.600							1.288	1.22	1.004
1.700								1.242	1.024
1.800								1.268	1.036
1.883								1.288	1.052
1.900									1.054
2.000									1.072
2.100									1.092
2.200									1.114
2.300									1.132
2.400									1.146
2.500									1.162
2.600									1.172
2.700									1.188
2.800									1.204
2.900									1.214
3.000									1.228
3.100									1.242
3.200									1.258
3.300									1.274
3.400									1.29

10.5 Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 65 °C.

▪ $e_0 = 0.05 \text{ g / L}$

t (h)	n=	n=2	n=3
	V/ml	V/ml	V/ml
0.000	0	0	0
0.008	0.11	0.096	0.064
0.017	0.178	0.132	0.082
0.025	0.242	0.172	0.084
0.033	0.298	0.2	0.084
0.042	0.354	0.232	0.094
0.050	0.398	0.256	0.098
0.058	0.446	0.286	0.104
0.067	0.488	0.314	0.108
0.075	0.526	0.34	0.116
0.083	0.56	0.364	0.132
0.092	0.598	0.384	0.154
0.100	0.63	0.406	0.164
0.200	0.916	0.608	0.268
0.300	1.05	0.734	0.356
0.400	1.132	0.82	0.432
0.500	1.192	0.882	0.496
0.600	1.242	0.934	0.554
0.700	1.282	0.972	0.606
0.733	1.296	0.984	0.622
0.800		1.008	0.652
0.900		1.04	0.694
1.000		1.072	0.728
1.100		1.1	0.764
1.200		1.124	0.796
1.300		1.15	0.826
1.400		1.172	0.852
1.500		1.194	0.878
1.600		1.214	0.902
1.700		1.234	0.924
1.800		1.252	0.946
1.900		1.27	0.966
2.000		1.288	0.988
2.075		1.3	1.002
2.100			1.006
2.200			1.024
2.300			1.042
2.400			1.06
2.500			1.078
2.600			1.096
2.700			1.11
2.800			1.124
2.900			1.14
3.000			1.154
3.100			1.17
3.200			1.182
3.300			1.2
3.400			1.216

3.500	1.23
3.600	1.246
3.700	1.26
3.800	1.268
3.900	1.278
4.000	1.29
4.091	1.3

▪ $e_0 = 0.10 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml
0	0	0	0	0
0.008	0.16	0.148	0.068	0.108
0.017	0.316	0.212	0.112	0.142
0.025	0.422	0.28	0.14	0.152
0.033	0.51	0.338	0.176	0.164
0.042	0.582	0.392	0.202	0.174
0.050	0.65	0.436	0.232	0.184
0.058	0.71	0.474	0.258	0.194
0.067	0.764	0.51	0.284	0.204
0.075	0.808	0.548	0.31	0.214
0.083	0.852	0.58	0.33	0.222
0.092	0.886	0.61	0.352	0.232
0.100	0.914	0.638	0.372	0.242
0.200	1.112	0.838	0.572	0.33
0.300	1.216	0.924	0.698	0.45
0.400	1.288	0.988	0.79	0.518
0.417	1.3	1	0.798	0.528
0.500		1.04	0.85	0.578
0.600		1.084	0.9	0.63
0.700		1.12	0.94	0.678
0.800		1.154	0.976	0.72
0.900		1.18	1.006	0.758
1.000		1.204	1.036	0.794
1.100		1.23	1.062	0.826
1.200		1.256	1.086	0.856
1.300		1.28	1.108	0.882
1.400		1.298	1.132	0.908
1.408		1.3	1.134	0.91
1.500			1.154	0.93
1.600			1.17	0.954
1.700			1.19	0.976
1.800			1.21	0.996
1.900			1.228	1.014
2.000			1.246	1.034
2.100			1.262	1.052
2.200			1.28	1.068
2.300			1.296	1.086
2.325			1.3	1.09
2.400				1.102
2.500				1.118
2.600				1.134
2.700				1.15
2.800				1.164
2.900				1.18
3.000				1.192
3.100				1.208
3.200				1.222
3.300				1.234
3.400				1.246
3.500				1.26
3.600				1.272

3.700	1.284
3.800	1.296
3.833	1.3

▪ $e_0 = 0.15 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V (ml)	n=2 V (ml)	n=3 V (ml)	n=4 V (ml)	n=5 V (ml)
0	0	0	0	0	0
0.008	0.214	0.196	0.148	0.242	0.014
0.017	0.42	0.32	0.23	0.284	0.044
0.025	0.544	0.404	0.284	0.332	0.052
0.033	0.646	0.476	0.326	0.364	0.062
0.042	0.728	0.542	0.372	0.38	0.07
0.050	0.796	0.6	0.414	0.394	0.078
0.058	0.854	0.652	0.446	0.41	0.088
0.067	0.894	0.684	0.482	0.426	0.098
0.075	0.932	0.73	0.516	0.44	0.106
0.083	0.962	0.76	0.542	0.454	0.116
0.092	0.992	0.784	0.566	0.468	0.124
0.100	1.014	0.81	0.592	0.482	0.134
0.200	1.186	0.962	0.784	0.614	0.23
0.300	1.286	1.052	0.872	0.708	0.312
0.317	1.3	1.064	0.888	0.722	0.324
0.400		1.122	0.938	0.778	0.386
0.500		1.172	0.99	0.83	0.446
0.600		1.22	1.036	0.874	0.504
0.700		1.256	1.078	0.91	0.556
0.800		1.294	1.11	0.944	0.604
0.817		1.298	1.116	0.948	0.612
0.900			1.142	0.974	0.648
1.000			1.172	1.004	0.688
1.100			1.196	1.028	0.722
1.200			1.22	1.052	0.756
1.300			1.244	1.074	0.786
1.400			1.266	1.096	0.816
1.500			1.288	1.118	0.842
1.542			1.296	1.126	0.852
1.600				1.138	0.866
1.700				1.158	0.89
1.800				1.18	0.914
1.900				1.2	0.934
2.000				1.218	0.954
2.100				1.238	0.974
2.200				1.256	0.994
2.300				1.274	1.012
2.400				1.292	1.03
2.450				1.3	1.038
2.500					1.048
2.600					1.064
2.700					1.078
2.800					1.094
2.900					1.108
3.000					1.122
3.100					1.136
3.200					1.15
3.300					1.164
3.400					1.178
3.500					1.192

3.600	1.204
3.700	1.218
3.800	1.23
3.900	1.242
4.000	1.254
4.100	1.264
4.200	1.276
4.300	1.288
4.383	1.3

▪ $e_0 = 0.20 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml	n=5 V/ml	n=6 V/ml
0	0	0	0	0	0	0
0.008	0.322	0.204	0.166	0.108	0.05	0.08
0.017	0.516	0.392	0.26	0.168	0.082	0.092
0.025	0.666	0.496	0.332	0.218	0.114	0.102
0.033	0.78	0.574	0.402	0.266	0.14	0.114
0.042	0.866	0.646	0.462	0.308	0.164	0.122
0.050	0.93	0.7	0.516	0.352	0.188	0.134
0.058	0.974	0.748	0.56	0.384	0.21	0.14
0.067	1.014	0.784	0.606	0.424	0.232	0.15
0.075	1.046	0.814	0.64	0.454	0.254	0.158
0.083	1.078	0.842	0.672	0.48	0.272	0.166
0.092	1.102	0.862	0.702	0.508	0.292	0.174
0.100	1.126	0.886	0.726	0.536	0.31	0.182
0.200	1.3	1.038	0.904	0.75	0.492	0.27
0.300		1.13	0.996	0.854	0.62	0.348
0.400		1.202	1.062	0.92	0.714	0.416
0.500		1.258	1.118	0.974	0.786	0.47
0.583		1.296	1.158	1.012	0.83	0.51
0.600			1.162	1.018	0.838	0.516
0.700			1.204	1.058	0.882	0.562
0.800			1.24	1.094	0.922	0.604
0.900			1.276	1.126	0.958	0.644
0.992			1.3	1.154	0.986	0.68
1.000				1.156	0.988	0.682
1.100				1.184	1.016	0.716
1.200				1.21	1.044	0.746
1.300				1.234	1.068	0.774
1.400				1.258	1.092	0.8
1.500				1.282	1.114	0.822
1.583				1.3	1.132	0.842
1.700					1.156	0.864
1.800					1.176	0.884
1.900					1.196	0.902
2.000					1.212	0.918
2.100					1.23	0.936
2.200					1.248	0.952
2.300					1.264	0.964
2.400					1.28	0.978
2.500					1.296	0.994
2.525					1.3	0.998
2.600						1.008
2.700						1.022
2.800						1.038
2.900						1.046
3.000						1.06
3.100						1.072
3.200						1.084
3.300						1.098
3.400						1.106
3.500						1.118
3.600						1.13

3.700	1.14
3.800	1.148
3.900	1.158
4.000	1.17
4.100	1.182
4.200	1.192
4.300	1.206
4.400	1.212
4.500	1.222
4.600	1.23
4.700	1.236
4.800	1.244
4.900	1.254
5.000	1.264
5.100	1.27
5.200	1.278
5.300	1.288
5.400	1.296

▪ $e_0 = 0.25 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml	n=3 V/ml	n=4 V/ml	n=5 V/ml	n=6 V/ml
0	0	0	0	0	0	0
0.008	0.34	0.412	0.216	0.196	0.01	0.08
0.017	0.602	0.548	0.336	0.258	0.032	0.09
0.025	0.74	0.66	0.422	0.326	0.05	0.114
0.033	0.842	0.744	0.502	0.376	0.16	0.192
0.042	0.928	0.81	0.566	0.428	0.244	0.204
0.050	0.996	0.864	0.622	0.478	0.27	0.218
0.058	1.03	0.904	0.672	0.516	0.306	0.228
0.067	1.076	0.936	0.706	0.552	0.33	0.238
0.075	1.1	0.964	0.742	0.584	0.356	0.252
0.083	1.134	0.984	0.768	0.618	0.38	0.264
0.092	1.182	1.004	0.796	0.642	0.406	0.276
0.100	1.202	1.022	0.816	0.67	0.426	0.29
0.108	1.214	1.042	0.832	0.694	0.452	0.3
0.150	1.3	1.104	0.898	0.78	0.544	0.358
0.200		1.164	0.958	0.848	0.634	0.418
0.300		1.246	1.044	0.934	0.758	0.518
0.383		1.298	1.098	0.988	0.82	0.584
0.400			1.11	0.998	0.832	0.596
0.500			1.164	1.046	0.892	0.664
0.600			1.208	1.09	0.934	0.72
0.700			1.252	1.13	0.964	0.768
0.800			1.286	1.162	0.996	0.808
0.842			1.3	1.176	1.008	0.822
0.900				1.196	1.028	0.842
1.000				1.224	1.054	0.876
1.100				1.248	1.082	0.904
1.200				1.276	1.108	0.928
1.300				1.3	1.132	0.952
1.400					1.158	0.972
1.500					1.18	0.99
1.600					1.2	1.006
1.700					1.222	1.018
1.800					1.244	1.03
1.900					1.264	1.044
2.000					1.284	1.058
2.100					1.3	1.072
2.200						1.084
2.300						1.094
2.400						1.104
2.500						1.116
2.600						1.128
2.700						1.14
2.800						1.152
2.900						1.168
3.000						1.18
3.200						1.206
3.300						1.22
3.400						1.236
3.500						1.25
3.600						1.262

3.700	1.276
3.800	1.288
3.900	1.3

10.6 Volumen de base frente a tiempo de reacción. T= 70 °C.

$$\blacksquare e_0 = 0.05 \text{ g / L}$$

t (h)	n=1 VB (mL)
0	0
0.008	0.136
0.017	0.218
0.025	0.288
0.033	0.352
0.042	0.418
0.050	0.468
0.058	0.512
0.067	0.554
0.075	0.596
0.083	0.632
0.092	0.66
0.100	0.696
0.200	0.918
0.300	0.994
0.400	1.04
0.500	1.06
0.600	1.066
0.700	1.066
0.800	1.066
0.900	1.066
0.908	1.066
1.000	1.066
1.100	1.066
1.200	1.066

▪ $e_0 = 0.10 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml
0	0
0.008	0.204
0.017	0.354
0.025	0.458
0.033	0.55
0.042	0.628
0.050	0.696
0.058	0.754
0.067	0.808
0.075	0.85
0.083	0.888
0.092	0.92
0.100	0.948
0.200	1.18
0.300	1.228
0.400	1.25
0.500	1.26
0.600	1.266
0.700	1.274
0.800	1.278
0.900	1.282
1.000	1.284
1.100	1.288
1.200	1.292
1.300	1.294
1.400	1.298
1.500	1.302
1.600	1.306

- $e_0 = 0.15 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml
0	0
0.008	0.196
0.017	0.454
0.025	0.578
0.033	0.676
0.042	0.760
0.050	0.834
0.058	0.894
0.067	0.936
0.075	0.972
0.083	0.998
0.092	1.020
0.100	1.040
0.200	1.160
0.300	1.202
0.400	1.222
0.500	1.234
0.600	1.242
0.700	1.246
0.800	1.254
0.900	1.260
1.000	1.266
1.100	1.272
1.200	1.280
1.300	1.290
1.400	1.298
1.483	1.306

▪ $e_0 = 0.20 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml
0	0
0.008	0.390
0.017	0.582
0.025	0.732
0.033	0.844
0.042	0.918
0.050	0.976
0.058	1.016
0.067	1.052
0.075	1.074
0.083	1.102
0.092	1.120
0.100	1.136
0.200	1.244
0.300	1.276
0.400	1.286
0.500	1.296
0.600	1.306

▪ $e_0 = 0.25 \text{ g / L}$

t (h)	n=1 V/ml	n=2 V/ml
0	0	0
0.008	0.406	0.120
0.017	0.702	0.174
0.025	0.846	0.218
0.033	0.950	0.264
0.042	1.014	0.304
0.050	1.062	0.344
0.058	1.100	0.380
0.067	1.132	0.414
0.075	1.152	0.440
0.083	1.174	0.468
0.092	1.194	0.494
0.100	1.208	0.518
0.192	1.306	0.712
0.200		0.722
0.300		0.822
0.400		0.880
0.500		0.916
0.600		0.940
0.700		0.956
0.800		0.972
0.900		0.984
1.000		0.996
1.100		1.008
1.200		1.018
1.300		1.028
1.400		1.038
1.500		1.048
1.600		1.056
1.700		1.064
1.800		1.072
1.900		1.080
2.000		1.086
2.100		1.094
2.200		1.100
2.300		1.108
2.400		1.118
2.500		1.126
2.600		1.134
2.700		1.140
2.800		1.148
2.900		1.158
3.000		1.168
3.100		1.174
3.200		1.182
3.300		1.190
3.400		1.198
3.500		1.206
3.600		1.214
3.700		1.224
3.800		1.232

3.900	1.240
4.000	1.248
4.100	1.256
4.200	1.262
4.300	1.270
4.400	1.278
4.500	1.286
4.600	1.294
4.700	1.300
4.767	1.306

10.7 Tiempo de hidrólisis. Resumen

Tabla 10-1. Tiempo de hidrólisis a 45°C

e_0 (g/L)	0.05		0.10		0.15		0.20		0.25	
	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)
	1	3.27	1	1.56	1	0.93	1	0.84	1	0.56
			2	4.36	2	2.51	2	2.04	2	1.28
					3	2.72	3	2.16	3	1.62
									4	1.78
									5	1.83

Tabla 10-2. Tiempo de hidrólisis a 50°C

e_0 (g/L)	0.05		0.10		0.15		0.20		0.25	
	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)
	1	2.25	1	1.06	1	0.83	1	0.50	1	0.43
	2	5.77	2	4.36	2	2.25	2	1.23	2	0.98
					3	2.95	3	2.00	3	1.43
							4	2.45	4	2.00
									5	2.08
									6	2.37

Tabla 10-3. Tiempo de hidrólisis a 55°C

e_0 (g/L)	0.05		0.10		0.15		0.20		0.25	
	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)
	1	1.39	1	0.69	1	0.48	1	0.39	1	0.28
	2	3.00	2	1.42	2	1.19	2	0.88	2	0.64
			3	2.23	3	1.67	3	1.35	3	0.99
					4	1.81	4	1.59	4	1.09
					5	2.23	5	1.78	5	1.50
									6	1.67

Tabla 10-4. Tiempo de hidrólisis a 60°C

e_0 (g/L)	0.05		0.10		0.15		0.20		0.25		
	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	
1	0.87	1	0.49	1	0.33	1	0.27	1	0.16		
2	1.88	2	1.19	2	0.74	2	0.59	2	0.34		
3	2.71	3	1.84	3	1.17	3	1.05	3	0.60		
4	3.55	4	2.11	4	1.28	4	1.20	4	0.78		
					5	1.73	5	1.53	5	1.03	
					6	1.96	6	1.69	6	1.10	
					7	3.03	7	1.88	7	1.61	
							8	2.16	8	1.89	
									9	3.41	

Tabla 10-5. Tiempo de hidrólisis a 65°C

e_0 (g/L)	0.05		0.10		0.15		0.20		0.25		
	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	
1	0.73	1	0.42	1	0.32	1	0.20	1	0.15		
2	2.08	2	1.41	2	0.82	2	0.58	2	0.38		
3	4.10	3	2.33	3	1.55	3	0.99	3	0.84		
			4	3.92	4	2.53	4	1.58	4	1.30	
					5	4.39	5	2.53	5	2.10	
							6	5.53	6	3.90	

Tabla 10-6. Tiempo de hidrólisis a 70°C-7. Tiempo de hidrólisis a 70°C

e_0 (g/L)	0.05		0.10		0.15		0.20		0.25		
	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	n	t (h)	
1	-	1	1.63	1	1.48	1	0.62	1	0.19		
									2	4.80	