



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS
DEL CENTRO DE LA REPUBLICA
(PROPAC)**

**"CONCENTRACION Y DESMINERALIZACION DEL
SUERO LACTEO Y EVALUACION DEL DAÑO A LA
PROTEINA COMO RESULTADO DEL
PROCESAMIENTO"**

TESIS

Que como parte de los requisitos
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presenta:

Q. EN A. SILVIA LORENA AMAYA LLANO.

Dirigen:

**Dr. Carlos Regalado González
Dr. Yunny Meas Vong**

SANTIAGO DE QUERETARO, QRO. ENERO DE 2000



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**"CONCENTRACION Y DESMINERALIZACION DEL SUERO LACTEO Y
EVALUACION DEL DAÑO A LA PROTEINA COMO RESULTADO DEL
PROCESAMIENTO"**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Presenta:

Q. EN A. SILVIA LORENA AMAYA LLANO.

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZALEZ
Presidente

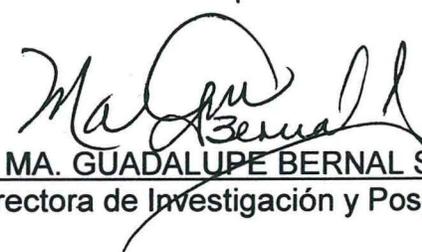
DR. YUNNY MEAS VONG
Secretario

DR. RAUL ORTEGA BORGES
Vocal

DR. JORGE FERNANDO TORO VAZQUEZ
Suplente

M. EN C. BLANCA GARCIA ALMENDAREZ
Suplente


Q.M.J. MERGED ESPARZA GARCIA
Director de la Facultad de Química


DRA. MA. GUADALUPE BERNAL SANTOS
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro., México

RESUMEN

La Industria del queso en México, produjo 77000 tons. de suero líquido en 1997, el cual es utilizado para fabricar leches maternizadas, concentrados proteínicos de suero (CPS), alimentación de ganado; sin embargo, gran parte se desperdicia. Por otro lado, México importó en 1996 cerca de 49,000 tons de suero en polvo. El CPS se obtiene principalmente por ultrafiltración (UF). La electrodiálisis (ED) es un proceso electroquímico que permite modificar la concentración iónica del CPS. El objetivo de este trabajo fue concentrar y desmineralizar el suero lácteo utilizando procesos de membrana (UF y ED) que evitan el daño térmico a la proteína para mantener sus propiedades de solubilidad y capacidad emulsificante. Además se evaluó el daño a la proteína como resultado del procesamiento, utilizando calorimetría diferencial de barrido y electroforesis.

El suero se concentró por UF, usando una membrana de 10 kDa de punto de corte en un módulo de hoja plana, para lograr un producto con 35% de proteína en base seca, disminuyendo la lactosa y algunas sales. Se desmineralizó el suero concentrado utilizando ED, logrando una eliminación del 50% del contenido inicial de sales sin modificar su pH, usando una celda de electrodiálisis de tres compartimientos.

Tanto el suero UF como el ED presentaron el menor contenido de proteína soluble a pH entre 4 y 4.5, observándose una tendencia a aumentar la solubilidad cuando se incrementó el pH. Las muestras concentradas y desmineralizadas mostraron su máxima solubilidad a pH cercano a 7, coincidiendo este valor con el de mayor índice de actividad emulsificante (IAE). El máximo IAE fue para el suero desmineralizado, por lo que se concluyó que el IAE fue significativamente afectado por la presencia de sales.

Los termogramas obtenidos muestran que la lactosa está presente como un sólido amorfo que funde entre 75 y 125 °C, dependiendo del contenido de agua de las muestras; asimismo se observa su cristalización entre 135 y 150°C. Debido a la disminución del contenido de lactosa y calcio en las muestras UF y ED pudo observarse un pico a aproximadamente 235°C que probablemente se debe a la proteína. Es necesario secar las muestras bajo condiciones controladas de actividad acuosa para tratar de discernir apropiadamente los picos. Por otra parte, electroforesis nativa y desnaturizante en condiciones reductoras y no reductoras a dos diferentes pH's no mostraron modificación en el patrón de bandas de proteína. Esto sugiere que no hubo modificación significativa en la estructura de la proteína que pudiera ser detectada por esta técnica, una vez que el suero ha sido concentrado por UF y desmineralizado por ED.

Palabras clave: suero lácteo, ultrafiltración, electrodiálisis, propiedades funcionales.

ABSTRACT

The cheese industry in Mexico produced 76920 tons. of whey in 1997. It is used for infant milk formula production, animal feed and in small amounts for whey protein concentrates (WPC). However, part of the whey is wasted. On the other hand, Mexico imported about 49,000 tons of dry whey in 1996. WPC is mainly produced by ultrafiltration (UF) and can be followed by electrodyalisis (ED) which allows modification of ionic concentration of concentrated whey. The objective of this work was to concentrate and demineralize sweet whey using membrane processes (UF and ED) to avoid protein heat damage and to maintain solubility and emulsifying properties. Protein changes were evaluated by using differential scanning calorimetry (DSC) and electrophoresis.

Initial protein content was concentrated to 35% (d.b.), by ultrafiltration using 10 kDa molecular weight cut off membranes in a Minitan (Millipore) system. Lactose and mineral salts distributed between the retentate and filtrate. The resulting WPC 35 was demineralized using a three compartment electrodyalizer to about 30% the original mineral content, while calcium was reduced to 10% of the original concentration, keeping a constant pH.

The concentrated and the demineralized whey products showed a minimum protein solubility between pH 4 and 4.5. Solubility increased above and below this pH range. Both, the UF and ED whey samples showed a maximum solubility at pH close to 7. High emulsion activity index (EAI), was also found around this pH, where the demineralized whey showed the highest EAI. Therefore, the presence of mineral salts significantly affected the EAI.

The DSC thermograms showed the presence of lactose as an amorphous solid in all samples which melted between 75° and 150° C. The thermograms corresponding to UF and ED samples showed a peak around 235° C. This peak is probably associated to protein phase transition because of the higher protein and reduced calcium concentration of these samples. It is suggested to treat the samples under controlled water activity to assign the peaks properly. On the other hand, native and denaturing electrophoresis under reducing and non-reducing conditions, at two different pH's did not show any difference in the proteins pattern. This technique suggested a not significant modification in the structure after UF and ED.

Keywords: sweet whey, ultrafiltration, electrodyalisis, functional properties.

DEDICATORIAS

A Dios,
por haberme permitido concluir esta meta.

A mis padres,
por su invaluable apoyo, ejemplo y confianza.

A mis hermanos,
Coco, Ana, Jorge y Laura,
por su entusiasmo y cariño.

A Roberto y Beto,
por ser la razón de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, especialmente al Mtro. Esparza,
Director de la Facultad de Química y a Conacyt
por el apoyo que me brindaron.

Al financiamiento de SIHGO a través del proyecto 19980201027.

Al Dr. Whitaker, Dr. Meas, Dr. Ortega, Dr. Toro, Dr. Regalado y M. en C. García por
su asesoría y su tiempo.

A mis compañeros de Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, así como
también a los compañeros del Laboratorio de Electroquímica en CIDETEQ y del
Laboratorio de Físicoquímica de Alimentos del CIEP, S.L.P., por su ayuda y
compañerismo.

A Anaberta, Marce, Vanessa, Sandra y Beneranda por su amistad.

INDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Indice general	v
Indice de figuras	viii
Indice de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Proteínas del lactosuero	8
2.1.1 β -lactoglobulina	8
2.1.2 α -lactoalbúmina	11
2.1.3 Seroalbúmina bovina	12
2.1.4 Inmunoglobulinas bovinas	12
2.1.5 Proteosas-peptonas	12
2.1.6 Otras proteínas del suero	13
2.2 Efecto de la temperatura sobre las proteínas del suero	13
2.3 Estudio térmico de las proteínas	14
2.4 Procesos usados en la producción de Concentrado Proteínico de suero (CPS)	17
2.4.1 Tratamiento del suero antes del procesamiento	17
2.5 Procesos de membrana	18
2.5.1 Características de las membranas	19
2.6 Polarización y ensuciamiento de la membrana	22
2.7 Ultrafiltración	23
2.7.1 Módulos de ultrafiltración	25
2.8 Electrodialisis	28
2.8.1 Aplicaciones de la electrodialisis	29
2.8.2 Módulo de electrodialisis	30
2.8.3 Leyes de Faraday y Ohm	31
2.8.4 Membranas para electrodialisis	32

3.	OBJETIVOS	35
	3.1 Objetivo General	36
	3.2 Objetivos específicos	36
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
	4.1 Reactivos	38
	4.2 Material biológico	38
	4.3 Métodos	38
	4.3.1 Caracterización fisicoquímica de la materia prima	38
	4.3.1.1 conductividad	38
	4.3.1.2 pH	38
	4.3.1.3 proteína	39
	4.3.1.4 grasa butírica	39
	4.3.1.5 minerales	39
	4.3.1.6 cloruros	39
	4.3.1.7 humedad	39
	4.3.1.8 lactosa	40
	4.3.2 Caracterización microbiológica	40
	4.4 Tratamiento del suero previo a la concentración	40
	4.5 Concentración del suero por ultrafiltración	40
	4.6 Tratamiento del suero para la desmineralización	41
	4.7 Desmineralización del suero por electrodiálisis	41
	4.8 Microscopía electrónica de barrido	42
	4.9 Pruebas de solubilidad	42
	4.10 Estimación del Índice de Actividad Emulsificante	42
	4.11 Evaluación de las proteínas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	44
	4.12 Análisis electroforético de las proteínas	44
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	46
	5.1 Caracterización fisicoquímica de la materia prima	47
	5.2 Caracterización microbiológica	48
	5.3 Concentración del suero por ultrafiltración	51
	5.4 Proceso de electrodiálisis	51
	5.5 Evaluación del ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración y electrodiálisis	63
	5.6 Pruebas de solubilidad en función del pH	68
	5.7 Estimación del Índice de Actividad Emulsificante (IAE)	71
	5.8 Evaluación de las proteínas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	72
	5.9 Análisis electroforético de las proteínas	76
	5.9.1 Electroforesis nativa	76
	5.9.2 Electroforesis desnaturalizante	76
6.	CONCLUSIONES	81

7. PERSPECTIVAS	84
8. REFERENCIAS	87
9. APÉNDICES	97
A.1 Curva de calibración de BSA con el reactivo de Bradford	98
A.2 Análisis de minerales antes y después del tratamiento con resinas de intercambio iónico	99
A.3 Comportamiento del voltaje, conductividad y pH del suero a 0.31 kA/m ²	100
A.4 Comportamiento del voltaje, conductividad y pH del suero a 0.13 kA/m ²	101
A.5 Aplicación de la Ley de Faraday para calcular el tiempo de desmineralización del suero lácteo.	102
A.6 Comportamiento del voltaje, conductividad y pH del suero a 0.31 kA/m ² y anolito neutralizado con NH ₄ OH	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Efecto del calentamiento por 30 minutos a diferentes temperaturas en las proteínas del suero	15
Figura 2.2	Comportamiento del flux como una función del tiempo	22
Figura 2.3	Principios de filtración por membranas	24
Figura 2.4	Sistema Minitan de ultrafiltración que ejemplifica al Módulo de Hoja Plana	27
Figura 2.5	Módulo de electrodiálisis	34
Figura 2.6	Electrodiálisis de suero lácteo en celda de tres compartimientos	34
Figura 5.1	Determinación de la velocidad de flujo con diferente área de filtrado.	52
Figura 5.2	a) Vista de la celda de vidrio empleada en los experimentos preliminares de desmineralización de suero concentrado por electrodiálisis b) Electrodiálizador marca Asahi c) detalle de electrodos, separadores y membranas del equipo	55
Figura 5.3	Comportamiento de los electrolitos durante la ED de suero a 0.319kA/m^2	56
Figura 5.4	Corriente límite para suero lácteo en celda de tres compartimientos	58
Figura 5.5	Comportamiento de los electrolitos durante la ED de suero a 0.13kA/m^2	59
Figura 5.6	Comportamiento de los electrolitos durante la ED de suero a 0.31kA/m^2 con la adición de NH_4OH al anolito	61
Figura 5.7	Fotografía al microscopio electrónico de la superficie de la membrana de UF después de concentrar el suero lácteo.	64
Figura 5.8	Fotografía al microscopio electrónico de la superficie de la membrana aniónica nueva.	65
Figura 5.9	Fotografía al microscopio electrónico de la superficie de la membrana aniónica después de haber desmineralizado el suero lácteo y lavada con NaOH 0.1 M por 10 min.	66
Figura 5.10	Fotografía al microscopio electrónico de la superficie de la membrana catiónica nueva.	67
Figura 5.11	Solubilidad del suero en diferentes etapas del proceso como función del pH	70
Figura 5.12	Termogramas DSC para suero lácteo.	75
Figura 5.13	Electroforesis nativa pH 8.8	78
Figura 5.14	Electroforesis desnaturalizante pH 8.8 (A) condiciones reductoras; (B) condiciones no reductoras	79
Figura 5.15	Electroforesis desnaturalizante pH 7.2 (A) condiciones reductoras; (B) condiciones no reductoras	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Composición aproximada del suero	7
Tabla 2.2	Proteínas del suero y sus propiedades	7
Tabla 2.3	Parámetros moleculares de β -lactoglobulina	10
Tabla 2.4	Sustituciones aminoácidas en las β -lactoglobulinas	10
Tabla 2.5	Polímeros para membranas de ultrafiltración	20
Tabla 2.6	Tamaño molecular aproximado de varios constituyentes del Suero	20
Tabla 2.7	Características típicas de las membranas	21
Tabla 5.1	Caracterización fisicoquímica del suero lácteo en cada una de las etapas del procesamiento	49
Tabla 5.2	Análisis de suero lácteo dializado contra amortiguador Tris-Cl y liofilizado para su análisis por DSC	49
Tabla 5.3	Caracterización microbiológica del suero en las diferentes etapas de preparación de suero concentrado y desmineralizado	50
Tabla 5.4	Determinación de eficiencia y equivalentes transportados de los electrolitos $i = 0.3 \text{ kA/m}^2$	57
Tabla 5.5	Determinación de eficiencia y equivalentes transportados de los electrolitos $i = 0.13 \text{ kA/m}^2$	60
Tabla 5.6	Determinación de eficiencia y equivalentes transportados de los electrolitos al adicionar $\text{NH}_4\text{OH} = 0.1 \text{ N}$ en el anolito $i = 0.3 \text{ kA/m}^2$	62
Tabla 5.7	Estimación del Índice de Actividad emulsificante para proteínas de suero a dos pH's	71

ABREVIATURAS

kDa	1000 Da = 1000 g/mol
MPa	Mega Pascales
pH _i	pH del punto isoeléctrico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
WPC	Whey Protein Concentrate (Concentrado de proteína de suero)
rpm	revoluciones por minuto
HMP	Hexametafosfato de sodio

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del DIPA en la Universidad Autónoma de Querétaro; en el Laboratorio de Electroquímica del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) y en el Laboratorio de Fisicoquímica de Alimentos del CIEP, S.L.P., contando con la asesoría del Dr. John R. Whitaker a través de la Cátedra Patrimonial, Nivel II, financiada por Conacyt y bajo la dirección del Dr. Carlos Regalado González y del Dr. Yunny Meas Vong.

1. INTRODUCCION

La región de la República Mexicana, que comprende los Estados de Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro, representaron el 18.5% de la producción total de leche de bovino en el período 1992–1996 (SAGAR, 1998). El suero es la fracción líquida que es drenada de la cuajada en la manufactura de queso. Es un líquido diluido constituido de lactosa, proteínas, minerales y trazas de grasa, conteniendo aproximadamente el 6 % de sólidos totales de los cuales el 70 % o más es lactosa y cerca del 11 % proteínas (Zall, 1992).

La Industria del queso en México, produjo 76.92 millones de litros de suero en 1997 (SAGAR, 1998). Este es parcialmente aprovechado para la fabricación de leches maternizadas, e incipientemente para la obtención de concentrados proteínicos de suero (CPS), desperdiándose el resto. Por otro lado, México importó en 1996 cerca de 49,000 ton de suero, principalmente en polvo (SAGAR, 1998). El CPS se obtiene principalmente por el uso de membranas a presiones de 1 a 10 MPa, utilizando métodos no térmicos como la ultrafiltración; éste método es utilizado para comparar otros métodos alternativos como la concentración por evaporación, coagulación y precipitación. Los CPS comerciales de alta concentración de proteína generalmente se desmineralizan para mejorar su sabor y algunas propiedades funcionales tal como la emulsificación, para tal fin pueden emplearse procesos como la nanofiltración o la electrodiálisis. Se ha demostrado que el costo de eliminar hasta 50% de los minerales es menor usando la electrodiálisis (Hoppe y Higgins, 1992). Existe una larga lista de productos en los cuales se utilizan los sólidos del suero en la forma de concentrados o en polvo, tales como confitería, panadería, cereales, alimentos infantiles, productos cárnicos, bebidas, sopas, salsas, postres y cremas entre otros (De Wit, 1989). Sin embargo, el CPS tiene algunas características en detrimento de sus propiedades funcionales tales como: alto contenido de lactosa así como poca formación y estabilidad de las espumas que forma (Howell, 1990). Las proteínas del suero en forma nativa y pura tienen un elevado valor nutrimental y funcional, por lo que los alimentos adicionados de estas proteínas tendrán propiedades únicas tanto nutrimentales como funcionales (buena solubilidad, buena capacidad de emulsificación y de espumado) pero el suero en forma nativa posee un elevado La contenido de sales y baja concentración de proteínas, lo que limita su adición directa.

proteína es un componente principal en muchos alimentos, contribuyendo a las propiedades funcionales de varios sistemas alimenticios. Estas propiedades son controladas por la estructura molecular de la proteína bajo ambientes específicos (Kilara et al., 1986). Entre las propiedades funcionales, la solubilidad es considerada como un pre-requisito para el funcionamiento de una proteína en muchas aplicaciones alimenticias (Kinsella, 1976) ya que influye significativamente sobre otras propiedades funcionales; en general, proteínas usadas por su funcionalidad son altamente solubles para proporcionar buenas propiedades emulsificantes, espumantes, gelificantes y de batido (Vojdani, 1996). Las preparaciones proteicas comerciales varían ampliamente en sus características de solubilidad como resultado de una desnaturalización parcial de las proteínas durante su procesamiento. Por ejemplo, las proteínas con un grado controlado de desnaturalización de suero dulce pueden ser muy solubles aún en su punto isoeléctrico, aunque las solubilidades de esas proteínas en concentrados de suero comerciales son muy bajas en un pH neutro, debido principalmente a la desnaturalización excesiva de la proteína durante la ultrafiltración del suero a presiones y temperaturas elevadas (De Wit et al., 1986). Las proteínas como otras macromoléculas, tienen dos importantes propiedades que son responsables de varias propiedades funcionales: la solubilidad y las propiedades hidrodinámicas. La solubilidad es el resultado de las propiedades activas de la superficie como es espumado, emulsificación, ligado de grasas y sabores. Las propiedades hidrodinámicas de las proteínas influyen en la viscosidad y en la gelación. Las propiedades activas de la superficie son el resultado de la composición de aminoácidos de la proteína, su distribución, flexibilidad molecular y en menor grado del tamaño y la forma. En contraste, las propiedades hidrodinámicas son afectadas enormemente por el tamaño y forma, siendo relativamente independientes de la composición y distribución de sus aminoácidos (Vojdani, 1996).

La solubilidad de una proteína se relaciona con el cambio en energía libre neta proveniente de las interacciones de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos de la proteína con el medio acuoso circundante del solvente (Damodaran, 1996). Por otra parte, la principal limitante en el uso de nuevas aplicaciones en alimentos para dichas proteínas, es la falta de conocimiento de las bases moleculares de la funcionalidad de las proteínas en los alimentos. La cualidad sensorial de un alimento no emana de

un atributo sensorial individual, sino que es producto de una interacción compleja de atributos múltiples. Esto implica que para que una proteína funcione bien en un producto alimenticio, debe poseer funcionalidad múltiple.

La mayoría de los alimentos procesados han sido sujetos a algún tratamiento térmico en el transcurso de su transformación; estos tratamientos pueden causar cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los constituyentes principales (proteínas, carbohidratos y lípidos), por lo que afectan la calidad y aceptabilidad de los productos. Las características de estos cambios dependen de la naturaleza del material. Los cambios fisicoquímicos en los alimentos, resultado de tratamientos térmicos pueden ser determinados por métodos agrupados colectivamente como análisis térmicos (TA, Harwalkar et al., 1996). Existen TA entre los que se encuentra la calorimetría diferencial de barrido (DSC) la cual es una técnica termoanalítica diseñada para monitorear cambios en las propiedades físicas o químicas de los materiales en función de la temperatura mediante la detección de cambios de calor (energía) asociados con tales procesos (Biliaderis, 1983). Estas técnicas pueden usarse para estudiar la relación estructura-función de la proteína y proporcionar información para controlar la funcionalidad de las proteínas a través de la manipulación de las condiciones de procesamiento (Harwalkar et al., 1996).

Como complemento de lo anterior, puede emplearse la electroforesis, que es una técnica analítica basada en el principio de separación de proteínas bajo la influencia de un campo eléctrico, migrando al electrodo de carga opuesta al que ella posee. Las proteínas que difieren en su movilidad electroforética, migran en distintas bandas a través del gel (Yada et al., 1996). La carga negativa en exceso proporcionada por el grupo sulfato del SDS, añadida en esta técnica predominará sobre la carga endógena de la proteína. La uniformidad de cargas hace posible que las proteínas se separen por peso molecular más que por su proporción carga-masa (Rickey et al., 1996).

2. ANTECEDENTES

El suero tiene una alta demanda bioquímica de oxígeno, lo que crea un problema cuando es tratado como agua residual, ya que su tratamiento es más costoso. Una fábrica de queso que produzca 60 toneladas de queso por día, descargará cerca de 500 000 litros de suero diario. Esto corresponde a la cantidad de agua descargada por una población de 5 000 habitantes.

Aunque los componentes individuales del suero lácteo (proteínas y lactosa) tienen uso por sí mismos, en ocasiones resulta difícil la disposición o utilización del suero generado, debido a su desfavorablemente alta proporción lactosa-proteína y la alta demanda bioquímica de oxígeno de 30 a 50 g/L y alto contenido de sales (Caric, 1994).

Pueden distinguirse dos tipos de suero, el dulce y el ácido. El suero dulce resulta de la manufactura de productos que principalmente usan enzimas tipo renina a pH cercano a 5.6. El suero ácido es un sub-producto de la manufactura de productos lácteos donde el coágulo se forma por acidificación a un $\text{pH} \leq 5.1$ (Bylund, 1995).

La composición general del suero lácteo se detalla en la tabla 2.1.

Las proteínas del suero comprenden entre el 15 y el 25 % de las proteínas en la leche descremada (Bylund, 1995). Están sujetas a una variación más marcada que la caseína y su composición se afecta particularmente en el estado de lactación. Cuando se desnaturalizan, pierden su solubilidad en la región de pH del punto isoeléctrico (carga neta = 0) o en soluciones de sal y co-precipitan con caseína (Parry, 1974). La composición de las proteínas del suero se describe en la tabla 2.2.

Tabla 2.1. Composición aproximada del suero (%) p/v

Constituyente	Composición (%)
Agua	93.6
Sólidos totales	6.4
Grasa	0.05
Proteína (N x 6.34)	0.55
NPN (Nitrógeno no proteico)	0.18
Lactosa	4.8
Cenizas (Minerales)	0.5
Calcio	0.043
Fósforo	0.040
Sodio	0.050
Potasio	0.160
Cloruros	0.110
Acido láctico	0.050

Adaptado de Bylund, (1995).

Tabla 2.2. Proteínas del suero y sus propiedades.

Proteína	Composición respecto a la Proteína total de la leche (%)*	Peso Molecular, (kDa)	pH del punto isoelectrico, pI
β -lactoglobulina	7 - 12	36	5.3
α -lactoalbúmina	2 - 5	14.4	4.2-4.5
Inmunoglobulinas	1.5 - 2.5	> 300	5.6
Seroalbúminas bovinas	0.7 - 1.3	69	4.7
Proteosomas y peptonas	2 - 6	4.1 - 20	3.3 - 3.7

* El porcentaje restante es caseína (74- 86 %) p/v

Adaptado de Gordon y Kalan, (1974); Swaisgood (1995).

2.1 Proteínas del Lactosuero.

Son compuestos nitrogenados que permanecen en el suero lácteo después de la precipitación de la caseína en su punto isoeléctrico (pH = 4.6). Aproximadamente el 20% de la fracción proteínica del suero es nitrógeno no proteico (De Wit, 1981). Las principales proteínas del lactosuero son: β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina bovina, inmunoglobulinas y proteosas-peptonas (Webb et al., 1970).

2.1.1 β -lactoglobulina.

La β -lactoglobulina es una proteína globular con un peso molecular de 36 kDa que existe como un dímero entre los pH's de 5.2 y 7.2, formado por 2 subunidades idénticas (peso molecular, PM = 18 kDa; 162 residuos) entrecruzadas por puentes disulfuro. Tiene una carga neta negativa al pH de la leche, además, la secuencia de distribución de residuos hidrofóbicos, polares y cargados es más uniforme que en la caseína. Consecuentemente, estas proteínas se pliegan intramolecularmente cubriéndose la mayoría de sus residuos hidrofóbicos (Swaisgood, 1996). El monómero de β -lactoglobulina, tiene un grupo sulfhidrilo libre y 2 enlaces disulfuro (Kilara, 1996). Sus grupos disulfuro (1 SH/mol) contribuyen al 90 % de los grupos SH en la leche. Se cree que la proximidad de los grupos disulfuro y sulfhidrilo hacen a la β -lactoglobulina susceptible a la desnaturalización por calor (Kilara et al., 1996). La estructura secundaria de la forma monomérica es una mezcla de α -hélice, hojas- β y cadenas desordenadas (Gordon et al., 1974). Las interacciones de β -lactoglobulina dependen del pH, y al pH de la leche forma dímeros (Swaisgood, 1996). A pH superior a 8.0 se inducen cambios conformacionales en su molécula, ocurriendo una desnaturalización irreversible y a pH menores a 3.5, se han reportado disociaciones reversibles de las formas heteroméricas. Por otra parte, a valores de pH entre 3.7 y 5.2 esta proteína experimenta tetramerización reversible a temperaturas cercanas a 0°C o en concentraciones elevadas de proteína (Hemley et al., 1979). La β -lactoglobulina es realmente una familia de proteínas consistente de variantes genéticas, la síntesis de las cuales es controlada por un par de genes. De ahí que se han identificado tres variantes: β A, β B y β C (Parry, 1974), en base a su movilidad

electroforética a pH 8.6. La forma A tiene mayor movilidad que la B (Mckenzie, 1971). Los parámetros moleculares de βA y βB se resumen en las tablas 2.3. y 2.4.

El coeficiente de sedimentación (S) es una medida de la proporción de la masa de la proteína y su coeficiente friccional, expresándose en Svedbergs ($1S = 10^{-13} s^{-1}$), el cual se determina de la pendiente de la gráfica del logaritmo natural de la distancia que las moléculas han sedimentado como una función del tiempo (Rhodes y Laue, 1990). Durante el calentamiento ocurren dos reacciones en las dos variantes de β -lactoglobulina, A y B. (Parry, 1974). La termo-desnaturalización de β -lactoglobulina ocurre por calentamiento a $97^{\circ}C$ por 50 min, y tendrá un mayor coeficiente de sedimentación (3.7S) que la proteína nativa (2.6S). La reacción secundaria conduce a la formación de un componente pesado (2.9S) el cual no es estabilizado por las uniones disulfuro. Sin embargo, la ocurrencia de la segunda reacción depende de la reacción primaria (Howell, 1992). Todas las variantes contienen cinco residuos de cisteína, cuatro de los cuales están involucrados en la formación de enlaces disulfuro intracadena.

Estudios de sedimentación y dispersión de luz (Townend, 1957; Townend, 1960; Timasheff, 1961) han mostrado que βA y βB a $pH < 3.5$ se disocian progresivamente en 2 subunidades idénticas de PM cercano a 18 kDa. Esta disociación es reversible y rápidamente re-equilibrada.

Por otro lado, cuando se preparan soluciones de β -lactoglobulina en el intervalo de pH de 3.7 a 5.1 a temperatura ambiente, las especies de PM 36 kDa entran en un rápido equilibrio reversible para formar un tetrámero de PM 144 kDa. La tetramerización es máxima a pH 4.65 y la extensión de la reacción se incrementa al disminuir la temperatura de la solución.

Cuando a $5.1 \leq pH \leq 6.5$, la β -lactoglobulina parece existir en el estado isoeléctrico molecular (PM 36 kDa; Timasheff, 1964).

Tabla 2.3. Parámetros moleculares de β -lactoglobulina
(fracciones A y B)

pH del punto isoeléctrico	5.1 – 5.3
Peso molecular	36 kDa
Hidratación	35 – 40 % p/p
Proporción axial (elipsoide)	2 : 1
Radio de giro	2.17 nm

Adaptado de (Townend, 1961)

Tabla 2. 4. Sustituciones aminoácidas en las β -lactoglobulinas.

Sustitución	β A	β B
Sustitución polar	Asp-64*	Gly
Sustitución no polar	Val-118*	Ala

* posición del residuo

Adaptado de Timasheff, 1964.

2.1.2 α -lactoalbúmina.

Es la segunda proteína más abundante del suero lácteo (tabla 2.2). Tiene un peso molecular de 14.4 kDa (Swaisgood, 1985). Tiene cuatro enlaces disulfuro intracadena, impartándole resistencia a la desnaturalización térmica. Sin embargo, el calor puede inducir reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro entre β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, incrementando de esta forma la sensibilidad térmica en la leche (De Wit, 1981). Tiene un punto isoeléctrico a pH de 4.2 - 4.5 (Swaisgood, 1985), existe como un monómero a este pH y la molécula es casi esférica (Shukla, 1972). En el intervalo de pH de 4.0 a 5.5 es insoluble y a pH por debajo de 4.0 y mayores a 5.5 existe como un polímero. Se han reportado cambios conformacionales por debajo de 5.1 que conducen a una exposición del dominio hidrofóbico de la molécula de proteína, ocasionando interacciones proteína-proteína y la interacción de ésta en la superficie de lípidos en aplicaciones de emulsificación (Yamauchi et al., 1980). La naturaleza del ambiente iónico parece tener un fuerte efecto sobre las propiedades de interacción de esta proteína (Farrell et al., 1974). Por debajo del punto isoeléctrico se presenta una complicada serie de reacciones consecutivas de polimerización, tiempo-temperatura dependientes. El grado de agregación disminuye con una disminución del pH, indicando la participación de fenómenos inespecíficos de repulsión electrostática a estos valores de pH.

Por encima del punto isoeléctrico, se observa una agregación más débil. Esto no es precedido por una transformación conformacional, lo que significa que las superficies reactivas están presentes en la estructura nativa a estos valores de pH ($>pH_i$). Contrariamente a la agregación ácida, esta reacción es independiente de la temperatura y de las especies iónicas presentes en solución. A $pH > 8.55$, la asociación es escasamente detectable. Con las uniones disulfuro intactas, como ocurre en la leche, la estructura terciaria de la α -lactoalbúmina se pliega y despliega reversiblemente, aunque se desnaturaliza a temperaturas menores que la β -lactoglobulina, la transición es reversible excepto a muy altas temperaturas, así que, a diferencia de la β -lactoglobulina, esta proteína no se desnaturaliza térmicamente de modo irreversible bajo la mayoría de las condiciones de procesamiento de la leche (Swaisgood, 1996).

Un análisis elemental de la proteína mostró que el fósforo está ausente, pero es rica en triptofano (Mckenzie, 1971). Deriva probablemente del mismo gen que la lisozima del huevo, ya que tiene una secuencia de aminoácidos que parece ser idéntica a aquella de la lisozima, aunque aparentemente su estructura tridimensional es completamente diferente (Regenstein et al., 1984).

Finalmente, la α -lactoalbúmina puede describirse como una proteína que sufre varias interacciones inter- e intra-moleculares. Cuando el $\text{pH} > \text{pI}$ existen asociaciones intermoleculares débiles, involucrando la estructura nativa de la molécula, mientras que cuando el $\text{pH} < \text{pI}$, se crea una nueva superficie reactiva, originada por una transición conformacional, que involucra una asociación reversible débil, seguida de una polimerización lenta de manera extensiva (Parry, 1974).

2.1.3 Seroalbúmina bovina.

Representa el 1 % de las proteínas totales y el 6 % de las proteínas del suero (Mckenzie, 1971). Es una proteína hidrosoluble, derivada de la sangre. Representa 0.7 – 1.3% de las proteínas séricas en la leche, tiene un peso molecular de 69 kDa y un punto isoeléctrico entre 4.7 y 4.8 (De Wit, 1981).

2.1.4 Inmunoglobulinas bovinas.

Son una serie de glucoproteínas que tienen la habilidad de ligar a otras moléculas con un alto grado de especificidad (Horowitz y Pigman, 1977). Representan en la leche el 1.9-3.3% del total de proteínas y son derivadas del suero sanguíneo (De Wit, 1981). Son heterogéneas con respecto al tamaño, carga, funciones y antigenicidad (Horowitz y Pigman, 1977).

2.1.5 Proteosas-peptonas.

Se definen como una mezcla de fosfogluco proteínas que son termoestables a 95°C por 20 minutos a pH de 4.7 y precipitan en 12% de ácido tricloroacético (Whitney et al., 1976). Estas proteínas comprenden el 2-6% del total de proteínas en la leche descremada. El peso molecular monomérico de una de ellas se ha reportado como 22,000, pero esta proteína existe regularmente como un dímero con un peso

molecular de 40,800 y un punto isoeléctrico de 3.7 (Whitney et al., 1976). El peso molecular promedio es 14,300, conteniendo entre 2 y 4 % de carbohidratos. (De Wit, 1981).

2.1.6 Otras proteínas del suero.

a. Lactoferrina.

La lactoferrina o proteína roja tiene la capacidad única de unir fierro a pH alcalino, produciendo un complejo rojo salmón en solución (Jimenez-Flores et al., 1996). Primero se reconoció esta capacidad de unión en la conalbúmina (componente de la clara de huevo; Farrell et al., 1974). La proteína roja de leche de vaca está distribuida entre la caseína, el suero y aparentemente en las fracciones de grasa de la leche. Esta distribución es probablemente una consecuencia de su habilidad para formar complejos los cuales, en algunos casos son suficientemente fuertes como para cambiar su conducta cromatográfica. Se ha calculado un peso molecular de 86 kD para lactoferrina y un volumen parcial específico de 0.725 ml/g (Parry, 1974).

b. Transferrina.

Está presente en pequeñas cantidades, y parece ser idéntica a la transferrina sérica sanguínea. Aparentemente está presente en calostro (Parry, 1974)

c. Lactolina.

Tiene un peso molecular de 43 kDa \pm 5 kDa y un punto isoeléctrico de 7.1. Presenta una ocurrencia simultánea de fenómenos de agregación-disgregación independientes de la temperatura y concentración de la proteína, que es irreversible (Timasheff, 1964). La lactolina no tiene metionina y tiene sólo pequeñas cantidades de alanina y cistina. Un ejemplo de polimerización lenta e irreversible se encuentra en ésta proteína, la cual ha sido aislada y caracterizada por Groves et al., (1963).

2.2 Efecto de la temperatura sobre las proteínas del suero.

La β -lactoglobulina representa cerca del 50 % de las proteínas del suero y es muy termosensible. Su desnaturalización comienza a 65°C y es casi total cuando el suero lácteo es calentado a 90°C por 5 minutos (Bylund, 1995).

Cuando el suero se calienta suficientemente, una porción de las proteínas del suero se desnaturaliza o precipita. Este precipitado, después de recuperado, lavado y secado, ha sido tradicionalmente conocido como "requesón". El producto una vez deshidratado, es un polvo insoluble en agua, con un color de canela a blanco, un contenido de proteína entre 60 y 95%, y un alto contenido en cenizas. Tiene un valor nutricional superior a la caseína pero su uso se ha limitado por su insolubilidad, textura granulosa y en algunos casos por su color (Robinson et al., 1976).

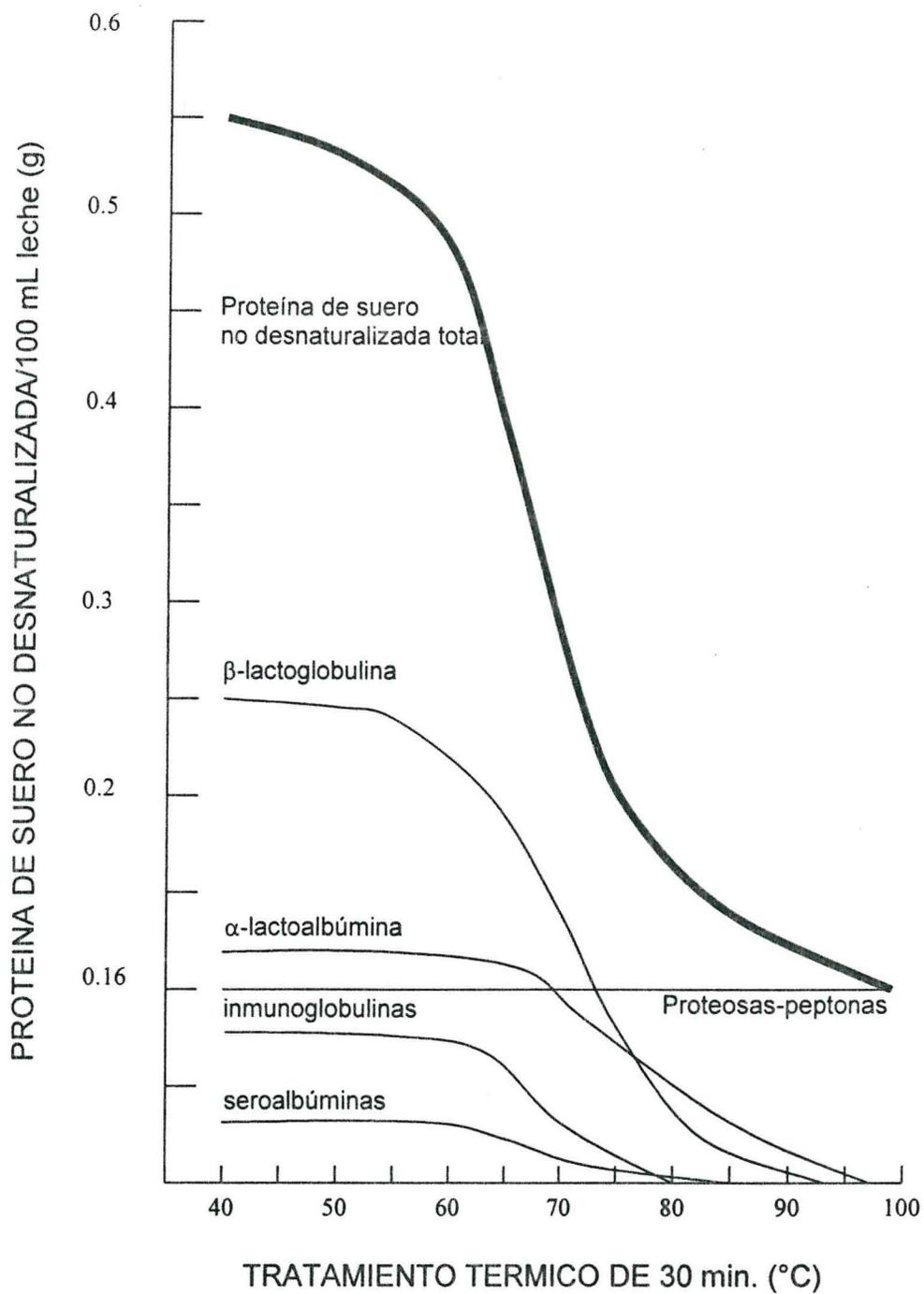
Parry (1974), identificó dos estados de desnaturalización. El primero involucra un cambio en la estructura cuaternaria de la proteína; mientras que el segundo involucra el proceso de agregación, seguido por coagulación. Estos tipos de desnaturalización ocurren no sólo por la acción del calor, sino por la acción de solutos orgánicos, tales como urea, cloruro de guanidinio, detergentes, etc. La desnaturalización por calor parece involucrar menor desdoblamiento que cuando se usa urea o cloruro de guanidinio. Al calentar la proteína a 65°C se forma un agregado de 5.6 S (comparado con 3.1 S del dímero nativo), aunque cerca de 75°C la velocidad de agregación se detiene, llegando a ser insignificante a 99°C. Puede no formarse el agregado, si la proteína fue expuesta primeramente a una temperatura de desnaturalización produciendo solamente un cambio en la estructura cuaternaria (Mckenzie, 1971).

2.3 Estudio térmico de las proteínas.

Los tratamientos térmicos son de gran importancia en la producción, concentración y procesamiento de proteínas en ciencia y tecnología de alimentos ya que pueden afectar sus propiedades funcionales (De Wit, 1998).

Durante los procesos de calentamiento, pueden ocurrir numerosas reacciones que influyen en las propiedades nutritivas y funcionales de la leche y productos subsecuentes. La ocurrencia y el grado de avance de esas reacciones dependen de las condiciones de calentamiento (temperatura y duración del tratamiento), así como de factores tales como composición del sistema, concentración y pH. Un grupo particularmente importante de reacciones es la desnaturalización térmica de las

Figura 2.1. Efecto del calentamiento por 30 minutos a diferentes temperaturas en las proteínas del suero (Parry, 1974).



proteínas del lactosuero. Las proteínas globulares como las del lactosuero, conservan su conformación sólo dentro de intervalos de pH y temperatura limitados (sección 2.1). La exposición de estas proteínas a extremos de temperatura y pH resultan en su desnaturalización, definida como un cambio considerable en la conformación nativa, en la cual la estructura tridimensional (terciaria) de las cadenas polipeptídicas adquiere un menor grado de ordenamiento. La conformación desplegada expone cadenas de residuos de aminoácidos que están normalmente dentro de la estructura nativa, ocasionándose un aumento en la reactividad de tales grupos, como es el caso del grupo tiol de la cisteína, la cual puede estar involucrada en reacciones de intercambio de grupos disulfuro. Sin embargo, una proteína desplegada, también es más susceptible a interacciones proteína-proteína vía unión con calcio y uniones hidrofóbicas (Anema y Mckenna, 1996).

El uso de análisis térmico, y en particular de DSC para monitorear cambios conformacionales de un sistema proteico durante el calentamiento, proporciona una técnica para el seguimiento de la desnaturalización térmica. El análisis de los termogramas proporciona la curva de estabilidad térmica de la proteína, la existencia de desnaturalización, y la temperatura a la cual ocurre la transición (Harwalkar et al., 1996). En el caso de las proteínas, este término comúnmente se refiere a la temperatura de desnaturalización y se puede definir de un gran número de formas. La temperatura usualmente especificada es la que corresponde al pico máximo que se denota como: T_d , T_m , T_D ó T_{max} . Esta medida particular de la desnaturalización tiene la desventaja de depender de la concentración (Moreno, 1999).

En varios alimentos y materiales biológicos, los sólidos están en un estado amorfo metaestable el cual es muy sensible a cambios en temperatura y contenido de humedad. Usualmente el estado amorfo es el resultado de una remoción rápida de agua por secado o congelación. Este es el caso de la lactosa, que es un azúcar que se encuentra en estado amorfo en el suero, cuando éste es liofilizado. La matriz amorfa puede existir como vítreo viscosa o como una estructura más líquida "cauchosa". El cambio de estado vítreo al estado cauchoso ocurre a la temperatura de transición vítrea (T_g), la cual es específica para cada material; sin embargo, plastificantes como el agua disminuyen el valor de T_g hasta valores cercanos a la temperatura ambiente. Por encima de T_g , la movilidad molecular se incrementa

grandemente y muchos compuestos amorfos cristalizan. La cristalización en alimentos sólidos puede por tanto ocurrir, ya sea por aumento de la temperatura o de la humedad. La velocidad de cristalización depende de la composición de la matriz amorfa. Transiciones térmicas típicas que caracterizan a materiales amorfos cristalizables son la transición vítrea, cristalización y fusión (Roos y Karel, 1991).

2.4 Procesos usados en la producción de Concentrado Proteico de Suero (CPS).

En las últimas décadas, están disponibles en la industria cinco procesos para producción de concentrados proteicos de suero (Grindstaff, 1974): Coagulación por calor, filtración en gel, electrodiálisis, precipitación con polifosfatos y ultrafiltración (Delaney y Donnelly, 1975).

Estos procesos pueden ser utilizados individualmente o en secuencia para remover materiales de bajo peso molecular de las proteínas del suero. Aquí sólo se discutirán aquellos procesos que se manejarán prácticamente: ultrafiltración y electrodiálisis.

2.4.1 Tratamiento del suero antes del procesamiento.

Para obtener un producto de uniformidad aceptable y estabilidad en almacenamiento, el suero debe ser pre-tratado con las operaciones que se detallan a continuación (Zadow, 1992).

a. Clarificación y Descremado.

Las partículas finas de cuajada confieren un serio riesgo de bloquear los canales de los intercambiadores de calor, o dañar las membranas de ultrafiltración. Además, pueden afectar negativamente las propiedades de solubilidad y sabor del producto final. La clarificación de suero es usualmente una combinación de sedimentación, filtración y centrifugación.

La eliminación de la materia grasa del suero se efectúa por razones económicas y de estabilidad del sabor en almacenamiento. Puede usarse un separador centrífugo, o bien en otras ocasiones el separador puede servir para clarificar el suero o actuar

como un segundo clarificador. Sin embargo, en la práctica, un contenido de 0.06% de grasa es inevitable en sueros de queso, a menos que se utilice un proceso adicional.

b. Pasteurización.

Para suero dulce, proveniente de queso o manufactura de caseína, es esencial pasteurizar el suero inmediatamente, para asegurar una calidad microbiológica óptima y estabilidad en almacenamiento. La combinación tiempo-temperatura debe estar en el intervalo de 72-75°C por 15 a 20 seg. para asegurar la reducción apropiada de cuenta viable y para inactivar las enzimas fosfatasa alcalina y quimosina (Kjaergaard y Oxlund, 1988), pero en la práctica se emplean temperaturas más elevadas (cerca de 78°C) para minimizar el riesgo de contaminación por bacteriófagos de la industria del queso (Pearce, 1992).

2.5 Procesos de membrana.

Los procesos que emplean membranas para lograr una separación se pueden caracterizar en forma general en base a (Mc Gregor, 1986):

- ◆ La fuerza impulsora del proceso.
- ◆ El tipo de membrana que emplean.
- ◆ El intervalo de tamaño de partícula que retienen sus membranas.

De acuerdo al tipo de fuerza impulsora los principales procesos de membrana se pueden clasificar de la siguiente forma (Tejeda et al., 1995):

- Gradiente de presión.
 - Ultrafiltración (UF).
 - Microfiltración (MF).
 - Ósmosis inversa (OI).
- Gradiente de potencial químico
 - Diálisis (D)
- Gradiente de voltaje
 - Electrodialisis (ED)

Dependiendo del proceso seleccionado, se puede purificar o fraccionar moléculas tales como proteínas en solución, usando ultrafiltración (UF), eliminar sales usando nanofiltración o electrodiálisis (ED) y concentrar usando ósmosis inversa. La UF es probablemente el proceso de membrana de mayor aplicación en la industria de alimentos y ha encontrado amplia aceptación por: a) avances en la ciencia de materiales de membranas, lo cual ha resultado en mejores membranas, más resistentes a los procedimientos de sanitización y limpieza usados en la industria; b) mejoramiento del diseño del equipo; c) incremento generalizado en la industria de alimentos acerca de la ciencia y tecnología de membranas (Tejeda et al., 1995).

2.5.1 Características de las membranas.

Una membrana se define como una barrera selectiva entre dos fases, el término "selectiva" resulta inherente a una membrana o a un proceso. Esta es una definición macroscópica, mientras que la separación debe considerarse a nivel microscópico. Una membrana puede ser delgada o gruesa, natural ó sintética, su estructura puede ser homogénea o heterogénea, el transporte puede ser activo o pasivo, el transporte pasivo puede ser conducido por una diferencia en presión, concentración o temperatura, puede ser cargada o neutra. Las membranas sintéticas pueden a su vez dividirse en membranas orgánicas (poliméricas o líquidas) e inorgánicas. Si nos limitamos a membranas sintéticas (sólidas), pueden distinguirse en cuanto a su estructura dos tipos: simétricas y asimétricas. El espesor de las membranas simétricas (porosas o no porosas) varía en un intervalo de 10 a 200 μm , la resistencia a la transferencia de masa es determinada por el espesor total de la membrana. Un menor espesor de la membrana resulta en un incremento en la velocidad de filtración (Mulder, 1991).

La tabla 2.5. muestra los materiales usados para membranas de ultrafiltración y la 2.6 el tamaño molecular aproximado de los constituyentes del suero.

Los materiales usados en la fabricación de membranas son derivados de polímeros naturales como la celulosa o de polímeros sintéticos. Recientemente se han desarrollado membranas de materiales cerámicos y metálicos (Tejeda et al., 1995; tabla 2.7).

Tabla 2.5. Polímeros para membranas de ultrafiltración

Polisulfonas/poli (éter sulfona)

Poliacrilonitrilo

Ésteres de celulosa

poliamida/poli(éter imida)

poliamida (alifática)

poli (fluoruro de vinilideno)

Adaptado de Mulder, 1991.

Tabla 2.6. Tamaño Molecular Aproximado de varios constituyentes del suero.

SUSTANCIA	MASA MOLECULAR RELATIVA (g/mol)	DIAMETRO (nm)
Agua	18.0	0.3
Ion cloro	35.4	0.4
Ion calcio	40.0	0.4
Lactosa	342	0.8
α -lactoalbúmina	14 500	3
β -lactoglobulina	36 000	4
Seroalbúmina sanguínea	69 000	5

Adaptado de Kessler, 1981.

Tabla 2.7. Características típicas de las membranas.

MATERIALES	MF	UF	OI	D	pH	T _{max}
Acetato de celulosa	X	X	X	X	3-10	75
Poliamida	X	X	X		2-12	-
Polisulfona	X	X	X		1-14	130
Politetrafluoruro	X				1-14	140
Etileno						
Polipropileno	X				1-14	130
Cerámica	X				1-13	140
Poliéster	X	X			-	150
Estructura	Asimétrica Simétrica	Asimétrica	Asimétrica	Simétrica		
% de Porosidad Superficial	30-70	1-10	-	10-20		
Tamaño del Poro	0.1-1 µm	1-20nm	-	0.3- 3 nm		

Adaptada de Brocklebank, 1990.

MF = Microfiltración

UF = Ultrafiltración

OI = Osmosis inversa

D = Diafiltración

T_{max} = Temperatura máxima (°C)

2.6 Polarización y ensuciamiento de la membrana.

Durante una separación, el funcionamiento del sistema puede cambiar mucho con el tiempo y frecuentemente puede observarse un comportamiento típico flux-tiempo: el flux (velocidad de flujo de filtrado por unidad de área) a través de la membrana disminuye con el tiempo. Este comportamiento se muestra esquemáticamente en la figura 2.2 y se debe principalmente a la polarización de la concentración, adsorción, formación de una capa de gel y al ensuciamiento.

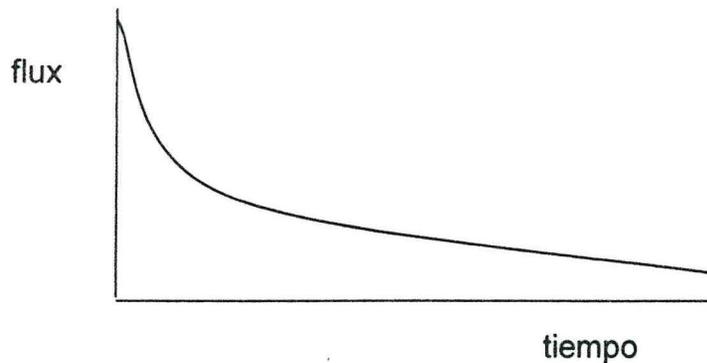


Figura 2.2. Comportamiento del flujo como una función del tiempo.

La polarización de la concentración es causada por una acumulación de moléculas en la superficie de la membrana. Se forma una capa como gel y actúa como una segunda capa de ultrafiltración disminuyendo la velocidad del flux y evitando el paso de algunas moléculas que pasarían normalmente a través de la membrana. Esto podría ser evitado por agitación o por flujo cruzado o tangencial.

El ensuciamiento de la membrana es causado por partículas o macromoléculas que se adsorben en la membrana o se embeben físicamente en los poros. Una vez que la membrana se ha ensuciado, la limpieza normalmente no regresará a las velocidades de flux originales, pero sí removerá la capa causada por la polarización de la concentración. Un camino sencillo para distinguir si la disminución del flux es causada por polarización de la concentración o por ensuciamiento es la observación del efecto del incremento del flujo tangencial sobre el flux. Si al incrementar el flujo tangencial se incrementa el flux, entonces la polarización de la concentración fue el problema; si al incrementar el flujo tangencial se disminuye el flux, entonces fue ensuciamiento de la membrana (Harris, 1995).

2.7 Ultrafiltración.

Es un proceso conducido a presión en el cual una membrana porosa es usada para separar los componentes de una mezcla sólido-líquido sobre la base de forma y tamaño y en algunos casos, carga (Hobman, 1992). En esta operación se emplean membranas especiales en diferentes tipos de arreglos para separar las macromoléculas en solución de contaminantes más pequeños (Tejeda et al., 1995). El límite más bajo de separación es para solutos con peso molecular de unos pocos miles de Daltones. Un intervalo de solutos con pesos moleculares que se extienden de unos pocos cientos a cerca de miles de Daltones pueden tratarse con nanofiltración que es un proceso entre ultrafiltración e hiperfiltración (ósmosis inversa, figura 2.3).

Para la ultrafiltración, más que el tamaño de poro, es común hacer referencia al peso molecular de corte nominal (NMWC; kDa; g/mol x 1000), el cual se refiere al mínimo peso molecular de una molécula globular que no pasa a través de la membrana. La forma de la molécula afectará el paso a través de los poros; así, mientras una proteína globular no pasa a través de una membrana de 100 kDa, las moléculas lineales de 1 000 kDa pueden pasar bajo ciertas condiciones (Harris, 1995).

La concentración por ultrafiltración tiene ventajas sobre otros métodos alternativos como lo son:

1. La precipitación de la proteína seguida por la centrifugación que requiere una concentración mínima de 100 mg/L y frecuentemente resulta en una recuperación pobre debida al cambio de fase.
2. La concentración por diálisis requiere mayor tiempo de proceso y los volúmenes están limitados por la dificultad de manejo.
3. El secado por congelación requiere de tiempos más largos de proceso y pueden dar como resultado baja recuperación debido al cambio de fase, además, al concentrar a la proteína, también se concentran las sales.

La teoría de ultrafiltración está orientada a tratar de predecir el flux en un sistema dado en función de los parámetros de operación como son: presión, temperatura, concentración de la solución y flujo cruzado o tangencial (la solución alimentadora corre paralelamente a la superficie de la membrana y el permeado fluye perpendicularmente a la membrana de filtración debido a que la solución

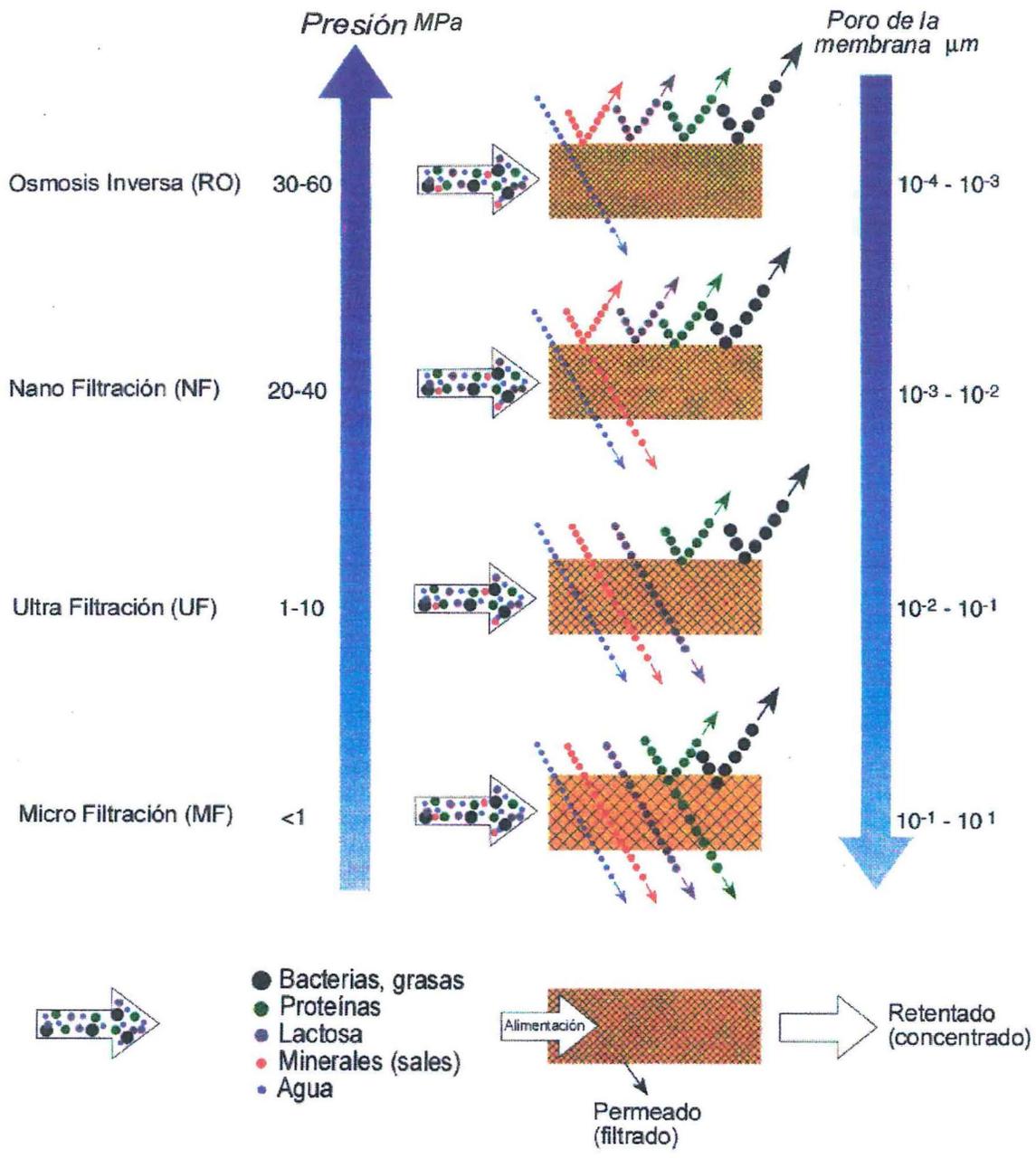


Figura 2.3 Principios de Filtración por membranas (Bylund, 1995).

alimentadora es forzada a través de la membrana bajo presión). La teoría de la ultrafiltración es de aplicación limitada, pero útil en la interpretación y extrapolación de los datos experimentales, sirviendo como guía para la operación de los equipos.

El principal parámetro de diseño de un sistema de UF para concentrar una solución es el área necesaria para lograr una concentración determinada en un tiempo dado, bajo limitaciones de rangos de presión y temperatura tolerados por los equipos y las proteínas. La predicción del flux o la interpretación correcta de las mediciones experimentales de éste, se enfocan a resolver este problema de diseño.

El flux que pasa a través de la membrana es el que requiere de optimización, dado que a flux mayores los tiempos de proceso se hacen menores. El flux es inversamente proporcional a la resistencia al paso de las moléculas a través de la membrana. Esta resistencia es la suma de tres factores: la resistencia de la membrana, y la resistencia causada por la polarización de la concentración y el ensuciamiento.

La resistencia de la membrana se minimiza por el aumento en el tamaño de poro, ya que se recomienda utilizar el tamaño máximo de poro que no permita el paso de la proteína de interés; también se minimiza la resistencia al aumentar la densidad de poro, la cual varía según el fabricante y frecuentemente con el lote, manteniendo un grosor mínimo de la membrana, ya que la mayoría de las membranas de ultrafiltración son asimétricas. La viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura y directamente proporcional a la concentración de solutos (Tejeda et al., 1995).

2.7.1 Módulos de Ultrafiltración.

Los módulos utilizados en los equipos de separación con membrana presentan diferente geometría que se pueden dividir en dos tipos básicos: de hoja plana y circulares (Tejeda et al., 1995).

- a. Módulos de Hoja Plana.- Son muy similares a los filtros convencionales de marcos y placas; su principal ventaja es su versatilidad. Este tipo de módulos puede trabajar a presiones mayores que los otros tipos, por lo que son empleados para manejar soluciones viscosas. Los filtros de hoja plana pueden ser desmontados para su limpieza y permiten restituir hojas defectuosas. Una

desventaja es que su área por unidad de volumen es menor en relación a los otros tipos de módulos y producen un flux moderado (figura 2.4).

- b. Módulos de hoja enrollada en espiral.- Utilizan un diseño de membranas con espaciadores tipo malla separando la membrana. Este tipo de arreglo produce un flux mayor que los de hoja plana debido a que presenta una mayor área por unidad de volumen. Son más difíciles de limpiar y frecuentemente debe descartarse toda la unidad aún cuando sólo parte del módulo esté dañado.
- c. Módulos de Tubos y Coraza.- Presentan una geometría similar a los intercambiadores de calor de tubos con varios tubos unidos en sus extremos a un cabezal común. Normalmente la alimentación fluye a presión a través del cabezal de entrada por el interior de los tubos, de tal manera que el permeado se colecta en la parte externa de los tubos a través de la coraza y el retentado sale por el extremo opuesto de los tubos a través del cabezal de salida. El diámetro de los tubos varía entre 0.6 y 2.5 cm. Los tubos son de polímeros o cerámica, lo que les confiere una alta resistencia mecánica y térmica. Son recomendables para procesar materiales viscosos y para la obtención de concentraciones celulares elevadas (Tejeda et al., 1995).
- d. Módulos de Tubo de Fibra Hueca.- Son parecidos a los de tubo y coraza convencionales, pero los diámetros de los tubos son muy pequeños: de 0.02 a 0.11 cm. Entre más pequeño sea el diámetro interno, menor es su capacidad de manejo de sólidos. Las fibras grandes (0.11 cm de diámetro) son especialmente útiles para separar células así como para el manejo de materiales viscosos. Este tipo de módulos es probablemente el más empleado tanto en MF como en UF, sin embargo presentan algunas limitaciones en cuanto a su rango de operación (presión y temperatura), así como en su dificultad de esterilización (Tejeda et al., 1995).

En el caso del procesamiento del suero a gran escala, debe optimizarse el flux. Además, debe minimizarse la desnaturalización y la pérdida de proteína. Los factores a considerar durante la optimización pueden minimizarse por consideraciones teóricas cuidadosas, pero la optimización final debe ser determinada por estudios experimentales. Los factores a considerar en un proceso de optimización son:

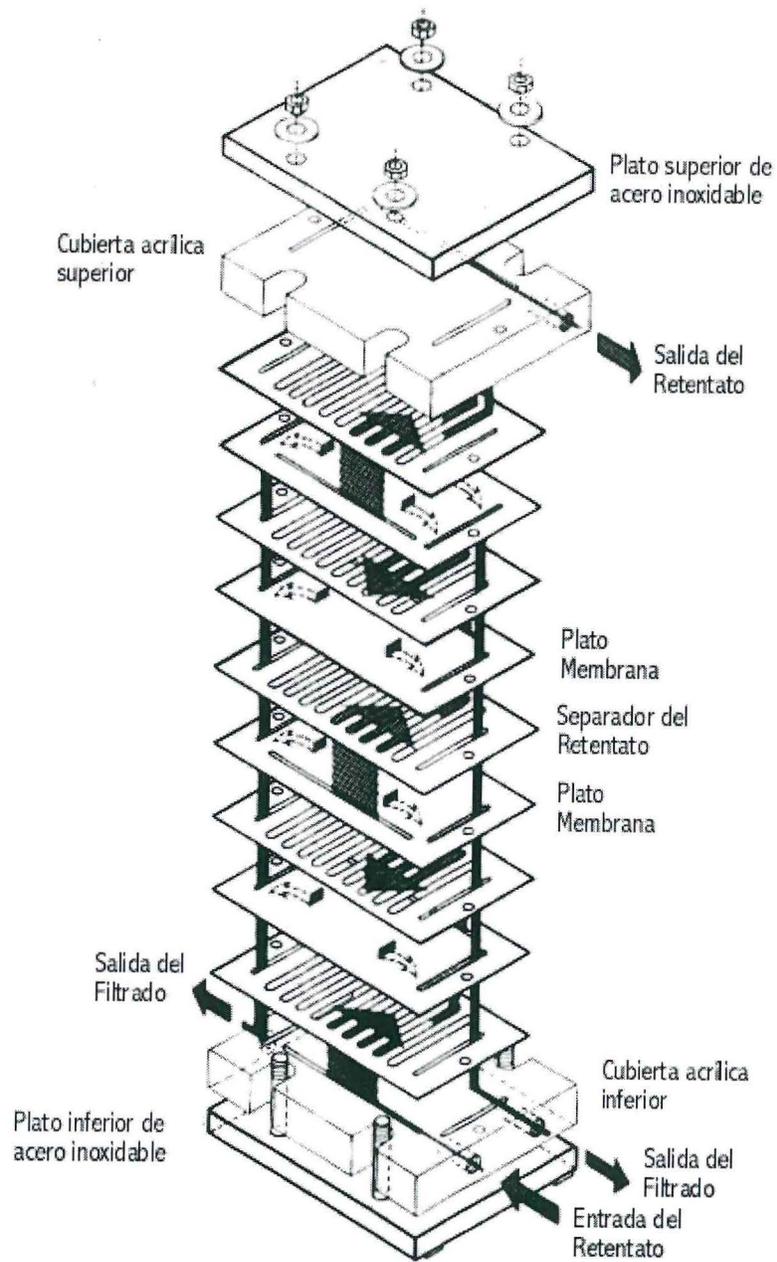


Figura 2.4. Sistema Minitan de ultrafiltración que ejemplifica al Módulo de Hoja Plana (Harris, 1989).

La máxima presión transmembrana dará un flux máximo, pero por encima del límite de la polarización por concentración limitará el flux y se aumentará el ensuciado de la membrana.

El flujo tangencial máximo minimiza la polarización de la concentración y el ensuciamiento pero puede ser la causa de desnaturalización de la proteína por esfuerzos cortantes (fricción) e incrementará el costo de bombeo. La viscosidad puede disminuirse al aumentar la temperatura, sin embargo, la mayoría de las proteínas se desnaturalizan por calor, por lo que en la práctica se tiene un límite de 40°C aproximadamente, aunque se han reportado valores mayores de temperatura. La concentración de la proteína aumentará la viscosidad, lo que disminuirá el flux (Hobman, 1992). Frecuentemente se adicionan antiespumantes que pueden aumentar la polarización de la concentración. El pH y la fuerza iónica también pueden tener efecto sobre el flux, por ejemplo, el amortiguador elegido debe minimizar la precipitación de alguno de los componentes de la muestra para evitar el ensuciamiento de la membrana. El pH no debe ser cercano o igual al punto isoeléctrico de la proteína, dado que el flux será mínimo. La fuerza iónica puede afectar la agregación de la proteína y puede entonces afectar las características observadas de uso.

Para seleccionar una membrana apropiada el flux debe medirse experimentalmente para cada aplicación. El valor experimental observado de NMWC puede diferir significativamente del valor nominal, mientras que la susceptibilidad al ensuciamiento también varía con el tipo de membrana y el proveedor. El grado de adsorción no específico de la proteína a la membrana varía con el tipo de membrana, de proteína a proteína, con las condiciones del amortiguador y concentración de la proteína. Una mayor área de la membrana incrementará el flux, pero también el costo, volumen retenido, consumo de energía y pérdida de proteína (Harris, 1995).

2.8. Electrodialisis.

La electrodialisis es un proceso electroquímico que permite modificar la concentración iónica de una solución (Weber, 1972); se basa en el uso de una celda compartamentalizada por medio de membranas selectivas al paso de cationes o aniones, aprovechando el campo eléctrico que se establece al aplicar una corriente o

una diferencia de potencial entre los electrodos que constituyen la celda. Moléculas sin carga no son afectadas por esta fuerza conductora y componentes cargados pueden ser separados de sus contrapartes no cargadas. Las membranas eléctricamente cargadas son usadas para controlar la migración de los iones, tales membranas son eléctricamente conductoras. Se distinguen dos tipos de membranas: membranas de intercambio catiónico, las cuales permiten el paso de cationes positivamente cargados y membranas de intercambio aniónico, que permiten el paso de aniones cargados negativamente (Mulder, 1991).

2.8.1 Aplicaciones de la electrodiálisis.

Las aplicaciones de la electrodiálisis dependen del tipo, número y disposición de las membranas utilizadas y, en general, pueden clasificarse en tres grupos según el objetivo perseguido: a) el electrolito, extraído y concentrado por electrodiálisis constituye el producto de interés, b) el producto no extraído tiene valor comercial al eliminarse los electrolitos que contiene o que lo contaminan, c) la solución desionizada y el electrolito extraído son productos de interés comercial.

Uno de los primeros usos de la electrodiálisis fuera del laboratorio ha sido la desmineralización del agua de mar, así como la producción de sal (Leitz y Eisenmann, 1981)

En la industria de los alimentos puede mencionarse: la purificación de soluciones de caña de azúcar, la desacidificación de jugos de frutas, la estabilización de vinos (Ben y Vladan, 1989), así como desmineralización de materiales como agar, gelatina, polisacáridos, proteína, celulosa y albúmina, entre otros. También se ha investigado el uso de la electrodiálisis en la separación del almidón en sus cadenas lineales (amilosa) y ramificadas (amilopectina); en la purificación de coloides; en la separación de aminoácidos en sus grupos ácidos, básicos o neutros; en la eliminación de cenizas de pulpa de madera para su conversión en papel aislante, el cual es utilizado para recubrir cables eléctricos, además de su aplicación en el tratamiento de efluentes (Leitz y Eisenmann, 1981).

En el ramo de la industria lechera, puede mencionarse la aplicación de la electrodiálisis en el tratamiento de subproductos provenientes de diversas operaciones de fabricación; de ellos, destacan el lactosuero, ya que su

desmineralización aumenta sus posibilidades de utilización comercial (Zadow 1992). Otra aplicación de la electrodiálisis es la desmineralización de la lactosa, que al año representa más de 150 000 tons de producto con una capacidad instalada de más de 35 000 m² de área de membranas.

Otra aplicación importante es la desmineralización de suero lácteo, del cual la mayoría de los minerales son removidos para emplearse como ingrediente en la elaboración de fórmulas para infantes. Este ingrediente representa una porción significativa del total de sólidos contenidos en este tipo de alimento. Para este uso, se remueven entre un 85 y un 95% de los minerales del suero. La producción mundial de suero desmineralizado se estima en 150 000 toneladas métricas (330 millones de libras) de suero bajo en minerales (base seca) por año. La remoción de minerales por electrodiálisis puede realizarse en operación por batch o en proceso continuo con reciclaje etapa por etapa. Sin embargo, durante ciertos periodos relativos a las variaciones estacionales en el suministro de leche, o en el procesamiento de ciertos tipos de suero, el proceso de electrodiálisis es más prolongado en tiempo por la dificultad de remoción de cantidades suficientes de ciertos iones minerales divalentes, especialmente calcio, magnesio y fosfatos que en porcentajes significativos están presentes en forma no iónica. Se encuentran unidos formando complejos con la proteína y no entran fácilmente en solución como iones libres, disponibles para ser removidos por electrodiálisis. Es debido a este fenómeno que la electrodiálisis exhibe selectividad substancial para la remoción relativa de iones monovalentes durante los estados iniciales de desmineralización de leche y sus subproductos (Batchelder, 1993).

La producción de agua ultra pura por la utilización de la electrodiálisis, comercializada en la actualidad por Millipore; la disociación electrodiálítica del agua, que produce ácidos y bases a partir de sales, son más ejemplos de los usos actuales de la electrodiálisis (Strathmann, 1988).

2.8.2 Módulo de electrodiálisis.

El módulo básico de electrodiálisis es hecho de varias membranas aniónicas y catiónicas alternantes, llamadas "pares de celdas", hasta formar un módulo adecuado a los requerimientos (Figura 2.5). Las membranas están separadas por

espaciadores para crear el canal de flujo requerido entre ellas y para soportar las membranas. Al final del módulo hay dos electrodos que crean la fuerza conductora sobre el módulo. Un módulo puede operar tanto en posición horizontal como vertical.

El suero se alimenta alternando en los canales de flujo y los canales remanentes, siendo alimentados con salmuera diluida que actúa como receptor de los iones que han sido removidos. El medio para separar los iones es generalmente una solución diluida de ácido clorhídrico. Esta solución es continuamente sustituida para prevenir acumulación de altas concentraciones de iones, llevado a altas presiones osmóticas. Los espaciadores, crean el canal de flujo y son también promotores de turbulencia.

2.8.3 Leyes de Faraday y Ohm.

La ley de Faraday es la base para la determinación de la cantidad de corriente eléctrica necesaria en un proceso de electrodiálisis para transferir una cantidad específica de minerales. Establece que el paso de 96 500 C por 1 s transferirá un equivalente de sal. En una solución de cloruro de sodio, 1 Faradio transferirá 1 equivalente-gramo de iones sodio al cátodo y 1 equivalente-gramo de iones cloruro al ánodo a un 100 % de eficiencia de corriente.

El cálculo de la corriente eléctrica necesaria para la transferencia de iones está dada por la ecuación (1):

$$I = \frac{F^* \cdot F_d \cdot \Delta N}{e \cdot N^*} \quad (1)$$

donde:

I = corriente eléctrica, (A)

F* = constante de Faraday = 96500 Coulombios

F_d = Flujo volumétrico a través del compartimiento diluido, (L/s)

ΔN = diferencia en Normalidad del compartimiento desmineralizado entre la entrada y la salida de la membrana

e = eficiencia de corriente eléctrica

N* = Número de pares de celdas

Los equivalentes-gramo transferidos están influenciados por la permeabilidad del agua (el agua se difundirá de la fase diluída a la concentrada por efectos osmóticos) y por el hecho de que la membrana no es completamente selectiva. La corriente eléctrica (I) está relacionada al potencial eléctrico (E) por la ley de Ohm (ec. 2):

$$E = I \cdot R \quad (2)$$

donde

R = resistencia del total de membranas (ohms)

E = potencial eléctrico, (V)

I = Corriente eléctrica, (A)

Por otra parte, la eficiencia de corriente eléctrica (e) se refiere al porcentaje del total de corriente que transfiere efectivamente iones y se calcula según la ecuación 3 (Murray, 1995):

$$e = \frac{I_{\text{teórica}}}{I_{\text{real}}} \quad (3)$$

2.8.4. Membranas para electrodiálisis.

Las membranas aniónicas contienen grupos cargados positivamente ligadas a un polímero, por ejemplo aquellos derivados de sales cuaternaria de amonio. Los cationes son repelidos de la membrana; este tipo de exclusión se denomina "exclusión Donnan". Por otra parte, las membranas catiónicas contienen grupos cargados negativamente, grupos primariamente sulfónicos o ácido carboxílico (Mulder, 1991).

Un factor limitante para la utilización de ED en procesamiento de lácteos es el costo de reemplazo de las membranas, separadores y electrodos, los cuales constituyen del 35 al 40 % del costo total de operación de la planta. El reemplazo de las membranas es necesario debido al ensuciamiento de éstas, el cual es causado principalmente por:

- precipitación del fosfato de calcio sobre la superficie de la membrana de intercambio catiónico.
- deposición de la proteína sobre la superficie de la membrana aniónica.

El primer problema puede ser manejado con un adecuado diseño de flujo sobre la superficie de la membrana y una limpieza ácida regular. Los depósitos de proteína son el factor principal en el acortamiento de la vida de las membranas debido a que al pH normal del suero, las proteínas pueden estar consideradas como aniones y se mueven bajo la influencia de la corriente eléctrica en el módulo. Estos aniones, al ser muy grandes no pasan a través de las membranas de intercambio aniónicas y son depositadas como una delgada capa de proteína sobre la cara de la membrana aniónica en contacto con el suero. Pueden utilizarse técnicas como polaridad inversa para desalojar estos materiales depositados sobre la membrana. Aunque frecuentemente la limpieza alcalina remueve la mayoría de los depósitos, se recomienda el desarmado del módulo para limpieza manual en intervalos de 2 a 4 semanas (Mulder, 1991). En un sistema de electrodiálisis, más de dos membranas pueden ser colocadas entre los electrodos para hacer más eficiente el proceso. La selección del material del electrodo puede cambiar los productos en una reacción electroquímica (Genders, 1990).

El suero lácteo puede desmineralizarse mediante electrodiálisis usando un arreglo de tres compartimentos como el mostrado en la figura 2.6.

El suero se hace pasar por el compartimento central y bajo la influencia del campo eléctrico el ion cloruro es transportado a través de la membrana aniónica hacia el compartimento anódico y el ion sodio es transportado a través de la membrana catiónica hacia el compartimento catódico. Las reacciones anódica y catódica generan a su vez protones e hidroxilos respectivamente y así la concentración de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio aumenta en sus respectivos compartimientos.

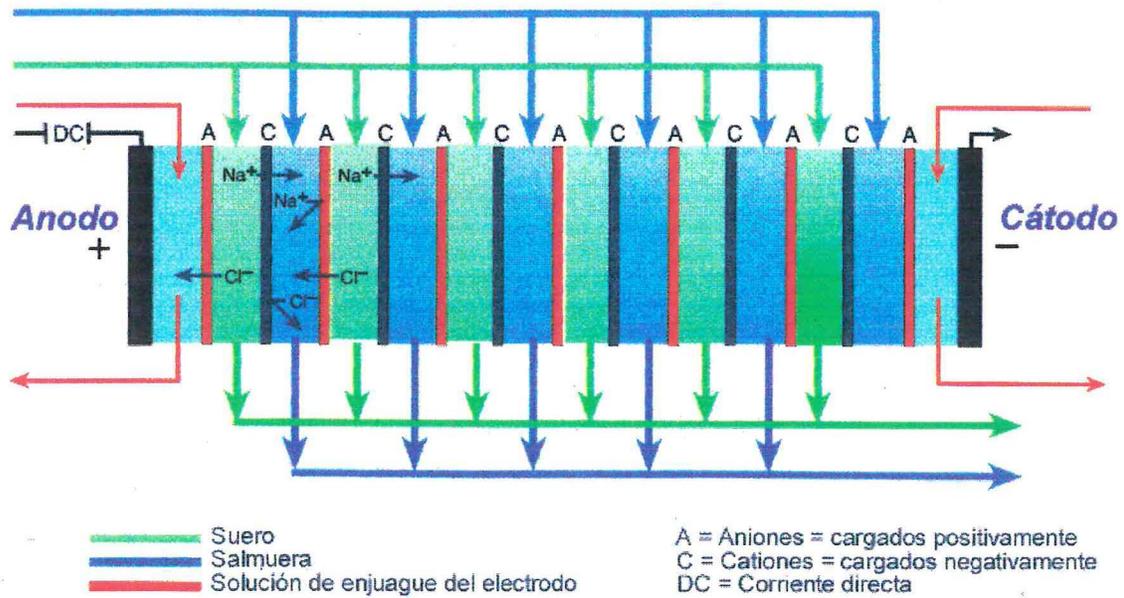


Figura 2. 5 Módulo de electrodiálisis (Bylund, 1995)

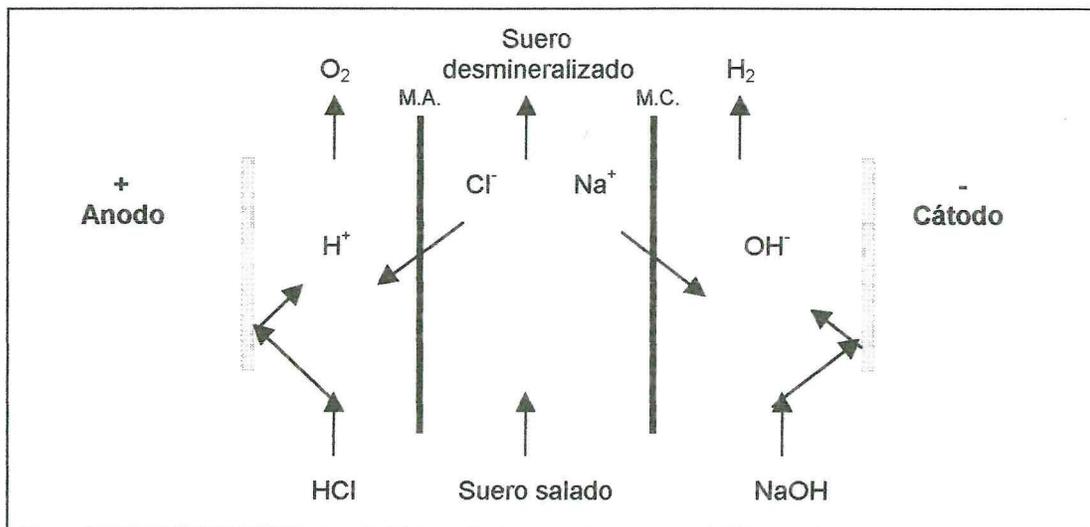


Figura 2.6 Electrodiálisis de suero lácteo en celda de tres compartimientos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Concentrar y desmineralizar el suero lácteo utilizando procesos de membrana, (ultrafiltración y electrodiálisis) que eviten el daño a la proteína para que mantenga sus propiedades funcionales de solubilidad e índice de actividad emulsificante (IAE).

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Obtener un Concentrado Proteico de Suero (CPS) mediante el uso de un módulo de ultrafiltración de Hoja Plana.
2. Caracterizar el proceso de electrodiálisis del suero de leche concentrado con el fin de determinar las condiciones más adecuadas de aplicación, en un arreglo básico (tres compartimientos).
3. Evaluar la modificación en las propiedades funcionales de solubilidad e IAE de las proteínas del suero como resultado de los procesos de ultrafiltración y electrodiálisis.
4. Evaluar el efecto de los procesos de concentración y desmineralización en las características fisicoquímicas de las proteínas del suero empleando calorimetría diferencial de barrido y electroforesis.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Reactivos

Se emplearon reactivos grado analítico comerciales. Se usó agua desionizada (Milli-Q, Millipore). para preparar las soluciones acuosas

4.2 Material biológico.

Suero dulce, subproducto de la elaboración de queso panela proporcionado por la empresa Establo Nacional, S.A. de C.V. de San Juan del Río, Qro. Se utilizó un lote de 40 lts. de suero, recolectado en planta, posteriormente colocado en envases de polietileno de baja densidad de 5L de capacidad, adicionado de 0.1 % de peróxido de hidrógeno y refrigerado (4 °C) hasta su uso.

Para la calorimetría diferencial de barrido, 500 mL de suero de cada etapa del procesamiento se dializaron con membranas Spectra/Por peso molecular de corte de 3500 Da, contra amortiguador de Tris-Cl pH =7, 10 mM, con tres cambios del amortiguador por espacio de 12 horas entre cada cambio; posteriormente se liofilizaron las muestras en un equipo Virtis 5L por 24 h, almacenándose en un desecador hasta su análisis.

4.3 Métodos.

4.3.1 Caracterización fisicoquímica de la materia prima.

La caracterización fisicoquímica del suero lácteo se llevó a cabo utilizando las técnicas descritas en la AOAC (1995) para la determinación de sólidos totales (925.23), cenizas (945.46) y nitrógeno proteico (991.22).

4. 3. 1. 1 Conductividad

Se determinó la conductividad de las muestras utilizando un conductímetro Marca Tacussel Tipo CD 810, calibrado con una solución de referencia. Se determinó la conductividad de muestras en cada una de las etapas del procesamiento del suero a una temperatura de 20 °C.

4. 3. 1. 2 pH

Se usó un potenciómetro Corning modelo 442 con electrodo combinado para medir el pH según la técnica descrita por Marshall (1992).

4. 3. 1. 3 Proteína

a. Proteína cruda

Se utilizó el método Kjeldahl para materia nitrogenada total, utilizando un factor de conversión de 6.38 (Pearson, 1987; Helrich, 1990).

b. Proteína Soluble

Se utilizó el método de Bradford utilizando el procedimiento de microensayo (1976), empleando el reactivo suministrado por Bio-Rad. La absorbencia de las muestras se leyó por triplicado en un espectrofotómetro UV-Vis UNICAM Helios Alpha, a 596 nm. Se hizo una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina como estándar (Apéndice A1).

4. 3. 1. 4 Grasa Butírica

La determinación de grasa se realizó siguiendo el método ácido-butirométrico de Gerber (Pearson, 1987; Marshall, 1992).

4. 3. 1. 5 Minerales

Se analizaron Ca, Mg y Na por espectrofotometría de emisión por plasma (ICP), en el laboratorio de análisis químico del CIDETEQ. Apéndice A2.

4. 3. 1. 6 Cloruros

La determinación de cloruros se realizó potenciométricamente, utilizando un electrodo de referencia XR 100 (calomel) y un electrodo de plata, valorando con una solución normalizada de nitrato de plata.

4. 3. 1. 7 Humedad

Se determinó según Marshall (1992) para determinación de humedad en productos lácteos concentrados tales como: margarinas, sueros condensados, concentrados proteínicos de suero, entre otros.

4.3.1.8 Lactosa

Se realizó empleando la técnica de azúcares reductores por el método de Sinner y Puls (1978). Se preparó una curva de calibración con lactosa (grado analítico) a concentraciones entre 1 y 10 mM, utilizando un blanco de calibración con agua desionizada. El desarrollo del color se efectuó por calentamiento en un baño de agua a 80 ± 0.5 °C de la muestra con el reactivo de Sinner por espacio de 10 min. Las muestras de suero dializadas y liofilizadas se diluyeron con agua desionizada. La absorbencia se leyó a 562 nm.

4.3.2 Caracterización microbiológica

La caracterización microbiológica parcial se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Peeler y Maturin (1992) para cuenta bacteriana total (CBT) y por Hitchins et al., (1992) para coliformes totales.

4.4 Tratamiento del suero previo a la concentración

El suero fue calentado a 55-60 °C por 30 min. (Hiddink et al., 1981; Nielsen, 1988), enseguida adicionado de hexametáfosfato de sodio, (HMP) 0.15% (Melachouris, 1977; Hiddink et al., 1981) y enfriado a 6 °C (Hobman, 1992). Posteriormente se centrifugó a $16\ 000 \times \vec{g}$ (11,500 rpm; rotor 11.5 cm. de diámetro), 4 °C por 15 min. (Hobman, 1992), e inmediatamente se filtró usando papel Whatman No. 1 (Hobman, 1992) para eliminar el calcio presente.

4.5 Concentración del suero por ultrafiltración

Se calentó a 50 ± 2 °C en un baño a temperatura constante (Büchi; Breslau y Kilcullen, 1977; Kessler, 1981) durante todo el proceso de concentración.

Se utilizó un módulo de hoja plana de Minitan (Millipore; figura 2.4). Se midió la velocidad de flujo en función del área de filtrado, eligiendo para la concentración el área máxima que permitió el equipo que fue de 600 cm², trabajando a una presión transmembrana promedio (ATP) entre el 75% y 90% del valor de flujo de filtrado máximo para evitar el fenómeno de polarización de la concentración en la membrana. La membrana de ultrafiltración utilizada fue de 10 000 NMWL de celulosa regenerada con baja capacidad de enlazamiento de la proteína (PLGC

OMPO4) de Millipore con un área filtrante por membrana de 60 cm² y de las siguientes dimensiones: largo, 15.2 cm; ancho, 8.3 cm y 2.54 mm de espesor.

4.6 Tratamiento del suero para la desmineralización

El suero concentrado por ultrafiltración se trató con resinas de intercambio catiónico (Tulsion, catiónica ácida, fuerte), con el objeto de sustituir los iones calcio por sodio, los cuales posteriormente se eliminaron con la aplicación de la electrodiálisis (Delaney y Donnelly, 1975; Ennis et al., 1981; Hiddink et al., 1981; Boer y Robbertsen, 1983).

4.7 Desmineralización del suero por electrodiálisis

Se efectuaron experimentos preliminares usando una celda de laboratorio de tres compartimientos, de 30 mL de capacidad por compartimiento (figura 5.2a). Se utilizó un ánodo de grafito y un cátodo de acero inoxidable de 1 cm² de área, cada uno. Se trabajó a dos valores de intensidad de corriente (1 kA/m² y 0.5 kA/m²) y se varió el tiempo de tratamiento (5 a 20 min.) con toma de muestra cada 5 min. Posteriormente, se trabajó con un equipo marca Asahi con un ánodo de titanio platinizado y cátodo de acero inoxidable de 156 cm² de área, eligiendo una velocidad de flujo de 100 L/h, y una distancia entre membranas consistente en una separación entre los electrodos anódico o catódico y su respectiva membrana (gap) de 3 mm y espacio en el compartimiento central de 1.5 mm. El arreglo del electrodiálizador fue una celda de tres compartimientos. Se utilizaron membranas marca Sybron Ionac MC-3470 (catiónica) y MA-3475 (aniónica). Para la primera prueba, se fijó una densidad de corriente de 0.3 kA/m² y se monitoreó el aumento en concentración de electrolitos a lo largo del tiempo.

La determinación de la corriente límite se realizó en el módulo Asahi, a las mismas condiciones que la prueba anterior. Para la tercera prueba, se fijó el valor de intensidad de corriente en 0.13 kA/m², tomando como base los resultados obtenidos en la segunda determinación.

4.8 Microscopía Electrónica de Barrido

Esta evaluación se hizo con el objeto de observar la presencia de minerales o proteína depositados en la superficie de las membranas de ultrafiltración y electrodiálisis, lo cual trae como consecuencia una disminución en la eficiencia del proceso y un daño físico para la membrana.

Se empleó un Microscopio electrónico de Barrido de bajo vacío Marca Jeol 5400 LV Kevex Delta Plus acoplado a un microanalizador Kevex. La preparación de la muestra se hizo secando ésta en un desecador al vacío; posteriormente cortándola y aplicándole una gota de pintura conductora de grafito para fijar la muestra al portamuestras, realizando enseguida la observación directa.

4.9 Pruebas de solubilidad

Las pruebas de solubilidad en función del pH se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Vojdani (1996) evaluando el contenido final de proteína soluble después de haber mezclado con amortiguador a un valor dado de pH, incubado por 12 hrs. en agitación, centrifugando a $16\ 000 \times g$ (11,500 rpm; rotor 11.5 cm. de diámetro) y filtrando con microfiltro (0.45 μm , Millipore) para separar el precipitado de la parte soluble.

4.10 Estimación del Índice de Actividad emulsificante (IAE)

Se siguió la técnica de Pearce y Kinsella (1978). Se utilizó aceite puro de maíz Mazola (Best Foods, Englewood Cliffs, NJ) adquirido en una tienda local. A 25 mL de una solución de proteína con concentración conocida (tabla 5.1) se adicionaron 80 mL de aceite (densidad promedio de 0.9258 determinada por duplicado con un picnómetro de 50 mL calibrado a 20 °C) para formar una emulsión utilizando un Ultraturrax modelo T25 S-1 empleando una velocidad de rotación de 8000 min^{-1} por dos minutos. Después de formar la emulsión, se pesó 1.00 g de ésta en un matraz aforado de 100 mL, completando el volumen con una solución de SDS (0.1% p/v). Se hicieron diluciones seriadas con SDS 0.1% para obtener una dilución final de 1:500. La absorbencia de la emulsión diluida fue determinada en celdas de 1 cm de longitud a 500 nm en un Espectrofotómetro UV-Vis UNICAM Helios Alpha. El valor obtenido

de las muestras leídas por triplicado se empleó para estimar el IAE, utilizando para cada muestra el promedio obtenido.

La turbidez de la muestra (T) está dada por la ecuación 5:

$$T = \frac{2.303 \cdot A_{(500 \text{ nm})}}{l} \quad (5)$$

l = longitud de la celda (cm)

$A_{(500 \text{ nm})}$ = Absorbencia a 500 nm

Para calcular la fracción en volumen de aceite en la emulsión (ϕ) se empleó la ecuación 6:

$$\phi = \frac{W_d - (S \cdot W_1)}{W_d + W_i [((1 + S) \cdot D_o) / D_m] - S} \quad (6)$$

donde

D_o = densidad del aceite

D_m = densidad de la solución de proteína (determinada por duplicado para cada muestra en un picnómetro de 25 mL calibrado a 20 °C)

S = concentración de solutos; masa por unidad de masa del solvente

C = peso de proteína por unidad de volumen de fase acuosa antes de formar la emulsión

W_1 = pérdida de peso de la emulsión en calentamiento/peso de la emulsión

W_d = peso seco/peso de la emulsión

El IAE se calculó con la ecuación 7:

$$\text{IAE} = \frac{2 \cdot T}{\phi \cdot C} \quad (7)$$

donde IAE tiene unidades del área de interfase estabilizada por unidad de peso de proteína ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$; Hill, 1996).

4.11 Evaluación de las proteínas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En los estudios de calorimetría se utilizó un calorímetro diferencial de barrido DSC-7 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, E.U.A.), equipado con cámara seca. La escala de temperatura del equipo se calibró con indio (temperatura de inicio de fusión $T_o = 156.6 \text{ }^\circ\text{C}$) y hexatriacontano (temperatura de inicio de fusión $T_o = 76.2 \text{ }^\circ\text{C}$). La línea base de referencia fue obtenida con portamuestras vacíos y sellados para grandes volúmenes (0319-0218, Perkin Elmer) en un intervalo de temperatura de 30° a $250 \text{ }^\circ\text{C}$, a una velocidad de $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, utilizando un flujo de $25 \text{ ml}/\text{min}$ de nitrógeno de ultra alta pureza (99.9% mínimo). Para la calibración de la escala de temperatura del equipo se determinó el inicio de la fusión para ambos estándares; cuando los valores encontrados presentaron diferencia de más de $2 \text{ }^\circ\text{C}$ con los establecidos, se calibró el equipo. Una vez calibrada la temperatura se llevó a cabo la calibración para el cambio de energía (ΔH), la cual se realizó con indio ($\Delta H = 28.45 \text{ J/g}$). El indio se calentó desde $130 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $180 \text{ }^\circ\text{C}$ a $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ usando como referencia una celda vacía. El hexatriacontano se calentó desde $20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $90 \text{ }^\circ\text{C}$ a la misma velocidad de calentamiento. Las muestras (1 a 6 mg) se pesaron en una microbalanza AT20 (Melter Toledo, Suiza) en los portamuestras especificados y fueron analizadas en el intervalo de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $240 \text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

4.12 Análisis electroforético de las proteínas

a. Electroforesis nativa y desnaturalizante a pH 8.8

Las técnicas electroforéticas permiten el análisis de diversas proteínas contenidas en una muestra líquida. En la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), la combinación de tamaño del poro del gel, carga, tamaño y forma de la proteína, determinan la velocidad de migración de ésta. Se utilizó un sistema discontinuo formado por 2 fracciones con el gel de separación conteniendo 10 y 16 % de la mezcla acrilamida + bisacrilamida (%T) y gel de alineamiento, 3.9 %T, propuesto por Ausubel et al. (1992). Las proteínas se analizaron en estado nativo y desnaturalizante (SDS-PAGE). En la SDS-PAGE las muestras fueron solubilizadas

en ebullición (2 min) en presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio); en la electroforesis desnaturizante reductora se adicionó 2-mercaptoetanol (2-ME). Se colocaron 15 μ L de mezcla 1:1 de la muestra con el amortiguador. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (6 500 a 45 000 Da; Sigma). Se empleó una cámara vertical Mighty Small SE 250 (Hoefer, Cal., USA), conectada a una fuente de poder Hoefer usando un voltaje constante de 100 V (electroforesis nativa) o una corriente constante de 15 mA (electroforesis desnaturizante) a una temperatura de 4 °C. La tinción de los geles se efectuó con azul brillante de Coomasie R-250 al 0.05% (Bio-Rad).

b. Electroforesis desnaturizante a pH 7.2

El procedimiento para electroforesis desnaturizante a pH 7.2 se realizó de acuerdo a Ausubel et al., (1992), utilizando un sistema continuo con geles al 10% T y el mismo amortiguador para el gel y las soluciones de electrodo (fosfatos/SDS, pH 7.2; 20 mM). Se corrió a corriente constante de 30 mA. y a una temperatura de 20 °C. Una vez concluida la corrida se efectuó la tinción con Azul de Coomasie R-250 según Ausubel et al., (1992).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5. 1 Caracterización fisicoquímica de la materia prima.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del suero lácteo se muestran en la tabla 5.1.

Como puede observarse, los valores de conductividad, que son una medida indirecta del contenido de sales en la muestra, permanecen más o menos constantes hasta antes del proceso de electrodiálisis en donde se observa una disminución de la conductividad, resultado de la eliminación de sales. También se observa que el contenido de cenizas en la muestra desmineralizada es aproximadamente 50 % menor que en la concentrada, lo que indica que se han conseguido los niveles deseados de desmineralización del suero lácteo, ya que en general, la electrodiálisis opera a costos razonables a niveles de desmineralización de cerca de 50%, aumentándose considerablemente el costo a niveles mayores (Hoppe y Higgins, 1992).

Por otro lado, al calcular el contenido de proteína en base seca (es decir, con respecto a la cantidad de sólidos totales presentes) de la muestra sin tratamiento, se obtiene un contenido de proteína de 9.8 %, valor que aumenta hasta un 35 % al aplicar la ultrafiltración. Se consiguió con esto un valor de proteína frecuentemente empleado en la industria, pero sin el contenido de sales que regularmente caracteriza a este tipo de concentrados proteicos disponibles en el mercado.

En lo que se refiere a la modificación del pH, se observa que hasta antes de la desmineralización, no ocurre modificación significativa del pH (tabla 5.1). Sin embargo, durante este proceso existe una disminución del pH con respecto al valor inmediato anterior, lo que concuerda con los datos obtenidos en otros trabajos [Okada et al., (1977); Hiraoka et al., (1979); Tanaka et al., (1987)]. El pH del suero concentrado y desmineralizado fue muy bajo respecto de los anteriores procesos (tabla 5.1), debido a la retromigración de protones del compartimiento central, como se explicará más adelante. Por otra parte, Short y Doughty (1977), reportan que para la electrodiálisis de sueros concentrados por ultrafiltración, la tendencia fue en dirección opuesta, con un incremento en los valores de pH sobre la electrodiálisis de

concentrados de suero tanto dulce como ácidos. La razón de este aumento no se discutió en este trabajo y creemos que probablemente fue debido a la formación de una sal básica, dependiendo de las membranas utilizadas.

La tabla 5.2 muestra el contenido de humedad, lactosa y y proteína de las muestras dializadas contra buffer tris-Cl 10 mM y liofilizadas para su análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

5. 2 Caracterización microbiológica

El suero y sus concentrados son substratos ricos para la acción microbiana, por lo que un control adecuado permitirá evitar riesgos no sólo de su deterioro, sino además de ser vehículo de algún agente patógeno.

Los resultados de la caracterización microbiológica parcial se muestran en la tabla 5.3.

De acuerdo con estos resultados, y considerando que puede aplicarse la Norma Oficial Mexicana para leche puesto que no existe norma para suero lácteo; el producto obtenido se encuentra, hasta antes del tratamiento con resinas de intercambio catiónico, dentro de los límites de la norma que marca 30 000 UFC/mL como límite máximo de Mesófilos Aerobios en leche pasteurizada (NOM-091-SSA1-1994). Sin embargo, se observa que en las dos últimas etapas del proceso éste valor se rebasa debido a que las resinas empleadas no se sometieron a ningún tratamiento previo de sanitización. No obstante, en pruebas posteriores (no reportadas), esta carga microbiana disminuyó sensiblemente al someter la resina a tratamiento térmico (80 °C, 5 min.), sin alterar sus características de intercambio iónico. En cuanto a coliformes totales, también se encuentra dentro de la norma, ya que se tienen menos de 10 UFC/mL después de que el suero ha sido tratado, y éste es el número máximo de organismos coliformes totales permitidos para leche pasteurizada en planta, (NOM-091-SSA1-1994).

Tabla 5.1 Caracterización fisicoquímica del suero lácteo en cada una de las etapas del procesamiento.

Tipo de suero	Conductividad (mS)	pH	Proteína (% bh*)	S.T. (%)	Cenizas (% bh)	Grasa (% bh)
Suero sin procesar	6.29	6.52	0.51	5.17	0.55	0.2
Suero Pre-tratado	6.15	6.28	0.53	5.58	0.66	0.2
Suero concentrado por Ultrafiltración	6.61	6.27	2.80	8.00	0.81	0.1
Suero pasado por resinas de intercambio catiónico	6.36	6.34	2.22	7.81	0.72	0.1
Suero desmineralizado por Electrodialisis	3.83	5.97	2.56	6.49	0.46	< 0.1

*bh= base húmeda

Tabla 5.2 Análisis del suero lácteo dializado contra amortiguador Tris-Cl y liofilizado para su análisis por DSC.

Tipo de suero	Lactosa (g/g muestra)	Proteína (g/g muestra)	Humedad (%)
Suero sin procesar	0.414	0.155	9.96
Suero Pre-tratado	0.885	0.152	21.09
Suero concentrado por Ultrafiltración	0.770	0.418	13.10
Suero desmineralizado por Electrodialisis	0.581	0.420	14.58

Tabla 5.3 Análisis bacteriológico del suero en las diferentes etapas de preparación del suero concentrado y desmineralizado.

Tipo de suero	C.B.T. (ufc/mL)	Coliformes Totales (ufc/mL)
Suero sin procesar	1 200	200 000
Suero Pre-tratado	< 10	< 10
Suero concentrado por UF	< 10	< 10
Suero pasado por resinas de intercambio catiónico	115 000	< 10
Suero desmineralizado por ED	43 000	< 10

UF= ultrafiltración

ED= electrodiálisis

5. 3 Concentración del suero por ultrafiltración.

Delaney y Donnelly (1975), Kessler (1981), evaluaron el efecto entre la presión transmembrana promedio (ATP) y el flux (flujo por unidad de área) y demostraron que para el procesamiento del suero a una ATP dada, el flux aumenta al incrementar la velocidad de flujo. Para una velocidad de flujo dada, un incremento en la presión resulta en un aumento en el flux hasta llegar a un valor máximo, en donde se vuelve independiente de la presión. Este fenómeno está primariamente relacionado al efecto de la polarización de la concentración.

Se realizaron diferentes corridas usando suero pretratado modificando el área filtrante y el flujo de filtrado (fig. 5.1), para evitar la polarización de la membrana, a una presión transmembrana promedio (ATP) entre el 75% y 90% del valor de flujo de filtrado máximo. Esto se hizo para evitar el fenómeno de polarización de la concentración en la membrana.

5. 4 Proceso de electrodiálisis.

Se efectuaron experimentos preliminares usando una celda de laboratorio de tres compartimientos, de 30 mL de capacidad por compartimiento (figura 5.2a). Se trabajó a dos valores de intensidad de corriente (1 kA/m^2 y 0.5 kA/m^2) ya que éstas son densidades de corriente comunes a los procesos de electrodiálisis y se modificó el tiempo de tratamiento (5 a 20 min.) para determinar su efecto en el grado de desmineralización que podía obtenerse. Estos experimentos permitieron evaluar el grado de ensuciamiento de las membranas y como base para fijar la intensidad de corriente en el equipo Asahi. Además, sirvieron para familiarizarse con el sistema y el manejo de las membranas, ya que su costo es elevado y no se conocía el efecto del suero en ellas.

Trabajando con el equipo Asahi (figura 5.2b), a una densidad de corriente de 0.3 kA/m^2 se observó la acidificación del suero contenido en el compartimiento central, como resultado de la retromigración del ion hidrógeno (figura 5.3; tabla 5.4), lo cual se consideró como una fuga de protones del compartimiento anódico hacia el compartimiento central, debido a una alta densidad de corriente, sin embargo fue seleccionada porque ofrecía la ventaja de tiempos cortos de tratamiento.

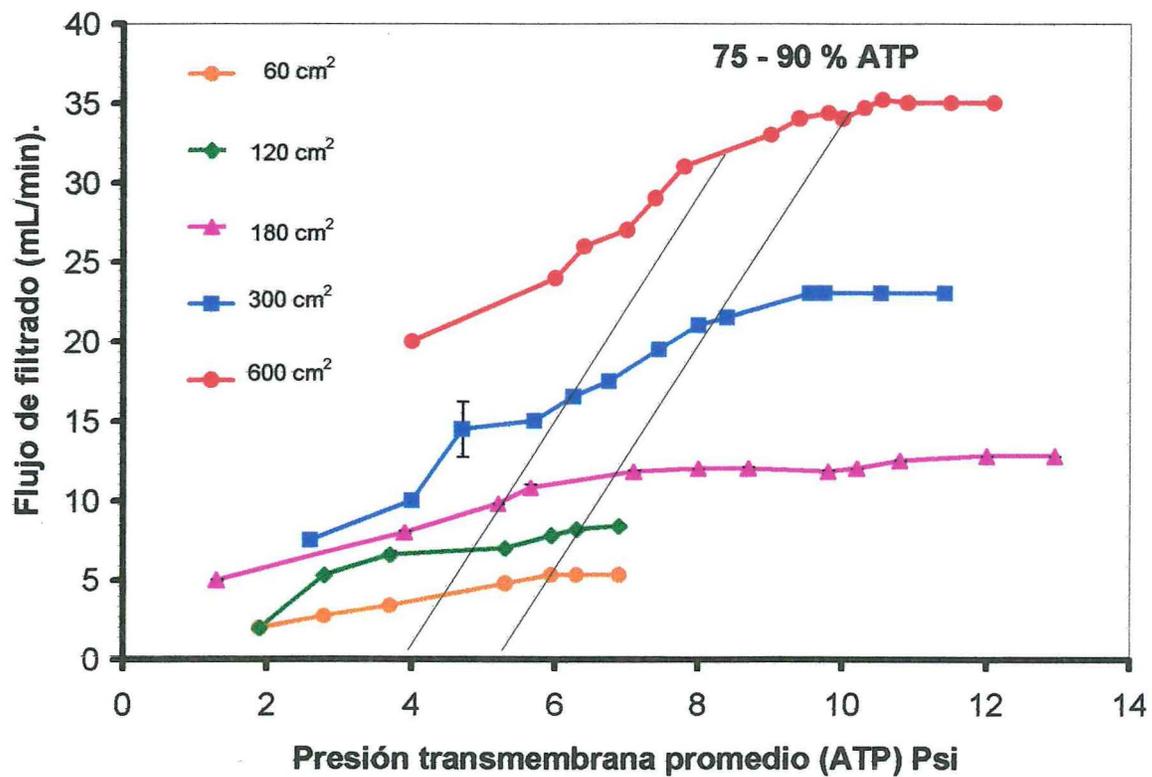


Figura 5.1 Determinación de la velocidad de flujo con diferente área de filtrado. Se eligió un valor de ATP entre el 75 y 90% del valor máximo de flujo de filtrado y el área máxima de filtrado. El coeficiente de variación fue menor a 5%.

Se modificó la intensidad de corriente y se midió el voltaje correspondiente. La gráfica de estos parámetros tuvo la forma de una curva sigmoideal cuya meseta representó la corriente límite, que de acuerdo a la literatura equivale a un punto conocido como de polarización pronunciada, ya que el incremento en voltaje ocasionó la disociación del agua en iones (H^+) e hidroxilo (OH^-) lo que provocó un cambio en el pH del compartimiento central al migrar estos iones a través de las membranas aniónicas y catiónicas, respectivamente. Este fenómeno tiene como consecuencia un incremento en el consumo de energía así como de la resistencia eléctrica, además de la disminución de la eficiencia en el gasto de corriente por la transferencia de los iones citada (Murray, 1995).

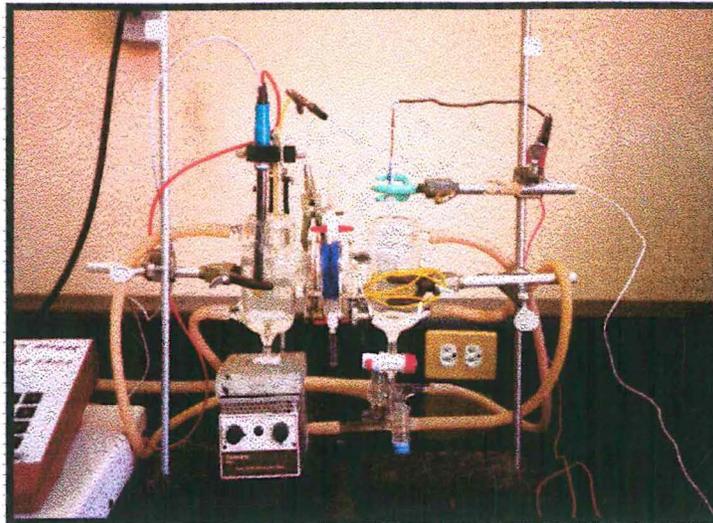
La corriente límite determinada para el suero lácteo fue de aproximadamente 2.6 A que correspondió a un voltaje de 9.8 V (figura 5.4); por lo que el valor recomendado de trabajo (75-80 % de la corriente límite), para la prueba siguiente fue 0.13 kA/m^2 obteniéndose una mayor eficiencia en el aumento de la concentración del anolito, como se apreció al comparar la eficiencia reportada en las tablas 5.4 y 5.5. Al contraponer la línea azul de las figuras 5.3 y 5.5, hasta un tiempo de 20 min. las rectas obtenidas tienen diferentes pendientes, es decir, el aumento en la concentración de anolito es menor para el caso de una densidad de corriente mayor (figura 5.3), pero aún con una mejora en la eficiencia, observada en la tabla 5.5 para una densidad de corriente aplicada de 0.13 kA/m^2 , el aumento en la concentración de anolito no es similar a la del catolito. Por otra parte, el fenómeno de retromigración de los iones (disminución de los protones), ocurrió después de los 20 min. de tratamiento y no antes (tabla 5.5). Es importante resaltar que al evaluar al anolito, se encontró en éste una concentración de proteína de 1.04 g/L, que indicó que hubo migración de proteína del compartimiento central, probablemente de las proteosas-peptonas, ya que son las de menor tamaño. Los datos obtenidos de pH en el compartimiento central, conductividad y comportamiento del voltaje a través del tiempo para estas dos pruebas se encuentran en los apéndices A.3 y A.4. El control de la acidificación del compartimiento central se realizó adicionando NaOH 2.5 N. Inicialmente se consideró la eliminación del 50% de las sales presentes en el suero, por lo cual se hicieron cálculos para determinar a partir de la ley de Faraday el tiempo necesario de desmineralizar el suero. Se obtuvo un valor de 16 min.

(Apéndice A.5), por lo que la fuga de protones en este intervalo, no representó problema alguno.

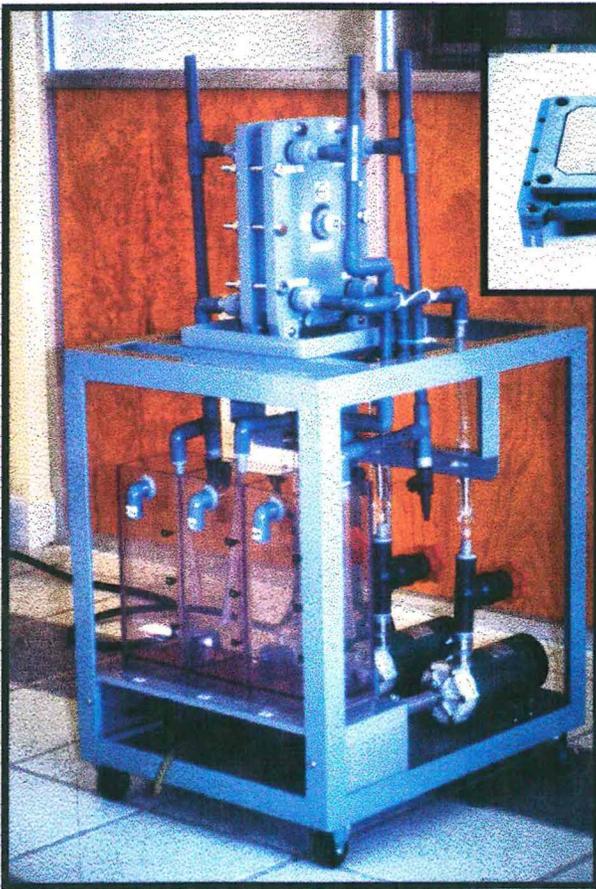
El tiempo de tratamiento puede disminuirse aún más aumentándose el número de compartimientos en la celda de ED. Sin embargo, con estas pruebas se logró la caracterización de los parámetros básicos de operación para la desmineralización de suero lácteo.

Finalmente, se realizó una prueba a una densidad de corriente de 0.3 kA/m^2 , pero adicionando NH_4OH 0.1 N desde el inicio al anolito (figura 5.6), para evaluar su efecto en la retromigración de iones H^+ hacia el compartimiento central, monitoreándose la concentración de los electrolitos y la modificación en el pH del suero. Se observó que había una menor diferencia entre las concentraciones del anolito y del catolito (tabla 5.6), pero seguía presentándose la migración de iones, por lo que la presencia de NH_4OH limitó pero no evitó la migración de éstos hacia el compartimiento central. Además, a pesar de que la retromigración es menor, la acidificación del compartimiento central no pudo evitarse, observándose la presencia de abundante espuma en el anolito, y el cambio de coloración (de incoloro a amarillo), sospechando la migración de proteína hacia este compartimiento. El comportamiento del voltaje, conductividad y pH del suero se muestra en el Apéndice A6. Al evaluar al anolito, se encontró una concentración de proteína de 1.34 g/L (aproximadamente el 5 % del contenido total), mayor que la encontrada a una densidad de corriente de 0.13 kA/m^2 . Este hecho es importante, ya que representó una disminución en el contenido de proteína del suero desmineralizado, pero además, su presencia en el anolito, limitó la posibilidad de utilización de éste como un medio de recuperación del costo de desmineralización.

a)



b)



c)

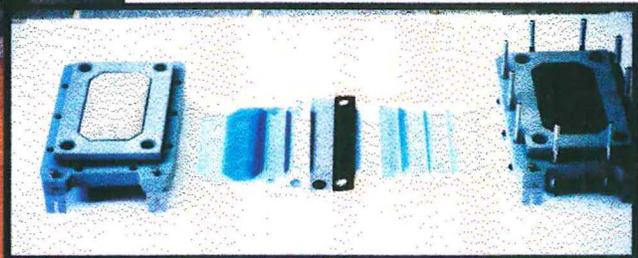


Figura 5.2 a) Vista de la celda de vidrio empleada en los experimentos preliminares de desmineralización de suero concentrado por electrodiálisis b) Electrodesizador marca Asahi c) detalle de los electrodos, separadores y membranas del equipo.

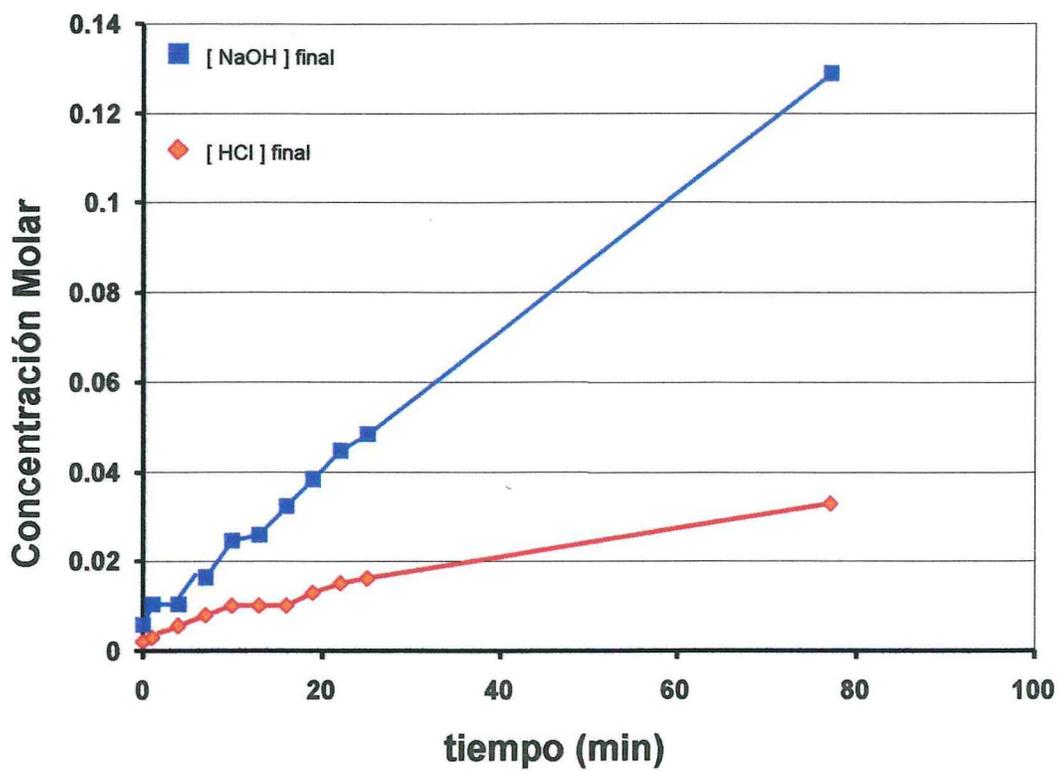


Figura 5.3 Comportamiento de los electrolitos durante la ED de suero a 0.319 kA/m^2

Tabla 5.4 Determinación de Eficiencia y Equivalentes transportados de los electrolitos, para la desmineralización de suero lácteo, en un electrodiálizador Asahi de tres compartimientos.

$$i = 0.3 \text{ kA/m}^2$$

TIEMPO (MIN)	[NaOH] mol/L	[HCl] mol/L	% de EFICIENCIA		Conc. Teórica (al tiempo t)*	VARIACION EN LA CONCENTRACION AL TIEMPO t	
			NaOH	HCl		A= 5.1	
						[NaOH] mol/L	[HCl] mol/L
0	0.006	0.002	0	0	0.000	0.000	0.000
1	0.010	0.003	143**	32	0.003	0.004	0.001
4	0.010	0.006	36	28	0.013	0.004	0.004
7	0.016	0.008	48	27	0.022	0.010	0.006
10	0.025	0.010	60	25	0.032	0.019	0.008
13	0.026	0.010	49	20	0.041	0.020	0.008
16	0.032	0.010	52	16	0.051	0.026	0.008
19	0.038	0.013	54	18	0.060	0.032	0.010
22	0.045	0.015	56	19	0.070	0.039	0.013
25	0.048	0.016	54	18	0.079	0.042	0.014
77	0.129	0.033	50	13	0.244	0.123	0.031

* Corresponde al No. de equivalentes transportados ya que el volumen fue 1 L.

** Probablemente debido al error de muestreo

$$Q = I \cdot t \text{ (Coulombios)}$$

$$\text{eq transportados} = Q / 96500$$

$$\text{Concentración teórica esperada} = \text{eq. Transportados} / \text{Volumen}$$

$$\text{Eficiencia} = (\text{Conc. Medida experimental} - \text{Conc. Inicial}) / \text{Conc. Teórica} \times 100$$

$$\text{Variación en la concentración de NaOH} = \text{Conc. tiempo t} - \text{Conc. Inicial}$$

$$i = \text{Densidad de corriente, kA/m}^2$$

$$Q = \text{Velocidad de Flujo, L/h}$$

$$t = \text{segundos, s}$$

$$I = \text{Corriente, A}$$

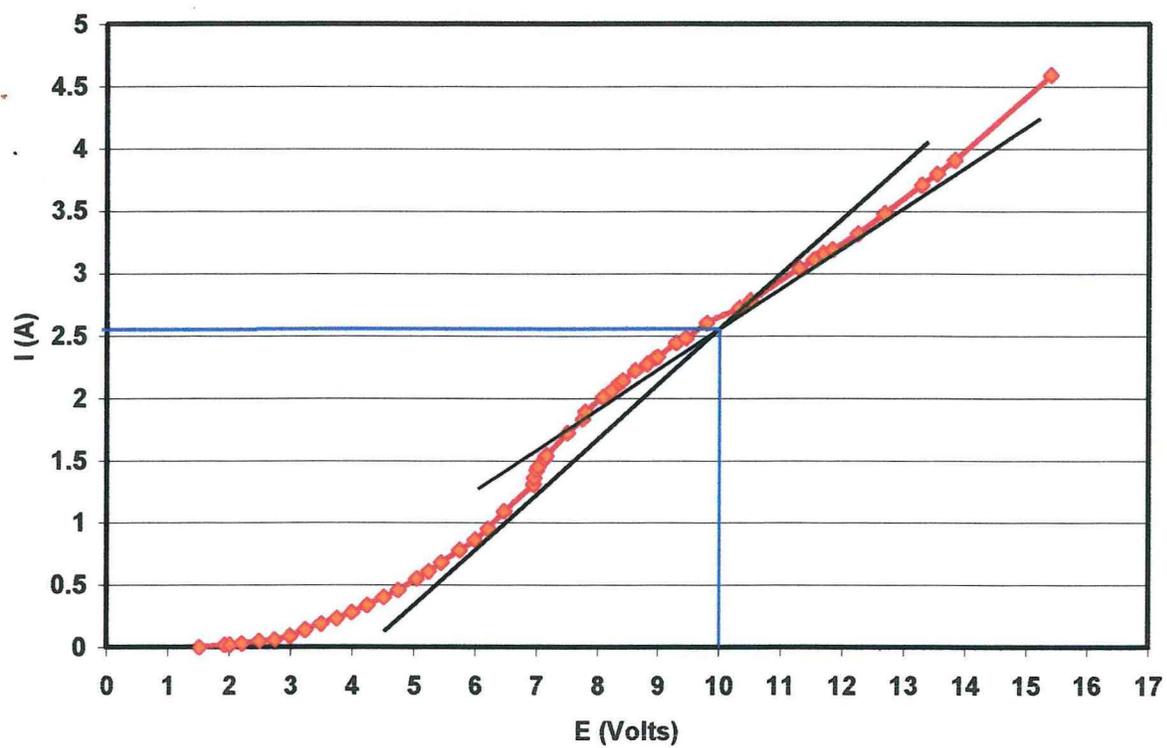


Figura 5.4 Corriente límite para suero lácteo en celda de tres compartimientos (Asahi).

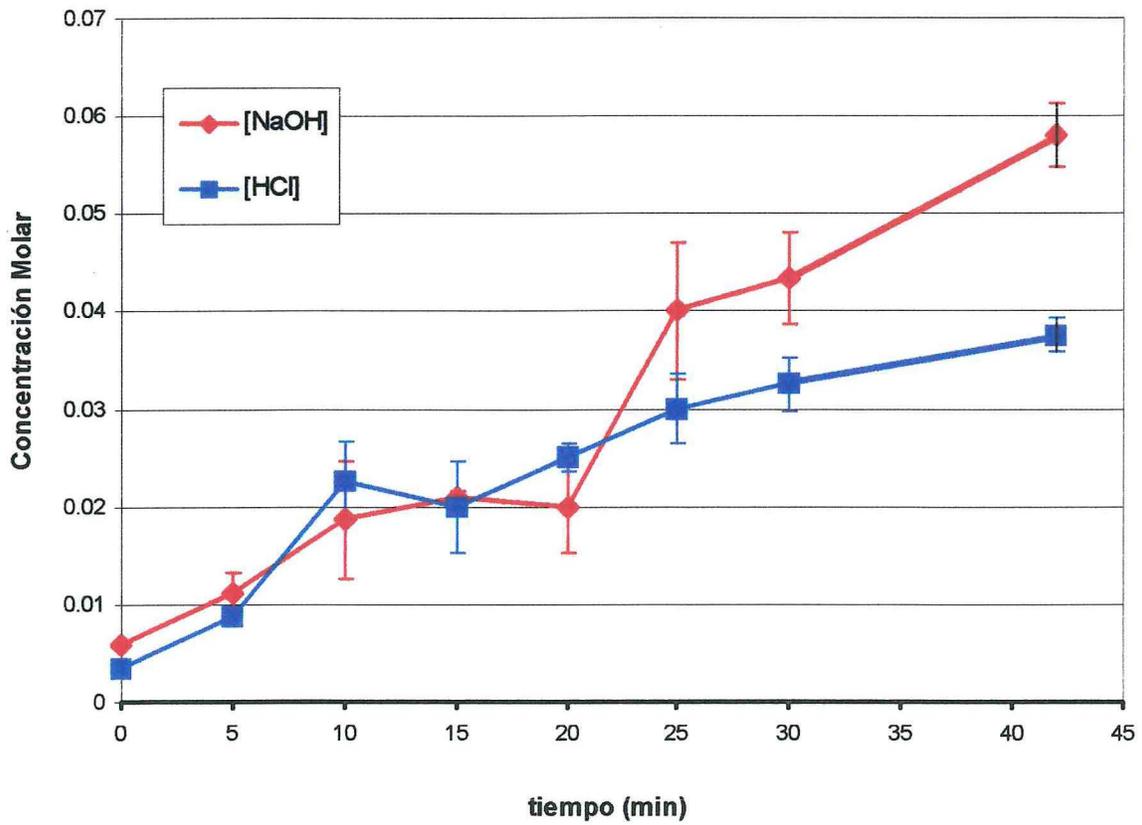


Figura 5.5 Comportamiento de los electrolitos durante la ED del suero a 0.13 kA/m^2 . Se corrieron dos experimentos y se muestran las barras de error de los resultados.

Tabla 5.5 Determinación de Eficiencia y Equivalentes transportados de los electrolitos, para la desmineralización de suero lácteo, en un electrodiálizador Asahi de tres compartimientos.

$$i = 0.13 \text{ kA/m}^2$$

TIEMPO (MIN)	[NaOH] mol/L	[HCl] mol/L	% de EFICIENCIA		Conc. Teórica (al tiempo t) *	VARIACION EN LA CONCENTRACION AL TIEMPO t	
			NaOH	HCl		A= 2.04	
						[NaOH] mol/L	[HCl] mol/L
0	0.006	0.003	0	0	0.000	0.000	0.000
5	0.011	0.009	82	83	0.006	0.005	0.005
10	0.019	0.023	99	150**	0.013	0.013	0.019
15	0.021	0.020	78	87	0.019	0.015	0.017
20	0.020	0.025	55	85	0.025	0.014	0.022
25	0.040	0.030	107**	84	0.032	0.034	0.027
30	0.043	0.033	98	76	0.038	0.037	0.029
42	0.058	0.038	98	64	0.053	0.052	0.034

* Corresponde al No. de equivalentes transportados ya que el volúmen fue 1 L.

** Probablemente debido al error de muestreo

$$Q = I \cdot t \text{ (Coulombios)}$$

$$\text{eq transportados} = Q / 96500$$

$$\text{Concentración teórica esperada} = \text{eq. Transportados} / \text{Volumen}$$

$$\text{Eficiencia} = (\text{Conc. Medida experimental} - \text{Conc. Inicial}) / \text{Conc. Teórica} \times 100$$

$$\text{Variación en la concentración de NaOH} = \text{Conc. tiempo t} - \text{Conc. Inicial}$$

$$i = \text{Densidad de corriente, kA/m}^2$$

$$Q = \text{Velocidad de Flujo, L/h}$$

$$t = \text{segundos, s}$$

$$I = \text{Corriente, A}$$

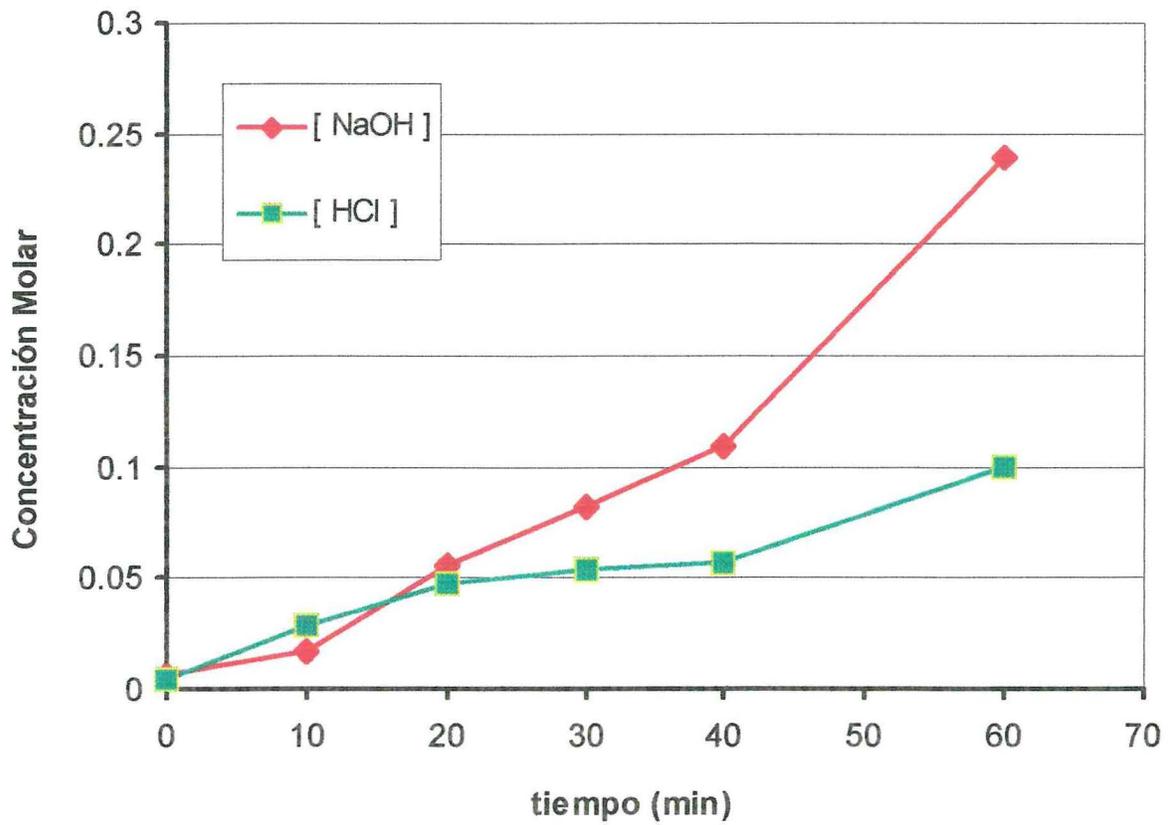


Figura 5.6 Comportamiento de los electrolitos durante la ED del suero a 0.31 kA/m^2 . El anolito se adicionó de NH_4OH 0.1 N para neutralizar el efecto de retromigración de iones H^+ hacia el comportamiento central.

Tabla 5.6 Determinación de Eficiencia y Equivalentes transportados de los electrolitos al adicionar NH_4OH 0.1 N en el anolito, para la desmineralización de suero lácteo, en un electrodiálizador Asahi de tres compartimientos
 $i = 0.31 \text{ kA/m}^2$

TIEMPO (MIN)	[NaOH] mol/L	[Cl ⁻] mol/L	[HCl] mol/L	% de EFICIENCIA			Conc. Teórica (al tiempo t) *	VARIACION EN LA CONCENTRACION AL TIEMPO t		
				NaOH	Cl ⁻	HCl		I = 5 A		
								[NaOH] mol/L	[Cl ⁻] mol/L	[HCl] mol/L
0	0.006	0.159	0.004	0	0	0	0.000	0.000	0.000	0.000
10	0.017	0.108	0.028	34	164**	79	0.031	0.011	0.051	0.024
20	0.056	0.071	0.048	80	142**	70	0.062	0.050	0.088	0.044
30	0.082	0.052	0.053	81	115**	53	0.093	0.076	0.107	0.049
40	0.109	0.037	0.056	83	98	42	0.124	0.103	0.122	0.052
60	0.240	0.019	0.099	125**	75	51	0.187	0.234	0.140	0.095

* Corresponde al No. de equivalentes transportados ya que el volúmen fue 1 L.

** Probablemente debido al error de muestreo

$$Q = I \cdot t \text{ (Coulombios)}$$

$$\text{eq transportados} = Q / 96500$$

$$\text{Concentración teórica esperada} = \text{eq. Transportados} / \text{Volumen}$$

$$\text{Eficiencia} = (\text{Conc. Medida experimental} - \text{Conc. Inicial}) / \text{Conc. Teórica} \times 100$$

$$\text{Variación en la concentración de NaOH} = \text{Conc. tiempo t} - \text{Conc. Inicial}$$

$$i = \text{Densidad de corriente, kA/m}^2$$

$$Q = \text{Velocidad de Flujo, L/h}$$

$$t = \text{segundos, s}$$

$$I = \text{Corriente, A}$$

5.5 Evaluación del ensuciamiento de las membranas de ultrafiltración y electrodiálisis.

Esta evaluación se hizo con el objeto de detectar la presencia de minerales o proteína depositados sobre la superficie de las membranas, lo cual trae como consecuencia una disminución en la eficiencia del proceso y un daño físico para la membrana.

En un segmento de la membrana de ultrafiltración se observó la presencia de iones calcio, el cual se encuentra adherido a la superficie (figura 5.7). Los demás elementos observados (oxígeno y fósforo) probablemente forman parte de la composición de las membranas, ya que en el análisis de una membrana nueva se detectaron los mismos elementos.

En una membrana aniónica nueva empleada en electrodiálisis (figura 5.8) el microanalizador detectó flúor, aluminio, cloro, carbono y cantidades pequeñas de otros elementos (no mostrados). El análisis de la membrana aniónica después de 20 min. de desmineralización por electrodiálisis y lavada posteriormente con una solución de hidróxido de sodio 0.1 M (figura 5,9), mostró un depósito de proteína sobre su superficie, sin detectarse presencia de especies como calcio o magnesio. El pico que se observó asociado por el microanalizador a Silicio, denotó una gran incertidumbre ya que se encontraron varias señales traslapadas y por tanto fue difícil determinar con certeza el elemento de que se trataba. Esto no se consideró relevante, ya que el objetivo de la observación microscópica se cumplió al observar el depósito de proteína sobre la superficie de la membrana, aún después de haber sido lavada (figura 5.9). Este hecho se explicó por la carga negativa que poseen las proteínas del suero a pH de procesamiento (6.2 - 6.6), que provoca que éstas sean atraídas por la carga positiva de la membrana sin pasar a través de ella, por su tamaño.

Las membranas catiónicas de electrodiálisis se encontraron compuestas principalmente de flúor, azufre, carbono y sodio (figura 5.10). No se observaron daños o depósitos en su superficie en un tiempo de desmineralización de 20 min. (Fotografía no mostrada).

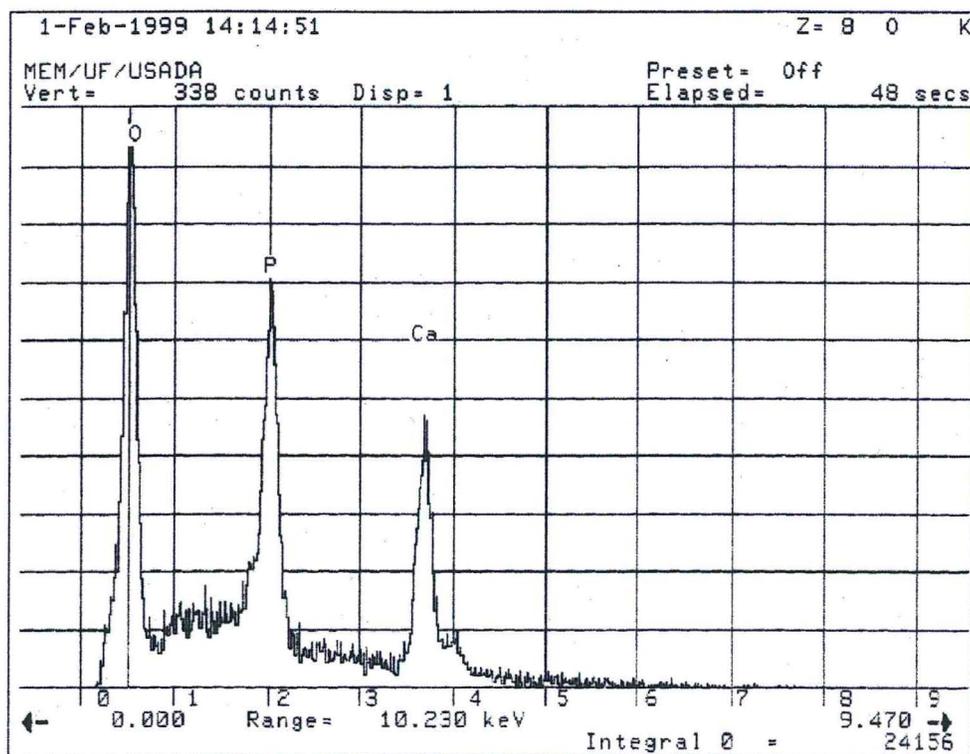
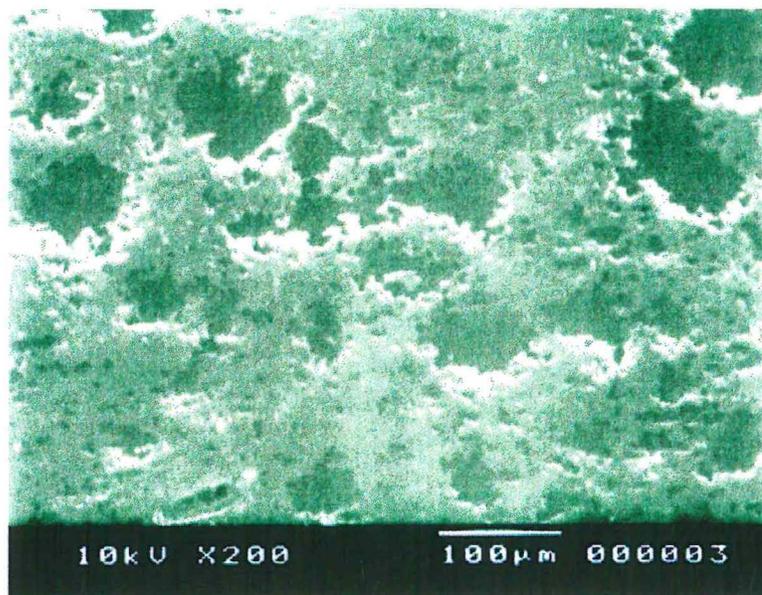


Figura 5.7 En la foto superior se observa una fotografía al microscopio electrónico de la superficie de la membrana de UF después de concentrar el suero lácteo. En la parte inferior se aprecia en el microanálisis, la presencia de calcio en la membrana, además de fósforo y oxígeno.

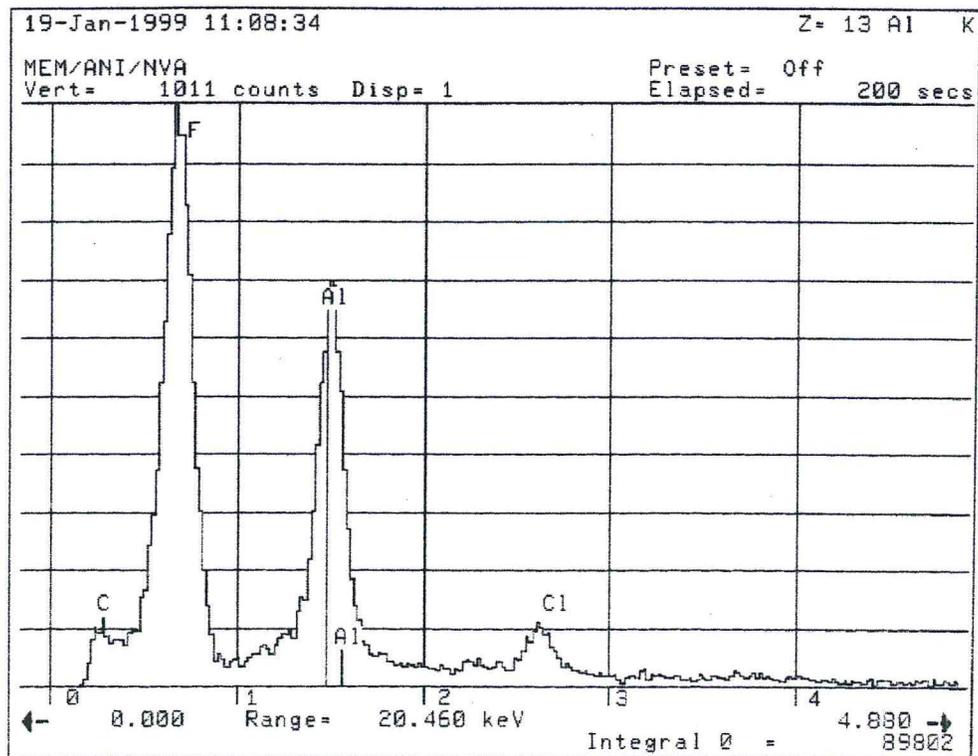
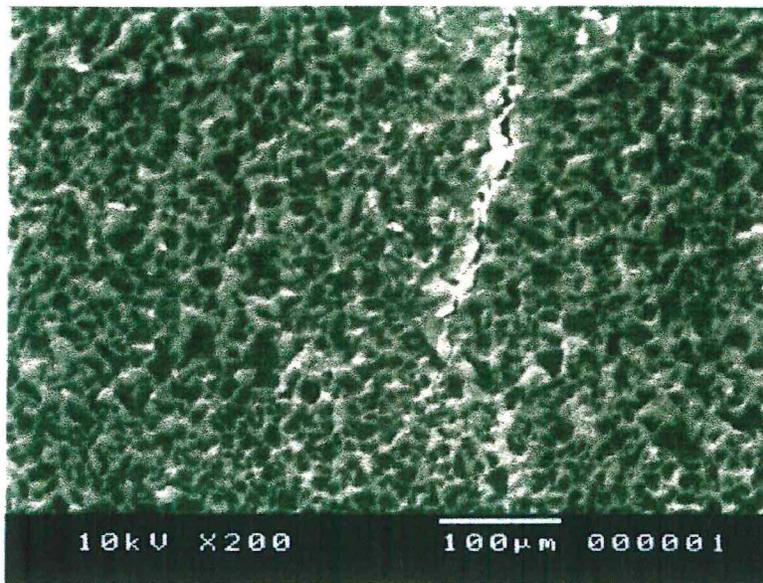


Figura 5.8 En la foto superior se observa una fotografía al microscopio electrónico de la superficie de una membrana aniónica nueva, en la parte inferior se aprecia que está compuesta de aluminio, flúor, además de carbono y cloro.

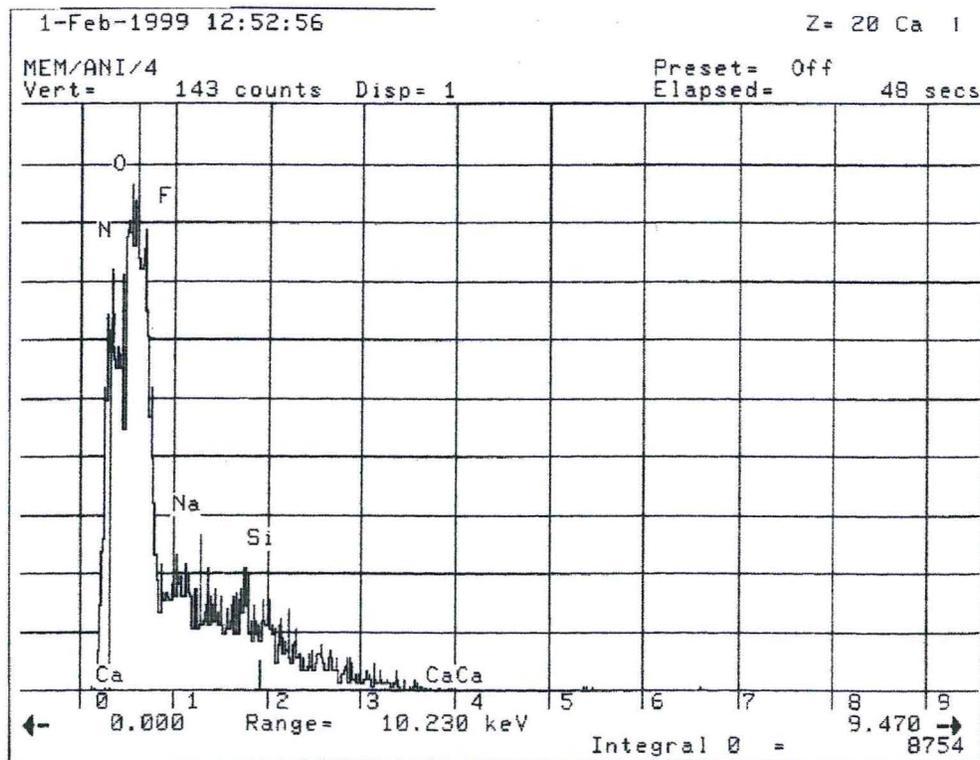
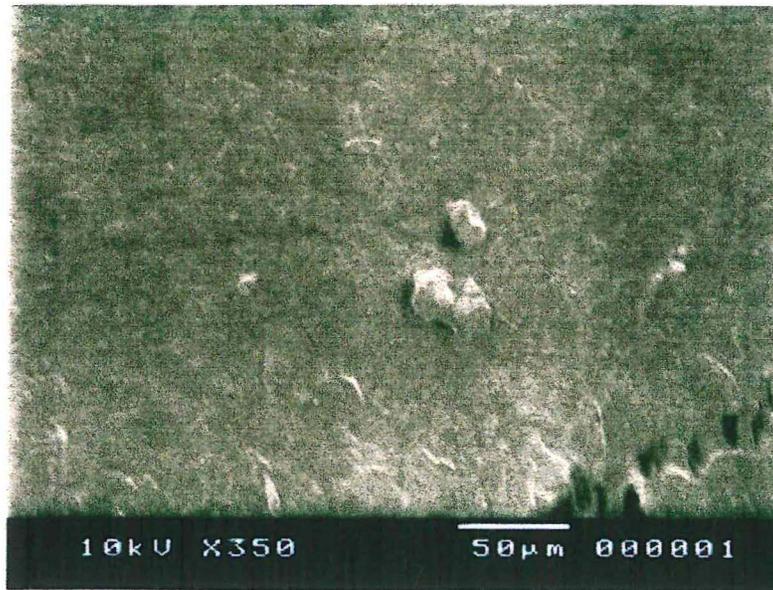


Figura 5.9 .- En la foto superior se observa una fotografía al microscopio electrónico de la superficie de la membrana aniónica después de haber sido desmineralizado el suero y lavada con NaOH (0.1N) por 10 min. Se observa depósitos de proteína cuya composición se muestra en la gráfica inferior.

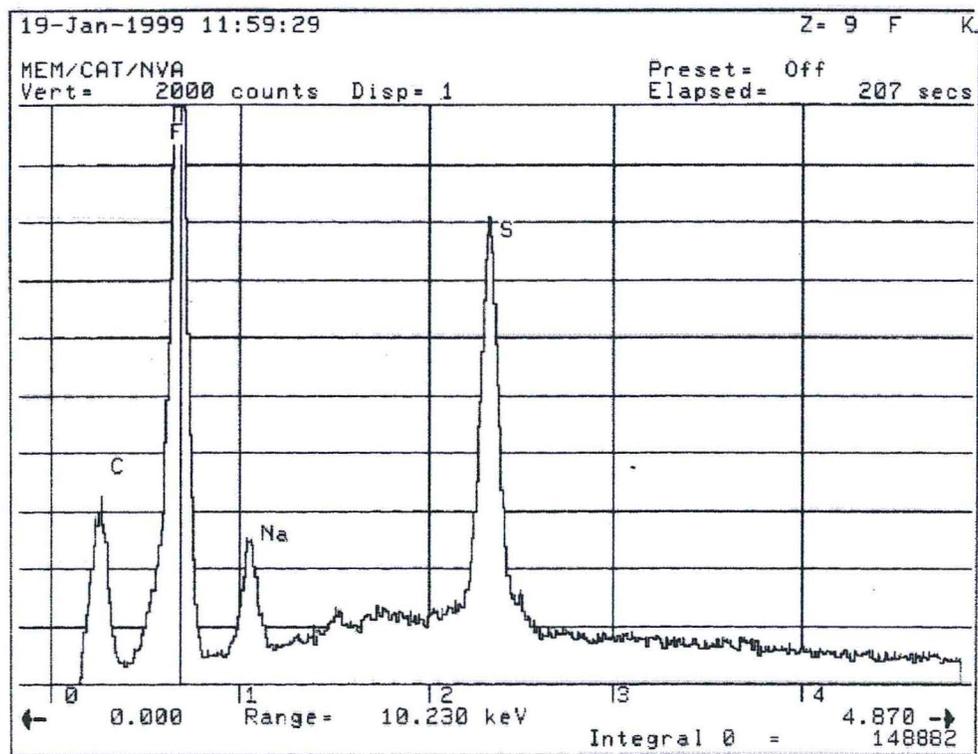
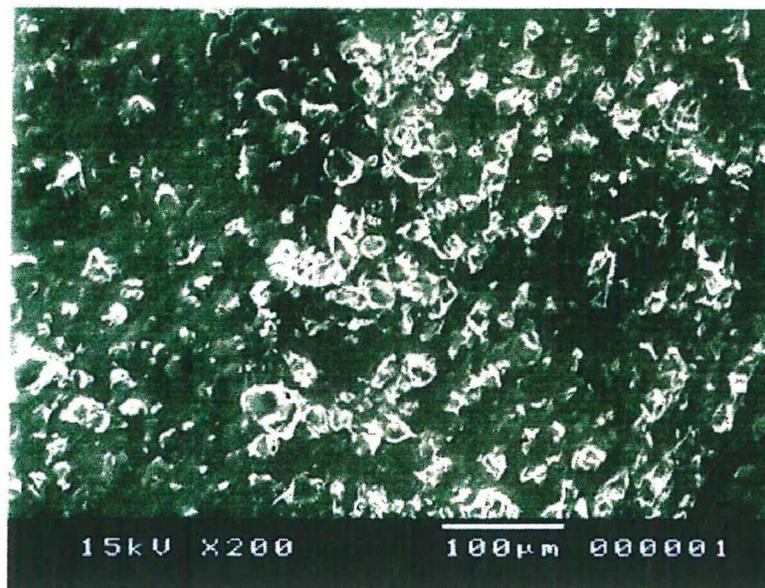


Figura 5.10 En la foto superior se observa una fotografía al microscopio electrónico de la superficie de la membrana catiónica nueva. En la parte inferior se observa que está formada por flúor y azufre, además de carbono y sodio.

5. 6 Pruebas de solubilidad en función del pH

Tanto el suero UF como el ED presentaron el menor contenido de proteína soluble entre los pH's 4.5 y 5.5 (fig. 5.11), observándose una tendencia a elevarse a medida que se alejaba de estos valores de pH. La proteína tuvo su máxima solubilidad a un pH cercano a 7, tanto en las muestras concentradas por ultrafiltración como las desmineralizadas por ED. El suero UF y el ED disminuyeron marcadamente su solubilidad a los pH's señalados probablemente debido a una desnaturalización localizada parcial causada por la fricción de las proteínas con las membranas de UF, (es importante resaltar que el suero desmineralizado por ED, fue concentrado previamente por UF). Como se verá más adelante, no hubo cambios apreciables en el patrón electroforético tanto en electroforesis nativa como en desnaturalizante, ya sea en condiciones reductoras como no reductoras.

Es bien conocido que la solubilidad de una proteína depende del pH de la solución. Una proteína en un sistema acuoso tiene una carga neta de cero en su punto isoeléctrico y no ocurre migración si se aplica un campo eléctrico. En el pH del punto isoeléctrico, usualmente tiene la menor solubilidad ya que las interacciones proteína-proteína aumentan porque las fuerzas electrostáticas de las moléculas están en un mínimo y menos agua interactúa con las moléculas de proteína, ésta, es una condición favorable para que las moléculas de proteína se acerquen unas a otras, se formen agregados y precipiten (Vojdani, 1996). El comportamiento que tuvieron las muestras no tratadas de suero, indica que su solubilidad se mantuvo más o menos constante en toda la escala de pH; esto concuerda con lo que reporta González y Damodaran (1990) y Damodaran (1996), con respecto a suero dulce no desnaturalizado, e incluso observan que el suero es altamente soluble hasta en su punto isoeléctrico. Esto podría explicarse en base a que las propiedades iónicas de las proteínas afectan sus propiedades de solubilidad y a la presencia de iones Ca^{2+} que probablemente mejoran la solubilidad de la mezcla de proteínas. Como se observa en la figura 5.11, las proteínas del suero, fueron altamente solubles en un intervalo de pH entre 2 y 9. Esta observación sugiere que la solubilidad de las proteínas no solamente depende de su hidrofobicidad promedio, de la proporción de sus aminoácidos con carga y de la interacción termodinámica con el solvente; sino

que, la hidrofobicidad y la hidrofiliidad superficiales de la proteína pueden tener un efecto directo sobre su solubilidad (Damodaran, 1996).

Muchas proteínas son completamente insolubles en su punto isoeléctrico, mientras otras son solubles, por ejemplo, β -lactoglobulina es casi 90% soluble en su punto isoeléctrico en una solución acuosa (1 mg/mL, pH 5.1), mientras que la caseína y la α -lactoalbúmina son 2.4 % (pH 4.6) y 68 % (pH 5.0) solubles, respectivamente a una concentración similar (1 mg/mL). Además, a pH por encima y por debajo del punto isoeléctrico, donde una proteína tiene una carga neta positiva o negativa, más agua interactúa con las cargas de la proteína. La carga neta y la repulsión de cargas contribuyen a una mayor solubilidad y la proteína puede estar en solución. Valores de pH extremos, sea ácidos o básicos, provocan desdoblamiento de la proteína, exponiéndose más sus grupos hidrofóbicos. El desdoblamiento (desnaturalización) a pH's muy ácidos o muy básicos ocurren por una disminución en los enlaces electrostáticos (Vojdani, 1996).

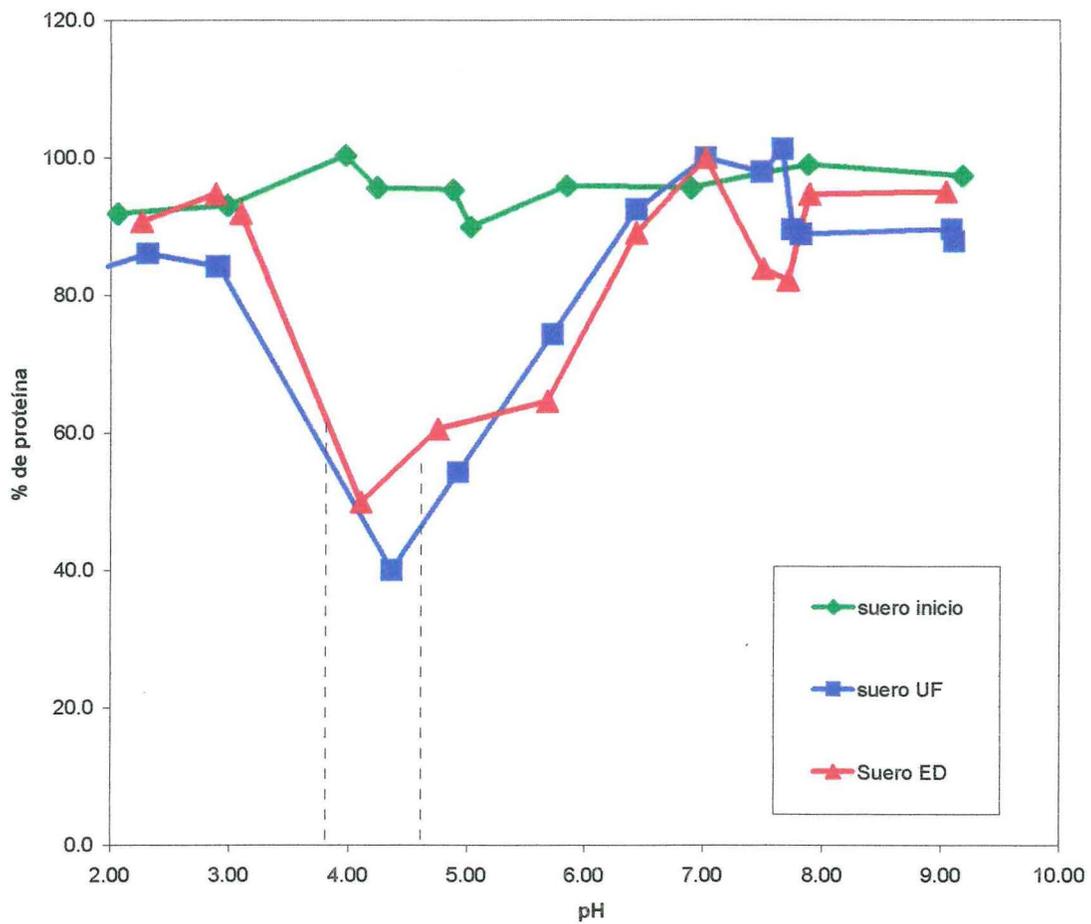


Figura 5.11 Solubilidad del suero en diferentes etapas del proceso en función del pH. Se marca la región de menor solubilidad del suero concentrado por UF y del desmineralizado por ED. El coeficiente de variación fue menor al 5 %.

5. 7 Estimación del Índice de Actividad emulsificante (IAE)

Como se observa en la tabla 5.6, los valores de IAE para las muestras medidas a pH 7 fueron mayores, lo que indicó que presentaron mejores propiedades como agente emulsificante.

Tabla 5.7 Estimación del Índice de Actividad Emulsificante para proteínas de suero a dos pH's (Amortiguador de fosfatos de fuerza iónica = 0.1 M)

MUESTRA	INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (m ² g ⁻¹)	
	pH 4	pH 7
Suero sin tratamiento	11.00	61.99
Suero UF	21.00	81.23
Suero ED	28.00	101.94

Es importante notar que el suero desmineralizado presentó un mejor IAE, lo que significó que la presencia de minerales afectó negativamente la capacidad de las proteínas analizadas a actuar como emulsificante. Se observó que la emulsión de una solución de proteína de suero desmineralizado a pH 7, continuó siendo estable después de 3 semanas de almacenamiento a temperatura de refrigeración (4 ± 1 °C). Un valor semejante del IAE del suero obtenido por electrodiálisis a pH 7, fue obtenido por Pearce y Kinsella (1978) a pH 6.5 y con una concentración de proteína del 0.5 %, empleando un amortiguador de fosfatos para ajustar su fuerza iónica a 0.1 M.

Según lo reportado por Kato y Nakai (1980), Voutsinas et al., (1983) y Nakai (1983), existe una fuerte correlación entre la hidrofobicidad superficial, la tensión interfacial y el Índice de Actividad Emulsificante (IAE). Aunque existe una correlación positiva entre la hidrofobicidad superficial y las propiedades emulsificantes, algunas evidencias sugieren que esta relación no es absoluta, por ejemplo: Aunque la hidrofobicidad superficial de la β -lactoglobulina es mayor a pH 3 que a pH 7, la proteína exhibe mejores propiedades emulsificantes a valores de pH superiores a 7

que a pH = 3 (Shimizu et al., 1985), lo que también concordó con lo observado en este trabajo para el suero concentrado y desmineralizado (tabla 5.7).

La mayoría de las emulsiones estabilizadas por proteínas son estables cuando el pH de la emulsión está alejado del punto isoeléctrico de las proteínas (Shimizu et al., 1981; Shimizu et al., 1985; Das y Kinsella, 1989). En éstas regiones de pH, las repulsiones electrostáticas son máximas; esto concordó con los resultados obtenidos ya que en general, cualquier tipo de suero mostró mejor IAE a pH 7, que es un valor lo suficientemente alejado del punto isoeléctrico de las proteínas del suero lácteo.

5. 8 Evaluación de las proteínas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

De acuerdo a los termogramas obtenidos (figura 5.12), se observó que a temperaturas menores de 50 °C ocurre una fusión, sin embargo, con los datos que se cuenta no fue posible asociarla a un evento en particular. Entre 75° y 125 °C se presentó la fusión de la lactosa hidratada y, dependiendo del contenido de humedad de las muestras, se observaron ligeras modificaciones de la temperatura a la que ocurre esta transición. El pico entre 135° y 150 °C fue asociado a la cristalización de la lactosa, cuyo intervalo también se vió afectado por el agua contenida en cada una de las muestras. En el intervalo de 135° y 225 °C se presentó nuevamente una fusión, que fue asociada a lactosa. Estas deducciones se hicieron en base al termograma de lactosa pura reportado por Roos y Karel (1991).

Se observaron modificaciones en el termograma del suero pretratado, con respecto al obtenido en el suero sin tratamiento. Esto pudo deberse a que se añadió HMP para formar complejos con los iones calcio presentes, los cuales ya no pudieron hidratarse, dejando una mayor disponibilidad de agua en el sistema.

El suero concentrado por ultrafiltración y el desmineralizado presentaron el 50 % y el 8% del calcio contenido en el suero inicial y sus termogramas presentaron perfiles similares. Sin embargo, se requeriría secar las muestras y hacer el análisis a diferentes valores de actividad de agua para discernir apropiadamente los picos.

Se observó un pico de fusión entre 55° y 125 °C que fue asociado a la lactosa. También se observó un pico de fusión más definido a temperaturas de 230 °C, el cual probablemente puede atribuirse a la fusión de proteínas no detectadas en las

otras etapas del procesamiento, dado que el contenido de proteína se incrementó alrededor de tres veces (de 15 % a 42%, tanto en la muestra en polvo ultrafiltrada, como en la desmineralizada). Estas observaciones concuerdan con los resultados de Roos y Karel (1991), ya que ellos comprobaron que la presencia de pequeñas cantidades de agua modifican los parámetros de cambios de fase como la temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_{cr}) y temperatura de fusión (T_m) de azúcares puros y en mezcla. Las muestras del suero liofilizado, contenían una buena proporción de lactosa (Tabla 5.2), habiéndose reportado (Roos y Karel, 1991) que cuando la lactosa en estado amorfo (presente en las muestras de suero liofilizadas) se encuentra en mezcla con otros azúcares o polímeros (proteínas), el comportamiento de cambio de fase cambia drásticamente respecto a cuando se encuentra en estado puro. Por esta razón los parámetros de cambio de fase típicos de la lactosa pura no corresponden a los encontrados en los termogramas del suero sometido a los diferentes tratamientos aquí reportados.

Por otra parte, según los mismos autores, un azúcar en estado amorfo (lactosa) debe estar a temperatura por encima de T_g a fin de cristalizar para posteriormente fundir, lo que coincide con lo observado en los termogramas obtenidos (figura 5.12).

Por otra parte, los reportes de Erdogdu et al., (1995) acerca del análisis térmico de fracciones de leche descremada no muestran la aparición de picos de lactosa, pese a que se menciona como un constituyente importante de las fracciones de suero analizadas. Las muestras analizadas contenían 66 % de humedad, sin embargo, no se reporta la presencia de lactosa en los termogramas. Por otra parte, Lupano y González (1999) analizaron el comportamiento térmico de WPC cuya composición incluye un 3.1 % de humedad y 38.7% lactosa, sin embargo, tampoco hicieron referencia a la aparición de lactosa en los termogramas obtenidos.

Bernal y Jelen (1985) estudiaron la estabilidad térmica de proteínas de suero mediante calorimetría diferencial de barrido y tampoco mencionaron la aparición de picos de lactosa en los termogramas. Dieron las temperaturas de desnaturalización de proteínas puras presentes en el suero a diferentes pH's, estando éstas en el intervalo de 58° a 75 °C; no obstante, al determinar los mismos valores en un WPC no mencionaron la posible interferencia de la lactosa, que constituía el 38% de los sólidos.

En estos reportes no se establece una estandarización de las condiciones utilizadas para las mediciones térmicas, y tampoco mencionan a la lactosa como responsable de algunos de los picos que aparecen en sus termogramas, lo que evidencia un gran vacío en cuanto a esta información.

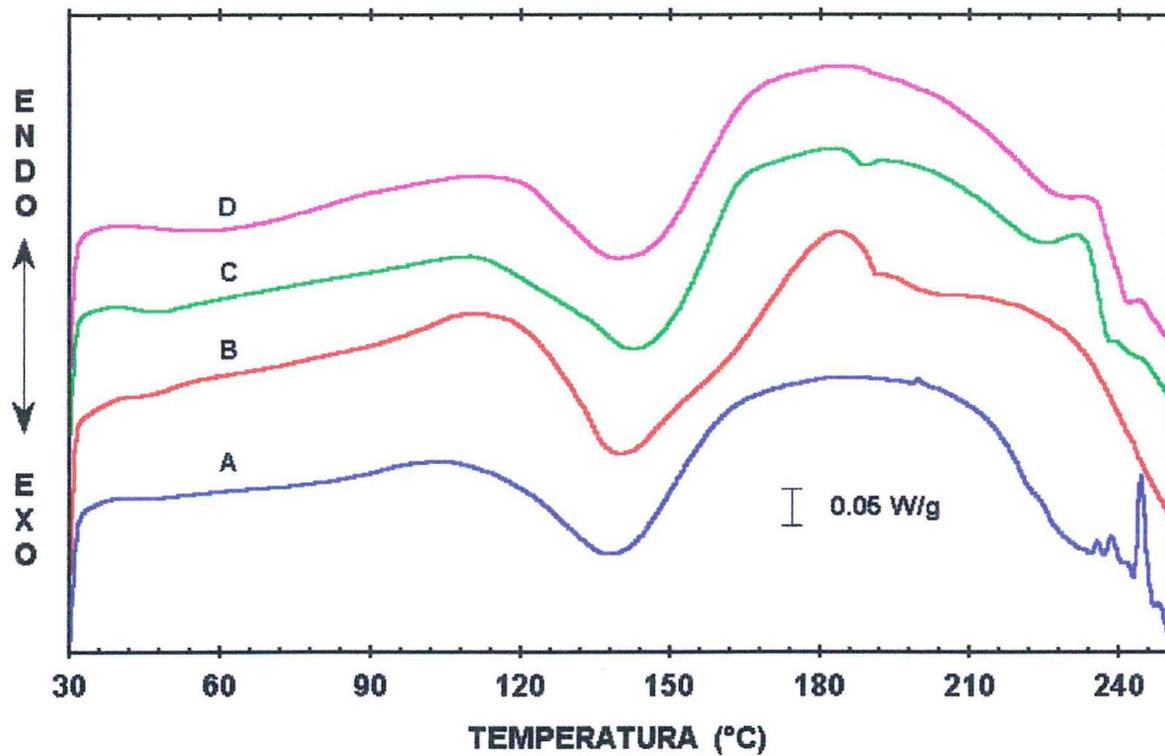


Figura 5.12 Termogramas del DSC para suero lácteo. (A) Suero sin tratamiento, (B) suero pretratado para eliminar calcio, (C) suero concentrado por UF (D) suero concentrado y desmineralizado por ED. La velocidad de calentamiento fue 5°C/min.

5. 9 Análisis electroforético de las proteínas.

5.9.1 Electroforesis nativa.

Se realizó electroforesis nativa en geles de poliacrilamida a pH 8.8 para las muestras en cada etapa del procesamiento del suero. El perfil electroforético se muestra en la figura 5.13. Como puede observarse, la β -lactoglobulina se separó en sus dos sub-unidades. En la figura 5.13, la α -lactoalbúmina corrió menos, pero como se colocó un estándar de α -lactoalbúmina pudo asociarse con su presencia. El patrón de bandas de las muestras de suero sin tratamiento, suero UF y suero concentrado ED fueron semejantes, lo que indicó que no hay diferencia en las fracciones proteicas presentes. Por otra parte, con esta electroforesis se observó que las subunidades de la β -lactoglobulina son semejantes pero no idénticas.

5.9.2 Electroforesis desnaturalizante.

La electroforesis desnaturalizante se realizó en condiciones reductoras y no reductoras con un gel de poliacrilamida de pH de 8.8 y 7.2. El perfil electroforético de las muestras corridas en un gel de pH 8.8 se muestran en las figuras 5.14 A y B, respectivamente.

En estos dos geles, se observan los pesos moleculares de las diferentes proteínas que se utilizaron como estándares; ocurriendo una reducción de la β -lactoglobulina en las muestras de suero en todas las etapas del procesamiento. Sin embargo, tanto para condiciones reductoras como no reductoras, se formaron los mismos patrones de bandas, independientemente del tipo de muestra de suero que se tratara (inicio, UF o ED), lo que indicó que no hay modificación en las fracciones proteicas presentes después de aplicar los tratamientos. Es importante recalcar que en estos geles en condiciones desnaturalizantes ya no hubo separación tan notoria de las dos sub-unidades de la β -lactoglobulina que sí se observaron en los geles de electroforesis nativa.

Para comprobar si el rompimiento del enlace disulfuro de la β -lactoglobulina era causado al aplicar la electroforesis a pH = 8.8, se corrió una electroforesis con geles de poliacrilamida a pH = 7.2, llevándose a cabo tanto en condiciones reductoras como no reductoras (figuras 5.15 A y B, respectivamente).

En la electroforesis con un gel a pH = 7.2 en condiciones reductoras (figura 5.15 A), y en condiciones no reductoras (figura 5.15 B), se observaron patrones de bandas similares, por lo que se pudo decir que no hubo cambios en la β -lactoglobulina, ya que ésta presentó dos sub-unidades con peso molecular semejante, pero no idéntico. Como se observó, no hubo diferencia de movilidad comparada con la observada en los geles de poliacrilamida a pH = 8.8, por lo que se concluyó que de haber cambios en las proteínas del suero, estos son pequeños como para ser evidenciados con la electroforesis.

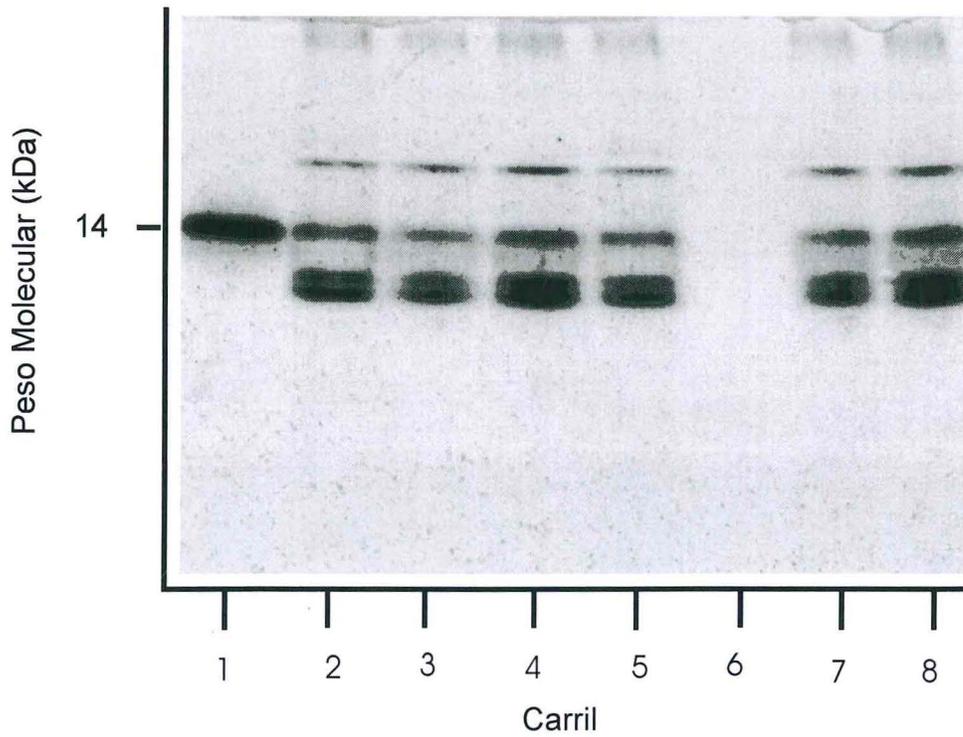


Figura 5.13. Electroforesis nativa, pH 8.8. Carriles: 1) α -lactoalbúmina (Sigma); 2) y 5) suero sin tratamiento; 3) y 7) suero UF; 4) y 8) suero ED.

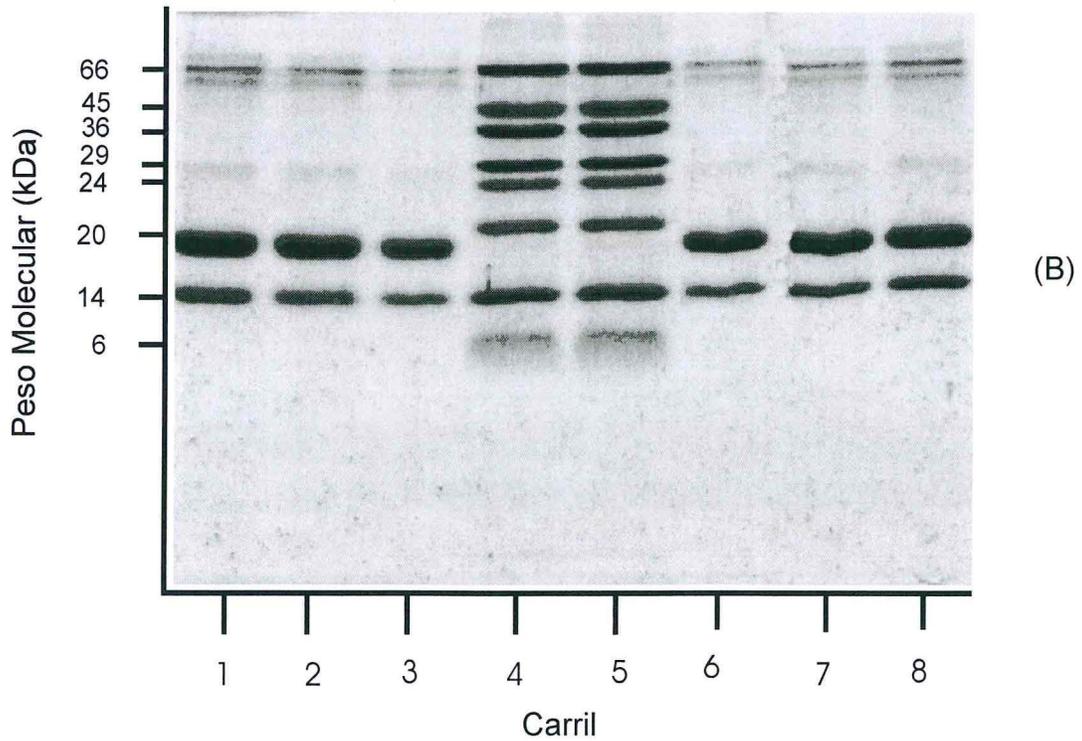
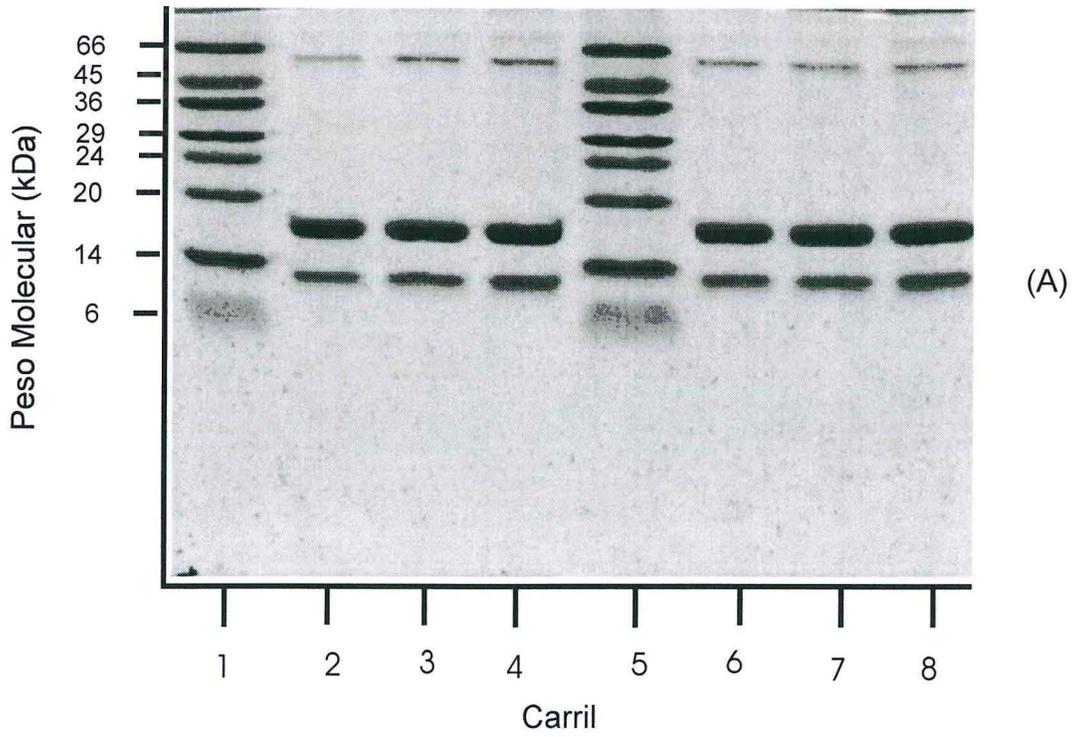


Figura 5.14. Electroforesis desnaturalizante, pH 8.8. (A) Condiciones reductoras. Carriles: 1) y 5) marcadores de peso molecular; 2) y 6) suero sin tratamiento; 3) y 7) suero UF; 4) y 8) suero ED. (B) Condiciones no reductoras. Carriles: 1) y 6) suero sin tratamiento; 2) y 7) suero UF; 3) y 8) suero ED; 4) y 5) marcadores de peso molecular.

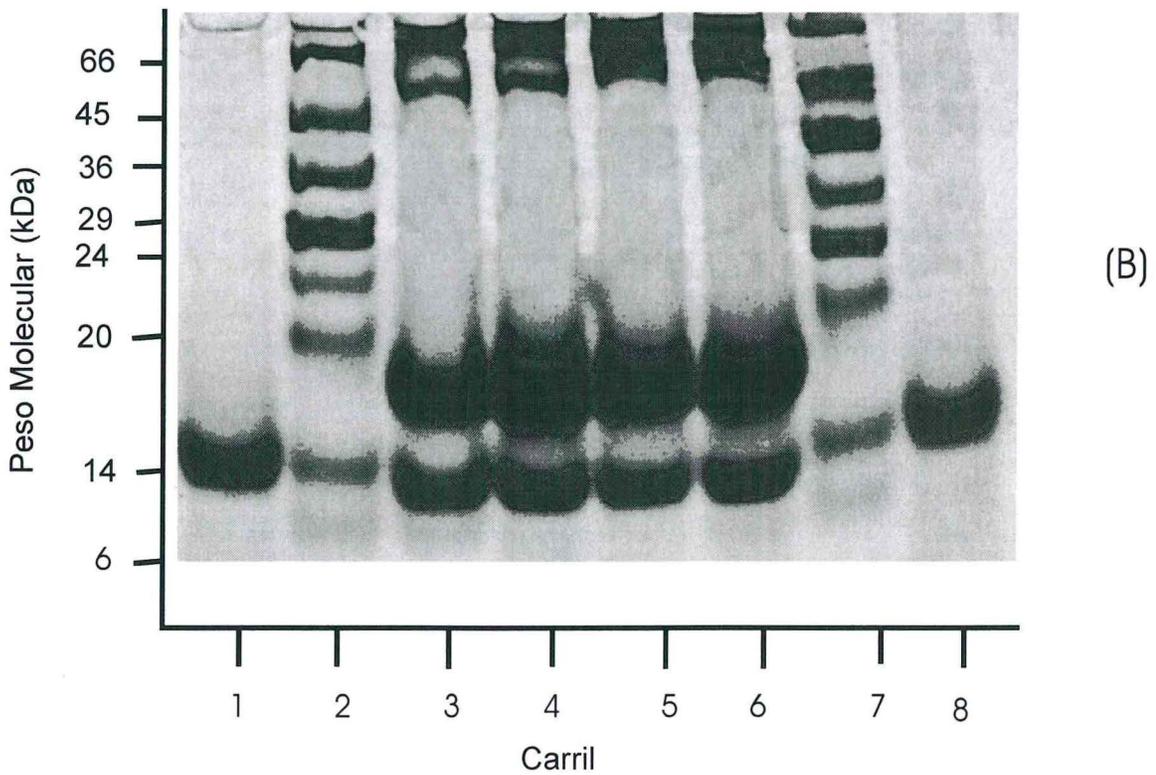
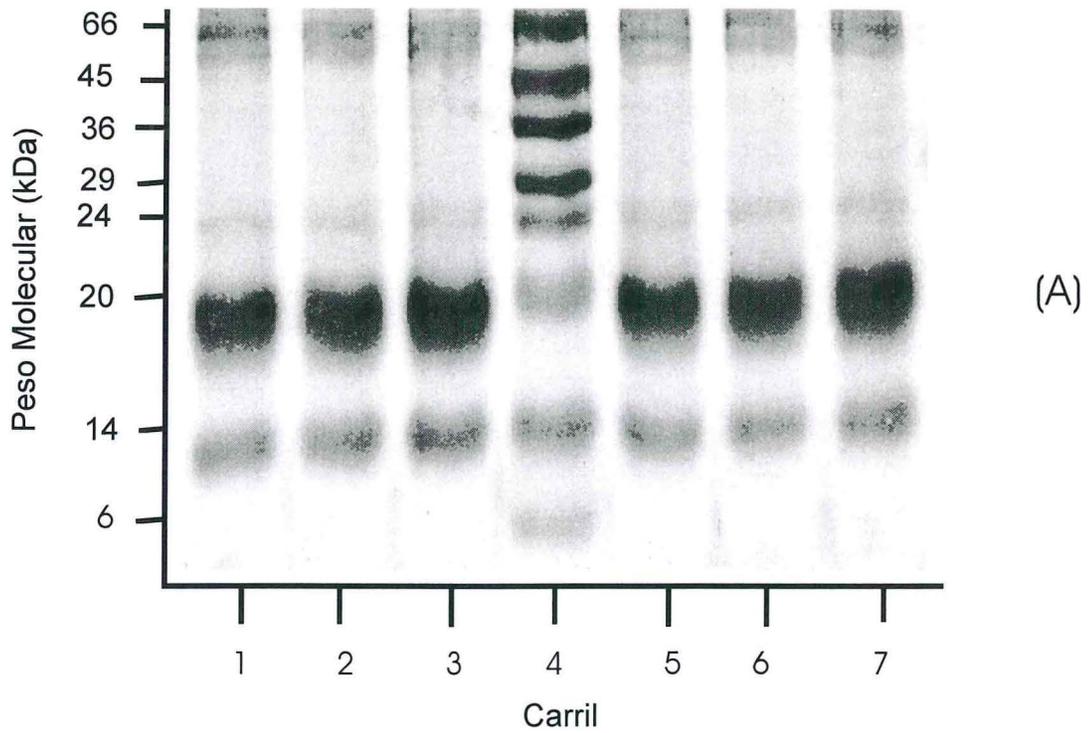


Figura 5.15. Electroforesis desnaturalizante, pH 7.2 (A) Condiciones reductoras Carriles: 1) y 5) suero sin tratamiento; 2) y 6) suero UF; 3) y 7) suero ED; 4) marcadores de peso molecular. (B) condiciones no reductoras. Carriles: 1 y 8) α -lactoalbúmina; 2 y 7) marcadores de peso molecular; 3) suero inicial; 4) suero pretratado; 5) suero UF; 6) suero ED.

6. CONCLUSIONES

La presencia de calcio en el suero produjo un ensuciamiento de la membrana de ultrafiltración, según las fotografías al microscopio electrónico. Esto resultó en una reducción significativa del flux, por lo que es esencial realizar un pretratamiento del suero para eliminar calcio y alargar la vida útil de las membranas.

Después del proceso de electrodiálisis (20 min.), la microscopía electrónica no evidenció depósitos de calcio en la membrana aniónica, pero sí de proteína aún después de lavar con NaOH 0.1 M. Por otro lado, la membrana catiónica no presentó depósitos superficiales de calcio ni de proteína.

Debido a la pequeña área del módulo de ultrafiltración usado, se usaron tiempos largos de proceso, que pudieron ocasionar cambios fisicoquímicos de la proteína medidos a través de las pruebas funcionales. No obstante, debe considerarse que en el suero inicial la lactosa tenía una baja concentración, mientras que en los sueros tratados (UF y ED), la concentración de la lactosa se incrementó más de 10 veces y la del calcio disminuyó significativamente. Se concluye entonces que, la elevada concentración de lactosa y la baja concentración de calcio son los principales responsables de los cambios observados en la solubilidad de los sueros tratados por UF y ED. Por otro lado, se recomienda usar una mayor área filtrante o reducir el tiempo de procesamiento en la UF para obtener una concentración similar a la obtenida en este trabajo, con menor probabilidad de daño térmico a la proteína.

La corriente límite calculada para desmineralizar el suero lácteo, determina la máxima corriente que puede aplicarse sin que ocurra la retromigración de protones del anolito. Este fenómeno es indeseable, ya que resulta en una disminución del pH en el suero, con la consecuente precipitación de la proteína.

La desmineralización de suero lácteo por electrodiálisis podría incurrir en menores costos de operación al aprovecharse el NaOH concentrado obtenido simultáneamente en el compartimiento catódico.

El suero concentrado y desmineralizado tuvo una solubilidad mínima a pH entre 4 y 4.5, mientras que a pH cercano a 7 se observó su máxima solubilidad (3 veces mayor que la mínima).

El intervalo de pH al cual se observó la mayor solubilidad coincidió con el de mayor IAE (pH cercano a 7). El suero desmineralizado mostró la máxima actividad emulsificante, permaneciendo estable la emulsión aún después de tres semanas de almacenamiento a 4 °C. Por lo cual se concluye que el IAE es significativamente afectado por la presencia de sales.

El estudio térmico de las muestras obtenidas durante las diferentes etapas del procesamiento del suero mediante DSC mostró que la lactosa se encuentra como un sólido amorfo que funde y recristaliza, dado que se encuentra en elevada proporción y evita que pueda observarse la respuesta de las proteínas, en las temperaturas donde se espera la desnaturalización (50-75 °C). Sin embargo, en los sueros UF y ED debido a la mayor concentración de proteína, se observó un pequeño evento de fusión a temperatura entre 200° y 225 °C que es probable que corresponda a la proteína.

El análisis electroforético de las proteínas del suero no mostró cambios en el patrón de las bandas de proteína para los diversos tratamientos, por lo cual se concluyó que el procesamiento no produjo una desnaturalización observable por este método, ya que la β -lactoglobulina apareció en sus dos subunidades desde la muestra sin tratamiento.

7. PERSPECTIVAS

Con este trabajo se pretende aumentar el valor agregado del suero líquido producido en la región, que actualmente representa un subproducto de la industria quesera.

La caracterización de los procesos de ultrafiltración y electrodiálisis, permite la posibilidad de escalamiento a nivel industrial, dado que se evaluaron los parámetros básicos de operación de cada proceso.

La evaluación de la modificación de las proteínas permite recomendar al producto obtenido para su posible utilización dentro de la industria, en alimentos con pH's > 4.5, como puede ser en la elaboración de aderezos para ensaladas, ya que puede proporcionar atributos parecidos a la grasa, permitiendo una reducción en el contenido de ésta; así como leches maternizadas por la alta calidad del suero y por la gran demanda mundial de este producto ya que posee proteínas de alta calidad. Los productos del suero son ricos en tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y otros nutrientes (U.S. Dairy Export Council, 1997). Por otra parte, puede recomendarse como agente de emulsificación ya que la presencia de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en la estructura de sus proteínas permite la creación de emulsiones estables, previniendo que los glóbulos de grasa formen una gran masa; presenta la ventaja adicional de proporcionar menor contenido de colesterol que la yema de huevo debido a que, prácticamente no contiene grasa, lo que es muy atractivo para los consumidores que se preocupan por su salud. Por sus propiedades emulsificantes a pH cercanos a 7, también puede emplearse en la fabricación de helados, alimentos horneados, bebidas, entre otros (U.S. Dairy Export Council, 1997).

Se recomienda para futuros trabajos, evaluar otras propiedades funcionales (gelatinización, espumado) que puede tener este producto para ampliar su posibilidad de aplicación en la industria, así como los cambios de las proteínas en el tiempo y temperatura de concentración y su efecto en tales propiedades.

En cuanto a los análisis de calorimetría diferencial de barrido, se recomienda utilizar un sistema de hidratación de las muestras bajo condiciones controladas, semejante a

lo recomendado por Roos y Karel (1991). Todo esto complementado por un análisis térmico de gelación para evaluar su perfil G' y G'' , además de su ángulo delta. Esto sería importante dado que existe un tremendo vacío en la literatura sobre la evaluación de cambio de fase y reológicas de este tipo de muestras.

8. REFERENCIAS

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. (15th. Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. 33:10,13,61; 42:7.
- Anema S.G. y Mckenna, A.B. 1996. Reaction Kinetics of Thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *J. Agric. Food Chem.* 44, pp.422-428.
- Arntfield, S.D., Ismond y M.A. Murray, E.D. 1990. Thermal Analysis of food proteins. En *Thermal analysis of food*. V.R. Harwalkar y C.Y. Ma (Eds). Elsevier Applied Science. London. pp. 51-53.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York. pp.
- Batchelder, B.T. 1993. Electrodialysis method for demineralization of liquid, whey-based material. U S Patent 5 223 107.
- Ben R. A. y Vladan, M. 1989 La placa des techniques à membrane dans les procédés propes. *Industry and Environment*. January-March. pp. 15-26.
- Bernal, V. y Jelen P. 1985. Thermal Stability of Whey Proteins. A calorimetric Study. *J. Dairy Sci* 68. No. 11. pp. 2847-2852.
- Biliaderis, C.G. 1983. Differential Scanning Calorimetry in food research-a review. *Food Chem.* 10:239-265.
- Boer, R. D. y Robbertsen, T. 1983. Electrodialysis applications in whey processing. 1986 International Whey Conference Chicago, 27-9 October. pp. 15-25.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breslau, B.R. y Kilcullen, B.M. 1977. Hollow fiber ultrafiltration of cottage cheese whey; performance study. *J. Dairy Sci.*, 60, 1379-86.
- Brocklebank, M.P. 1990. Downstream processing plant and equipment. En *Separation Processes in Biotechnology*. J.A. Asenjo (Ed). New York. Marcel Dekker. 19, 617-740.
- Bylund, G. 1995. Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund. pp. 123-132, 331-352.
- Damodaran S. 1989. Interrelationship of molecular functional properties of food proteins. En *Food Proteins*. J.E. Kinsella y W.G. Soucie (Eds). American Oil Chemists Society, Champaign, Il pp. 21.

- Damodaran S. 1996. Functional Properties. En Food Proteins: Properties and characterization S. Nakay, H.W. Modler, (Ed). Wiley-VCH New York. 4, pp. 167-234.
- Das, K.P. y Kinsella, J.E. 1989. pH-Dependent emulsifying properties of β -lactoglobulin. J. Dispersion Sci. Technol. 10 pp. 77-102.
- De Wit, J. N. 1981a. Functional properties of Whey proteins. En Developments in Dairy Chem-4, Functional Milk Proteins. P. F. Fox (Ed). Elsevier Applied Science, New York. pp. 285.
- De Wit, J.N. 1981b. Structure and functional behavior of whey proteins. Neth. Milk Dairy J. 35. pp. 47-64.
- De Wit, J.N. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. J. Dairy Sci. 81: 597-608.
- De Wit, J.N., Klarenbeek, G. y Adamse, M. 1986. Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates: 2. Effects of processing history and composition. Neth. Milk Dairy J. 40: 41-56.
- Delaney, R.A.M. y Donnelly, J.K. 1975. Ion exchange/ultrafiltration studies on whey complementary aspects. En Separation Processes by Membranes, Ion exchange and Freeze Concentration in the Food Industry. International Symposium. APRIA, Paris, pp. D 19:1 - D 19:18.
- Erdogdu N., Czuchajowska Z. y Pomeranz Y. 1995. Wheat Flour and Defatted Milk Fractions Characterized by Differential Scanning Calorimetry. I. DSC of Flour and Milk Fractions. Cereal Chemistry. Vol. 72: 70-75.
- Ennis, B.M., Johns, J.E.M. y O'Connell, M.T. 1981. The effect of the replacement of calcium with sodium on the ultrafiltration of acid whey, N.Z.J. Dairy Sci., Technol., 16: 69-78.
- Farell, H.M. y Thompson, M.P. 1974. Physical Equilibria: Proteins. En: B. Webb, A. Johnson y J. Alford. (Eds). Fundamentals of Dairy Chemistry. AVI Publising Co. Westport, CT, pp 468.
- Genders, J. 1990. Electrodes, membranes and cell design for electrosynthesis. En Electrosynthesis, from Laboratory, to Pilot, to Production.. D. Genders y P. Derek (Ed). Amherst, New York. pp. 80,81.
- Gersten, D.M. 1996. Gel Electrophoresis Proteins. Essential Techniques. John Wiley and Sons. Chichester, pp.60.

- González, J.M. y Damodaran S. 1990. Recovery of proteins from raw sweet whey using a solid state sulfitolysis. *J. Food Sci.* 55 : 1559-1563.
- Gordon, W. y Kalan, E. 1974. Proteins of Milk. En *Fundamentals of Dairy Chemistry*. B. Webb, A. Johnson y J. Alford (Eds). AVI Publising Co. Westport, CT. pp. 87-124.
- Gough, P. y Jennes, R. 1962. Heat denaturation of β -lactoglobulins A y B. *J. Dairy Sci.*, 45: 1033-1039.
- Grindstaff, D.A. 1974. Processing of modified wheys. En *Proc. Whey Products Conf.*, Chicago, Ill, pp. 60-66.
- Groves, M. L., Basch, J.J. y Gordon. W.G .1963. Isolation, characterization, and aminoacid composition of a new crystalline protein, lactollin, from milk. *Biochem.* 2: 814-817.
- Harris, E.L.V. 1995. Concentration of the extract. En *Protein Purification Methods A practical approach*. E.L.V., Harris y S. Angal (Ed). IRL Press. Oxford. pp. 125-157.
- Harris, E.L.V. y Angal, S. 1990. *Protein Purification Applications. A practical approach*. IRL Press. Oxford. pp. 122.
- Harwalkar, V.R. y Ma, C.Y. 1996. Thermal Analysis: Principles and Aplications. En *Food Proteins: Properties and characterization*. S. Nakay, H. Modler, (Eds). Wiley-VCH. New-York. Cap. 8. pp. 405-428.
- Helrich, K. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15 th. Ed. Washington, D.C. JAOAC 74: 281.
- Hemley, R. Kohler, E. y Sibiski, P. 1979. Absorption spectra for the complexes formed from vitamin A and β -lactoglobulin. *Biophys. J.* 28:447-455.
- Hiddink, J., De Boer, R. y Nooy, P.F.C. 1981. Effect of various pre-treatments on the ultrafiltration of sweet cheese whey at about 55 °C. *Milchwissenschaft*, 36:657-663.
- Hill, S.E. 1996. Emulsions. En *Methods of Testing Protein Functionality*. G.M. Hall, (Ed). Blackie Academic & Professional. London. pp. 170-177.
- Hiraoka, Y., Itoh, K, y Taneya, S. 1979. Demineralization of cheese whey and skimmed milk by electro dialysis with ion exchange membranes. *Milchwissenschaft*, 34:397-400.

- Hitchins, A.D., Feng, P., Watkins, W.D., Rippey, S.R., y Chandler, L. 1992. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. En *Bacteriological Analytical Manual*. 7a. Ed. AOAC International. Arlington. pp. 27-49.
- Hobman, P.G. 1992. Ultrafiltration and Manufacture of Whey Protein Concentrates. En *Whey and Lactose Processing*. J.G. Zadow, (Ed). Elsevier Applied Science. Londres. pp. 196-230.
- Hoppe, G.K. y Higgins, J.J. 1992. Demineralization. En *Whey and Lactose Processing*. J.G. Zadow, (Ed). Elsevier Applied Science. Londres. pp. 92-127.
- Horowitz, M.I. y Pigman, W. 1977. *The Glycoconjugates, Vol. 1, Mammalian Glycoproteins and Glycolipids*. Academic Press, New York. pp.85
- Howell, J., Dove, R. y Kuwata, T. 1990. Manufacture and use of High Protein Whey Products. *Proc. Dairy Prod. Tech. Conf. American Dairy Products Institute, Chicago II*. pp. 43.
- Howell, N. K. 1992. Protein-Protein Interactions. En *Biochemistry of Food Proteins*. B.J.F. Hudson (Ed). Elsevier Science. Publishers. Cambridge. pp. 53.
- Jimenez-Flores R. y Bleck G. 1996. Biotechnology. En *Food Proteins Properties and Characterization*. S. Nakai, y H.W. Modler (Eds). Wiley-VCH. New York. pp. 524.
- Kato A. y Nakai, S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 624:13-20.
- Kessler, H.G. 1981. Ultrafiltration-processing variables. En *Food Engineering and Dairy Technology*, Kessler, A. (Ed). Alemania. pp 86-100.
- Kilara, A. y Harwalkar, V.R. 1996. Denaturation. En *Food Proteins. Properties and Characterization*. S. Nakai, y H.W. Modler (Eds). Wiley-VCH. New York Cap. 3 pp. 71-166.
- Kilara A. y Sharkasi, T.Y. 1986. Effects of temperature on Food Proteins and its implications on functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 23: 323-395.
- Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of food proteins: A review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7:219-280.
- Kinsella, J. E. 1982. Relationship between structure and functional properties of Food Proteins. En *Food Proteins*, P.F. Fox y J.J. Conden (Eds.) Applied Science Publishers, London. pp. 51-103.

- Kinsella, J. E. y Phillips, L.G. 1989. Structure: Function relationships in Food Proteins. En Food proteins, J. E. Kinsella y W. G. Soucie (Eds.) Am. Oil Chem. Soc. Champaign, Ill. pp.52.
- Kjaergaard, G. y Oxlund, J.K. 1988. Concentration and drying of whey and permeates. Bulletin of IDF238. New York.. pp. 4-20.
- Leitz, F. y Eisenmann, J. 1981. Electrodialysis as a Separation Process. Lectures in Electrochemical Engineering. AIChE symposium Series. American Institute of Chemical Engineers. No. 204, Vol. 77 : 204-212.
- Lupano C. y González S. 1999. Gelation of Whey Protein Concentrate-Cassava Starch in Acidic Conditions. J. Agric. Food Chem. 47: 918-923.
- Marshall, R. 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16 th. Edition. American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 437,438, 465-469, 490,491,504-508.
- Mc Gregor, W. C. 1986. Selection and use of ultrafiltration membranes. En Membrane Separations in Biotechnology. W.C. Mc Gregor (Ed.) Marcel Dekker. New York. 1, pp. 1-35.
- Mc Kenzie, H.A. 1971. Milk Proteins. Chemistry and molecular biology. Academic Press. Vol II. New York. Cap. 1. pp. 14
- Melachouris, N. 1977. Process for recovery of whey protein having improved solution clarity using polyphosphates. U S Patent 4 043 990.
- Moreno, A. 1999. Calorimetría diferencial de Barrido. En Avances en purificación y Aplicación de enzimas en Biotecnología. L.A. Prado Barragán, S. Huerta Ochoa, G. Rodríguez Serrano, G. Saucedo Castañeda (Eds) Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp.181- 193.
- Mulder, M. 1991. Basic Principles of Membrane Technology. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 110-311.
- Murray, P. 1995. Electrodialysis and Electrodialysis Reversal. Manual of Water Supply Practices AWWA Manual M38. American Water Works Association. Denver. pp.22, 29-31.
- Myers, C.D. 1990. Study of Thermodynamics and kinetics of protein stability by thermal analysis. En Thermal Analysis of Food. V.R. Harwalkar y C.Y. Ma. (Eds). Elsevier Applied Science. London. pp. 16-50.
- Nakai, S. 1983. Srtructure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance or protein hidrophobicity. J. Agric. Food Chem. 31: 676-683.

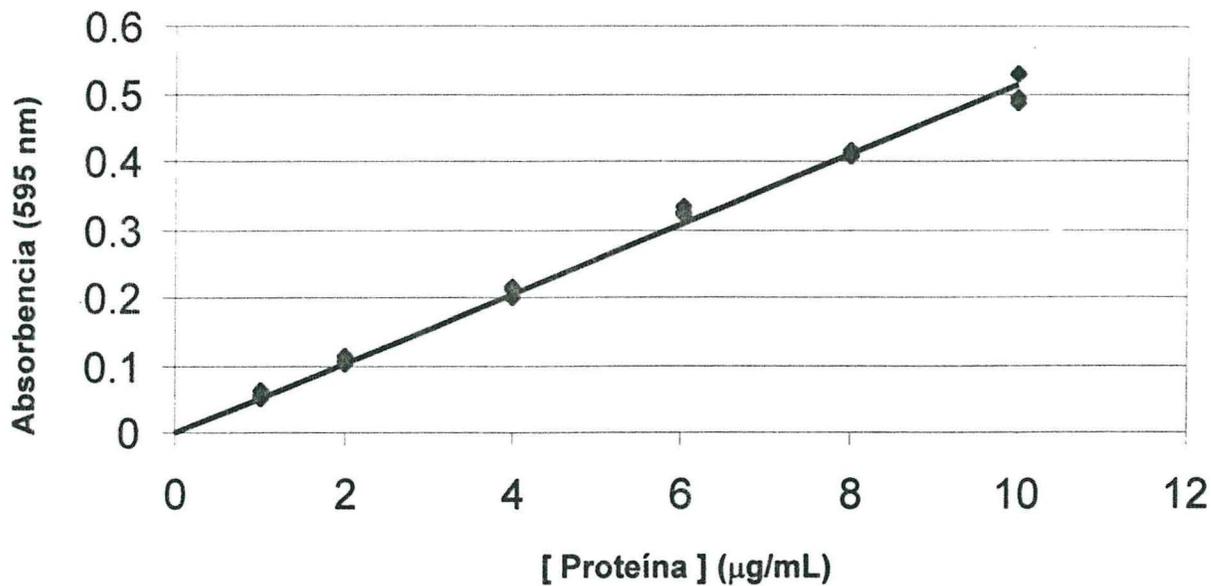
- Nielsen, P.S. 1988. Membrane filtration for Whey Protein Concentrate. Marketing Bulletin. APV Pasilac A S, Aarhus, Denmark.
- Okada, K., M. Tomita y Y. Tamura. 1977. Electrodialysis in the treatment of dairy products. Part 2. Development of electrodialysis plant. *Milchwissenschaft*, 32: 1-8.
- Parry, R.M. 1974. Milk Coagulation and Protein Denaturation. En *Fundamentals of Dairy Chemistry*. B.H. Webb, A.H. Johnson y J.A. Alford (Eds). AVI Publishing Co. Inc. Westport, CT. pp. 603 -661.
- Paulsson, M y Dejmek. 1990. Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studied by differential scanning calorimetry. *J. Dairy Sci.* 73: 590-600.
- Paulsson, M. 1990. Thermal denaturation and gelation of whey proteins and their adsorption at the air/water interface. Ph. D. Thesis, University of Lund, Sweden.
- Pearce, K.N. y Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins. Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716-723.
- Pearce, R.J. 1992. Whey Processing. En *Whey and Lactose processing*. J.Z. Zadow (Ed). Elsevier Applied Science. London. pp.74-77.
- Pearson, H. E. 1987. *Análisis Químico de los Alimentos*. Ed. Valdivia. México. pp. 18-45.
- Peeler, J.T. y Maturin, L.J. 1992. Aerobic plate count. En *Bacteriological Analytical Manual*. 7a. Ed. AOAC International. Arlington. Cap. 3. pp. 17-26.
- Privalov, P.L. 1979. Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33:167-241.
- Privalov, P.L. y Klechinashvili, N.N. 1974. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure. *J. Mol. Biol.* 6: 665-684.
- Regenstein, J.M. y Regenstein, C.E. 1984. *Food Protein Chemistry. An Introduction for Food Scientists*. Academic Press. Orlando. pp. 53, 54.
- Rhodes, D. y Laue T. 1990 Determination of Purity. En *Guide to Protein Purification*. M. Deutscher. Academic Press. San Diego. pp. 574,575.
- Rickey Y. Jackman, R., Smith, J. y Marangoni, A. 1996. Analysis: Quantitation and Physical Characterization. En *Food Proteins. Properties and Characterization* S.Nakai, H.W. Modler (Eds). Wiley-VCH. New York. Cap. 7. pp. 333-403.

- Robinson, B. P., Short, J.L. y Marshall, K.R. 1976. Traditional α -lactalbumin manufacture, properties and uses. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 11:114-126.
- Roos Y. y Karel M. 1991. Plasticizing Effect of Water on thermal behavior and cristallization of amorphous food models. *J. Food Sci.* 56:38-43.
- SAGAR, 1998. Boletín Mensual de Leche. Vol. VI. No. 1. pp. 5,16,17,21.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1994. NOM-091-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Leche Pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- Shimizu, M. Kamiya, T. y Yamauchi, K. 1981. The adsorption of whey proteins on the surface of emulsified fat. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2491- 2496.
- Shimizu, M., Saito, M. y Yamauchi K. 1985. Emulsifying and structural properties of β -lactoglobulin at different pHs. *Agric. Biol. Chem.* 49:189-194.
- Short, J.L. y Doughty, R.K. 1977. Demineralization of deproteinated wheys by electro dialysis. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.* 13: 181-194.
- Shukla, T.P. 1972. Chemistry and biological function of α -lactoalbumina. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 3: 241-312.
- Sinner, M. y Puls. J. 1978. Non-corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography. *J. Chromatog.* 156: 197-201.
- Strathmann, H. 1988. Electrodialysis. En *Membrane Separation Systems, Recent Developments and Future Directions*. R.W. Baker, E.L. Cussler, W. Eykamp, W. J. Koros, R.L. Riley y H. Strathmann (Eds). Noves Data Corporation New Jersey, pp. 413-419.
- Swaigood, H.E. 1985. Characteristics of edible fluids of animal origin: Milk. En *Food Chemistry*, O.R. Fennema (Ed). Marcel Dekker. New York. 13: 791 – 827.
- Swaigood, H.E. 1996. Characteristics of Milk. En *Food Chemistry*. O.R. Fennema Marcel Dekker. New York. 14: 842-873.
- Tanaka, T., Matsui, T., Kamaya, M. y Tsuzura, K. 1987. Desalination by electro dialysis in the presence of organic matters. Poster at the International Congress on Membranes and Membrane Process. Tokyo, 8-12, June.
- Tanford, C. 1970. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 24:1-95.

- Tejeda, A., Montesinos, R.M. y Guzmán, R. 1995. Bioseparaciones. Ed. Unison, Sonora, Cap. 10. pp. 548 – 616.
- Timasheff, S. N. y Townend, R. 1961. Molecular interactions in β -lactoglobulin below the isoelectric point. *J.Am.Chem.Soc.* 83: 464-469.
- Timasheff, S.N. 1964. The Nature of Interactions in Proteins Derived from milk. En *Symposium on Foods. Proteins and their Reactions.* H.W. Schultz, A.F. Anglemier (Eds). AVI Publishing Co. Westport. pp.179 – 208.
- Townend, R. y Timasheff, S.N. 1957. The molecular weight of β -lactoglobulin. *J.Am.Chem.Soc.* 79 :3613-3614.
- Townend, R. y Timasheff, S.N. 1960. Molecular interactions in β -lactoglobulins III. Light Scattering investigation of the stoichiometry of the association between pH 3.7 and 5.2. *J.Am.Chem.Soc.* 82: 3168-3174.
- Vojdani F. 1996. Solubility En *Methods of Testing Protein Functionality.* G.M. Hall (Ed). Blackie Academic & Professional. London. pp.11-18, 49-55.
- Voutsinas, L.P. Cheung, E. y Nakai, S. 1983. Relationship of hydrophobicity to emulsifying properties on heat denatured proteins. *J. Food Sci.* 48: 26-32.
- Webb, B. 1974. *Fundamentals of Dairy Chemistry.* B. Webb, A. Johnson y J. Alford (Eds). AVI Publishing Co. Westport, CT, pp. 87-124.
- Weber, W.J. 1972. *Physicochemical Processes for Water Quality Control* (Ed) John Wiley and Sons. New York. pp. 308-359.
- Whitney, R.M., Brunner, J.R., Ebner, K.E., Farrell, H.M., Josephson, R.V., Moor, C.V. y Swaisgood, H.E. 1976. Nomenclature of proteins of cows milk, 4th rev. *J. Dairy Sci.* 59: 795-815.
- Yada, R.Y., Jackman, R.L., Smith, J.L. y Marangoni, A.G. 1996. Analysis: Quantitation and Physical Characterization En *Food Proteins: Properties and Characterization.* S. Nakai, H.W. Modler (Eds). Wiley-VCH. New York. pp. 333-404.
- Yamauchi, K., Shimizu, M. y Kamiya, T. 1980. Emulsifying properties of whey protein. *J. Food Sci.* 45: 1237-1242.
- Zadow, J.Z. 1992. *Whey and Lactose processing.* Elsevier Applied Science. London. pp. 7, 9, 24, 26, 30, 31, 64-83, 85-88, 144-148, 178, 188-190, 210-225, 263.

Zall, R.R. 1992 Sources and composition of whey and permeate. En *Whey and Lactose Processing*. J.G. Zadow (Ed). Elsevier Applied Science. Londres. pp. 5-72.

9. APENDICES



$$\text{Concentración de Proteína } (\mu\text{g/mL}) = A_{595 \text{ nm}} / (0.0516)$$

$$R^2 = 0.993$$

A1. Curva de calibración de BSA con el reactivo de Bradford (Bio Rad). La absorbancia de las muestras se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis Helios Alpha Unicam a 595 nm , por triplicado.

A.2

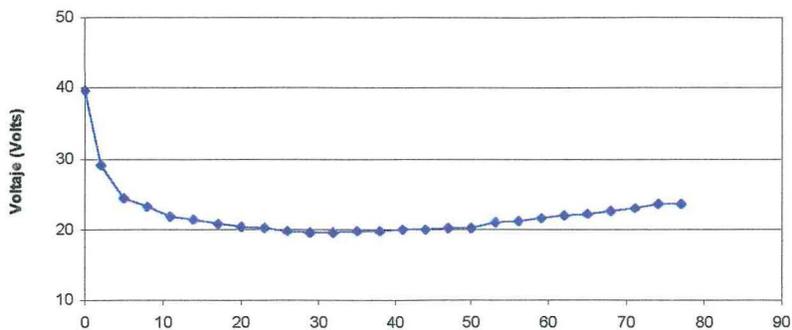
Análisis de minerales antes y después del tratamiento con resinas de intercambio iónico.

Muestra	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	Na (mg/L)
Suero Inicio	248.2	-	-
Suero pre-tratado con HMP y centrifugado	109.6	18.34	194.8
Suero concentrado por UF	124.6	21.2	230
Suero tratado con resina de intercambio iónico	20.48	6.04	542

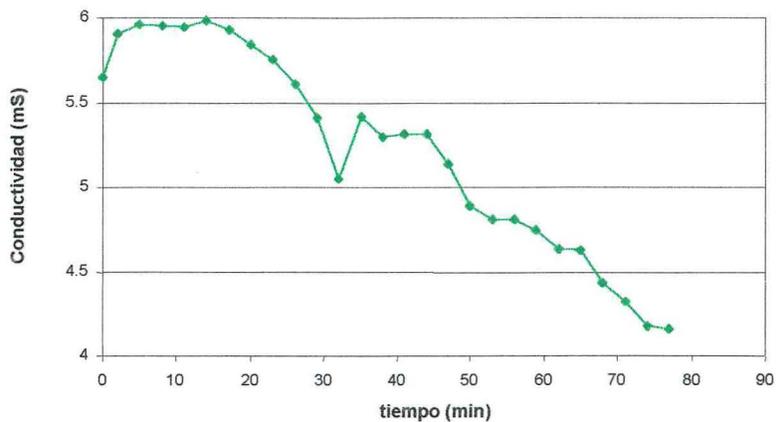
Analizadas por ICP.

A.3 Comportamiento del Voltaje, Conductividad y pH del suero a 0.31 kA/m^2

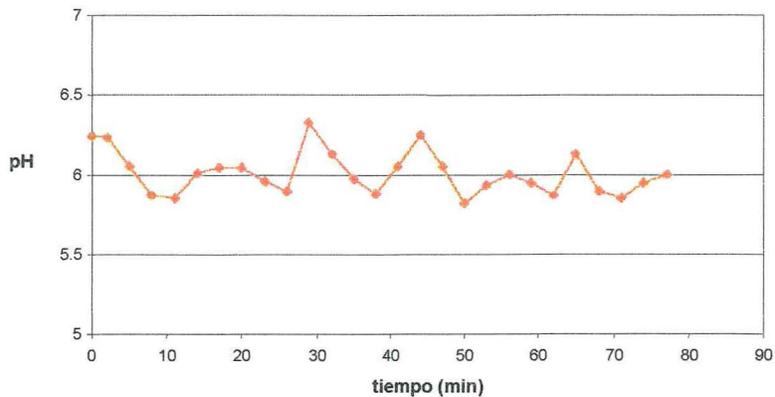
Voltaje



Conductividad del suero

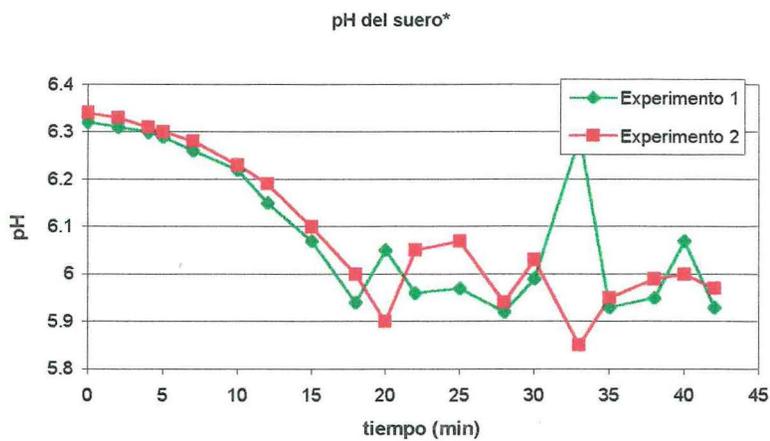
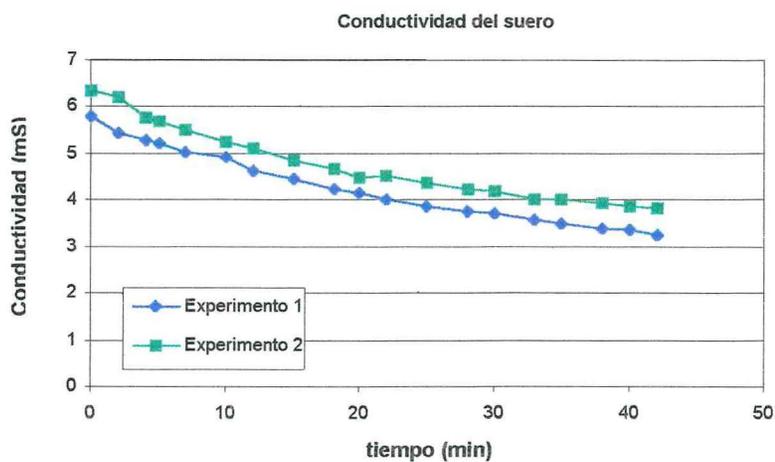
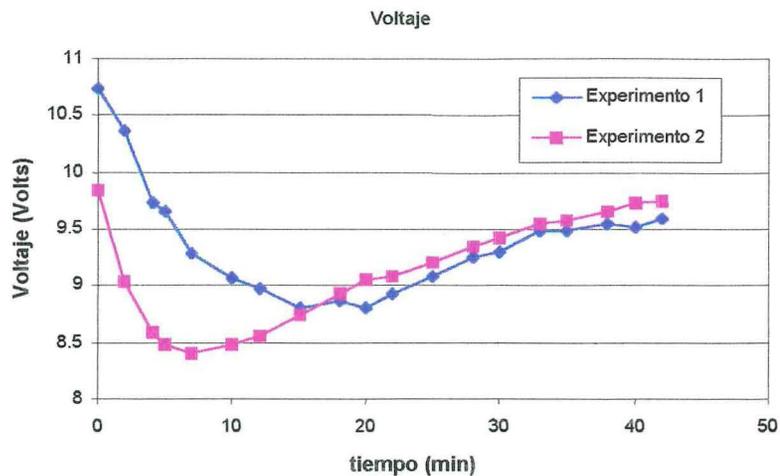


pH del suero *



* La acidificación del suero se controló adicionando NaOH 2.5 N en el compartimiento central

A.4 Comportamiento del Voltaje, Conductividad y pH del suero a 0.13 kA/m^2



* La acidificación del suero se controló adicionando NaOH 2.5 N en el compartimiento central

A.5 Aplicación de la Ley de Faraday para calcular el tiempo de desmineralización del suero lácteo.

Ley de Faraday:

$$t = \frac{w \cdot n^0 \cdot F}{i \cdot M}$$

- t = tiempo de desmineralización, seg
w = Peso del material reaccionando por unidad de área de electrodo , g/cm²
i = Densidad de corriente, A/cm²
M = Peso molecular, g/g-mol
n⁰ = número de eq-g electroquímicos por g-mol
F = Constante de Faraday = 96493 C/eq-g

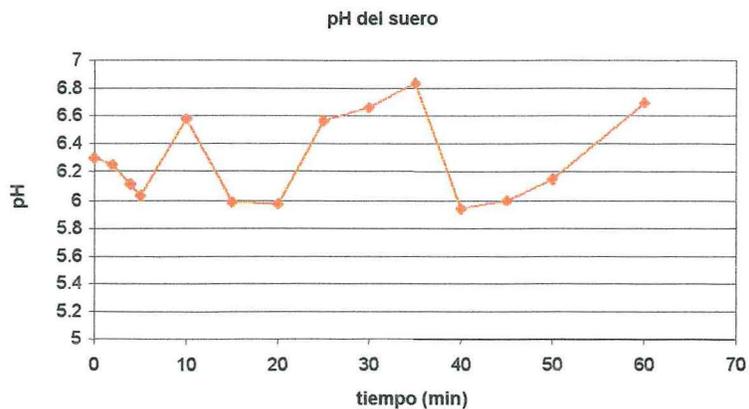
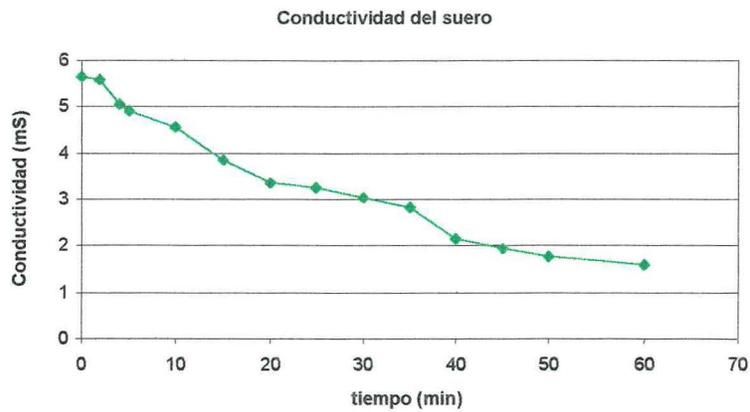
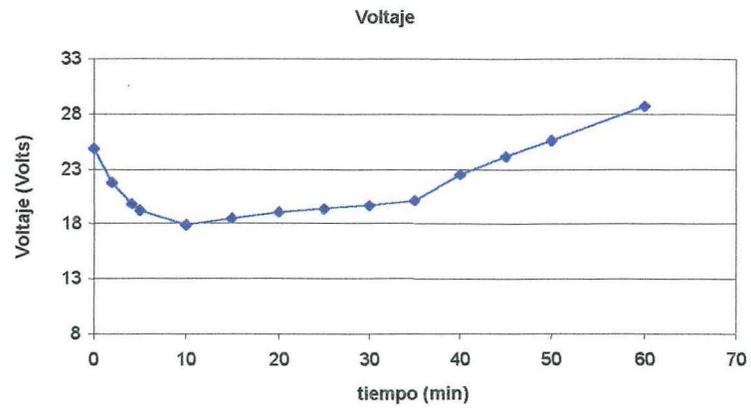
Ejemplo: Para el caso del experimento, el cálculo de t_{teórico} para 1 mol de NaCl con i = 0.01302 A/cm².

$$\begin{aligned} \text{Area del electrodo} &= 156.632 \text{ cm}^2 \\ w &= 0.709 \text{ g}/156.632 \text{ cm}^2 \end{aligned}$$

$$t = \frac{(0.0045 \text{ g/cm}^2)(1 \text{ eq-g/g mol})(96493 \text{ C/eq-g})}{(0.01302 \text{ A/cm}^2)(35.453 \text{ g/g-mol})}$$

$$t = 946.23 \text{ s} = 15.77 \text{ min.}$$

A.6 Comportamiento del Voltaje, Conductividad y pH del suero a 0.31 kA/m^2 y anolito neutralizado con NH_4OH 0.1 N



* La acidificación del suero se controló adicionando NaOH 2.5 N en el compartimiento central.