



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y APLICADAS

CARRERA DE INGENIERÍA INDUSTRIAL

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“ESTUDIO DE LOS MÉTODOS PARA EL DESARROLLO DE LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN, CONCENTRACIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO.”

Proyecto de investigación presentado previo a la obtención del título de Ingeniero Industrial.

Autores:

Chipantiza Naula Marco Roberto

Molina Herrera Jefferson Mesias

Tutora:

Lic. Ing. MSc. Lilia Cervantes Rodríguez

Latacunga – Ecuador

Marzo – 2021



DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotros **Chipantiza Naula Marco Roberto** y **Molina Herrera Jefferson Mesias**, declaramos ser autores del presente proyecto de investigación: **“ESTUDIO DE LOS MÉTODOS PARA EL DESARROLLO DE LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN, CONCENTRACIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO.”**, siendo la Lic. Ing. MSc. Lilia Cervantes Rodríguez, tutora del presente trabajo; y eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Chipantiza Naula Marco Roberto
C.I. 050298618-5

Molina Herrera Jefferson Mesias
C.I. 055005160-1



AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

En calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el título:

“ESTUDIO DE LOS MÉTODOS PARA EL DESARROLLO DE LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN, CONCENTRACIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO.” de, Chipantiza Naula Marco Roberto y Molina Herrera Jefferson Mesias, de la carrera de **INGENIERÍA INDUSTRIAL**, considero que dicho Informe Investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes científico-técnicos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Validación de Proyecto que el Honorable Consejo Académico de la **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y APLICADAS** de la Universidad Técnica de Cotopaxi designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Universidad
Técnica de
Cotopaxi

Latacunga, Marzo, 2021

F.....

Tutora

Lic. Ing. MSc. Lilia Cervantes Rodriguez

CI: 1757274376



Universidad
Técnica de
Cotopaxi



Ingeniería
Industrial

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprueban el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi, y por la FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y APLICADAS; por cuanto, los postulantes: CHIPANTIZA NAULA MARCO ROBERTO, MOLINA HERRERA JEFFERSON MESIAS, con el título de Proyecto de titulación: **“ESTUDIO DE LOS MÉTODOS PARA EL DESARROLLO DE LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN, CONCENTRACIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO.”** han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de Sustentación de Proyecto.

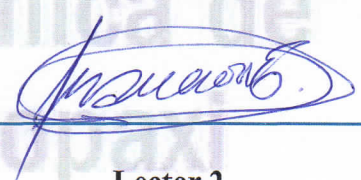
Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga a, Marzo 2021

F 

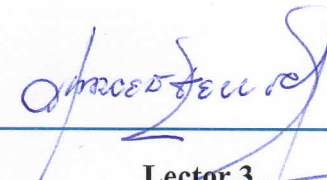
Lector 1 (Presidente)

Ing. Msc. Navas Olmedo Bladimir Hernán
CC: 050069554-9

F 

Lector 2

Ing. PhD. Ulloa Enríquez Medardo Ángel
CC: 100097032-5

F 

Lector 3

Ing. MSc. Tello Cóndor Ángel Marcelo
CC: 050 151855-9

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad, por permitirme concluir la carrera universitaria y graduarme de Ingeniero Industrial, gracias al apoyo de mis padres y de mis hermanos, por los consejos, valores y principios que me han enseñado.

Agradezco de manera especial a mi esposa, y mi hija, quienes me brindaron todo su apoyo, confianza y nunca me dejaron solo también a mis compañeros y amigos por estar en momentos alegres y tristes adquiriendo experiencias y nuevos conocimientos.

Agradecemos a nuestros docentes de la Universidad Técnica de Cotopaxi, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión.

JEFFERSON MOLINA

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, por guiarme en el camino y fortalecerme espiritualmente para culminado mi carrera universitaria lleno de éxito.

Quiero mostrar mi gratitud a todas aquellas personas que estuvieron presentes en la realización de mi sueño hecho realidad siendo tan importante para mí, agradecer todas sus ayudas, sus palabras motivadoras, sus conocimientos, sus consejos y sobre todo por formar parte de la formación académica.

MARCO CHIPANTIZA

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado con toda la humildad que mi corazón puede emanar principalmente a Dios por todas sus bendiciones, a mis padres: Mesias Molina y Judith Herrera, por estar conmigo, por enseñarme a crecer y a que si caigo debo levantarme, por apoyarme y guiarme, por ser las bases que me ayudo a llegar hasta aquí. A mis hermanas: Erika, Joanna y Tatiana y mis hermanos Danilo y Flavio que han estado junto a mí y brindándome su apoyo a mi esposa, Daysi y mi hija, Maylen por ser mi fortaleza moral durante todo este tiempo siempre me sentiré orgulloso de ustedes quienes fueron los principales protagonistas para llegar a cumplir esta meta tan anhelada.

JEFFERSON MOLINA

Quiero dedicar este proyecto a Dios y a todas las personas que siempre estuvieron a mi lado en todo momento y que siempre han creído en mí y me han ayudado a levantarme.

Dedico mi trabajo a mi querida familia, el tesoro más grande que la vida y Dios me han dado. A mis padres Medardo Sangopanta e Inés Naula. A mis amigos, que me han acompañado durante las etapas de mi vida y se han quedado en mi corazón por siempre.

A todos mis maestros que de alguna manera siempre me alentaron a superarme día con día y por los conocimientos impartidos para lograr superar personalmente.

MARCO CHIPANTIZA

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	pág.
DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE DIAGRAMAS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT	xix
AVAL DE TRADUCCIÓN.....	xix
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	2
4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.....	4
4.1. Beneficiarios directos.....	4
4.2. Beneficiarios indirectos	4
5. EL PROBLEMA.....	5
6. OBJETIVOS.....	6
6.1. General.....	6
6.2. Específicos.....	6
7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS:.....	7
7.1. Actividades del objetivo 1	7

7.2.	Actividades del objetivo 2.....	8
7.3.	Actividades del objetivo 3.....	9
7.4.	Actividades del objetivo 4.....	10
8.	FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	10
8.1.	Elaboración del queso para la obtención del subproducto lactosuero	10
8.2.	Proceso de elaboración del queso.....	11
8.2.1.	Tratamiento de la Leche	11
8.2.2.	Coagulación.....	11
8.2.3.	Corte de la cuajada y su desuerado.....	12
8.2.4.	Moldeo.....	12
8.2.5.	Prensado	12
8.2.6.	Salado	12
8.2.7.	Afinado o Maduración.....	12
8.3.	Qué es el subproducto Lactosuero.....	13
8.4.	Las proteínas	14
8.4.1.	Clasificación	14
8.5.	Clasificación de las proteínas albumina	14
8.5.1.	β -Lactoglobulina.....	14
8.5.2.	α -Lactoalbúmina.....	16
8.5.3.	Lactoferrina	18
8.5.4.	Seroalbúmina.....	20
8.5.5.	Inmunoglobulinas	21
8.6.	Proteínas séricas propiedades funcionales y usos de las proteínas del lactosuero.....	22
8.7.	Ventajas de consumir lactosuero	24
8.8.	Clasificación de los concentrados de proteínas del lactosuero.....	24
8.8.1.	Concentrados de proteínas de Lactosuero	24

8.8.2.	Aislados de proteínas del Lactosuero	25
8.8.3.	Hidrolizados de proteínas de Lactosuero	25
8.8.4.	Concentración y fraccionamiento de las proteínas del lactosuero.....	25
8.9.	Purificación de proteínas	26
8.10.	Métodos de purificación de proteínas	26
8.10.1.	Método de precipitación por sales para la purificación de proteínas	26
8.10.2.	Métodos de purificación basados en el tamaño molecular	27
8.10.3.	Técnica de Cromatografía de gel de exclusión molecular.....	29
8.11.	Métodos basados en la carga eléctrica	30
8.11.1.	Técnica de electroforesis para la purificación de proteínas.....	30
8.11.2.	Técnica de Electro elusión para la purificación de proteínas	31
8.11.3.	Cromatografía de intercambio iónico	31
8.11.4.	Selección de la resina en la cromatografía de intercambio iónico	32
8.12.	Cuantificación de proteínas de suero	32
8.12.1.	Método de Bradford para cuantificar las proteínas en el suero	33
8.12.2.	Método de Lowry para cuantificación de proteínas	33
8.13.	Tabla de comparativa de los métodos de purificación.....	34
8.14.	Tecnología de membranas.....	38
8.14.1.	Clasificación de las membranas según su Naturaleza	39
8.14.2.	Clasificación de las membranas según su Estructura	39
8.15.	Introducción de la Tecnología de Membranas a los procesos	40
8.16.	Concentración de proteínas	41
8.16.1.	Métodos de membranas para la concentración de proteínas	41
8.16.2.	De qué manera interviene la nanofiltración en el proceso de concentración de las proteínas del lactosuero.....	42
8.16.3.	Como se produce la concentración mediante el método de la ultrafiltración de las proteínas del lactosuero.....	43
8.17.	Tabla comparativa de los métodos de concentración	44

8.18. Separación de proteínas del lactosuero	45
8.18.1. Métodos de separación de proteínas del lactosuero.....	45
8.18.2. Cómo actúa la microfiltración al momento de separar las proteínas del lactosuero	47
8.18.3. De qué manera interviene la ultrafiltración en la separación de las proteínas del lactosuero	47
8.18.4. Cuál es método que utiliza la Osmosis inversa para separar la proteína del lactosuero	49
8.18.5. Cómo actúa la nanofiltración para separar las proteínas del lactosuero.....	49
8.18.6. Técnica de Diafiltración para la separación de las proteínas del lactosuero ..	50
8.18.8. Extracción de proteínas mediante la aplicación de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad CEPAI	51
8.18.9. Técnicas cromatográficas utilizadas en la separación de proteínas.....	51
8.19. Tabla comparativa de los métodos de separación	53
9. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS	55
10. METODOLOGÍAS	55
10.1. Investigación explicativa	55
10.2. Investigación descriptiva	56
10.3. Métodos de investigación	56
10.3.1. Método Inductivo - Deductivo	56
10.3.2. Método Bibliográfico.	56
10.3.3. Método Analítico – Sintético.....	56
10.4. Técnicas de investigación.....	56
10.4.1. Observación	56
10.4.2. Encuestas	56
11. DESARROLLO DE LA PROPUESTA (ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS).....	57
11.1. Diagrama del proceso de fabricación del queso	57

11.2. Estudio del Proceso de la elaboración de queso	57
11.3. Procedimiento experimental para la obtención del lactosuero	57
11.3.1. Obtención del lactosuero	57
11.4. Proteínas presentes en el lactosuero - representación de los procesos de purificación, concentración y separación.....	58
11.5. Diagrama de flujo para la purificación de proteínas por el método de centrifugación - cromatografía de intercambio iónico.....	58
11.6. Descripción de las etapas del proceso de purificación de las proteínas del lactosuero.....	59
11.6.1. Fundamento teórico de centrifugación en la purificación de proteínas.....	59
11.6.2. Fundamento teórico del método de cromatografía de intercambio iónico	59
11.7. Proceso de concentración de las proteínas del lactosuero.....	61
11.7.1. Diagrama de flujo para el proceso de concentración por el método ósmosis inversa - ultrafiltración	61
11.7.2. Concentración de Proteínas, métodos más usados	61
11.7.3. Proceso de concentración del Lactosuero por Ósmosis Inversa.....	62
11.7.4. Proceso de Concentración del Lactosuero por el método de Ultrafiltración..	64
11.8. Diagrama de flujo para la separación de proteínas por el método de ultrafiltración - Cromatografía de exclusión molecular	65
11.8.1. Diagrama de flujo de los procesos de separación de Proteínas del lactosuero	65
11.8.2. Fundamentación teórica de los métodos de separación de proteínas	65
11.9. Aprovechamiento integral de las proteínas del lactosuero.....	67
11.9.1. Procedimiento para el aprovechamiento integral de la inmunoglobulina	67
11.9.2. Procedimiento para aprovechamiento integral de la Lactoferrina.....	68
11.10. Aprovechamiento integral del lactosuero.....	69
11.10.1. Proceso para el aprovechamiento integral del lactosuero para la fabricación de galletas.....	70

11.11. Procedimiento de elaboración de una bebida fermentada a base suero lácteo con pulpa de manzana.....	72
11.11.1. Diagrama para el Aprovechamiento integral del Lactosuero para la elaboración de bebida fermentada a base de lactosuero.....	72
11.12. Procedimiento integral del lactosuero para la una correcta obtención de polvo de suero lácteo.....	74
11.12.1. Diagrama para el Aprovechamiento integral del Lactosuero para la obtención de polvo de suero lácteo	74
12. IMPACTOS.....	76
12.1. Aspecto Técnico.	76
12.2. Aspecto Económico.....	77
12.3. Aspecto Ambiental.....	77
13. PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN:	77
13.1. Presupuesto proyecto.	77
13.2. Presupuesto para implementar.	79
14. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	80
14.1. CONCLUSIONES.....	80
14.2. RECOMENDACIONES	81
15. BIBLIOGRAFIA.....	82
Trabajos citados	82
16. ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE TABLAS	pág.
Tabla 1. Beneficiarios Directos.	4
Tabla 2. Beneficiarios Indirectos.	4
Tabla 3. Actividades del objetivo 1.	7
Tabla 4. Actividades del objetivo 2.	8
Tabla 5. Actividades del objetivo 3.	9
Tabla 6. Actividades del objetivo 4.	10
Tabla 7. Composición de lactosuero Dulce y Ácido	13
Tabla 8. Posibles funciones de la lactoferrina.	19
Tabla 9. Proteínas séricas propiedades funcionales y usos de las proteínas del lactosuero.	22
Tabla 10. Ventajas de consumir lactosuero	24
Tabla 11. Centrifugación según la velocidad	28
Tabla 12. Tabla comparativa de los métodos de purificación.	34
Tabla 13. Clasificación de las técnicas de membrana según el tamaño de partícula y presiones de trabajo.	40
Tabla 14. Tabla comparativa de los métodos de concentración.	44
Tabla 15. Peso molecular de las proteínas del suero.	48
Tabla 16. Tabla comparativa de los métodos de separación.	53
Tabla 17. Cantidad de proteínas derivadas del lactosuero.	76
Tabla 18. Presupuesto para estudio.	77
Tabla 19. Presupuesto para implementar.	79

ÍNDICE DE FIGURAS	pág.
Ilustración 1. Diagrama estructural de β -lactoglobulina.	15
Ilustración 2. Diagrama estructural de α -lactoalbúmina.....	17
Ilustración 3. Diagrama estructural de Lactoferrina.	18
Ilustración 4. Diagrama estructural de Seroalbúmina	21
Ilustración 5. Diagrama estructural de una unidad básica de inmunoglobulina.	22
Ilustración 6. Método de precipitación por sales.	26
Ilustración 7. Diálisis para la purificación de proteínas.	27
Ilustración 8. Separación en un tubo gradiente de densidad.....	29
Ilustración 9. Perfil de Elución.	30
Ilustración 10. Técnica de electroforesis	30
Ilustración 11. Tecnología de membranas.	39
Ilustración 12. Diferentes tipos de filtración y concentración, Características del tamaño de corte, según el tipo de materia a filtrar.....	40
Ilustración 13. Proceso de la osmosis inversa.	41
Ilustración 14. Proceso de Nanofiltración.	42
Ilustración 15. Proceso de ultrafiltración.....	44
Ilustración 16. Clasificación por tamaño de partícula de los procesos de separación por membranas.	46
Ilustración 17. Diagrama general de flujo de la Ultrafiltración.....	47
Ilustración 18. Figura Matriz de cromatografía para separación de proteínas.	52
Ilustración 19. Diagrama del Proceso de Ósmosis Inversa	62
Ilustración 20. Proceso de ósmosis inversa	63
Ilustración 21. Proceso de producción de Aislados de Proteínas (WPI), mediante Ultrafiltración.....	64
Ilustración 22. Posibles mecanismos del efecto de la Lactoferrina y sus fragmentos obtenidos por hidrolisis, para prevenir la carcinogénesis en los diferentes órganos.	69

ÍNDICE DE DIAGRAMAS	pág.
Diagrama 1. Clasificación de las membranas según su Naturaleza.	39
Diagrama 2. Clasificación de las membranas según su Estructura.	39
Diagrama 3. Proceso de elaboración de Queso.	57
Diagrama 4. Proceso de purificación de proteínas.	58
Diagrama 5. Proceso de concentración de las proteínas del lactosuero.	61
Diagrama 6. Procesos de separación de Proteínas del lactosuero.	65
Diagrama 7. Aprovechamiento integral del lactosuero para la fabricación de galletas	70
Diagrama 8. Aprovechamiento integral del Lactosuero para la elaboración de bebida fermentada a base de lactosuero.	72
Diagrama 9. Aprovechamiento integral del Lactosuero para la obtención de polvo de suero lácteo.	74

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y APLICADAS

TEMA: “Estudio de los métodos para el desarrollo de los procesos de purificación, concentración y separación de proteínas presentes en el lactosuero.”

Autores:

Chipantiza Naula Marco Roberto

Molina Herrera Jefferson Mesias

RESUMEN

En las proyecciones de la OECD/FAO, se prevé que la producción mundial de leche aumentará a 175 millones de toneladas hacia el año 2024. El queso seguirá siendo el producto lácteo más importante, representando alrededor del 40% de la leche elaborada en todo el mundo. Esta producción de queso trae consigo una mayor producción de lactosuero. Las proteínas presentes en el subproducto lactosuero no constituyen la fracción más abundante, pero es la más interesante en los terrenos económico y nutricional. El trabajo de investigación que se presenta tiene como objetivo realizar un estudio de los métodos para el desarrollo de los procesos de purificación, concentración separación y de las proteínas presentes en el lactosuero que facilite la diversificación de la producción en la industria láctea. La metodología para el estudio es la búsqueda de información actualizada de los tipos de lactosuero existentes, el análisis de su composición y la selección de los métodos que faciliten la separación de las proteínas presentes en este subproducto, su purificación y concentración. Con el conocimiento de dichos métodos se realiza la propuesta de la reutilización integral del lactosuero en diferentes industrias. Como conclusión del trabajo se ha considerado que las tecnologías de membrana son los más eficientes para separar y concentrar las proteínas del lacto suero y el método de electroforesis para la purificación y separación de las mismas. En la propuesta del aprovechamiento integral del subproducto se considera la industria de alimento como la más representativa en su reutilización.

Palabras claves: Lactosuero, proteínas, separación, purificación, concentración.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF ENGINEERING AND APPLIED SCIENCES

THEME: "Study of methods for development purifying, concentration and separating processes of proteins present in the dairy whey."

Authors:

Chipantiza Naula Marco Roberto

Molina Herrera Jefferson Mesias

ABSTRACT

At the OECD/FAO projection, the world milk production is forecasting to increase to 175 million tons by 2024. The cheese will continue being the most important dairy product, it represented about 40% of elaborated milk around the world. This cheese production brings with itself a mayor production of dairy whey. The proteins present in the sub product of dairy whey are not constituted the most major fraction, but it is the most interesting in the economic and nutritional lands. The presented research work has the purpose carrying out to study of methods for development purifying, concentration and separating processes of proteins present in the dairy whey what make easy the diversification of production in the dairy industry. The methodology for study is the search of updated information about the types of dairy whey exist, the composition's analysis of each of them and the methods selection that make easily the proteins' separating present in the sub-product, their purifying and concentration. With the knowledge of these methods we performed the proposal about the whole reuse of dairy whey in different industries. As conclusion of this work we have been considered that membrane technologies are the most efficient to separate and concentrate the dairy whey proteins and the electrophoresis method to purify and separate them. In the proposal of integral making advantage of the sub-product, the food industry is considered as the most representative in its reuse.

Keywords: dairy whey, proteins, separation, purification, concentration.



AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que: La traducción del resumen del proyecto de investigación al Idioma Inglés presentado por los estudiantes egresados de la Carrera de **INGENIERÍA INDUSTRIAL** de la **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y APLICADA, CHIPANTIZA NAULA MARCO ROBERTO** y **MOLINA HERRERA JEFFERSON MESIAS**, cuyo título versa “**Estudio de los métodos para el desarrollo de los procesos de purificación, concentración y separación de proteínas presentes en el lactosuero**”, lo realizaron bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a los peticionarios hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimaren conveniente.

Latacunga, marzo del 2021.

Atentamente,

DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS

Mg. C Nelson Wilfrido Guagchinga Chicaiza.

C.C: 050324641-5

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título:

“Estudio de los métodos para el desarrollo de los procesos de purificación, concentración y separación de proteínas presentes en el lactosuero.”

Fecha de inicio:

Octubre - 2020

Fecha de finalización:

Marzo - 2021

Lugar de ejecución:

Provincia de Cotopaxi / Zona 3

Facultad que auspicia:

CIENCIAS DE LA INGENIERÍA Y APLICADA

Carrera que auspicia:

INGENIERÍA INDUSTRIAL

Proyecto de investigación vinculado:

Ingeniería Industrial

Equipo de Trabajo:

 TUTOR:

Lic. Ing. MSc. Lilia Cervantes Rodríguez

 ESTUDIANTES:

Chipantiza Naula Marco Roberto

Molina Herrera Jefferson Mesias

Área de Conocimiento:

Ingeniería, Industria y Producción

Línea de investigación:

Procesos Industriales

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Procesos de producción con el uso de subproductos y residuos.

2. INTRODUCCIÓN

La producción de queso de las industrias lácteas en el Ecuador ha generado un cierto grado de polémica ya que tiene como contrapartida un subproducto que es el lactosuero, algunas empresas dedicadas a la elaboración de estos productos desechan de manera indiscriminada estos subproductos produciendo a si una contaminación ambiental. El lactosuero proveniente del proceso de elaboración del queso es una sustancia líquida que se origina al separar el coagulo de la leche, en su composición presenta principalmente lactosa, proteínas, grasa y sales minerales. La composición nutricional que el lactosuero posee puede diferenciarse uno de otro, lo cual depende de varios factores ya sea por el tipo de leche que se usa, el tipo de queso que se elabora y el proceso tecnológico que se aplica.

Como efecto de las variaciones de los componentes de cada suero se hallan dos tipos de lactosuero el dulce y el ácido. El primero de estos se genera cuando se prepara el queso usando cuajo lo que provoca que las proteínas se fragmenten, se vuelvan inestables y por lo tanto se precipiten. Por otra parte, se tiene el lactosuero ácido que se origina cuando se genera la precipitación de la caseína al disminuir el pH de la leche.

Actualmente como alternativa de solución frente a la contaminación que se genera por el desecho del lactosuero se propone la presente investigación la cual tiene como principal finalidad el estudio de los métodos para el desarrollo de los procesos de purificación, concentración y separación. Otra alternativa frente a esta situación es la tecnología de membranas la cual nos ayuda a aprovechar de mejor manera el lactosuero y nos permite separar componentes o concentrarlos. Para generar la obtención de proteínas por lo que representan el 70% se utilizará la tecnología de membranas lo cual ha sido usado para unificar varios procesos de filtración, este proceso toma un papel muy importante en lo que respecta a los métodos de separación o concentración. La importancia de esta aplicación radica en que se emplea baja energía, bajas temperaturas y procesos fáciles de realizar. El proceso de filtración tiene como principal función el uso de membranas semipermeables, es decir que el método se realiza en función de la dimensión de los sólidos que se encuentran suspendidos lo cual permitiría elegir el tamaño del poro de la membrana que se va a utilizar.

3. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se centra en el estudio de los métodos para el desarrollo de los procesos de purificación, concentración y separación de proteínas presentes en el lactosuero, este contiene aproximadamente la mitad de las proteínas de la leche con la que se fabricó el

queso. Estas proteínas son ricas en aminoácidos esenciales con un valor nutritivo pero la composición del lactosuero presenta una elevada demanda química de oxígeno (DQO), lo que ocasiona una alta carga contaminante. Por tal motivo, en este trabajo se va estudiar cuales son los correctos métodos de tratamiento que permita valorizar los componentes esenciales que se encuentran en el lactosuero y con ello lograr obtener un beneficio tanto económico como medioambiental.

Las proteínas del lactosuero, en la actualidad, son usadas principalmente como complemento alimentario en atletas practicantes de culturismo, ya que su uso favorece la hipertrofia muscular. Una de las proteínas más abundantes en el lactosuero de la vaca es la caseína, esta proteína se puede aprovechar para muchos usos, tanto alimentarios, y en la elaboración de embutidos como un agente ligante o cohesionante, así también como proteínas para personas adultas la cual sirve para reducir la pérdida de masa y función muscular, dentro de la nutrición del cuidado de los niños se puede lograr un índice de recuperación más elevado obteniendo así una recuperación dentro de las poblaciones desnutridas con un costo extra muy bajo en comparación con la proteína de origen vegetal.

Es de suma importancia separar las proteínas, por lo que representa aproximadamente el 12% de los sólidos totales en el lactosuero, por lo cual gracias a una correcta separación podemos fácilmente generar un aprovechamiento de las cantidades apreciables de proteínas químicas, físicas y funcionales muy adecuadas para ser utilizadas en la alimentación, medicina y farmacología. Se distinguen diferentes tipos de proteínas, siendo la β -lactoglobulina su principal componente con cerca del 50% y α -lacto albúmina con 20% de las proteínas solubles del suero; además, contiene otras proteínas como inmunoglobulinas, seroalbúmina bovina y otras menores como la lactoferrina, lactoperoxidasa, y los glicomacropéptidos.

En la actualidad, el lactosuero que se genera por las empresas queseras, sobre todo en pequeñas factorías donde no es posible la valorización, es llevado en su totalidad a un agente autorizado para su gestión. En estos casos, dicha gestión supone un coste elevado, por lo que no se obtiene ningún beneficio económico del posible uso que se le dé al lactosuero, tan solo el cumplir con la legislación vigente en materia de vertidos y evitar las consecuentes sanciones.

Por ello el aprovechamiento correcto de las proteínas presentes en el lactosuero ayudará a reducir la contaminación ambiental, al aprovechar estos concentrados se generará subproductos que se encuentran presentes en diferentes fracciones, como por ejemplo,

proteína de la más alta calidad, sales minerales, vitaminas y lactosa, que tienen aplicaciones muy importantes tanto en la industria alimentaria (suplementos alimenticios) como en la industria farmacéutica (formulación de medicamentos), es decir, ofrecen una gama de oportunidades que pueden ser aprovechadas. (Torres, 2018)

4. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

4.1. Beneficiarios directos.

Tabla 1. Beneficiarios Directos.

	Industrias lácteas y queserías	Beneficio	Cantidad
Beneficiarios Directos	LA AVELINA	<p>Obtener un óptimo conocimiento de cómo dar un mejor tratamiento al subproducto lactosuero.</p> <p>Para poder aprovechar de mejor manera las proteínas que están dentro y lograr producir diversos productos generando así una reducción de gasto y aumentando la rentabilidad de la empresa.</p>	1
	TANILAC		1
	ECUALAC		1
	PASTOLAC		1
	PAISANITA		1
	PARMALAT		1
	INDULAC		1
	EL RANCHITO		1

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

4.2. Beneficiarios indirectos

Tabla 2. Beneficiarios Indirectos.

	Proveedores	BENEFICIO	CANTIDAD
Proveedores zona media Cotopaxi			
	Latacunga	Aumento de las ventas	
	Tanicuchí		
	Mulaló		
	Pastocalle		
	Lasso		
	Ignacio Flores		

Beneficiarios Indirectos	San Buenaventura	generando mayor ingreso.	35%	
	Juan Montalvo			
	Belisario Quevedo			
	Saquisilí			
	Salcedo			
	Pujilí			
	Proveedores zona baja Cotopaxi			
	Pucayacú	Aumento de las ventas generando mayor ingreso.	5%	
	Guasaganda			
	Consumidores	BENEFICIO	HOMBRES	MUJERES
Población Económicamente Activa	Productos de mejor calidad y más bajo precio.	101.712	71.382	

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

5. EL PROBLEMA.

La producción mundial de Lactosuero es directamente proporcional al crecimiento de la industria procesadora de queso. EUA, España, México y Japón son lugares estratégicos para registrar invenciones en cuanto al aprovechamiento de lactosuero, esta cualidad se relaciona directamente con el índice de competitividad que poseen (Fernández, Martínez, Moran, & Gómez, 2016). El World Economic Forum (2015), informa que EUA, España y Japón son países con economías impulsadas por la innovación y la sofisticación empresarial. México y Brasil están situados en la etapa de transición de la economía impulsada por la eficiencia a una economía impulsada por la innovación, mientras que China se encuentra situada en una economía impulsada por la eficiencia. Los avances tecnológicos han permitido a países con gran producción de leche utilice 50% del lactosuero producido, así pues, en la Región Europea en Madrid España se implementó, métodos que permiten proteínas en el lactosuero, diversificando los productos en las industrias queseras.

En Sud América país de Colombia se realizó un estudio del aprovechamiento de proteínas existentes en el lactosuero, en el estudio Tecnología de Membranas: Obtención de Proteínas del Lactosuero estudio realizado por la Universidad del valle, este señala que para la

separación de proteínas utilizaron la tecnología de membranas, es decir que las industrias lácteas han utilizado el procesamiento de membranas desde su introducción en la industria alimentaria, para, concentrar, purificar y separar proteínas del lactosuero (Vélez , 2018).

La producción de leche en el Ecuador en el año 2017 fue de 5.135.405 lts/día y va aumentando en 2% anual según el registro oficial del INEC, de esta cantidad, aproximadamente el 90% del total de leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca del 55% nutrientes y 18% en proteínas (INEC, 2017). Por esta razón se está planteando buscar nuevos usos, pues finalmente se trata de otro derivado del procesamiento lácteo. Una las opciones es adquirir proteínas existentes en el lactosuero mediante métodos, técnicas que ayuden a la concentración purificación y separación, de esta manera las industrias alimentarias, farmacéuticos, empresas cosmetológicas, pueden elaborar productos con altos concentrados proteicos. Actualmente las industrias lactes del Ecuador desconocen esta metodología, puesto que en algunas de ellas se a llegando hasta el procedimiento de concentración de proteínas en la elaboración de quesos. Jiménez (2018) menciona que Ecuador debe importar 228,48 toneladas de productos lácteos, equivalentes a \$531.250. El 39% de esta cantidad corresponde a lactosuero, total o parcialmente desmineralizado, y un 44%, a suero desproteínizado. Irónicamente, Ecuador importa productos elaborados a base a suero de leche, cuando existe la posibilidad de industrializar y procesar la gran cantidad de suero existente en el país y obtener los mismos productos.

¿Cómo se puede reutilizar el lactosuero a partir del conocimiento de los métodos para purificar, concentrar y separar las proteínas que contiene?

6. OBJETIVOS

6.1. General

Estudiar los métodos para el desarrollo de los procesos de purificación, concentración y separación de las proteínas presentes en el lactosuero que facilite la reutilización de este subproducto para la diversificación de la productiva en la industria láctea.

6.2. Específicos

- ✚ Diferenciar los tipos de lactosuero en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y su composición para la selección del más conveniente en la obtención de concentrados de proteínas.

- ✚ Caracterizar los tipos de proteínas presentes en el lactosuero y sus propiedades para el análisis de su aplicación en diferentes sectores industriales.
- ✚ Analizar los métodos para la purificación, concentración y separación de las proteínas del lactosuero, que posibilite la selección de los más apropiados para el aprovechamiento integral de este subproducto.
- ✚ Realizar la valoración de los costos necesarios para la utilización de los métodos que pueden ser usados en la purificación, concentración y separación de las proteínas del lactosuero.

7. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS:

7.1. Actividades del objetivo 1

Tabla 3. Actividades del objetivo 1.

Objetivo 1	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
1. Diferenciar los tipos de lactosuero en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y su composición para la selección del más conveniente en la obtención de concentrados de proteínas.	1.1 Descripción del proceso de elaboración de queso donde se obtiene como subproducto el lactosuero con sus parámetros de control.	Proceso de elaboración de queso. Parámetros de control.	Tablas descriptivas, análisis de datos. Páginas Web/ Libros. Diagrama de Procesos.
	1.2 Representación del diagrama de flujo y de proceso para la producción de queso.	Etapas del proceso Identificación de parámetros de control en cada etapa del	Software Lucidchart

		proceso.	
	1.3 Establecimiento de las diferencias de los tipos de lactosuero en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y composición.	Suero dulce y ácido. Propiedades físicas, químicas y composición del lacto suero.	Tabla de muestreo de actividades. Páginas Web/Libros. Tablas de clasificación de tipos de lactosueros.

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

7.2. Actividades del objetivo 2

Tabla 4. Actividades del objetivo 2.

Objetivo 2	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
2. Caracterizar los tipos de proteínas presentes en el lactosuero y sus propiedades para el análisis de su aplicación en diferentes sectores industriales.	2.1 Caracterización de las proteínas del lactosuero.	Tipos de proteínas.	Páginas web/Libros.
	2.2 Análisis de las propiedades y aplicaciones de las proteínas del lactosuero en diferentes industrias.	Propiedades y aplicaciones de las proteínas.	Artículos Científicos. Tesis de grado y de maestría.

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021).

7.3. Actividades del objetivo 3

Tabla 5. Actividades del objetivo 3.

Objetivo 3	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
<p>3. Analizar los métodos para la purificación, concentración y separación de las proteínas del lactosuero, que posibilite la selección de los más apropiados para el aprovechamiento integral de este subproducto.</p>	<p>3.1 Descripción de los métodos para la purificación de proteínas.</p>	<p>Métodos para la purificación de proteínas.</p>	<p>Páginas web/Libros. Artículos Científicos.</p>
	<p>3.2 Descripción de los métodos utilizados para la concentración de proteínas contenidas en el lacto suero.</p>	<p>Métodos de concentración de proteínas del lactosuero.</p>	<p>Tesis de grado y de maestrías.</p>
	<p>3.3 Explicación de los métodos a utilizados para la separación de las proteínas</p>	<p>Identificación de los métodos para separar proteínas.</p>	<p>Matriz Excel.</p>
	<p>3.4 Selección de los métodos más apropiados para la concentración, purificación y separación de las proteínas de acuerdo a las posibilidades de ser aplicados.</p>	<p>Matriz con resultado de los métodos seleccionados.</p>	<p>Diagrama de procesos. Graficas estadísticas de barras.</p>
	<p>3.5 Valoración de los procedimientos para el aprovechamiento</p>	<p>Procedimientos utilizados.</p>	<p>Páginas Web/Libros. Artículos científicos.</p>

	integral de las proteínas en la industria.		
--	--	--	--

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

7.4. Actividades del objetivo 4

Tabla 6. Actividades del objetivo 4.

Objetivo 4	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
4. Realizar la valoración de los costos necesarios para la utilización de los métodos que pueden ser usados en la purificación, concentración y separación de las proteínas del lactosuero.	4.1. Valoración de costos directos con el uso de los métodos seleccionados para la purificación, concentración y separación de proteínas del lactosuero.	Costos directos.	Ecuaciones de cálculo. Hoja de cálculo.
	4.2. Valoración de costos indirectos con el uso de los métodos seleccionados.	Costos indirectos.	Ecuaciones de cálculo. Hoja de cálculo.

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

8. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

8.1. Elaboración del queso para la obtención del subproducto lactosuero

La materia prima para la elaboración del queso es la leche se debe contar con leche de buena calidad para lograr la obtención de quesos de buena calidad. Por lo que existen factores físico-químicos y microbiológicos, que afectan la coagulación de la leche y que están ligados a su composición (cantidad de proteínas soluble, balance salino, pH, etc.) por otro lado la carga microbiana por razones obvias afecta la calidad sanitaria, la inocuidad del queso y la vida útil del mismo (Poncelet, 2016)

8.2. Proceso de elaboración del queso

Hay cientos de tipos de quesos que se producen en todo el mundo, y todos se elaboran con diferentes recetas, técnicas, procesos de fabricación e incluso secretos comerciales. Sin embargo, desde la granja lechera hasta nuestros platos, todos los quesos diferentes tienen el mismo tipo de procesamiento básico. La transformación de la leche en queso generalmente comprende siete etapas (Ramírez, 2016).

Según (Delgado, 2016) cita la correcta elaboración de quesos:

8.2.1. Tratamiento de la Leche

Esta fase consiste en el filtrado de la leche para eliminar macro-sustancias extrañas procedentes de su manipulación. Puede añadirse o eliminarse la nata, según el tipo de queso que se quiera elaborar. Tras este proceso, la leche debe homogeneizarse para igualar el tamaño de las partículas que la componen y así obtener una textura más uniforme.

La pasteurización de la leche destinada para la elaboración de quesos se hace generalmente a 70°C en 15 o 20 segundos en el tratamiento rápido o a 65°C en 30 minutos en el tratamiento lento. Si se efectuara a temperaturas mayores el calcio tiende a precipitar como trifosfato calcio que es insoluble, lo cual llevaría a una coagulación defectuosa.

Respecto a los componentes de la leche, luego de la pasteurización no afecta la línea de crema, la lactosa prácticamente no sufre ningún cambio. Tampoco sufren cambios las proteínas del lactosuero, por lo cual no se forman suerhidrilos ni tampoco olor y sabor a cocido. Si bien no se forma el complejo β , lactoglobulina, caseína, pero si se modifica la estructura de las micelas, por lo cual cambia la actividad del cuajo.

En cuanto a las enzimas, la pasteurización destruye las lipasas y se inhibe la actividad de las fosfatasas alcalinas.

8.2.2. Coagulación

Una vez tenemos la leche fermentada se realiza el cuajo o coagulación. Este paso consiste en añadir fermentos lácticos o coagulantes vegetales o animales. Es en este momento cuando el queso pasa de ser líquido a estar sólido o semisólido. Se crea así una especie de cuajada.

8.2.3. Corte de la cuajada y su desuerado

Una vez la cuajada tenga la textura perfecta realizamos el corte. Se usan unas cuchillas llamadas "liras" y dependiendo del corte que se haga y de los "granos" que se generen, se hará un queso u otro. Después se drena el suero y se colocan los trozos en un molde que se da la vuelta para que el suero escurra totalmente. Esto determinará qué tipo de queso obtendremos.

8.2.4. Moldeo

Consiste en el llenado de los granos de la cuajada en moldes. Estos moldes son actualmente de acero inoxidable o de plástico alimenticio, aunque antiguamente podían ser de esparto o madera. En los quesos tradicionales se ha mantenido las marcas o formas antiguas de los moldes.

8.2.5. Prensado

Después de poner el producto en el molde se prensa la masa para terminar de sacar el suero. A veces se usa una tela porosa para hacerlo más rápido.

8.2.6. Salado

Es el proceso más básico y fundamental para conservar bien el producto, para que se forme la corteza y para evitar que salgan microorganismos. Además se potencia el sabor y el aroma.

8.2.7. Afinado o Maduración

En este proceso los quesos se mantienen en cuevas de maduración o cámaras controladas donde se revisan la temperatura, humedad, aire. Existen ocasiones que para que no se deforme el queso y madure por igual, se va volteando o se cepilla la corteza y se sazona con salmuera. Según su maduración podemos obtener queso curado, queso semicurado, queso tierno o queso fresco. Es en la maduración donde se determinará el sabor (queso fuerte, queso suave), el aroma, la forma y la consistencia del queso. (Delgado, 2016)

Mediante la información obtenida de los autores antes mencionados al momento de realizar todo este procedimiento se obtiene el lactosuero. De forma aproximada, por cada 100 litros de leche inicial, entre 80 y 90 litros se convierten en lactosuero. Lo cual es un subproducto que se genera en cantidades enormes. (Arozarena, 2015)

El lactosuero es el sub producto que se obtiene de la elaboración del queso. Contiene gran cantidad de contribuyentes nutricionales y la mayor cantidad de lo minerales de la leche, sin

embargo es muy común que el lactosuero sea utilizado en la alimentación de animales debido a su alto contenido de vitaminas. (González, 2012)

8.3. Qué es el subproducto Lactosuero

El lactosuero o suero de leche es un líquido claro, de color amarillo verdoso translúcido, o incluso, a veces, un poco azulado (el color depende de la calidad y el tipo de leche utilizada en su obtención). Es el coproductor más abundante de la industria láctea, resultante después de la precipitación y la remoción de la caseína de leche durante la elaboración del queso, donde el lactosuero representa alrededor del 85-95% del volumen de la leche y retiene el 55% de sus nutrientes. (Sebastián, 2011)

Contiene principalmente lactosa, proteínas como sustancias de importante valor nutritivo, minerales, vitaminas y grasa. La composición y tipo de lactosuero varía considerablemente dependiendo del tipo de leche, tipo de queso elaborado y el proceso de tecnología empleado. La lactosa es el principal componente nutritivo (4,5 % p-v), proteína (0,8% p/v), y lípidos (0,5%). si en la coagulación de la leche se utiliza enzimas el lactosuero se denomina dulce, y si se reemplaza la enzima por ácidos orgánicos se denomina ácido (Huertas, 2009).

Tabla 7. Composición de lactosuero Dulce y Ácido

COMPONENTE	LACTOSUERO DULCE (g/L)	LACTOSUERO ÁCIDO (g/L)
Sólidos Totales	63.0 – 70.0	63.0 – 70.0
Lactosa	46.0 – 52.0	44.0 – 46.0
Proteína	8.0 – 10.0	6.0 – 8.0
Calcio	0.4 – 0.6	1.2 – 1.6
Fosfatos	1.0 – 3.0	2.0 – 4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1
Sales y minerales	0.56	0.46
Ácido láctico	0.2-0.3	0.7-0.8

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

Al realizar una comparación como podemos observar en la tabla, que en relación a la cantidad de sales y minerales el suero dulce tiene mayor cantidad (0.56%), comparado con el del suero ácido que solo tiene (0.46%). Por lo cual observando también los datos se tiene que el lactosuero dulce tiene mayor cantidad de lactosa, mayor cantidad de proteínas con respecto al lactosuero ácido. Además, vemos que la mayor cantidad de ácido láctico está presente en el lactosuero ácido. (Huertas, 2009)

8.4. Las proteínas

Las proteínas del lactosuero pueden ser, como la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina, que representan conjuntamente el 70% de las proteínas del lactosuero de vaca, y la lactoferrina., o bien de transferencia sanguínea, como la albúmina y las inmunoglobulinas. Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por las de sus dos principales proteínas, α -lactoalbúminas y β -lactoglobulina. Entre ellas destacan su solubilidad, incluso a pH 4,5, si no se calientan, sus propiedades emulsionantes y espumantes y su capacidad de gelificación. Se recuperan por ultrafiltración o intercambio iónico, con secado a temperaturas lo más bajas posible para evitar su desnaturalización. (Solís, 2005)

8.4.1. Clasificación

Según (Guzman, 2006) a las proteínas séricas se las clasifican en:

- **Albumina:** son el 75% de las proteínas del suero y el 11% de las proteínas totales hay 3 tipos β -lactoglobulinas (LG), α -lactoalbúminas (LA) y seroalbúminas (SA).
- **Globulinas (IG):** son del 10 al 20 % de las proteínas solubles. Es una fracción heterogénea con actividad inmunológica significativa.
- **Proteosas-peptonas (P-P):** son el 105 de las proteínas solubles. Es un grupo muy heterogéneo.

Las proteínas más importantes del lactosuero son β -lactoglobulinas, α -lactoalbúminas y la lactoferrina. Sus actividades se las detalla a continuación.

8.5. Clasificación de las proteínas albumina

8.5.1. β -Lactoglobulina

La β -lactoglobulina es la proteína más abundante en el lactosuero, representa alrededor de la mitad de las proteínas presentes. Es bastante fácil de aislar, es de pureza elevada y es de gran solubilidad. A temperaturas de alrededor de 22 °C, no está ligada a otras fracciones proteicas.

Está formada por una sola cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de 18362 g/mol y un punto isoeléctrico de 5.2 (Pérez, 2008)

Ilustración 1. Diagrama estructural de β -lactoglobulina.



Fuente: (Gavilanes, 1993)

Es la principal proteína del suero por su alto valor nutricional. Posee regiones con gran cantidad de aminoácidos cargados, lo que le permite fijar minerales y acarrearlos durante su paso a través de la pared intestinal. (Gavilanes, 1993)

Una parte de su composición muestra un comportamiento ligeramente hidrofóbico, que facilita la absorción de vitaminas liposolubles y ácidos grasos de cadena larga. Además, por su alto contenido de aminoácidos azufrados participa en el sistema inmune (Pérez, 2008)

(Perez, 1992) Demostró que la β -lactoglobulina producía un aumento de la actividad de una lipasa pre-gástrica mientras se inhibía la acción de dicha enzima. Por tanto esta proteína podría participar en la digestión de los lípidos lácteos durante el periodo de lactancia.

En la actualidad existen diversas variantes genéticas, siendo las más comunes las llamadas A y B, que difieren en dos aminoácidos. La variante A posee una valina en la posición 118, y un aspártico en la posición 64, mientras que la variante B tiene alanina y glicina, respectivamente. (Kushibiki, 2001)

La β -lactoglobulina es muy soluble en el agua debido a que la mayor parte de sus componentes no polares se encuentran dentro de la proteína y la mayoría de los componentes polares permanecen en la superficie. Dependiendo de las condiciones de la solución puede existir en uno de los distintos estados estructurales dependientes del pH. Por debajo de pH 3, la β -lactoglobulina se presenta en forma de monómeros. Alrededor de pH 4.5, tiende a formar estructuras de hasta ocho moléculas. Al pH de la leche, se presenta en forma de dímeros, con los monómeros unidos de forma no covalente. Estos dímeros se forman entre pH 4 y pH 8. Por encima de pH 8, se produce la desnaturalización irreversible de la β -lactoglobulina, que se

presenta en forma de monómeros que pierden su estructura terciaria rígida y parte de su estructura secundaria. (Kushibiki, 2001)

8.5.1.1. Principales utilidades de la proteína β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina posee muy buenas características gelificantes, por lo que es utilizada en alimentos en los que se requiera retener agua y que presenten buena textura (Smithers, 2006).

Se utiliza en carnes, productos con pescado, productos de confitería y otros muchos alimentos prefabricados. El rango de aplicaciones de productos enriquecidos con esta proteína se amplía en base a la flexibilidad de los geles que se forman, ya que éstos pueden ser translúcidos, opacos, elásticos o inelásticos según las condiciones químicas, fundamentalmente pH y fuerza iónica, en las que ocurra la gelación (Smithers, 2006) .

Se utiliza como espumante y emulsionante, por lo que es ampliamente utilizada en formulaciones alimentarias como merengues y productos similares. Presenta muy buena solubilidad y claridad en un rango amplio de pH, es estable a tratamientos a altas temperaturas y tiene un valor nutricional elevado. Todas estas propiedades hacen que sea una proteína muy usada como agente activo en bebidas enriquecidas con proteína, como zumos de frutas y bebidas para deportistas, y en bebidas de larga duración. (Smithers, 2006).

8.5.2. α -Lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina está presente en la leche. Interviene en la reacción enzimática implicada en la síntesis de la lactosa, siendo a la vez la estructura reguladora de una galactosiltransferasa que en ausencia de la α -lactoalbúmina transfiere la galactosa a las glicoproteínas. La α -lactoalbúmina es el producto que se deriva de la precipitación térmica de las proteínas del suero y es una mezcla de α -lactoalbúmina desnaturalizada, β -lactoglobulina y otras proteínas del suero. Para su producción se calienta el suero para desnaturalizar, coagular y precipitar las proteínas del suero (Larisa, 2012).

Es una proteína formada por una sola cadena polipeptídica, posee 123 aminoácidos con un peso molecular de 14147 g/mol. Su estructura es terciaria, compacta, globular, está compuesta por cuatro puentes de disulfuro, con una zona de hélice α y otra de hojas plegadas α . Es una proteína ácida con un punto isoeléctrico entre 4.5 y 4.8 es la segunda proteína en concentración en el lactosuero de vaca, y la más abundante en el lactosuero. Va a existir por lo tanto una relación directa entre el contenido en lactosa y el contenido de α -lactoalbúmina.

Tiene gran afinidad por el ion calcio (Ca^{2+}), entre otros minerales, lo que facilita su absorción. (Falvo, 2013)

Ilustración 2. Diagrama estructural de α -lactoalbúmina.



Fuente: (Falvo, 2013)

La α -lactoalbúmina presenta la estructura “molten globule”. Desde pH 3 a 1.5, mantiene dicha estructura, si se desciende hasta pH 1.5, la estructura terciaria tiende a ser más flexible. Entre pH 4 y pH 4.5 esta proteína se encuentra en forma dímera. Entre pH 6 y 8.5, no hay prácticamente agregación. Por encima de pH 9.5, se produce una expansión pero sin agregación (Kushibiki, 2001).

8.5.2.1. Principales aplicaciones de la proteína α -lactoalbúmina

Su principal utilización es como nutracéutico debido a su alto contenido en triptófano a partir de ella se pueden obtener también precursores de serótina, una sustancia que regula el sueño y la vigilia. Debido a su alto contenido de aminoácidos ramificados, puede disminuir el daño al tejido muscular provocado por el ejercicio, siendo de gran aplicación en la industria de suplementos alimenticios (Guzman, 2006).

Se utiliza también como un aditivo en fórmulas infantiles las proteínas del lactosuero ofrecen al recién nacido la ventaja de disponer de concentraciones de triptófano en plasma iguales a las que tendrían si se alimentaran con leche materna, y elimina la desventaja de fórmulas anteriores en las que se proporcionaba al recién nacido un exceso de nitrógeno, no beneficioso para su organismo (Liang, 2006).

Recientemente, se ha descubierto que una variante de la α -lactoalbúmina puede entrar selectivamente en células tumorales e inducir la apoptosis de dichas células (Smithers, 2006).

8.5.3. Lactoferrina

Constituye, junto con la lisozima y el sistema lactoperoxidasa, las llamadas proteínas protectoras de la leche, ya que son proteínas que aumentan y complementan el sistema inmunológico. La lactoferrina posee propiedades antibacterianas y antioxidantes; secuestra y solubiliza el hierro del suero sanguíneo, lo que le hace disponible para su absorción a nivel intestinal; y por otro lado, disminuye la concentración de este mineral en el organismo, el cual es una fuente para el desarrollo bacteriano. Se ha demostrado también que puede promover la diferenciación celular, ayudando a la reparación de tejidos dañados. (Martínez, 2009)

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

La lactoferrina es una glicoproteína con un peso molecular de 78000 g/mol y con un punto isoeléctrico en la zona básica, 9.0. La secuencia de aminoácidos de la lactoferrina bovina consiste en una cadena polipeptídica simple de 689 aminoácidos, dos aminoácidos menos que la lactoferrina humana. (Lien, 2003)

Ilustración 3. Diagrama estructural de Lactoferrina.



Fuente: (Lien, 2003)

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

8.5.3.1. Principales aplicaciones de la proteína lactoferrina

Tabla 8. Posibles funciones de la lactoferrina.

LACTOFERRINA	Immunomoduladora
	Antiparasitaria
	Antifúngica
	Antivírica
	Antibacteriana
	Proteasa
	Inhibidora de proteasa
	Ribonucleasa
	Procoagulante
	Péptidos catiónicos
	Autoanticuerpos
	A factor de transcripción
	anti-tumoral
	Anti-inflamatoria
	Hipoferremia
Absorción de hierro	

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021) (adaptado de (Brock, 2013))

Una de las funciones más importantes de la lactoferrina es su actividad antimicrobiana contra gran cantidad de bacterias, hongos y virus. Su primera función antimicrobiana es bacteriostática, es decir, detiene el crecimiento de las bacterias. Gracias a su gran capacidad para enlazar hierro, la lactoferrina retira éste de las zonas de infección, no permitiendo a los patógenos disponer de este nutriente esencial para su crecimiento. Además, la lactoferrina tiene una segunda función antimicrobiana, mediante actuación directa sobre los microorganismos. La apolactoferrina (forma de la lactoferrina desprovista de hierro) puede

unirse a la membrana externa de bacterias, causando una rápida liberación de lipopolisacáridos y, por tanto, un aumento de la permeabilidad de la membrana, siendo más susceptible a choques osmóticos, a lisozima y a otras moléculas bacterianas. (Brock, 2013)

Recientemente se ha descubierto una tercera función antibacteriana de la lactoferrina, una actividad proteolítica. Mediante proteólisis, la lactoferrina degrada a ciertos microorganismos, disminuyendo así su patogenicidad. En cuanto a su actividad antivírica, la lactoferrina bovina es un potente inhibidor del desarrollo de diferentes virus tales como el virus del herpes simplex 1 y 2, el virus de la inmunodeficiencia humana o los virus de la hepatitis B y C (Valentin, 2005).

Otra de las funciones destacables de la lactoferrina es la regulación de las respuestas inmune y antiinflamatoria. A nivel celular, la lactoferrina actúa como promotor de la activación, diferenciación y proliferación de las células del sistema inmunológico. En los focos de inflamación, la lactoferrina retira las moléculas de hierro libre, previniendo de este modo que sirva de catalizador en la producción de radicales libres dañinos. Además la lactoferrina puede realizar esta función antiinflamatoria de forma directa al unirse a las endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos), mediadores en la respuesta inflamatoria en infecciones bacterianas (Brock, 2013).

8.5.4. Seroalbúmina

Constituye solamente el 5% de las proteínas solubles de la leche. Tiene la facultad de ligarse reversiblemente, a sustancias muy variadas. Es una de las proteínas más abundantes en el sistema circulatorio sanguíneo. Su principal función biológica se debe a su habilidad para unirse a gran variedad de ligandos la cual sirve de transporte de los ácidos grasos, insolubles en el plasma sanguíneo; aísla radicales libres de oxígeno o inactiva metabolitos lipófilos que son tóxicos (Pacheco, 2008).

Es una proteína relativamente grande, 69000 g/mol con una cadena formada por 583 aminoácidos. Es una proteína ácida, presentando carga neta nula a valores de pH entre 4.7 y 4.9 su estructura tridimensional está compuesta por tres dominios, cada uno de ellos formado por diez segmentos helicoidales. Su estructura secundaria, en su forma nativa, es principalmente alfa-helicoidal.

Ilustración 4. Diagrama estructural de Seroalbúmina



Fuente: (Pacheco, 2008).

Esta proteína presenta diferentes estados de isomerización en función del pH al que se encuentre.

8.5.4.1. Principales aplicaciones y utilización de la proteína Seroalbúmina

Es muy utilizada tanto en la industria alimentaria como para fines estas aplicaciones son debidas a sus principales propiedades: capacidad espumante, propiedades gelificantes y capacidad de enlazar ligandos. La primera de ellas es consecuencia de que su difusión a través de la interfase aire-agua la cual le permite reducir la tensión superficial, creando y estabilizando las emulsiones.

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

8.5.5. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas cuya función es la de unirse a un antígeno. Esta unión tiene una gran especificidad, de tal manera que una inmunoglobulina se unirá fundamentalmente y con mayor avidez a un antígeno determinado. Para la destrucción de dicho antígeno requieren de la colaboración de otros elementos. Así, cuando las

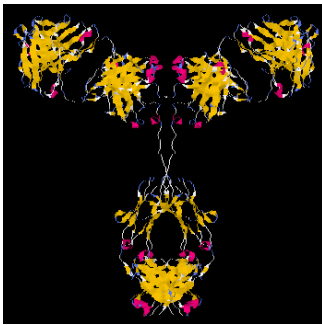
inmunoglobulinas detectan los antígenos, se unen a ellos y actúan de transductores de la información de la presencia de los mismos que serían destruidos por macrófagos, polimorfonucleares o células NK.

Las inmunoglobulinas transmiten la inmunidad de la madre al recién nacido. Son capaces de aglutinar numerosos tipos de bacterias y esporas y se consideran dentro del grupo de las principales sustancias antibacterianas de la leche cruda y el suero. (Martínez, 2009)

Las proteínas mencionadas que se obtienen del lactosuero son sensibles al calor y pueden

Las inmunoglobulinas tienen un punto isoeléctrico entre 5.5-8.3 y un peso molecular que varía entre 150000-1000000 g/mol. Están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas, dependiendo del tipo de inmunoglobulina, en una o varias unidades estructurales básicas.

Ilustración 5. Diagrama estructural de una unidad básica de inmunoglobulina.



Fuente: (Martínez, 2009)

8.5.5.1. Principales propiedades de las inmunoglobulinas

Según (Mehra, 2004) indica que en esta proteína se encuentra la capacidad para prevenir el ataque de patógenos al tejido epitelial, es un paso crítico en el establecimiento de una infección. Es decir, las inmunoglobulinas suponen una protección inmunológica pasiva contra infecciones microbianas.

8.6. Proteínas séricas propiedades funcionales y usos de las proteínas del lactosuero

Tabla 9. Proteínas séricas propiedades funcionales y usos de las proteínas del lactosuero.

TIPO DE COMPONENTE	COMPONENTES INDIVIDUALES	PROPIEDADES	USOS
PROTEÍNAS MAYORITARIAS	Lactoglobulina	Estabilizantes de espumas	Confitería, panadería, embutidos

	Lactoalbúmina	Propiedades gelificantes	Formulas infantiles y farmacéuticos
	Seroalbúmina bovina	Espumante	Productos como merengue
	Inmunoglobulinas	Emulsionantes	Alimentos funcionales
		Enlaces con lípidos	
		Composición en aminoácidos	
		Afinidad por receptores glicosilados	
		Efecto inmunoregulatorio	
PROTEÍNAS MINORITARIAS	Lactoferrina	Actividad antimicrobiana	Farmacéutica
	Lactoperoxidasa	Efecto bactericida	Fórmulas infantiles
	Factores de crecimiento (GFs)	Promotores de utilización del hierro	Aplicaciones nutraceuticas
	Péptidos bioactivos	Actividad antihipertensiva	Ingredientes bioactivos en suplementos alimentarios
	Caseinmacropeptidos	Actividad antitrombótica, antienvjecimiento	Cuidado de la piel y salud bucal

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021) (adaptado de (CASTELLS))

8.7. Ventajas de consumir lactosuero

Tabla 10. Ventajas de consumir lactosuero

VENTAJAS	
Niños	Contribuye a un excelente desarrollo físico y mental, fortalece las defensas a enfermedades, estimula una microbiota saludable, protegiendo su aparato digestivo de lo agresivo de otros productos menos nutritivos.
Jóvenes	Brinda la energía natural que les permite cubrir su acelerado ritmo de vida, también les proporciona los nutrientes que les permite tener un excelente desarrollo intelectual.
Deportistas	Ayuda a preservar la elasticidad de los tejidos, promueve la producción de masa muscular de forma natural, gracias a sus antioxidantes, combate los radicales libres causados por el exceso de ejercicio y fortalece los huesos gracias a su contenido de calcio.
Mujeres	Mejora el rendimiento y da energía para realizar sus actividades, proporciona nutrientes indispensables para cubrir las necesidades del organismo durante el embarazo y aligera los trastornos hormonales ocasionados por la menopausia.
Hombres	Incrementa la energía para responder a las necesidades que le exige su ritmo de vida. Reduce el cansancio, la tensión y el estrés, además de proporcionar nutrientes de calidad que contrarrestan las deficiencias de su alimentación. Promueve a través del selenio y el zinc una mejor vida sexual.
Personas Mayores	En las personas mayores los nutrientes presentes en el lacto suero mejoran la agudeza mental mientras que su contenido de calcio fortalece huesos y dientes, estimula el sentido del gusto y mejora la digestión, además incrementa la inmunidad contra enfermedades, reduce la fatiga y el estrés permitiéndoles disfrutar esta etapa de su vida.

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021) (adaptado de (Falvo, 2013)

8.8. Clasificación de los concentrados de proteínas del lactosuero

8.8.1. Concentrados de proteínas de Lactosuero

Los concentrados de proteína de lactosuero son elaborados por la ultrafiltración que consiste de una membrana semipermeable, la cual selectivamente permite pasar materiales de bajo peso molecular como agua, iones y lactosa, mientras retiene materiales de peso molecular alto como la proteína. El retenido es así concentrado por evaporación y liofilizado (Miñi & Paez , 2005).

8.8.2. Aislados de proteínas del Lactosuero

Los aislados de proteína de lactosuero, son obtenidos a partir del lactosuero en polvo parcialmente desmineralizado, estos poseen un contenido de proteína superior al 90% y su contenido de lactosa es menor en comparación con los concentrados de proteínas. Han sido aplicados como proteínas de alimentos funcionales debido a su alta pureza además por sus propiedades de hidratación, gelificación, emulsificación, entre otras. (Sanchez, 2018)

Los aislados de proteínas poseen un contenido menor de lactosa, entre 0.5% - 1.0%, con el fin de obtener el porcentaje de proteína deseado, para lograrlo, estos deben ser concentrados en varias ocasiones y parcialmente desmineralizados. Debido a su alta pureza, los aislados de proteínas son comúnmente utilizados como suplementos nutricionales, bebidas deportivas, como fuente de péptidos. Además de ser utilizado como aditivo en productos que requieren una fuente de sólidos lácteos con bajo nivel de minerales, como por ejemplo algunas fórmulas infantiles. (Parra, 2009)

8.8.3. Hidrolizados de proteínas de Lactosuero

Los hidrolizados, WPH, son compuestos proteicos de suero de leche que proceden de WPI, y que están posteriormente “pre digeridos” o tratados con enzimas digestivas para romper las proteínas en cadenas de péptidos que pueden ser rápidamente absorbidas en el aparato digestivo por su menor tamaño. Por lo tanto, su tolerancia es superior pero no su valor biológico, que dependerá del grado de concentración del preparado que se haya hidrolizado para obtenerlas. (Rolim, 2008)

8.8.4. Concentración y fraccionamiento de las proteínas del lactosuero

La concentración y fraccionamiento del lactosuero después de la producción de quesos nos permite controlar y suministrar determinados nutrientes por lo cual se logra que el productor logre recuperar una fracción importante de proteínas y al mismo tiempo eliminar los desechos sin atentar contra el medio ambiente. (Gyimesy, 2010)

El efecto de la concentración de proteínas sobre la agregación se ha evaluado ampliamente (Bryant, 1998) . Con respecto a las proteínas de suero, el aumento de la concentración de proteínas a menudo produce: aumento de la agregación debido a una mayor probabilidad de proteína interacciones de proteínas; y precipitación debido al límite de solubilidad. La concentración juega un efecto importante en la agregación de proteínas, particularmente

cuando la desnaturalización es inducida por calor; en este caso, la tendencia de una proteína a agregarse es mayor cuando su concentración es alta (Wehbi, 2005).

8.9. Purificación de proteínas

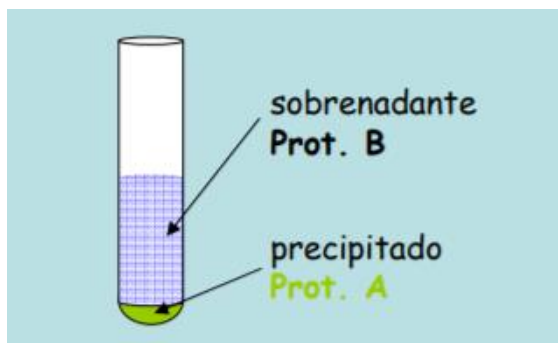
Las técnicas de la ingeniería de la proteína son una parte esencial de modificar o de producir las proteínas para requisitos particulares con las propiedades específicas que se pueden aplicar en diversos procesos industriales. Así son cruciales a la investigación biotecnológica. Sin embargo, estos métodos dependen de poder aislar y purificar las proteínas deseadas para poder entender sus propiedades físicas y químicas, junto con sus estructuras terciarias.

8.10. Métodos de purificación de proteínas

8.10.1. Método de precipitación por sales para la purificación de proteínas

La precipitación salina de las proteínas es una técnica en donde se logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar esta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas. Comúnmente se usa sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ debido a su gran solubilidad que se mezcla con agua a una temperatura de 20°C y porque el ion sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición gradual de esta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas, pero no desnaturalizadas. Las proteínas en solución se hacen menos solubles cuando se aumenta la fuerza iónica y esto se puede lograr adicionando sales como el sulfato de amonio. (Berg, Tymoczko J, & Striyer, 2008)

Ilustración 6. Método de precipitación por sales.



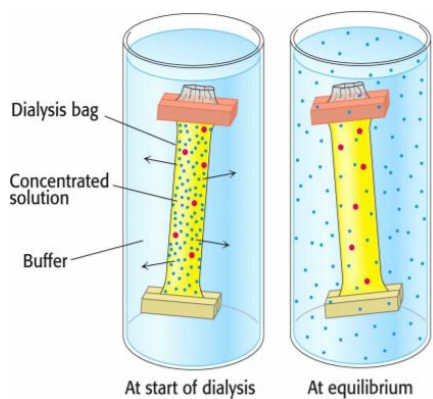
Fuente: (Berg, Tymoczko J, & Striyer, 2008)

8.10.2. Métodos de purificación basados en el tamaño molecular

8.10.2.1. Diálisis para la purificación de proteínas

La diálisis es un proceso que separa moléculas de bajo peso molecular, mediante el empleo de membranas semipermeables que contienen poros de dimensiones inferiores a las macromoleculares. Estos poros permiten que moléculas pequeñas, tales como las de los disolventes, sales y metabolitos pequeños, se difundan a través de la membrana, pero bloquean el paso de moléculas mayores. La diálisis se emplea rutinariamente para cambiar el disolvente en el que se encuentran disueltas las macromoléculas. Una disolución macromolecular se introduce en el saco de diálisis, que se sumerge en un volumen relativamente grande de disolvente nuevo. Las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana al fluido externo hasta que se alcanza el equilibrio, las macromoléculas permanecerán en el interior de saco de diálisis. (Dunn, 2010)

Ilustración 7. Diálisis para la purificación de proteínas.



Fuente: (Dunn, 2010)

8.10.2.2. Centrifugación

Es un proceso que utiliza la fuerza centrífuga para separar mezclas de partículas de diferentes masas o densidades suspendidas en un líquido. Cuando un recipiente que contiene una mezcla de proteínas u otra materia particulada, como células bacterianas, se gira a altas velocidades, la inercia de cada partícula produce una fuerza en la dirección de la velocidad de las partículas que es proporcional a su masa. La tendencia de una partícula dada a moverse a través del líquido debido a esta fuerza se compensa con la resistencia que el líquido ejerce sobre la partícula.

El efecto neto de girar la muestra en una centrífuga es que las partículas masivas, pequeñas y densas se mueven hacia afuera más rápido que las partículas menos masivas o las partículas con más arrastre en el líquido. Cuando se centrifugan suspensiones de partículas en una centrífuga, se puede formar un gránulo en el fondo del recipiente que está enriquecido para las partículas más masivas con bajo arrastre en el líquido.

Las partículas no compactadas permanecen mayoritariamente en el líquido llamado sobrenadante y pueden retirarse del recipiente separando así el sobrenadante del sedimento. La velocidad de centrifugación está determinada por la aceleración angular aplicada a la muestra, típicamente medida en comparación con la *g*. Si las muestras se centrifugan el tiempo suficiente, las partículas en el recipiente alcanzarán un equilibrio en el que las partículas se acumulan específicamente en un punto del recipiente donde su densidad de flotación se equilibra con la fuerza centrífuga.

Tabla 11. Centrifugación según la velocidad

Centrifugación a baja velocidad	menos de 10.000 rpm
Centrifugación a alta velocidad	entre 10.000 y 20.000 rpm
Ultra centrifugación	más de 20.000 rpm

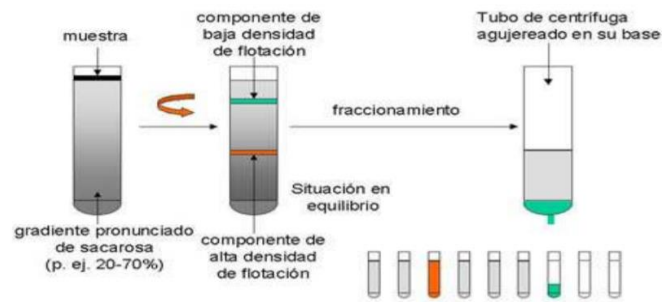
Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina, (2021)

La centrifugación utiliza la teoría de membranas y en especial la técnica de microfiltración, aplicación de una presión a través de un filtro compuesto por una membrana semipermeable. En la filtración de flujo tangencial, la corriente de alimentación pasa paralela a la cara de la membrana cuando una porción pasa a través de la membrana (permeado) mientras que el resto (retenido) se recircula de nuevo a el depósito de alimentación.

8.10.2.3. Centrifugación en gradiente de densidad

Se basa en la separación de partículas en función de su densidad de flotación. Este procedimiento se basa en la unión de una muestra se suero más sacarosa o de cloruro de cesio. Al centrifugar cada componente se desplaza hacia arriba o hacia abajo hasta que alcance una posición en la que su densidad sea igual a la de su entorno. Mediante esto se producirán una serie de bandas discretas, las más próximas al fondo del tubo contendrán las partículas con mayor densidad de flotación.

Ilustración 8. Separación en un tubo gradiente de densidad.



Fuente: (Wehbi, 2005).

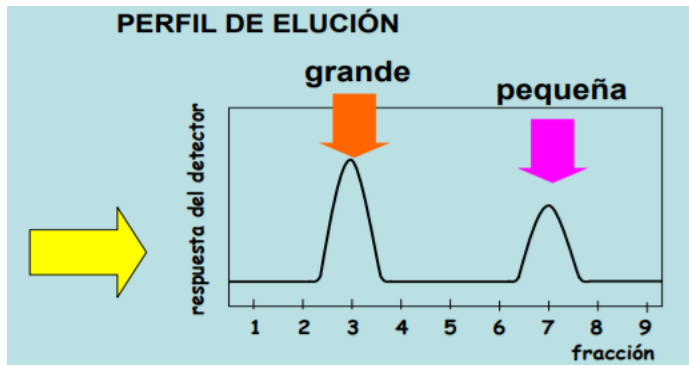
8.10.3. Técnica de Cromatografía de gel de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel o de tamiz molecular) es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación y purificación de proteínas. Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa, poliacrilamida. Todos estos geles se hallan constituidos por partículas de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado. (Burdo, 2014)

El principio de la separación se desarrolla colocando el suero que llena la columna en la fase estacionaria, gel o resina, este está formado por partículas con poros de un cierto intervalo de tamaños. Las moléculas mayores que los poros no pueden entrar en ellos, por lo que avanzan por la columna con mayor rapidez que las de tamaño menor, que pueden entrar en los poros y así realizan un recorrido mayor, progresando más lentamente a lo largo de la columna. En una cromatografía en columna lo habitual es recoger fracciones del líquido que sale, para analizarlas individualmente y así trazar el perfil de elución de la cromatografía.

Dependiendo de su punto isoeléctrico y el pH del medio, una proteína puede presentar una carga neta positiva o negativa, por lo tanto, el procesamiento del suero de queso mediante cromatografía de intercambio aniónico o catiónico puede ser empleado para la purificación de proteínas individuales o grupos de proteínas. En estos procesos, las proteínas son adsorbidas sobre el material cromatográfico mediante fuerzas electrostáticas y luego de sucesivos lavados en los que son removidos los componentes del suero que no interactúan con la matriz se procede a la desorción o elución de las proteínas mediante el incremento en la fuerza iónica o bien mediante el cambio. (Urtasun, 2009)

Ilustración 9. Perfil de Elución.



Fuente: (Urtasun, 2009)

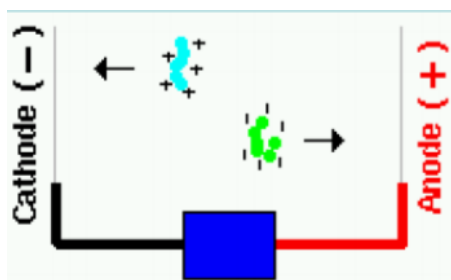
8.11. Métodos basados en la carga eléctrica

8.11.1. Técnica de electroforesis para la purificación de proteínas

Se basa en la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos + y - respectivamente), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La electroforesis es un método analítico semi preparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. (García, 2010)

Según Ministerio de salud, (2003), la poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además, tiene la ventaja de que, variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro.

Ilustración 10. Técnica de electroforesis



Fuente: (García, 2010)

8.11.2. Técnica de Electro elusión para la purificación de proteínas

Dunn, (2010), menciona que es una técnica que se basa en la extracción de una muestra de un gel de electroforesis mediante la aplicación de una corriente eléctrica la cual produce la migración de las proteínas. Se trata de recuperar la proteína inmersa en el gel, y si es posible volver a re naturalizarla. En esta técnica, las zonas proteicas se localizan después de la electroforesis mediante tinción con azul brillante Coomassie R-250. Los pedazos de gel que contienen proteínas se cortan del gel principal para luego colocar en una cámara de electroerosión donde las proteínas se transfieren bajo la acción de un campo eléctrico desde el gel a la solución y se concentran sobre una membrana de diálisis con un límite de poro molecular apropiado. Aunque este método puede tener una alta eficacia (90%) de recuperación de proteínas, sufre de una serie de desventajas, que incluyen aislamiento relativamente lento de un pequeño número de muestras, contaminación de la proteína eluida con dodecil sulfato de sodio, sales y otras impurezas.

Según Nicolás,(2009) manifiesta que algunas proteínas, se necesita otros tipos de técnicas para su purificación, como los basados en fenómenos de adsorción. Estos procesos implican captura y separación, por lo que estas proteínas son menos selectivas. Inicialmente, estas estrategias fueron diseñadas fundamentalmente, para las industrias biofarmacéutica y biotecnológica pertenecen a las denominadas Operación "Recuperación y depuración". La estrategia adsorptiva más ampliamente utilizada para la purificación de las proteínas del suero de queso es la cromatografía de intercambio iónico.

8.11.3. Cromatografía de intercambio iónico

Es un método que permite la separación de moléculas polares basadas en sus propiedades de carga eléctrica, El intercambio de iones es el método más ampliamente utilizado para la separación y la purificación de biomoléculas cargadas tales como polipéptidos, proteínas, polinucleótidos, y ácidos nucleicos. Su aplicabilidad dispersa, alta capacidad y simplicidad, y su alta resolución son las razones dominantes de su éxito como método de purificación, siendo ampliamente utilizada en varios procesos industriales (Reyes, 2015).

La cromatografía de intercambio iónico separa las moléculas en base a su carga iónica neta, la separación se lleva a cabo por la competencia entre proteínas con diferente carga superficial por grupos cargados opuestamente sobre un adsorbente o una matriz de intercambio iónico. Actualmente, es una de las técnicas de purificación de proteínas más usadas.

Una proteína que no tiene carga neta a un pH equivalente a su punto isoelectrico no podrá interactuar con la matriz o fase estacionaria cargada. Sin embargo, a un pH por encima de su punto isoelectrico una proteína podrá ligarse a una matriz cargada positivamente o intercambiador aniónico mientras que a un pH por debajo de, una proteína podrá unirse a una matriz cargada negativamente o intercambiador catiónico. Dichos intercambiadores existen en estado de equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria (O'Connor, 2010).

Según Costañón , (2015) la cromatografía se compone de:

- **Fase estacionaria:** insoluble, lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil.
- **Fase Móvil:** en cromatografía de intercambio iónico suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas y deben poder disolver la muestra y tener una fuerza disolvente que proporcione tiempos de retención razonables.

El principio básico de la cromatografía de intercambio Iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser unidas o desunidas cambiando el ambiente iónico. El intercambiador catiónico con grupos cargados negativamente, pudiendo intercambiar Iones Positivos, mientras intercambiadores aniónicos con grupos cargado positivamente, pudiendo intercambiar iones negativos. La elección entre intercambiadores fuertes o débiles está basada en el efecto del pH sobre la carga y la estabilidad. (Rojas, 2018)

8.11.4. Selección de la resina en la cromatografía de intercambio iónico

Las resinas de intercambio iónico tienen positivo o negativo los grupos funcionales cargados covalente conectados a una matriz sólida. Las matrices se hacen generalmente de la celulosa, del poliestireno, de la agarosa, y de la poliacrilamida. Algunos de los factores que afectan a la opción de la resina son cambiador del anión o de catión, flujo, intercambiador de iones débil o fuerte, talla de partícula de la resina, y capacidad de enlace. La estabilidad de la proteína del interés dicta la selección de un anión o de un cambiador de catión - cualquier cambiador puede ser utilizado si la estabilidad es de ningún interés.

8.12. Cuantificación de proteínas de suero

Es importante estimar la concentración de las proteínas durante el proceso de purificación y el uso de un método de cuantificación adecuado depende de diversos factores como la cantidad

de proteína total en la muestra, la concentración de la proteína, la especificidad del método, así como también la presencia de otras sustancias que puedan interferir en la medición.

8.12.1. Método de Bradford para cuantificar las proteínas en el suero

García, (2010) refiere que este método se basa en la unión no covalente del colorante Azul de Coomassie G-250 y la proteína; el colorante en solución ácida presenta dos formas coloreadas, café y azul. El color café cambia a azul cuando el colorante se ha unido con la proteína, la formación de este complejo colorante-proteína toma aproximadamente 2 minutos y permanece estable por 1 hora. Las muestras se leen en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm. El método de Bradford es sensible para los residuos de aminoácidos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina.

Es muy importante determinar y cuantificar la concentración total de proteínas, existen varios métodos para lograrlo pero aquí hablaremos del método de Bradford, ya que es uno de los más rápidos, sencillos, baratos y pocas sustancias interfieren en su determinación, entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas

La solución de Bradford se prepara con:

- 10 mg de Azul de Coomassie G-250
- 5 mL de etanol al 95%
- 10 mL de ácido fosfórico al (5% (w/v))

La solución se diluye a volumen final de 100 mL.

8.12.2. Método de Lowry para cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína con cobre y el reactivo Folin es un método sensible que no requiere digestión previa. Es mucho más sensible y específica que la determinación por absorción en el ultravioleta a 280 nm, así como relativamente sencilla y fácil de adaptar a análisis en pequeña escala. Sin embargo, la cantidad de color producido varía con diferentes proteínas y en algunos casos el color no es estrictamente proporcional a la concentración²⁹. Existen dos pasos que llevan al desarrollo de color en las proteínas, la reacción con cobre en álcali y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico por el complejo proteína-cobre.

La determinación cuantitativa de la concentración de proteínas es una de las pruebas que más frecuentemente deben hacerse en el laboratorio de bioquímica. Primitivamente, la cantidad de proteínas se evaluaba midiendo la cantidad total de nitrógeno proteico, y teniendo en cuenta que este elemento representa aproximadamente el 16% del peso de una proteína. Este era un método largo y laborioso y con poca sensibilidad. La aparición de métodos calorimétricos ha permitido solventar estos dos inconvenientes. (Hans, 2010)

La reacción que tiene lugar en el método de Lowry es bastante compleja y no del todo conocida. Pues la reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} , en presencia de tartrato para evitar la precipitación. Es esencialmente idéntica a la reacción del Biuret, formándose un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico.

Las características del método según (Hans, 2010) son:

- La intensidad de la coloración varía con la composición de aminoácidos de la proteína.
- Rango oscila de 0,1-1 mg/ml.
- La modificación de Hartree incrementa la sensibilidad de 2-200 $\mu\text{g/ml}$.
- Presenta algunas interferencias.

8.13. Tabla de comparativa de los métodos de purificación

Tabla 12. Tabla comparativa de los métodos de purificación.

Métodos de purificación de proteínas			
Método	Características	Ventajas	Desventajas
Método de precipitación por sales	Se usa mucho en los primeros pasos de la purificación de proteínas. Se realiza la deshidratación mediante la precipitación de proteínas Para su	Puede realizar en forma continua. El equipo que se utiliza es sencillo. Los agentes de precipitación en muchos casos son baratos.	La adición de sales elimina el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente.

	<p>aprovechamiento se debe añadir Sulfato amónico y cloruro de sodio, sal.</p>		
Diálisis	<p>Método basado en el tamaño molecular</p> <p>Uso de membranas semipermeables.</p> <p>Toca desalar muestras por la diferencia de presión osmótica dentro y fuera del saco de diálisis.</p> <p>La mezcla de proteína a desalar se coloca dentro de una membrana de celofán.</p>	<p>La diálisis se emplea rutinariamente para cambiar el disolvente en el que se encuentran disueltas las macromoléculas.</p>	<p>Tiempo prolongado para la diálisis.</p> <p>Alto consumo de amortiguador.</p> <p>Se puede romper la membrana.</p>
Centrifugación	<p>Método basado en el tamaño molecular</p> <p>Método que utiliza la fuerza centrífuga.</p> <p>Realiza la purificación mediante la separación de partículas presentes en el lactosuero.</p> <p>Utiliza la teoría de membranas en</p>	<p>Técnica de líquido continuo y a gran escala.</p> <p>Baja viscosidad.</p> <p>Técnica combinada con la teoría de membranas.</p> <p>Más precisión al momento de purificación.</p>	<p>La velocidad de centrifugación está determinada por la aceleración angular aplicada a la muestra.</p>

	<p>especial la técnica de microfiltración.</p> <p>Separa partículas de tamaños grandes existentes en el lactosuero.</p>		
Centrifugación de gradiente de densidad	<p>No provoca modificación biológica en la muestra.</p> <p>No interacciona con el método de detección.</p> <p>Fácilmente separable la muestra.</p> <p>No difusible.</p> <p>Muestra que se le añade sacarosa y glicerol.</p>	<p>Una de sus ventajas es que su conservación es simple.</p> <p>Materiales de bajo costo para su remplazo.</p> <p>Bajo coste, pureza inerte.</p>	<p>Alta viscosidad.</p> <p>Su arranque es relativamente lento este tipo de centrifugación tiene a desaparecer por no corresponder a las exigencias de las industrias.</p>
Cromatografía de gel o exclusión molecular	<p>Técnica sencilla utilizada en la separación y purificación de proteínas.</p> <p>Este método se realiza en columnas cilíndricas.</p> <p>Los geles utilizados son de tipo</p>	<p>Incluyen buena separación de las moléculas grandes de las pequeñas.</p> <p>Se pueden aplicarse a varias soluciones sin interferir en el proceso de filtración.</p>	<p>En este método no puede medir cuanto espacio ocupa una molécula de polímero particular cuando está en solución.</p>

	dextranos, agarosa o poliacrilamida.		
Electroforesis	<p>Utilizado en la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico.</p> <p>Método analítico semi preparativo.</p> <p>Químicamente inerte.</p> <p>Separación por su punto isoeléctrico.</p>	<p>Técnica barata fácil y rápida para el vertido.</p> <p>Permiten la estimación del tamaño de las moléculas.</p> <p>No desnaturaliza las muestras.</p> <p>Las muestras pueden ser recuperadas.</p>	<p>Los geles pueden fundirse durante la electroforesis.</p> <p>El buffer puede agotarse.</p> <p>Diferentes formas de material genético pueden tratarse cuando su forma no es predecible.</p>
Electroelución	<p>Extracción de una muestra de un gel de la electroforesis.</p> <p>Aplicación mediante la aplicación de corriente eléctrica.</p> <p>Recupera proteína inmersa en el gel.</p> <p>Utiliza una tinción azul brillante Coomassie R-250.</p>	<p>Tiene la posibilidad de volver a naturalizarla.</p> <p>Este método tiene una eficacia buena de recuperación de proteínas.</p>	<p>Técnica utilizada para biofarmacéutica y biotecnología.</p> <p>Necesita otro tipo de métodos para la purificación de proteínas.</p>
Cromatografía de intercambio iónico	<p>Purificación de moléculas en base a su carga iónica neta.</p> <p>La carga de los</p>	<p>Alta capacidad.</p> <p>Alta resolución.</p> <p>Se puede sembrar un gran volumen para</p>	<p>Las muestras deben estar desalinizadas antes de ser aplicadas a este tipo de cromatografía.</p>

	<p>grupos iónicos inmóviles se equilibra con la de otros iones de signo opuesto.</p>	<p>luego eluirlo en un menor volumen. Actualmente utilizado en las industrias.</p>	
--	--	---	--

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

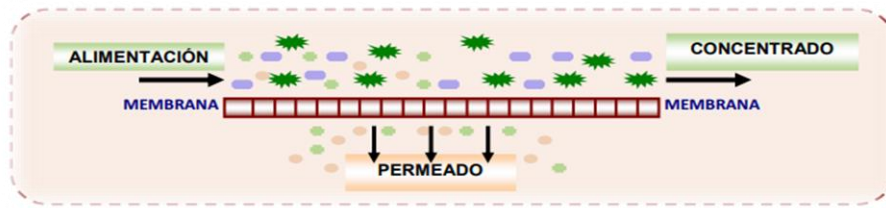
8.14. Tecnología de membranas

La tecnología de membranas es un método de filtración de solutos disueltos en un fluido, cuyo fundamento es la separación por la diferencia de los pesos moleculares y el tamaño de partícula. La industria láctea ha utilizado el procesamiento de membranas desde su introducción en la industria alimentaria, a fines de la década de 1960, para clarificar, concentrar y fraccionar una variedad de productos lácteos. El uso de UF y ósmosis inversa para concentrar LS fue una de las primeras aplicaciones de membranas en esta industria. (Chávez, 2001)

Se aplican en la separación de compuestos y consisten en la instalación de membranas semipermeables y en la operación de filtrado por flujo cruzado a presión controlada del material a fraccionar. Como descarga de esta operación siempre se obtienen dos corrientes: el permeado que contiene aquellos compuestos que son filtrados por la membrana semipermeable normalmente se deshecha y el concentrado o retenido que se compone de las sustancias aprovechables que se desean mantener en el producto final. (Parzanese, 2008)

Los sistemas de membranas se utilizan ampliamente en toda industria láctea para controlar el contenido de proteínas, grasas y lactosa de una variedad de productos. Estos procesos de membrana han tenido éxito porque pueden implementarse de manera efectiva y económica a gran escala requerida para la mayor de las aplicaciones lácteas. Estas técnicas son básicamente procesos de filtraciones los que se utiliza membranas porosas de diámetro minúsculo como medio de filtración para separar los componentes solidos de la fase liquida. (Tsakali & Allessandro, 2012)

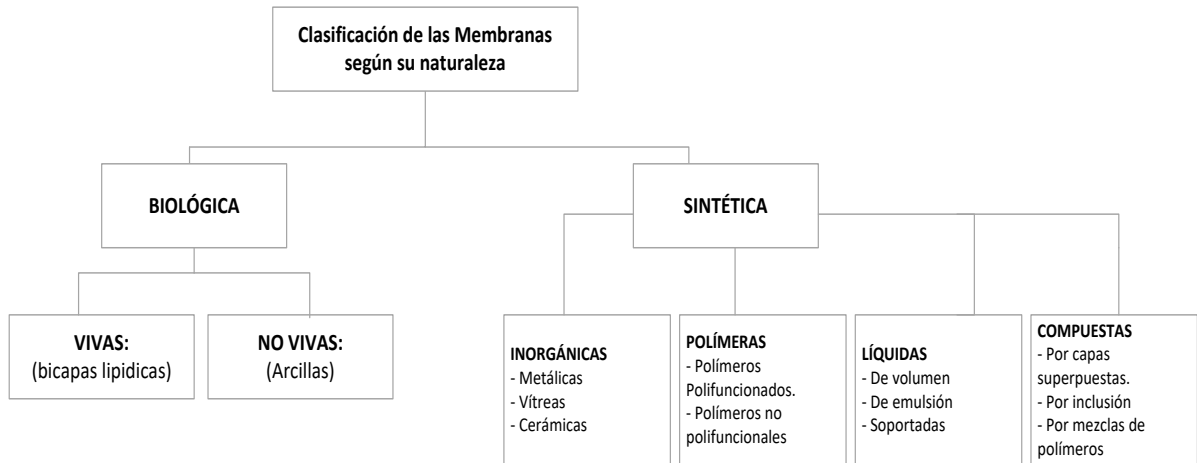
Ilustración 11. Tecnología de membranas.



Fuente: (Tsakali & Alessandro, 2012)

8.14.1. Clasificación de las membranas según su Naturaleza

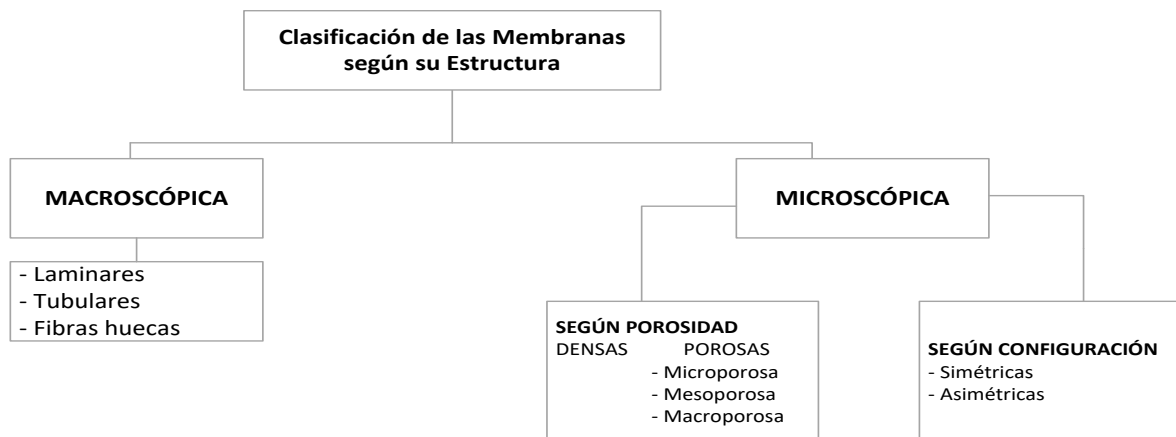
Diagrama 1. Clasificación de las membranas según su Naturaleza.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

8.14.2. Clasificación de las membranas según su Estructura

Diagrama 2. Clasificación de las membranas según su Estructura.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

Tabla 13. Clasificación de las técnicas de membrana según el tamaño de partícula y presiones de trabajo.

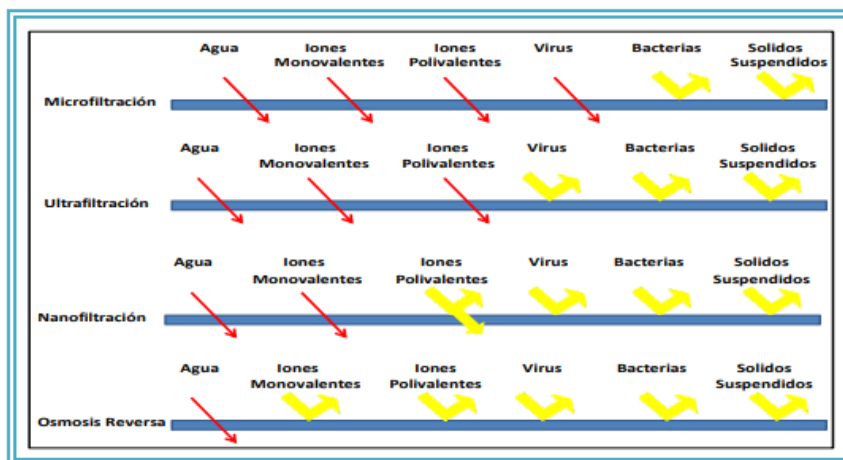
Técnica	Tamaño de Partícula	Presión de trabajo (bar)
Microfiltración	50 a 10000 nm	2
Ultrafiltración	5 a 100 nm	1-5
Nanofiltración	0,5 a 5 nm	5-15
Osmosis Inversa	0,01nm	10-70

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

8.15. Introducción de la Tecnología de Membranas a los procesos

Los procesos por membrana están encuadrados dentro de los procesos de separación, concentración y purificación. Se trata de uno de los procesos más comunes en los procesos de la industria láctea y química actualmente. La principal ventaja con respecto a otros métodos convencionales de separación, como pueden ser la destilación, la cristalización o la extracción con disolventes, es su menor necesidad energética, lo que lo convierte en una alternativa limpia. Además, en la mayoría de los casos los procesos se realizan a temperatura ambiente, reduciendo, en el caso de compuestos sensibles a la temperatura, su afectación por ser tratados. (Calderon, 2015)

Ilustración 12. Diferentes tipos de filtración y concentración, Características del tamaño de corte, según el tipo de materia a filtrar.



Fuente: (Calderon, 2015)

8.16. Concentración de proteínas

8.16.1. Métodos de membranas para la concentración de proteínas

La concentración de proteínas que se requiere obtener de un producto acabado, está ligada con la tecnología de membranas que se va a utilizar en dicho procedimiento. Actualmente el mercado ofrece una gran variedad de equipos tecnológicos, algunos resultan más complejos, caros y de un menor diámetro de poros. En la siguiente tabla se detalla las moléculas y partículas que son capaces de penetrar los poros según su tipo de filtración. (Albarral, 2016).

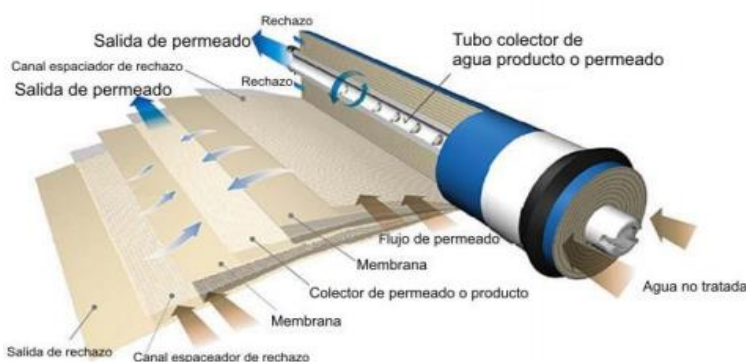
Antes de indicar las posibles alternativas de concentración por membranas, es importante añadir que el lacto suero tiene que ser purificado. Esta concentración representa unos ingresos elevados para la obtención de las proteínas. (Osver, 2013)

8.16.1.1. Cómo actúa la osmosis inversa en la concentración de las proteínas del lactosuero

Se puede considerar como un proceso de concentración ya que no emplea calor, Consiste en un proceso en el cual se da una separación únicamente del agua presente en las proteínas del lacto suero, esto gracias a que el tamaño del poro empleado es sumamente pequeño en este tipo de membranas. (Villalobos, 2006)

La ósmosis inversa es el movimiento de moléculas a través de una membrana parcialmente permeable porosa, que va de una región de menor concentración a otra de mayor, en esta acción la membrana tiende a igualar las concentraciones en los dos lados. (Valencia, 2019)

Ilustración 13. Proceso de la osmosis inversa.



Fuente: (Valencia, 2019)

Esta membrana posee el nivel más fino de la filtración, pues no posee poros. Actúa como una barrera selectiva a todos los iones disueltos y a moléculas orgánicas con un peso molecular

superiores a 100 Da. En cambio las moléculas de agua pasan libremente a través de la membrana. Es usada para concentrar el lacto suero o la leche desnatada. (Uribe, 2005)

Con esta tecnología se concentra hasta 3 veces todos los componentes del lacto suero, a excepción de una cantidad relativamente baja de ácido láctico. Con las membranas de Ósmosis Inversa, y que puede generar retenidos con un contenido máximo de 30% en sólidos. (Sambrano, 2005)

8.16.2. De qué manera interviene la nanofiltración en el proceso de concentración de las proteínas del lactosuero

La nano filtración en lo últimos años ha empezado a ser estudiada para la concentración de las proteínas del lactosuero, logrando un fraccionamiento con resultados favorables. La nanofiltración es una operación baja presión, que deja pasar solo las partículas de tamaño menores de 1 nanómetro, de aquí el término de nanofiltración. Las membranas de nanofiltración operan en rangos más altos de corte de peso molecular 300 – 500 g/mol.

En este proceso, el tipo de membranas posee un tamaño de poro menor de 2 nm. El rango de presiones de operación está entre 0,5 y 4 MPa. La nanofiltración permite separar los azúcares de otras moléculas orgánicas, así como sales minerales multivalentes de moléculas orgánicas, y sales multivalentes de las monovalentes, debido a los efectos de exclusión iónica y estérica. (Uribe, 2005)

Ilustración 14. Proceso de Nanofiltración.



Fuente: (Uribe, 2005)

La nanofiltración es una técnica que combina características de ultrafiltración y ósmosis inversa, pues su mecanismo de separación se basa tanto en diferencias de tamaños, propio de la ultrafiltración, como en el modelo de disolución – difusión, tal como ocurre en ósmosis

inversa finalmente, puede concluirse que las membranas de nano filtración se caracterizan por. (Samaniego, 2018)

- Carga iónica: los iones divalentes son mejor rechazados que los monovalentes, haciendo posible separar iones de diferentes valencias y tamaños. Siendo muy útil en ablandamiento de aguas, eliminación de nitratos y desmineralización del lacto suero.
- Peso molecular: especies de alto peso son mejor rechazados que los de bajo peso molecular.
- Grado de disociación: ácidos débiles como el ácido láctico es mejor rechazado a valores altos de pH, donde la disociación es completa.
- Polaridad: las sustancias menos polares son mejor rechazadas.
- Grado de hidratación: Especies altamente hidratadas son mejor rechazadas que las menos hidratadas (entalpía de hidratación).

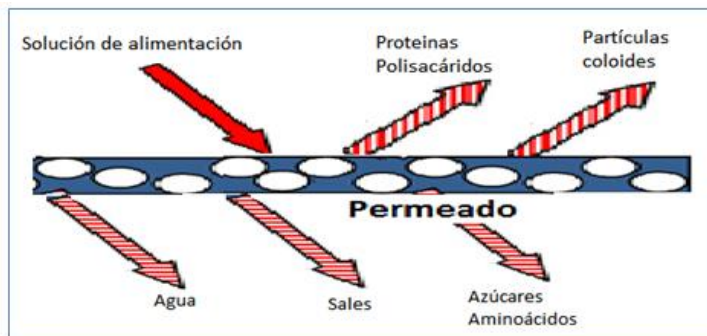
8.16.3. Como se produce la concentración mediante el método de la ultrafiltración de las proteínas del lactosuero

La ultrafiltración ofrece la ventaja fundamental de mantener las proteínas en sus estados nativos este proceso se puede utilizar para concentrar proteínas. Esta opción estuvo durante mucho tiempo en el aire y al final se optó por descartarla. Se debió tomar esa decisión porque las cantidades de finos de queso son sumamente pequeñas para eliminarse en la centrifugación y si después quedaba algún resto no ocasionaría ningún problema en el concentrado. (Albarral, 2016)

En el método de ultrafiltración, las proteínas se concentraron utilizando membranas cerámicas de circonio-titanio de flujo cruzado (corte de 50 kDa y áreas de membrana efectivas de 0.020 m²). Esta membrana posee un tamaño de poro entre 50 y 2 nm. El rango de presiones de operación está entre 0,1 y 1 MPa. La ultrafiltración es utilizada para separar contaminantes microbiológicos, coloides (proteínas) y en general moléculas de gran tamaño. (Sartorius A. , 2019)

Este método de concentración de proteínas usa como principio básico la filtración por membranas según un flujo cruzado. Los módulos de filtración que se utilizan pueden tener diferentes diseños: Láminas enrolladas en espiral, placas y bastidor, tubular (ya sea de cerámicas o de polímeros) y fibra hueca en la ultrafiltración se obtienen dos productos: el retenido o concentrado que es el líquido retenido en la membrana y el permeado o filtrado que es el líquido que pasa a través de la membrana. (Cadena, 2010)

Ilustración 15. Proceso de ultrafiltración.



Fuente: (Albarral, 2016)

8.17. Tabla comparativa de los métodos de concentración

Tabla 14. Tabla comparativa de los métodos de concentración.

Concentración de proteínas			
Método o técnica	Características	Ventajas	Desventajas
Ultrafiltración	<p>Capaz de concentrar sólidos suspendidos, bacterias, proteínas, colorantes y compuestos con un peso molecular mayor a 150.000 Da.</p> <p>Su uso y aplicación se extiende al campo industrial e investigativo como método para concentrar y separar soluciones.</p> <p>Utiliza baja presión para forzar el fluido a través de la membrana, lo cual resulta en bajos costos de operación.</p>	<p>Estabilidad y calidad del permeado.</p> <p>Efluentes desinfectados tras atravesar la membrana.</p> <p>Compactibilidad debido al mínimo requerimiento de espacio.</p>	<p>Polarización de la concentración.</p> <p>Membranas más cerradas que las utilizadas en microfiltración.</p>

<p>Osmosis Inversa</p>	<p>Proceso de concentración ya que no emplea calor.</p> <p>Se realiza movimiento de moléculas a través de una membrana parcialmente permeable porosa.</p> <p>Actúa con moléculas orgánicas con un peso molecular superiores a 100 Da.</p>	<p>Con esta tecnología se concentra hasta 3 veces todos los componentes del lactosuero.</p> <p>Puede generar retenidos con un contenido máximo de 30% en sólidos.</p> <p>Los sistemas de ósmosis inversa ocupan poco espacio.</p> <p>Mantenimiento de bajo costo.</p>	<p>Sirve únicamente para la separación de agua de una solución.</p>
<p>Nanofiltración</p>	<p>La nanomembrana no es tan cerrada y funciona a una presión de agua de alimentación.</p> <p>Contribuye al reciclaje de las aguas residuales de uso comercial e industrial.</p> <p>Las membranas de Nanofiltración retienen moderadamente las sales univalentes.</p> <p>Requiere menos presión y menor consumo de energía.</p>	<p>Volúmenes de descarga más bajos, concentraciones de retenido más bajas.</p> <p>Reducción en metales pesados.</p> <p>Desinfección.</p> <p>Reducción del contenido de sal y contenido de materia disuelta.</p>	<p>Mayor consumo de energía que UF y MF.</p> <p>Retención limitada de sales e iones univalentes.</p> <p>Las membranas son sensibles.</p>

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

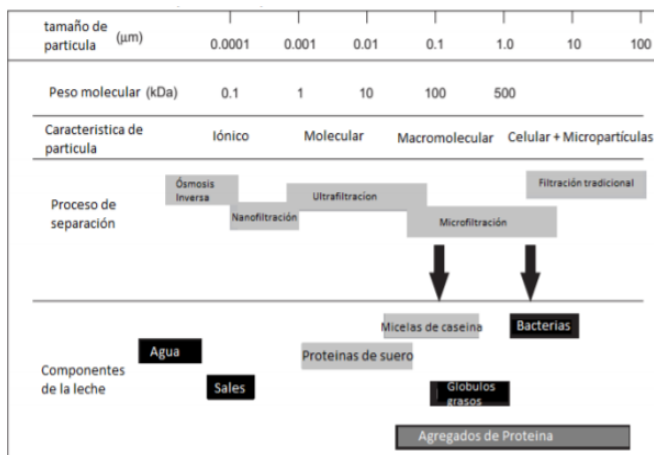
8.18. Separación de proteínas del lactosuero

8.18.1. Métodos de separación de proteínas del lactosuero

8.18.1.1. Clasificación de los procesos de membranas para la separación de las proteínas presentes en el lactosuero

Los procesos de separación por membrana se clasifican de acuerdo al tamaño de las partículas o moléculas que son capaces de retener: microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa y electrodiálisis. Así se tiene:

Ilustración 16. Clasificación por tamaño de partícula de los procesos de separación por membranas.

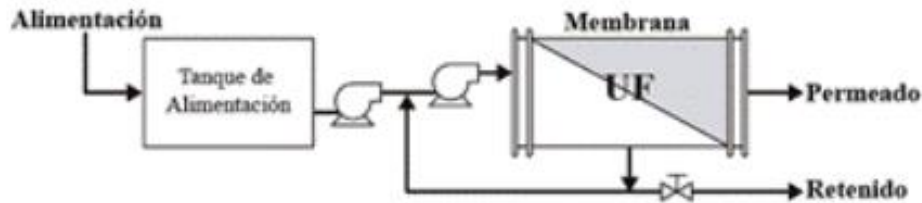


Fuente: (Sartorius A. , 2019)

La obtención de las proteínas del suero puede lograrse mediante la separación de sus solutos disueltos por medio de una membrana de Ultrafiltración. En la literatura científica se presentan diversas configuraciones y tipos de membranas utilizadas, pero el empleo de metodologías diferentes conduce a que los rendimientos en el permeado y retenido varíen. Sin embargo, los factores críticos del método de Ultrafiltración, tales como la presión transmembranaria, el pH y la temperatura deben ser siempre valores muy similares en cualquier proceso de fraccionamiento.

A continuación se presenta un diagrama general de flujo de la Ultrafiltración de suero. En esta se observa que el permeado se retira continuamente y parte del retenido es recirculado continuamente durante el proceso.

Ilustración 17. Diagrama general de flujo de la Ultrafiltración.



Fuente: (Sambrano, 2005)

8.18.2. Cómo actúa la microfiltración al momento de separar las proteínas del lactosuero

Separa partículas con un tamaño comprendido entre 0,05 y 10 μm , a presiones comprendidas entre los 0,5 y 3 bar. Usualmente se usa para retener sólidos en suspensión: por lo tanto, se emplea como etapa de limpieza, de concentración o como pretratamiento para la nanofiltración o a la ósmosis inversa.

8.18.2.1. Aplicaciones industriales de la microfiltración

La microfiltración tiene diversas aplicaciones, algunas de ellas son: el tratamiento de aguas residuales y la esterilización de leche, la separación y purificación de componentes de coproductos de industria de alimentos, en el caso de los lácteos, es una forma alternativa para producir proteínas de suero de leche. Las proteínas séricas solubles, recuperadas en el permeado, tienen el mismo pH que la leche, a diferencia de suero de queso tradicional, que es relativamente ácido. Por lo tanto, el valor tecnológico y económico del obtenido por MF es mayor que el tradicional, ya que la solución de proteínas de suero no contiene péptidos de caseína, enzimas, grasas y proteínas de suero desnaturalizadas. (Dickson & Kenstish, 2015)

8.18.3. De qué manera interviene la ultrafiltración en la separación de las proteínas del lactosuero

La ultrafiltración es un método que permite separar macromoléculas y sustancias coloidales. En este proceso la membrana actúa como barrera selectiva y permite una separación de partículas que se ubican entre los 5 y 100nm. Estos tamaños pueden asimilarse a tamaños moleculares, entre 0,5 y los 500kDalton. Esta técnica se usa para separar polímeros y almidones, dispersiones, microorganismos y mezclas de proteínas de diferentes pesos

moleculares. El límite del peso molecular de la membrana se define como el peso molecular de las proteínas globulares que son retenidas en un 90% por la membrana (Sartorius, 2019).

Las moléculas que no atraviesan la membrana se conocen como material retenido o concentrado. Los materiales disueltos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana por acción de una fuerza impulsora de presión hidrostática relativamente baja (1 – 10 bar); esta corriente que se forma se conoce como permeado o filtrado.

La ultrafiltración utiliza membrana que posee un tamaño de poro entre 50 y 2 nm. El rango de presiones de operación está entre 0,1 y 1 MPa. La ultrafiltración es utilizada para separar contaminantes microbiológicos, proteínas y en general moléculas de gran tamaño. El límite del peso molecular de la membrana se define como el peso molecular de las proteínas globulares que son retenidas en un 90% por la membrana. La regla general es que la masa molecular debe diferir por un factor de 10 para lograr una buena separación (Sartorius, 2019)

Tabla 15. Peso molecular de las proteínas del suero.

Proteínas	Peso Molecular (kDa)
Caseínas	23,0
β -lactoglobulina	18,3
α -lactoalbúmina	14,0
Inmunoglobulinas	Hasta 1000
Seroalbúminas	63,0

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

Concentra grandes moléculas y macromoléculas de peso molecular entre 1000 y 200,000 Da; por lo cual la membrana tiene un diámetro aproximado de poro de 0,01 μ m. Se realiza a valores de presión inferiores 1000 ka

8.18.3.1. Aplicación Industrial de Ultrafiltración

La ultrafiltración se ha empleado para el fraccionamiento de leche, suero y proteínas, la recuperación de biomoléculas a partir de salmueras, el tratamiento de agua para consumo humano; la concentración de proteínas y anticuerpos solubles. Es un proceso atractivo para la

reducción de hasta un 10% de la lactosa en la leche. Las grasas y las proteínas quedan en el retenido, mientras que la lactosa, algunos minerales y sales pueden pasar fácilmente a través de la membrana (Ghosh & Sadavarte, 2015)

8.18.4. Cuál es método que utiliza la Osmosis inversa para separar la proteína del lactosuero

Se define como la concentración de soluciones por eliminación de agua; el tamaño del poro se encuentra entre 5 – 15 Å permitiendo obtener retenidos con un contenido máximo de sólidos del 30%. El método consiste en el uso de membranas que son solubles en agua e impermeables para la sal, por ello se usan para desalinizar agua suero ácido. La OI tiene un costo energético elevado debido a las altas presiones usadas, no obstante sus resultados son óptimos. (Ashhab & Gillor, 2014)

8.18.4.1. Aplicación Industrial de Osmosis Inversa

La Osmosis Inversa es especialmente adecuada para procesos de deshidratación, concentración, separación de sustancias, o tratamiento de residuos líquidos, ejemplo de esto son: la separación y purificación de componentes de soluciones salinas; la remoción de patógenos del agua para consumo humano. (Ibrajim & Nagasawa, 2015)

8.18.5. Cómo actúa la nanofiltración para separar las proteínas del lactosuero

El origen de la NF se remonta a 1970, como tecnología alterna a la Osmosis Inversa, caracterizada por ser más permeables y utilizar presiones bajas. Los más grandes desarrollos de la NF se dieron entre 1900 y 2000, con la mejora de las características de las membranas y el incremento de sus aplicaciones, esta técnica separa partículas con diámetro de poro inferior a $0,001\mu\text{m}$ (1nm). Retiene lactosa y otros componentes de gran tamaño, permitiendo permear sólo iones minerales monovalentes y agua. (Bruggen, 2008)

8.18.5.1. Aplicación industrial de la nanofiltración

Electrodialisis (ED): Es un proceso de membrana en el cual la separación de iones cargados eléctricamente resulta de la aplicación de un campo eléctrico. Los iones son transportados, de una solución a otra, a través de la membrana de intercambio iónico, bajo la influencia de un potencial eléctrico. Las cargas eléctricas de los iones permiten su conducción a través de las soluciones y la membrana cuando se aplica un voltaje a través de estos medios. El énfasis del diseño de una Electrodialisis se dirige hacia el mantenimiento de una distribución uniforme

del flujo de la solución y la minimización de la resistencia eléctrica y la fuga de corriente. (Carvalho & Maubois, 2010)

8.18.6. Técnica de Diafiltración para la separación de las proteínas del lactosuero

La diafiltración es un caso particular y específico de la ultrafiltración en donde el retenido es diluido en agua y recirculado en el proceso de modo que se reduzca la concentración de los compuestos solubles y se incremente la concentración de los componentes del retenido. Su principal uso en la industria láctea es para obtener un lavado tanto de lactosa como de las sales minerales a partir de suero de leche y poder obtener un concentrado con mayor contenido proteico. (Santamarin, 2010)

Esta técnica convencional puede ser utilizada para la dilución de sales en una mezcla, siendo práctica en comparación con la electrodiálisis debido a la poca manipulación y practicidad en comparación con dicha técnica. La Diafiltración se puede realizar por medio de dos métodos los cuales son la Diafiltración continua o la discontinua los cuales varían en tiempo y volúmenes principalmente. (Schwartz, 2016)

8.18.7.1. Diafiltración Continua

Esta técnica también conocida como volumen de Diafiltración constante, implica un lavado inicial de la muestra obtenida en el retenido durante la primera etapa de ultrafiltración, por medio de adición de agua, también es posible adicionar el agua con la misma velocidad en que empieza a filtrar. Si se está utilizando agua para diafiltrar, como resultado se obtiene que las sales se van diluyendo y la conductividad también decrece. La cantidad de sales removidas está directamente relacionada con el volumen de Diafiltración el cual se refiere a la relación entre el volumen filtrado (permeado) en comparación con el volumen del retenido. Cuando el volumen filtrado es igual que el volumen del retenido inicial se considera como un ciclo de Diafiltración. Cabe resaltar que para que el sistema sea continuo la adición del líquido tiene que ser a la misma tasa en que se está filtrando (Schwartz, 2016).

8.18.7.2. Diafiltración Discontinua

Secuencial: la Diafiltración discontinua por dilución secuencial involucra inicialmente una dilución de la mezcla con agua, luego la muestra es posteriormente concentrada por ultrafiltración a su volumen inicial. Este proceso se repite hasta que finalmente las moléculas como las sales o de bajo peso molecular sean diluidas a conveniencia. (Schwartz, 2016) .

8.18.8. Extracción de proteínas mediante la aplicación de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad CEPAI

La aplicación de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad (CEPAI) es una técnica desarrollada en la conservación de alimentos mediante proceso no térmico, con la que se obtiene un producto de gran calidad parecido al producto fresco. Esta técnica, cada vez más estudiada y perfeccionada, debe su importancia a la capacidad de estabilizar alimentos sin variar la calidad original, a diferencia de los procesos térmicos que suelen tener efectos negativos, como la alteración de las propiedades organolépticas y las pérdidas de nutrientes termolábiles de los alimentos (Spilimbergo, 2014).

La técnica se basa en la propiedad que tienen los alimentos fluidos, que están compuestos principalmente por agua y nutrientes como vitaminas, triglicéridos y minerales, de ser muy buenos conductores eléctricos debido a las altas concentraciones de iones que contienen y a su capacidad de transportar cargas eléctricas (Fernández, 2010).

El sistema CEPAI consta de varios componentes, entre ellos un interruptor, una fuente de potencia, una cámara de tratamiento, un banco de condensadores, equipo de medición de voltaje, temperatura, corriente y equipo de envasado aséptico. Resultados de varios estudios indican que la intensidad de campo, la duración, la cantidad y la forma del pulso son las principales variables que afectan a la actividad de las proteínas. (Raventós, 2010)

Los primeros estudios de aplicación de CEPAI se centran en la esterilización a baja temperatura, sin embargo, hasta hace poco, se descubrió que esta técnica puede ser ampliamente utilizada para extraer ingredientes a partir de productos naturales, con las ventajas de rendimiento no térmico, rapidez, eficiencia, bajo consumo de energía y baja contaminación. (Helux, 2014)

8.18.9. Técnicas cromatográficas utilizadas en la separación de proteínas

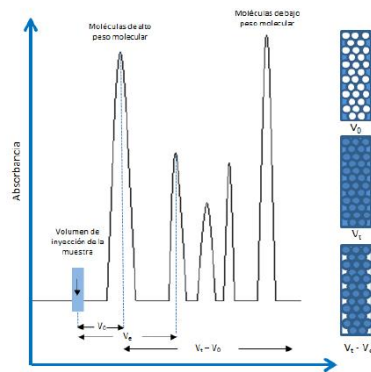
8.18.9.1. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular es el nombre general para los procesos de separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño cuando una solución fluye a través de una cama empacada con un medio poroso (Kostanski, 2004).

Para la separación, se utilizan las propiedades de tamiz molecular de una variedad de materiales porosos. El proceso de separación depende del tamaño y el volumen hidrodinámico

(volumen que ocupa una molécula en solución), el cual define la capacidad de la molécula de penetrar o no en los poros de la fase estacionaria. De tal forma que, las moléculas de alto peso molecular son excluidas de los poros debido a un efecto estérico y pasan rápidamente a través de la matriz. (Janson, 2011)

Ilustración 18. Figura Matriz de cromatografía para separación de proteínas.



Fuente: (Janson, 2011).

(Rapley, 2008) menciona que las moléculas que son completamente excluidas eluyen primero en el volumen vacío, V_0 . El volumen de elución de las moléculas que pueden entrar en los poros libremente es designado como volumen total, V_t . El volumen de elución de una proteína que está entre V_0 y V_t es designado como V_e .

Las columnas de alto rendimiento son usadas analíticamente para estudiar la pureza de las proteínas, su plegamiento, las interacciones proteína-proteína, etc. Por otro lado, las separaciones preparativas se realizan utilizando matrices de baja presión y sirven para separar mezclas de proteínas con diferentes pesos moleculares, proteínas de otras macromoléculas biológicas y para la separación de proteínas agregadas de monómeros. La cromatografía de exclusión molecular es frecuentemente utilizada como un paso de pulimiento final del producto (Rapley, 2008).

8.18.9.2. Fase móvil

En contraste con otros tipos de cromatografía, la selectividad de una matriz no se puede ajustar cambiando la composición de la fase móvil. Las matrices tienden a ser compatibles con muchos buffers acuosos; incluso en la presencia de surfactantes, agentes reductores o agentes desnaturizantes. Dado que las moléculas no son adsorbidas en la matriz, las proteínas se eluyen de modo isocrático para lo cual se requiere de un solo buffer. Idealmente,

todos los buffers usados, todos los tipos de cromatografía deben de ser filtrados con una membrana de 0.2 μ m y desgasificados (Rapley, 2008).

La resina de intercambio iónico tiene una capacidad de adsorber juntas 40 – 45 g de LP y LF por litro de resina antes de que ocurra la colmatación. Con un volumen de lecho de resina de 100 litros se pueden tratar 100.000 litros de suero por ciclo.

8.19. Tabla comparativa de los métodos de separación

Tabla 16. Tabla comparativa de los métodos de separación.

Separación de proteínas			
Métodos o técnicas	Características	Ventajas	Desventajas
Tecnología de membranas Ultrafiltración	Capaz de concentrar sólidos suspendidos, bacterias, proteínas, colorantes y compuestos con un peso molecular mayor a 150.000 Da. Su uso y aplicación se extiende al campo industrial e investigativo como método para concentrar y separar soluciones. Utiliza baja presión para forzar el fluido a través de la membrana, lo cual resulta en bajos costos de operación.	Estabilidad y calidad del permeado. Efluentes desinfectados tras atravesar la membrana. Compactibilidad debido al mínimo requerimiento de espacio.	Polarización de la concentración. Membranas más cerradas que las utilizadas en microfiltración.
Tecnología de membranas Osmosis Inversa.	Proceso de concentración ya que no emplea calor. Se realiza movimiento de moléculas a través de una	Con esta tecnología se concentra hasta 3 veces todos los componentes del	Sirve únicamente para la separación de agua de una solución.

	<p>membrana parcialmente permeable porosa.</p> <p>Actúa con moléculas orgánicas con un peso molecular superiores a 100 Da.</p>	<p>lactosuero.</p> <p>Puede generar retenidos con un contenido máximo de 30% en sólidos.</p> <p>Los sistemas de ósmosis inversa ocupan poco espacio.</p> <p>Mantenimiento de bajo costo.</p>	
Método de CEPAI	<p>Técnica desarrollada en la conservación de alimentos mediante proceso no térmico.</p> <p>Capacidad de estabilizar alimentos sin variar la calidad original.</p> <p>CEPAI consta de varios componentes, entre ellos un interruptor, una fuente de potencia, una cámara de tratamiento, un banco de condensadores, equipo de medición de voltaje, temperatura, corriente y equipo de envasado aséptico.</p>	<p>Técnica, cada vez más estudiada y perfeccionada.</p> <p>Rendimiento no térmico, rapidez, eficiencia, bajo consumo de energía y baja contaminación.</p>	<p>No existen valores reales que den una confiabilidad de implementación de este método.</p>
Cromatografía	Técnica sencilla utilizada en	Incluyen buena	En este método no

de exclusión Molecular.	<p>la separación y purificación de proteínas.</p> <p>Este método se realiza en columnas cilíndricas</p> <p>Para la separación, se utilizan las propiedades de tamiz molecular de una variedad de materiales porosos.</p> <p>Los geles utilizados son de tipo dextranos, agarosa o poliacrilamida.</p>	<p>separación de las moléculas grandes de las pequeñas.</p> <p>Se pueden aplicarse a varias soluciones sin interferir en el proceso de filtración.</p>	<p>puede medir cuanto espacio ocupa una molécula de polímero particular cuando está en solución.</p>
-------------------------	---	--	--

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

9. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

- ✚ ¿Qué propiedades físicas y químicas diferencian los tipos de lactosuero?
- ✚ ¿Qué propiedades y aplicaciones tienen las proteínas contenidas en los diferentes tipos de lactosueros?
- ✚ ¿Qué métodos pueden ser utilizados para purificar, concentrar y separar proteínas las proteínas del lactosuero?

10. METODOLOGÍAS

10.1. Investigación explicativa

El presente tipo de investigación es muy importante en el desarrollo de este proyecto porque mediante esta se explica los efectos que originan un correcto orden los procesos de purificación, concentración y separación, se usó además para describir las tecnologías más usadas en los procesos anteriores y realizar la propuesta del aprovechamiento integral del lactosuero.

Para investigar la relación causa- efecto que existe en la utilización adecuada del lactosuero en las industrias lácteas.

10.2. Investigación descriptiva

Como su nombre indica, este tipo de investigación puede determinar el estado actual en el que se encuentra el subproducto lactosuero obtenido a partir de la fabricación del queso, determinar las actividades más críticas en fabricación, analizar todos los procesos involucrados y aplicar las diferentes herramientas de diagnóstico.

10.3. Métodos de investigación

Los métodos de investigación aplicadas de acuerdo a los protocolos establecidos para el desarrollo en el presente proyecto son:

10.3.1. Método Inductivo - Deductivo

Se aplicó para el análisis de cada etapa que se requiere en los métodos para el tratamiento del lactosuero y su aprovechamiento integral, además de considerar los más eficientes a partir de generalizar su uso en diferentes industrias.

10.3.2. Método Bibliográfico

Este método proporciona etapas básicas y fundamentales que se requieren para realizar el proyecto como lo es la fundamentación científica - teórica y la correcta conceptualización de los procedimientos de purificación, concentración y separación. El método bibliográfico da un aporte a la investigación debido al análisis de información recopilada.

10.3.3. Método Analítico – Sintético

Mediante este método nos permite analizar el procedimiento a seguir en los procesos de purificación, concentración y separación de las proteínas del lactosuero, e incluso analizar el procedimiento, representar las etapas en las que se pueden realizar cada uno de estos procesos, representación de su análisis y síntesis para poder analizar los procedimientos a seguir en la purificación y separación de las proteínas en el lactosuero. Para proponer la forma de aprovechar integralmente del lactosuero.

10.4. Técnicas de investigación

10.4.1. Observación

Se utilizó para observar el proceso de fabricación de queso, la obtención del subproducto lacto suero y la valoración de sus propiedades físicas y químicas.

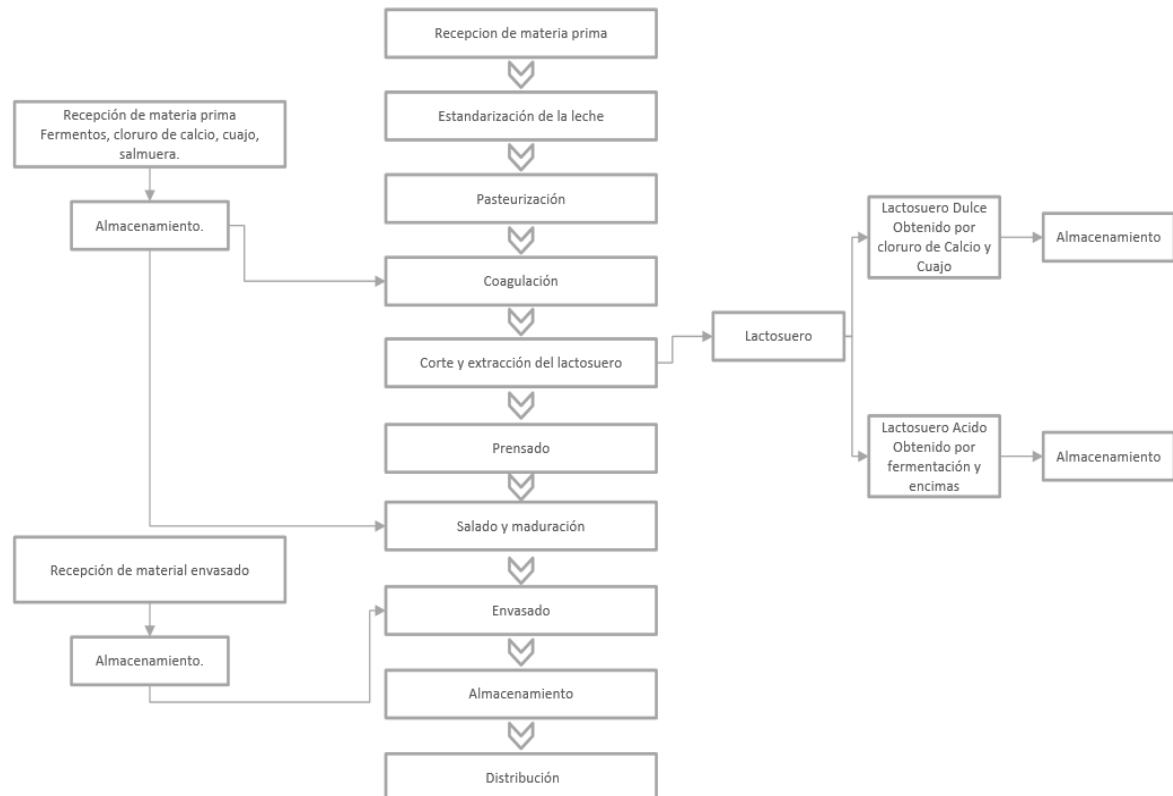
10.4.2. Encuestas

Se aplicó para determinar el problema existente en las industrias lácteas con el aprovechamiento industrial del subproducto lactosuero.

11. DESARROLLO DE LA PROPUESTA (ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS)

11.1. Diagrama del proceso de fabricación del queso

Diagrama 3. Proceso de elaboración de Queso.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

11.2. Estudio del Proceso de la elaboración de queso

En el mundo existen varios tipos de quesos y cada uno depende calidad de leche, del tipo de tecnología utilizada en la producción, y el tipo de coagulación y añadidura para poder separar la caseína del lactosuero y la obtención del queso. En el diagrama de flujo de la elaboración del queso presentado se detalla los procesos que deben cumplir para la obtención del queso como producto y el lactosuero como un subproducto.

En la mayoría de industrias lácteas tienen procesos similares en la elaboración del queso, lo cual en la mayoría de casos se obtiene el lactosuero dulce.

11.3. Procedimiento experimental para la obtención del lactosuero

11.3.1. Obtención del lactosuero

El lactosuero es un subproducto de las industrias queseras, también es una parte líquida resultante de la separación de la cuajada al elaborar el queso. La temperatura en la

coagulación de leche es de 54 grados centígrados, después se debe disolver 120ml de calcio y 30ml de cuajo. Dejar reposar por 10 minutos aproximadamente y verificar que la caseína empiece a separar del lactosuero.

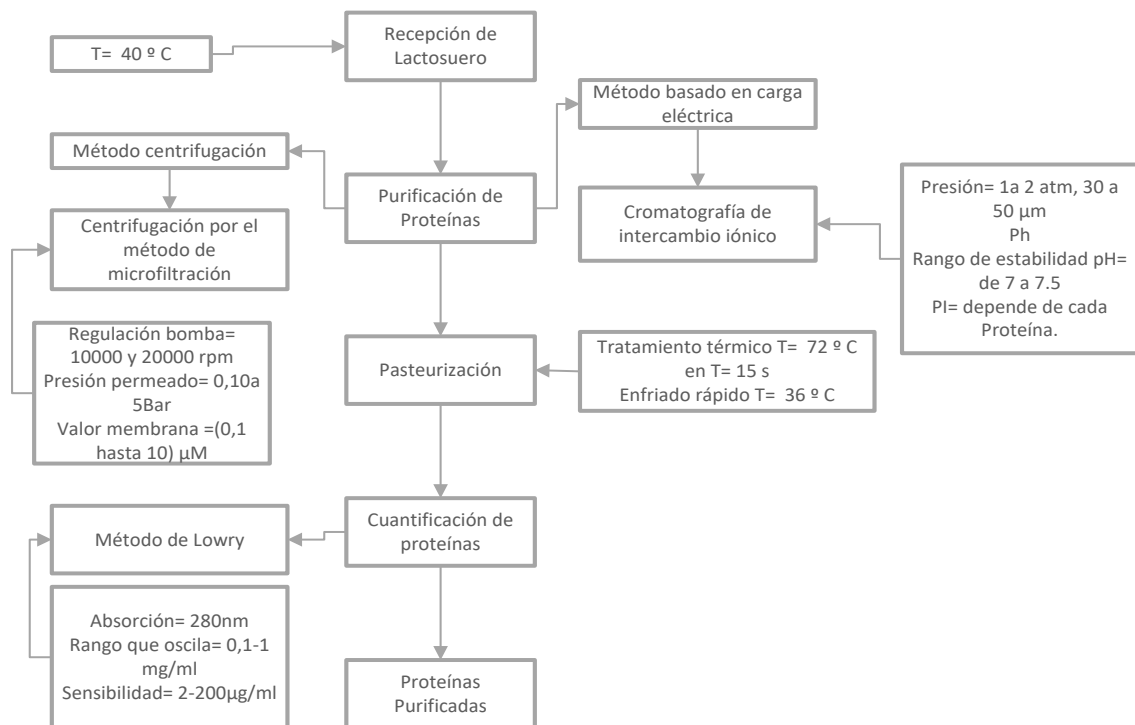
Cortar la cuajada con una cortadora y remover la caseína para que madure la cuajada y se pueda separar del lactosuero. Colocar la cuajada en moldes para la obtención del queso. El aspecto del lactosuero es claro, amarillento y está compuesto principalmente por proteínas, sustancias nitrogenadas no proteicas, lactosa, ácido láctico, grasa y minerales. Luego de ser obtenido debe ser trasferido almacenado en tanque de enfriamiento una temperatura de 15 °C para su posterior uso.

En casi la mayor parte de procesamiento industrial en la elaboración de queso se obtenido el lactosuero dulce. Podemos afirmar mediante tablas y datos recopilados médiante investigaciones que este subproducto contiene la mayor cantidad de sustancias físico químicas para poder realizar un proceso posterior en la obtención de proteínas.

11.4. Proteínas presentes en el lactosuero - representación de los procesos de purificación, concentración y separación

11.5. Diagrama de flujo para la purificación de proteínas por el método de centrifugación - cromatografía de intercambio iónico

Diagrama 4. Proceso de purificación de proteínas.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

11.6. Descripción de las etapas del proceso de purificación de las proteínas del lactosuero

11.6.1. Fundamento teórico de centrifugación en la purificación de proteínas

Este método está basado en la purificación de las proteínas por la separación de partículas en función de su masa o densidad de flotación. El efecto neto de girar la muestra en una centrífuga es que las partículas masivas, pequeñas y densas se mueven hacia afuera más rápido que las partículas menos masivas o las partículas con más arrastre en el líquido. Cuando se centrifugan suspensiones de partículas en una centrífuga, se puede formar un gránulo en el fondo del recipiente que está enriquecido para las partículas más masivas con bajo arrastre en el líquido.

Este método de purificación está ligado directamente con la tecnología de membranas el cual utiliza la técnica microfiltración para la obtención de proteínas purificadas del lactosuero. Esta técnica cumple con las características y requerimientos para poder filtrar el líquido purificado y retener las soluciones de alta densidad.

11.6.1.1. Procedimiento para la purificación de proteínas del lactosuero por centrifugación

Alimentación de producto: se obtiene el lactosuero con una temperatura de 40 grados, en el silo de centrifugación.

Regulación de bomba centrípeta: es la encargada de hacer girar el lactosuero con una velocidad alta entre 10000 y 20000 rpm para poder clarificar las proteínas.

Retenido: la sustancia de alta densidad se mantiene en el contenedor para ser expulsado como desecho.

Permeado: sustancia purificada por la técnica de microfiltración, esta tiene una aplicación de una presión de 0,1 a 5 Bar, a través de un filtro compuesto por una membrana semipermeable de valor de 0,1 μM hasta 10 μM .

Trasporte: finalmente el lactosuero clarificado es pasado a una cámara de pasteurización para uso posterior y aprovechamiento de proteínas.

11.6.2. Fundamento teórico del método de cromatografía de intercambio iónico

El principio básico de la cromatografía de intercambio Iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser unidas o desunidas cambiando el ambiente iónico. El intercambiador catiónico con grupos cargados negativamente, pudiendo intercambiar Iones Positivos, mientras intercambiadores

aniónicos con grupos cargado positivamente, pudiendo intercambiar iones negativos. Es un método que permite la separación de moléculas polares basadas en sus propiedades de carga eléctrica, El intercambio de iones es el método más ampliamente utilizado para la separación y la purificación de biomoléculas cargadas tales como polipéptidos, proteínas, y ácidos nucleicos.

Una proteína que no tiene carga neta a un pH equivalente a su punto isoeléctrico no podrá interactuar con la matriz o fase estacionaria cargada. Su aplicabilidad dispersa, alta capacidad y simplicidad, y su alta resolución son las razones dominantes de su éxito como método de purificación, siendo ampliamente utilizada en varios procesos industriales.

11.6.2.1. Procedimiento para la purificación de proteínas del lactosuero por cromatografía

Proceso Intermitente. Se realiza la carga del lactosuero en la columna de en un contenedor de carga. La unión de moléculas a la resina de la columna se basa en interacciones iónicas de la resina para atraer a la carga opuesta.

Producto absorbido o no absorbido: las moléculas cargadas de polaridad opuesta a la resina están fuertemente unidas, mientras que otras moléculas que no están cargadas o tiene carga opuesta no están unidas y se lavan a través de la columna.

Tamaño de partícula: en esta parte se toma en cuenta el preso molecular y la presión.

- Presión: va de 1 a 2 atm, 30 a 50 μm

Selección de matriz: para un mejor rendimiento se debe utilizar una resina de fácil limpieza, que tenga una gran capacidad de absorción. La resina fuerte sigue ionizada en disoluciones acidas, mientras la resina débil se protona a un pH de 4.

Selección del medio: El rango de estabilidad de pH de las proteínas va desde 7 a 7,5. A valores de pH menores al punto Isoeléctrico, la carga neta de una proteína es positiva, por lo que puede unirse fuertemente a una resina con cargas negativas o intercambiador catiónico. Por el contrario, a un pH mayor al punto Isoeléctrico, la proteína tendrá carga negativa y será capaz de unirse a intercambiadores de tipo aniónico que contienen grupos cargados positivamente.

Elusión: para la proteína de interés se utilizan soluciones que modifican el pH o la concentración de sales en la resina. Estas sales también pueden interactuar con la resina, reemplazando a las proteínas que están adheridas a ella.

Dado que la carga neta de una proteína depende del pH, las muestras también se pueden eluir de un medio alterando el pH del tampón de elución. Como no hay sal gradiente, las muestras simplemente se retienen en la columna a un pH y se eluyen por aumentar o disminuir el pH.

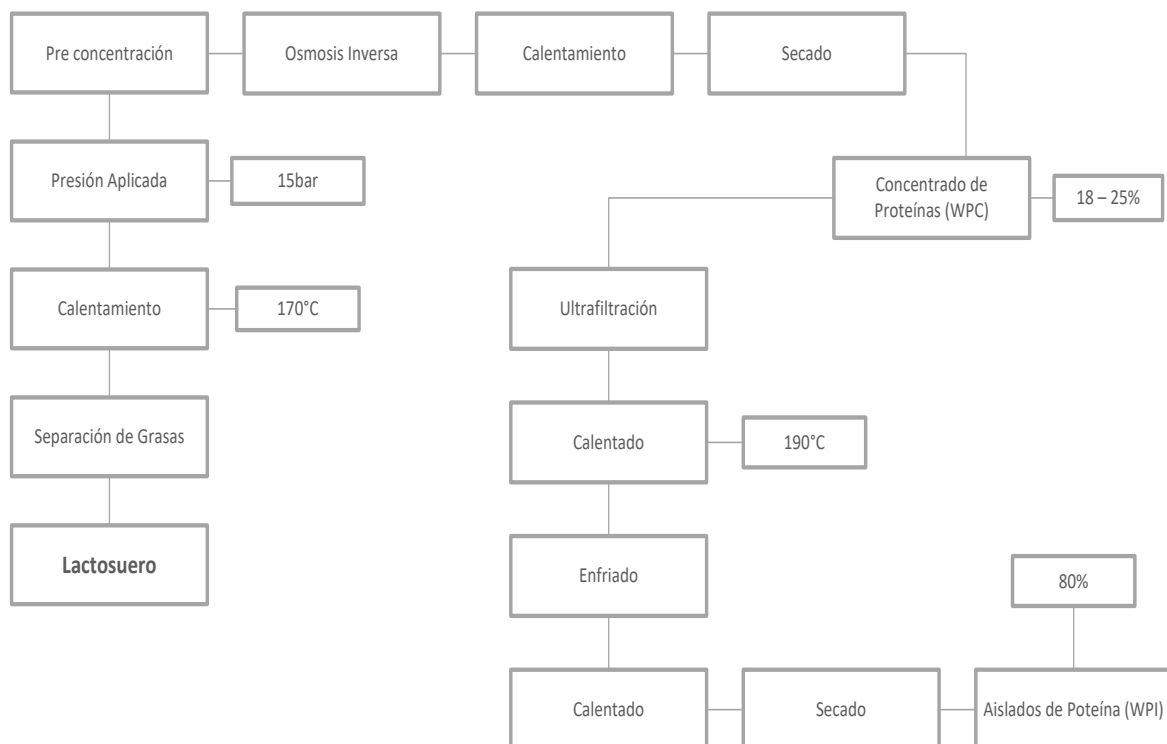
Regeneración: normalmente, luego de la corrida la columna debe ser regenerada, dejándola en condiciones de ser reutilizada. En general si las columnas no se utilizan continuamente deben ser guardadas conteniendo un agente conservador, como el etanol al 20% para evitar el crecimiento de microorganismos.

Pasteurización: la temperatura de entrada del suero es la ambiental, alrededor de 15 ° C, luego se realiza un tratamiento térmico suave de $T = 72\text{ ° C}$ y $t = 15\text{ s}$ y un enfriado rápido a 15 ° C, ya que las proteínas contenidas son termolábiles. Esta operación se realiza para inactivar los enzimas y bacterias que puedan estar presentes en el suero.

11.7. Proceso de concentración de las proteínas del lactosuero

11.7.1. Diagrama de flujo para el proceso de concentración por el método ósmosis inversa – ultrafiltración

Diagrama 5. Proceso de concentración de las proteínas del lactosuero.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

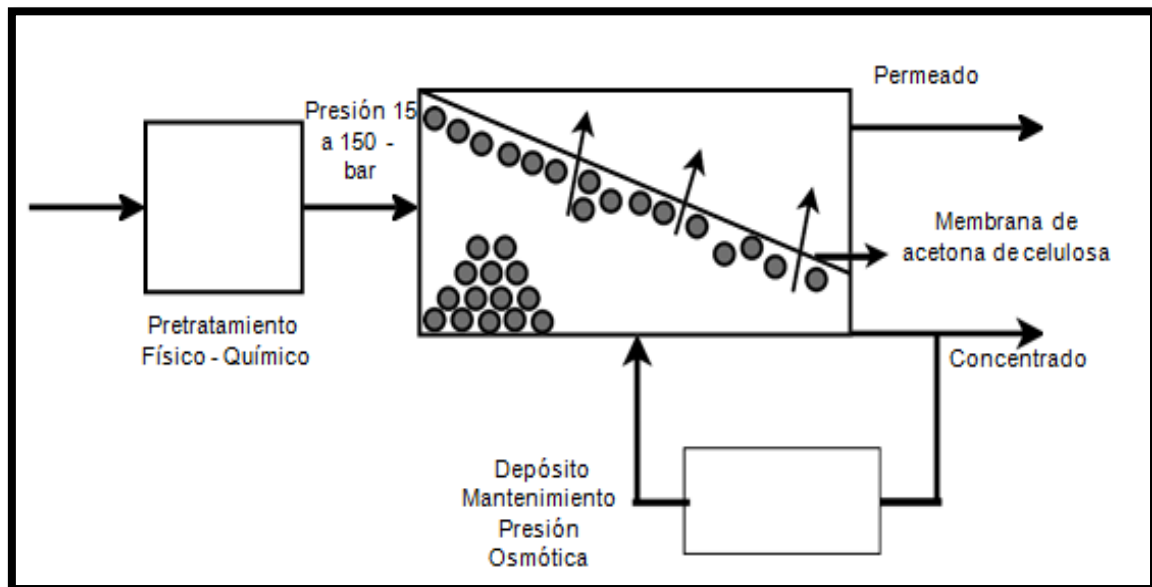
11.7.2. Concentración de Proteínas, métodos más usados

El concentrado de proteínas del Lactosuero (WPC), se define por como las sustancias obtenidas por la eliminación de suficientes constituyentes no proteicos, logrando que el

producto final contenga no menos del 25% de proteínas. La mayoría de los concentrados de proteínas contiene de 34 – 35% o un 80% de proteínas. Para lograr la concentración de proteínas dentro de los procesos se utilizará la tecnología de membranas ya que se trata de uno de los procesos más comunes y actuales dentro de la industrial.

11.7.3. Proceso de concentración del Lactosuero por Ósmosis Inversa

Ilustración 19. Diagrama del Proceso de Ósmosis Inversa

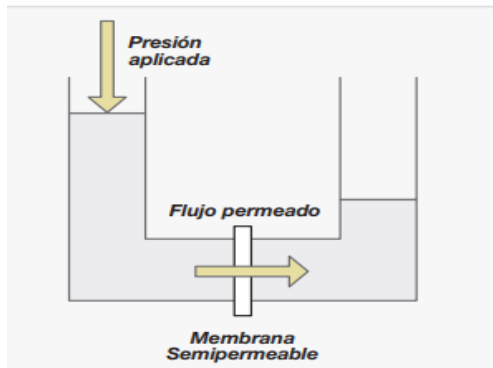


Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

Para poder generar la concentración de los sólidos mediante el proceso de Ósmosis Inversa el lactosuero debe pasar por un pre-tratamiento de clarificación, descremado y pasteurización para lograr que el lactosuero se separe en dos fracciones: el Retenido, que contiene todos los sólidos del lactosuero, y el Permeado (básicamente agua con trazas de Orgánicos y Sales). Por lo que se puede alcanzar hasta un 18-25% de concentrado permitiendo un fácil transporte del lactosuero concentrado a los centros de tratamiento especializados.

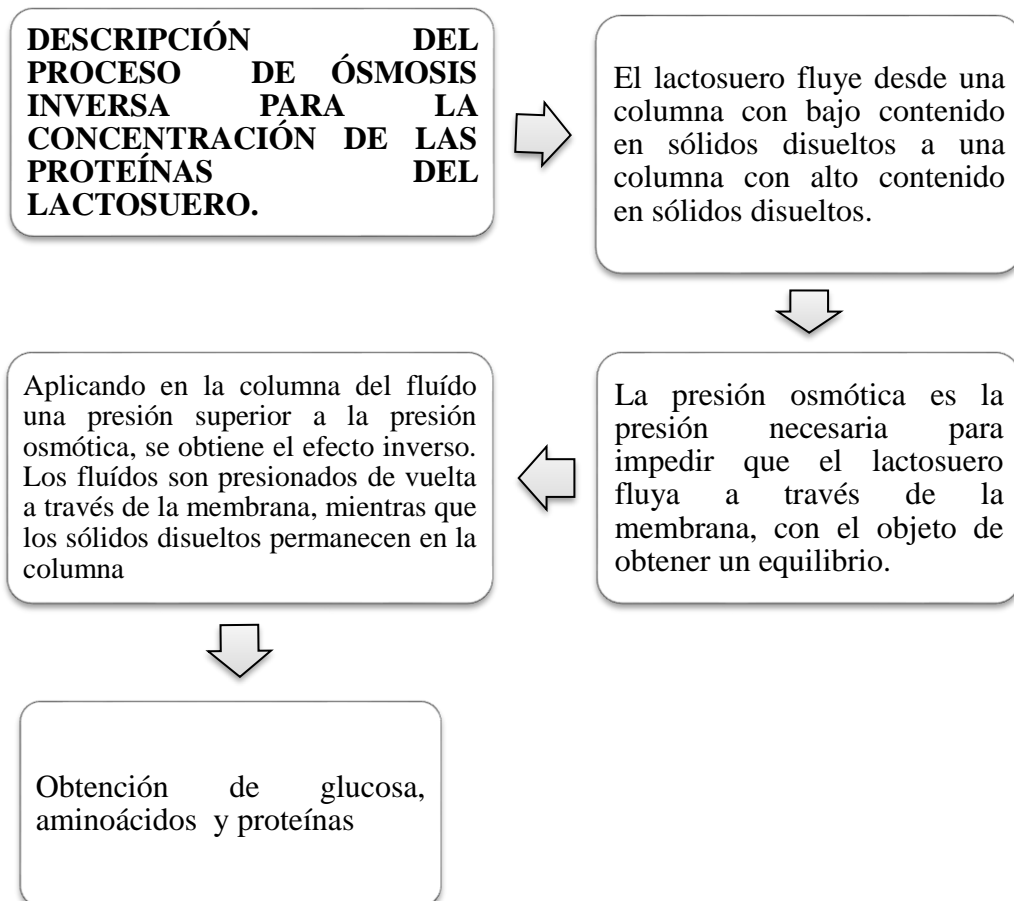
La ósmosis inversa es un proceso que consiste en la concentración osmótica (salinidad) mediante la utilización de una membrana semipermeable este tipo de membrana es se llama acetona de celulosa logra retener y concentrar todas las partículas, mayores al diámetro del poro selectivo el proceso en si consiste en invertir el flujo osmótico mediante la membrana 5con la aplicación de presión las presiones de trabajo son de 15 a 150 bar.

Ilustración 20. Proceso de ósmosis inversa



Fuente: (Almecija, 2007)

11.7.3.1. Procedimiento para concentrar las proteínas del lactosuero por el método de ósmosis inversa



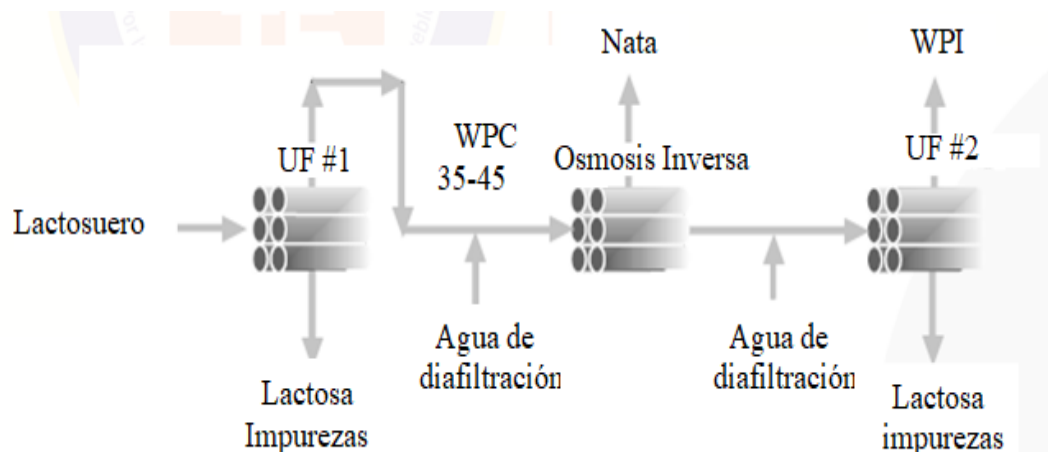
Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

11.7.4. Proceso de Concentración del Lactosuero por el método de Ultrafiltración

Las membranas de ultrafiltración aplicadas, son diseñadas exclusivamente para retener los constituyentes del lactosuero en el rango molecular, como es el caso de las proteínas, separándolas de lactosa y otras impurezas presentes en el lactosuero. Esta técnica produce Aislados de Lactosuero (WPI). El proceso se lleva a cabo a temperaturas intermedias, el producto final está casi completamente exento de proteínas desnaturalizadas.

En la ilustración N° 21, se representa un posible proceso de producción de Aislados de Lactosuero (WPI) a partir de lactosuero utilizando tecnología de membranas. El lactosuero clarificado y pasterizado se concentra de 5 a 6 veces mediante una primera etapa de ultrafiltración, obteniéndose un concentrado de proteínas con un contenido en proteína entre 35 y 45 %. Este Concentrado de Proteínas (WPC) contiene pequeñas cantidades de grasa natural. Mediante el filtrado de los concentrados de proteínas se reduce estas grasas. El filtrado de este proceso es Concentrado de Proteínas (WPC) 35-45% desgrasado y es la alimentación a una segunda etapa de ultrafiltración, cuyo retenido final es un aislado de proteínas de lactosuero (WPI) con un contenido superior al 90 % de proteínas.

Ilustración 21. Proceso de producción de Aislados de Proteínas (WPI), mediante Ultrafiltración.

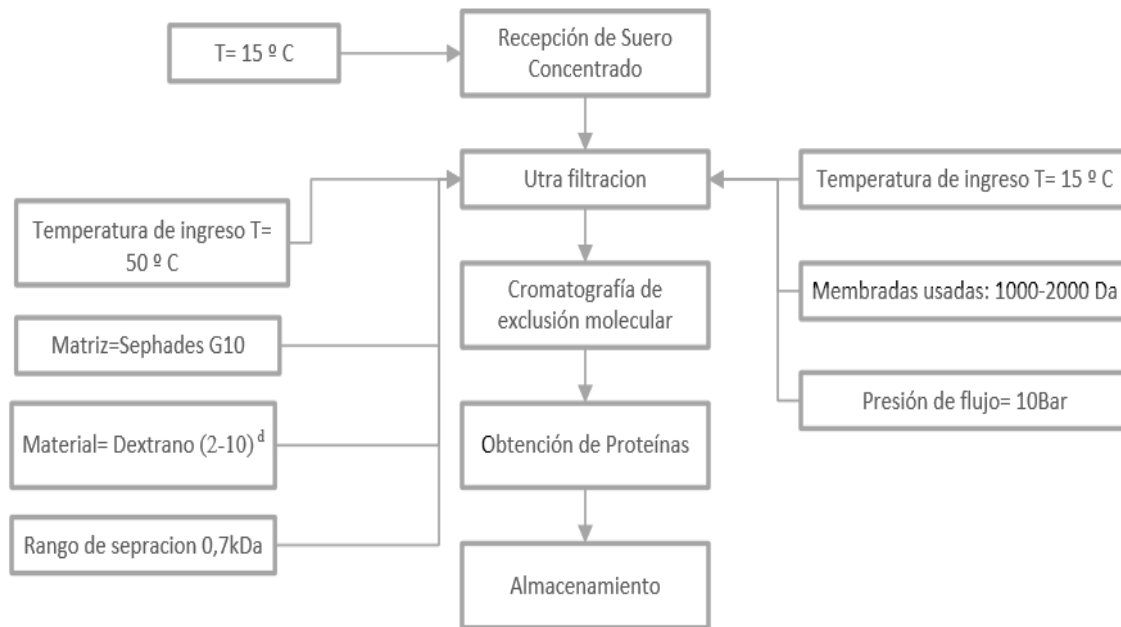


Fuente: (Almecija, 2007)

11.8. Diagrama de flujo para la separación de proteínas por el método de ultrafiltración - Cromatografía de exclusión molecular

11.8.1. Diagrama de flujo de los procesos de separación de Proteínas del lactosuero

Diagrama 6. Procesos de separación de Proteínas del lactosuero.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

11.8.2. Fundamentación teórica de los métodos de separación de proteínas

En la separación de proteínas se emplea tecnologías de membranas y el método de cromatografía de intercambio iónico, cada uno de estos métodos ayuda a obtener proteínas con un porcentaje del 80 al 90%, así también se puede separar cada una de las proteínas derivadas del lactosuero, de esta manera se puede aprovechar integral o parcialmente estas proteínas para su posterior uso.

11.8.2.1. Separación de proteínas por el método de ultrafiltración

La obtención de las proteínas del suero puede lograrse mediante la separación de sus solutos disueltos por medio de una membrana de ultrafiltración. Para ello hay diversas configuraciones y tipos de membranas utilizadas, pero el empleo de metodologías diferentes conduce a que los rendimientos en el permeado y retenido varíen. Sin embargo, los factores críticos del método de Ultrafiltración, tales como la presión transmembranaria,

el pH y la temperatura deben ser siempre valores muy similares en cualquier proceso de fraccionamiento.

11.8.2.1.1. Procedimiento de separación de proteínas del lactosuero por el método de ultrafiltración

La temperatura de entrada del suero acondicionado debe ser 50 ° C, para maximizar el área de trabajo de la membrana y alargar la vida útil de la membrana.

Esta operación consiste en el paso de un caudal de alimentación de suero acondicionado, el cual entra de forma tangencial en un módulo tubular de ultrafiltración, y es filtrado por unas membranas de 1000 – 200 000 Da, donde obtenemos dos salidas de fluido:

La fuerza motriz del proceso es la presión y se utilizan unos valores aproximados de 10 bar.

La membrana porosa, presenta una estructura asimétrica de cerámica en forma tubular, resistente a productos químicos, fácil limpieza y resistente a elevadas temperaturas.

El filtrado, conocido como permeado el cual sale de forma perpendicular respecto al módulo tubular, y el concentrado o retenido que contiene las proteínas deseadas.

11.8.2.2. Separación de proteínas por el método de Cromatografía de exclusión molecular

Es el nombre general para los procesos de separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño cuando una solución fluye a través de una cama empacada con un medio poroso. Los procesos de separación utilizan las propiedades de tamiz molecular de una variedad de materiales porosos. El proceso de separación depende del tamaño y el volumen que ocupa una molécula en una solución, el cual define la capacidad de la molécula de penetrar o no en los poros de la fase estacionaria

Las columnas de alto rendimiento son usadas analíticamente para estudiar la pureza de las proteínas, su plegamiento, las interacciones proteína-proteína. Por otro lado, las separaciones preparativas se realizan utilizando matrices de baja presión y sirven para separar mezclas de proteínas con diferentes pesos moleculares, proteínas de otras macromoléculas biológicas y para la separación de proteínas agregadas de monómeros.

10.1.1.1. Procedimiento de separación de proteínas por el método de cromatografía de exclusión molecular

Abastecimiento: se realiza la carga del lactosuero en los tubos de cromatografía a una temperatura de 50 °C para poder realizar la separación de proteínas.

Selección de matriz y material cromatográfico: se utilizan matrices de baja presión, por ejemplo, Sephadex de G10 con el material Dextrano (2-10)^d.

Separación: El proceso de separación depende del tamaño y el volumen hidrodinámico (volumen que ocupa una molécula en solución), el cual define la capacidad de la molécula de penetrar o no en los poros de la fase estacionaria. El rango de separación es de 0 a 0,7 kDa, pues las moléculas son separadas de acuerdo a su peso molecular.

La elución: es isocrática, pues las proteínas se eluyen de modo solvente de composición constante para lo cual se requiere de un solo buffer. Idealmente, todos los buffers usados en esta cromatografía y en todos los tipos de cromatografía deben de ser filtrados con una membrana de 0.2 µm y desgasificados.

Recolección de fracciones: En una cromatografía en columna lo habitual es recoger fracciones del líquido que sale, para analizarlas individualmente y así analizar parcialmente las proteínas derivadas del lactosuero.

10.2. Aprovechamiento integral de las proteínas del lactosuero

Las proteínas del lactosuero, además de tener sus propiedades específicas, parcialmente hidrolizadas son una importante fuente de péptidos bioactivos, que encuentran aplicación en la industria alimentaria. Así, por ejemplo, la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina son precursores de las lactofinas, que presentan actividad opioide. Estos péptidos son capaces de unirse a receptores opioides situados, principalmente, en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal.

10.2.1. Procedimiento para el aprovechamiento integral de la inmunoglobulina

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

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

Las inmunoglobulinas encuentran la capacidad de prevenir un ataque de patógenos al tejido epitelial, ya que es un paso crítico en el establecimiento de una infección.

Las inmunoglobulinas pueden ser utilizadas para efectos terapéuticos cuando las infecciones ya se encuentran establecidas, esto sólo ha sido comprobado en enfermedades donde la infección se mantiene mediante constantes reataques y reinfecciones, como es el caso de las caries; o en aquellas en las que están involucradas toxinas o componentes inflamatorios.

Actualmente se comercializan alimentos enriquecidos en inmunoglobulinas destinados tanto a la alimentación de animales de granja, como también para suplementar la dieta humana.

10.2.2. Procedimiento para aprovechamiento integral de la Lactoferrina

En los últimos años se ha estudiado en animales el efecto inhibitorio de la lactoferrina en el desarrollo de tumores experimentales cuando se administra oralmente en el estado de post-iniciación.

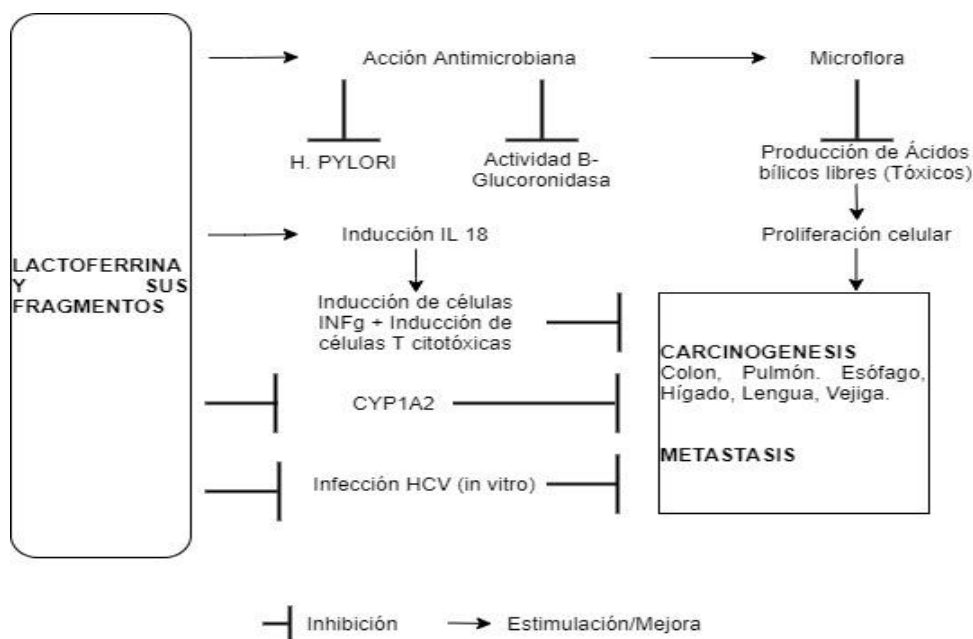
Se ha encontrado inhibición de carcinogénesis de colon, esófago, pulmón y vejiga en ratas, se recogen los posibles mecanismos de acción de la lactoferrina y fragmentos de ésta para prevenir la carcinogénesis en diferentes órganos.

La inhibición de la carcinogénesis de colon parece debido a la supresión de enzimas de fase I, como citocromo que es preferentemente inducido por aminas heterocíclicas carcinogénicas. Otro posible mecanismo encontrado en la metástasis de células en el intestino delgado supone la estimulación de la producción de Interleukina y caspasa-1 en las células epiteliales, que conlleva una inducción de las células positivas de interferón. Esto supone que la inmunidad de la mucosa intestinal mejore sustancialmente.

Por otro lado, la lactoferrina ejerce una actividad antiviral de la hepatitis C (HCV) en pacientes con hepatitis activa crónica.

Por último, mediante la mejora de la microflora, la lactoferrina inhibe la producción de ácidos bólicos libres (tóxicos) que favorecen la proliferación celular y, por tanto, la carcinogénesis. Con todo esto se concluye que, mediante la ingesta oral de la lactoferrina obtenida del lactosuero, se puede prevenir el cáncer de colon, reducir la metástasis de células tumorales, aumentar la inmunidad intestinal y actuar como agente antiviral de la hepatitis C.

Ilustración 22. Posibles mecanismos del efecto de la Lactoferrina y sus fragmentos obtenidos por hidrólisis, para prevenir la carcinogénesis en los diferentes órganos.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

Las proteínas del lactosuero individualmente, presentan propiedades biológicas, nutricionales y funcionales que las hacen muy interesantes para la mejora de fórmulas infantiles, alimentos funcionales y nutracéuticos. Por tal razón la purificación, concentración y separación de proteínas del lactosuero es de suma importancia para la recuperación y aislamiento de las proteínas que contiene, logrando generar un gran interés científico y comercial.

10.3. Aprovechamiento integral del lactosuero

Para la utilización del suero de leche como materia prima en la elaboración de ingredientes, productos de consumo directo y ser utilizado como aditivo en algunas

producciones, es necesario que el suero cumpla con determinados parámetros de calidad. Dependiendo del proceso posterior y el producto que sea elaborado, algunos parámetros pueden variar. El suero debe cumplir con los siguientes requerimientos:

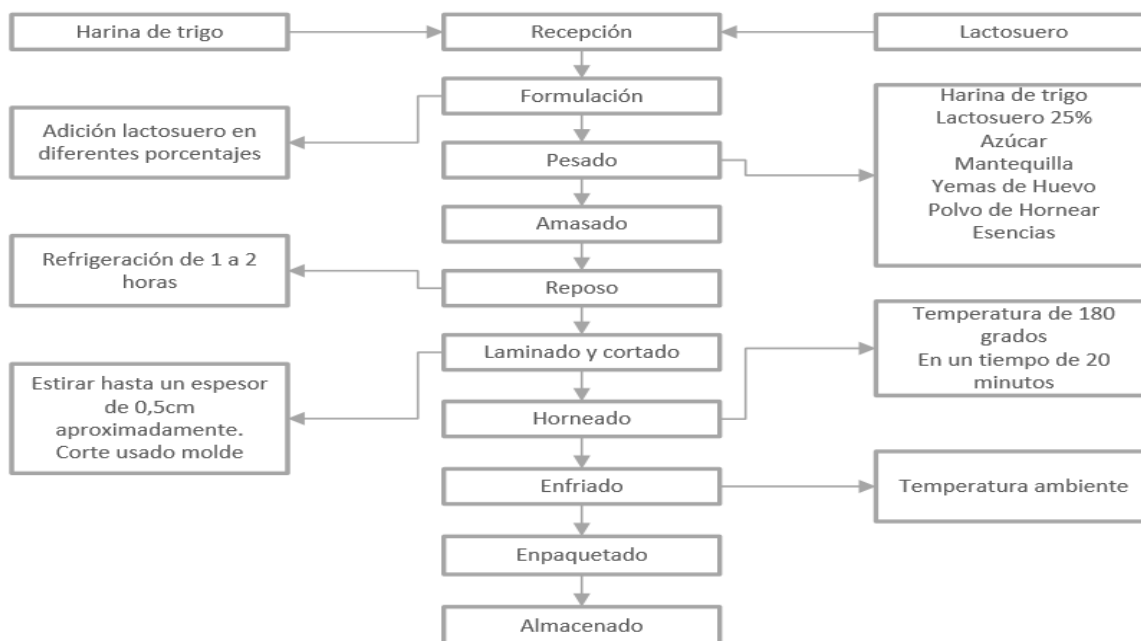
- Temperatura: 4 +/- 2°C
- pH entre 6,0 y 6,6 (algunas empresas requieren 6,3 como mínimo)
- Contenido de proteína mínimo 0,8 g/100 g
- Materia grasa \leq 0.10 %
- Finos de caseína \leq 0,05%
- Nitrato

Una vez se cumplan los requerimientos establecidos se puede utilizar con diferentes fines en la industria.

10.3.1. Proceso para el aprovechamiento integral del lactosuero para la fabricación de galletas

10.3.1.1. Diagrama para el Aprovechamiento integral del lactosuero para la fabricación de galletas

Diagrama 7. Aprovechamiento integral del lactosuero para la fabricación de galletas



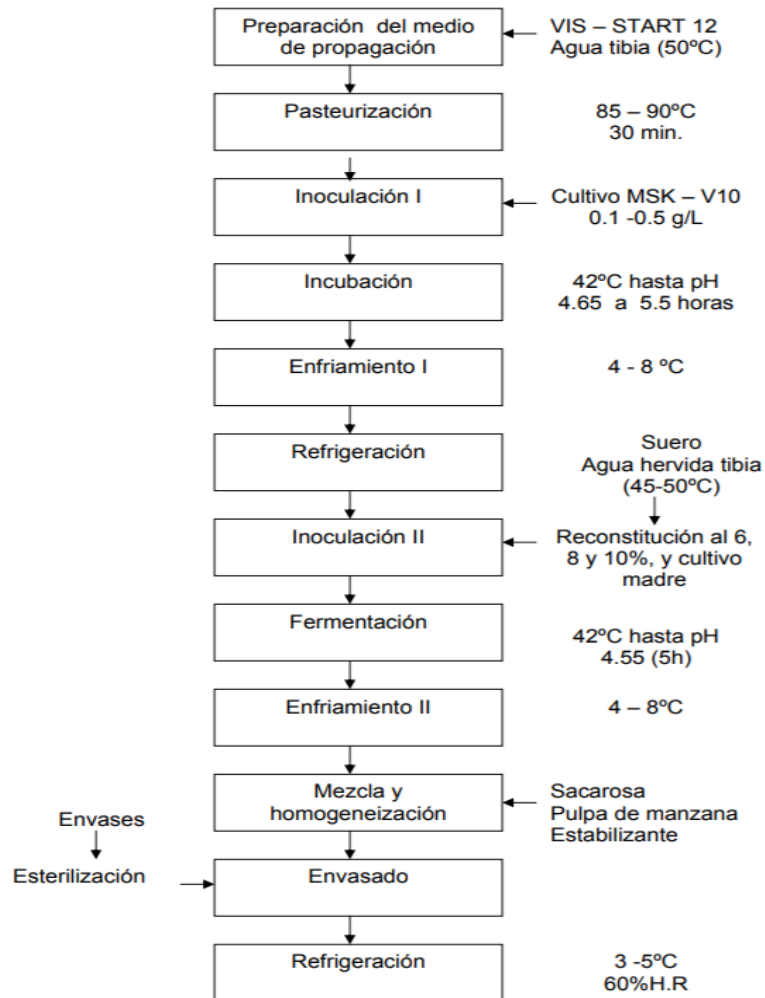
10.3.1.2. Descripción del procedimiento para el aprovechamiento integral del lactosuero para la fabricación de galletas

- **Recepción:** En esta área se verifica que las materias primas se encuentren dentro de sus parámetros, es decir, su fecha de elaboración y vencimiento, en el caso del suero este se le realizará previamente sus análisis correspondientes.
- **Formulación:** Las formulaciones están establecidas en el 25, 50 y 75% de suero de queso, con el 100% de harina de trigo cada formulación.
- **Pesado:** Procedemos a realizar el peso de las materias primas e insumos de acuerdo a la formulación establecida en la parte experimental.
- **Laminado y cortado:** Estirar la masa con ayuda de un rodillo hasta un espesor de 0.5cm aproximadamente, luego se realiza los cortes con figuras y son colocadas en las bandejas para hornear.
- **Horneado:** Las bandejas de galleta se las coloca en el horno a una temperatura de 160°C por un tiempo de 20 a 25 minutos. Siempre se tiene que vigilar que este tiempo y temperatura se mantengan constantes.
- **Enfriado:** Luego del horneado, son retiradas las galletas y colocados en una zona seca y libre de contaminación. Las galletas se enfrían por un espacio de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente.
- **Empaquetado:** Se coloca las galletas en bolsas herméticas bien selladas evitando el ingreso de oxígeno para conservar sus características organolépticas o también en contenedores plásticos.
- **Almacenamiento:** Luego se procedió a almacenar la galleta en un lugar limpio alejado de olores extraños para evitar contaminación, se almacenó a temperatura ambiente.

10.4. Procedimiento de elaboración de una bebida fermentada a base suero lácteo con pulpa de manzana

10.4.1. Diagrama para el Aprovechamiento integral del Lactosuero para la elaboración de bebida fermentada a base de lactosuero

Diagrama 8. Aprovechamiento integral del Lactosuero para la elaboración de bebida fermentada a base de lactosuero.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

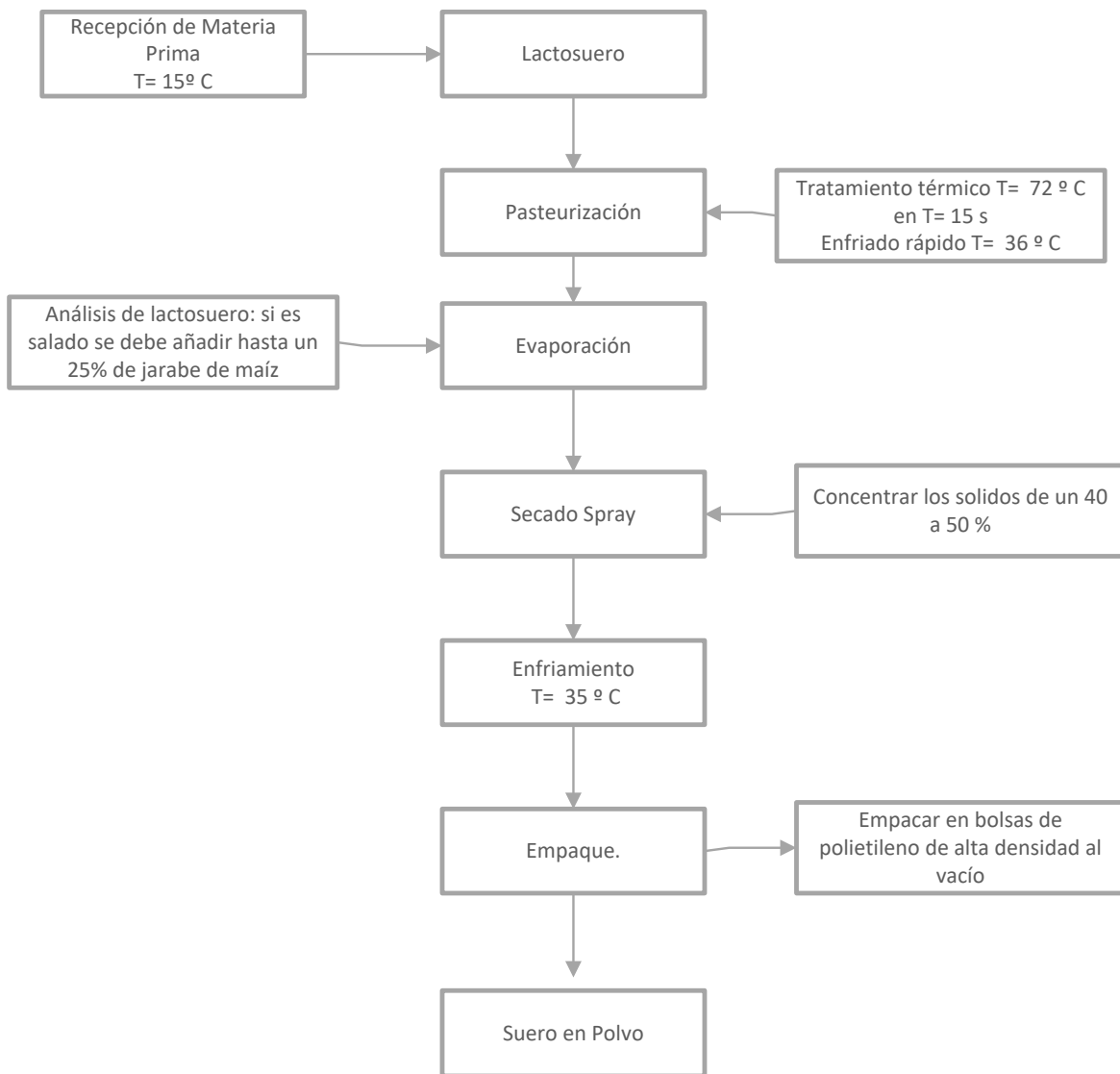
10.4.1.1. Descripción del procedimiento de elaboración de una bebida fermentada a base suero lácteo con pulpa de manzana

- **Preparación del medio de propagación:** El medio Vis-Star 12, se constituye con agua tibia a 50 grados.
- **Pasteurización:** al medio de propagación se lo pasteuriza a 85-90 grados en 30 minutos y se enfría hasta alcanzar una temperatura de 43 grados.
- **Inoculación:** al medio de propagación se inocula el medio de cultivo de pacificación suave que es MSK-V10, en cantidad de 0.1-0.5g/L.
- **Incubación 1:** es un baño termorregulador a 42 grados hasta alcanzar un pH de 0.05 en 5.5 horas.
- **Enfriamiento 1:** al cultivo madre se lo debe mantener a temperatura de refrigeración para evitar la propagación.
- **Preparación lactosuero:** la reconstitución de 6,6 10 % se realizó con agua recién hervida y tibia en aproximadamente 45 a 50 grados.
- **Inoculación 2:** luego se inocula el suero reconstituido con el cultivo madre o cultivo industrial al 3%
- **Fermentación:** se realiza a 42 grados, aproximadamente por 5 horas, hasta alcanzar un pH de 4.5+-0.05
- **Enfriamiento:** luego se enfría rápidamente a 4-8 grados
- **Mezcla y homogeneización:** se mezcla la sacarosa (7g/100ml) con el estabilizante (0.20g/100m), luego se incorpora la pulpa de frutas (6 y 7 g/100ml), se mezcla bien y se agrega el suero fermentado (1000g/100ml).
- **Envasado:** se utilizará envases de polietileno trilaminado con un aluminio esterilizados para autosopotantes de 500 ml
- **Almacenamiento y refrigeración:** se conserva en refrigeración a 3-5 grados con un 60% de humedad relativa.

10.5. Procedimiento integral del lactosuero para la una correcta obtención de polvo de suero lácteo

10.5.1. Diagrama para el Aprovechamiento integral del Lactosuero para la obtención de polvo de suero lácteo

Diagrama 9. Aprovechamiento integral del Lactosuero para la obtención de polvo de suero lácteo.



Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

10.5.1.1. Descripción del proceso integral del lactosuero para la obtención de polvo de suero lácteo

- **Recepción de materia prima:** se debe usar el suero acondicionado después de haber sido purificado para luego ser procesado, posterior a esto se debe realizar un análisis microbiológico para conocer la carga microbiana con la que llega la materia prima. Análisis fisicoquímico. Conocer el pH, acidez de la materia prima.
- **Análisis Microbiológico:** Previo al inicio del proceso de lactosuero se debe realizar un análisis microbiológico para conocer la carga microbiana con la que llega la materia prima.
- **Análisis fisicoquímico:** Conocer el pH, acidez titulable de la materia prima.
- **Pasteurización:** realizar una pasteurización a $T= 72^{\circ} C$ en el tiempo de 15 segundos y un enfriado rápido a $T= 36^{\circ} C$.
- **Evaporación:** Se debe considerar si el suero es salado o dulce. En caso de ser un suero salado se debe añadir jarabe de maíz hasta un 25% para reducir la acidez.
- **Secado:** El secado les impide efectivamente sobrevivir en él. Se realizara un secado llegando hasta un 40-50% con una concentración de sólidos.
- **Enfriamiento:** se debe enfriar el producto a una temperatura de $35^{\circ} C$, posterior realizar un análisis microbiológico del producto final polvo de lactosuero.
- **Análisis Microbiológico:** Realización de análisis del producto final polvo de lactosuero.
- **Empacado:** En esta operación se empacara en bolsas de polietileno de alta densidad al vacío, para con esto asegurar que no haya paso de la humedad hacia el interior del mismo y contaminación del producto. Además se diseñó un proceso donde se aplican distintos tipos de tecnologías de membrana, mediante etapas de filtrado en serie:
 - **Ultrafiltración I.** Alimentación: corriente de concentrado de suero tipo WPC 35.
 - **Microfiltración.** Alimentación: corriente de salida de la etapa de Ultrafiltración I.
 - **Ultrafiltración II.** Alimentación: corriente de salida de la etapa de Microfiltración.

10.6. Cantidad de proteínas derivadas del lactosuero

Para el aprovechamiento de proteínas se dice que por cada litro de lactosuero se obtiene de 6 a 10 gramos de proteínas, valores de interés para la producción láctea, siendo uno de los sectores más importantes de la economía de muchos países industrializados y en vías de desarrollo (Moreno , 2018)

Tabla 17. Cantidad de proteínas derivadas del lactosuero

Proteínas existentes en el lactosuero	Concentración (g/L)
α – Lactoalbúmina	3,30
β – lactoglobulina	1,30
Seroalbúminas	0,30
Inmunoglobulinas	0,50
Proteosa- peptona	0,60
Total	6

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021) adaptado: FAO (1985)

11. IMPACTOS

11.1.Aspecto Técnico.

Estamos en una época de la era tecnológica donde cada día se generan nuevas tecnologías e innovaciones. El aprovechamiento y uso de los métodos de purificación, concentración y separación de proteínas que existen en la actualidad lleva a innovar y generar nuevas tecnologías combinando estos métodos, pues ayudan a obtener un resultado óptimo y apropiado en la obtención de proteínas existentes en el lactosuero. La reutilización de este subproducto se ha vuelto muy importante hoy en día, pues mediante el aprovechamiento de proteínas existentes en el mismo podemos usarlos para desarrollar nuevos productos o a su vez tener un suplemento que en la mayoría de industrias alimenticias requieren este tipo de proteínas.

11.2.Aspecto Económico

En impacto económico generado por la presente investigación genera una disminución de importaciones de suplementos de contenido proteico para la fabricación de alimentos. Ecuador debe importar 228,48 toneladas de productos lácteos, equivalentes a \$531.250. El 39% de esta cantidad corresponde a lactosuero, total o parcialmente desmineralizado, y un 44%, a suero desproteínizado.

11.3.Aspecto Ambiental.

En la parte ambiental el impacto disminuirá, ya que se va aprovechar el lactosuero, generando nuevas aplicaciones y que este subproducto pueda ser aprovechado al máximo. Además, se disminuirá la cantidad de vertimiento lo que genera un impacto ambiental en a la sociedad.

12. PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN:

12.1.Presupuesto proyecto.

Tabla 18. Presupuesto para estudio.

PRESUPUESTO PARA LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO				
ÚTILES DE OFICINA				
RECURSOS	CANT.	DESCRIPCIÓN	V. UNITARIO \$	V. TOTAL \$
Esferos	3	Unidades	\$0,45	\$ 1,35
Lápiz	2	Unidades	\$0,40	\$ 0,80
Borradores	2	Unidades	\$0,30	\$ 0,60
Cuaderno de apuntes	1	Unidades	\$0,95	\$ 0,95
SUBTOTAL				\$ 3,70
RECURSOS TECNOLÓGICOS				
RECURSOS	CANT.	DESCRIPCIÓN	V. UNITARIO \$	V. TOTAL \$

Laptop Hp	1	-----	1200	\$ 1200
Impresora láser	1	-----	300	\$ 300
Resmas de papel	20	-----	3	\$ 60
Flash memory	1	-----	15	\$ 15
SUBTOTAL:				\$ 1575
SERVICIOS				
RECURSOS	CANT.	DESCRIPCIÓN	V. UNITARIO \$	V. TOTAL \$
Internet	6	Meses	25	\$ 150
Imprenta (anillados)	4	Ejemplares	4	\$ 16
Imprenta (empastados)	3	Ejemplares	20	\$ 60
Impresiones	350	Hojas	0,1	\$ 35
Transporte	7	Días	3	\$ 21
SUBTOTAL				\$ 282
TOTAL (útiles de oficina + recursos tecnológicos + servicios)				\$ 1860,70
Imprevistos 10%				\$ 186,70
TOTAL GENERAL				\$ 2046,77

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

12.2.Presupuesto para implementar

Tabla 19. Presupuesto para implementar.

PRESUPUESTO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LOS SISTEMAS PARA PURIFICACIÓN, CONCENTRACIÓN Y SEPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN EL LACTOSUERO.				
RECURSOS	CANT.	DESCRIPCIÓN	V. UNITARIO \$	V. TOTAL \$
Centrifugación	1	Sistema	\$10.000	\$ 10.000
Ósmosis inversa	1	Sistema	\$5.000	\$ 5.000
Ultrafiltración	1	Sistema	\$5.500	\$ 5.500
Cromatografía de exclusión molecular	1	Sistema	\$12.000	\$ 12.000
SUBTOTAL				\$ 32.500

Elaborado por: Marco Chipantiza – Jefferson Molina (2021)

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

13.1.CONCLUSIONES

1. Del estudio realizado sobre los tipos de lactosuero se pudo constatar que no existen diferencias significativas entre las propiedades físicas y químicas del lactosuero dulce y el ácido, la lactosa es el componente mayoritario y las proteínas en menor proporción pero de mayor importancia para ser utilizada en diversas industrias.
2. Las proteínas más importantes de las caracterizadas con presencia en el lactosuero son: β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, Lactoferrina, Seroalbúmina e inmunoglobulinas, las cuales son aplicadas con los siguientes fines industriales tanto en industrias alimentarias, farmacéuticas y empresas cosmetológicas las cuales pueden elaborar productos con altos concentrados proteicos.
3. De los métodos estudiados para la concentración y separación de proteínas del suero lácteo los que aplican las tecnologías de membrana son más eficientes y económicos, actualmente la ultrafiltración el método más utilizado y con mejores resultados experimentales. Para la separación y purificación los métodos cromatográficos ofrecen los mejores resultados y para su selección depende de los reactivos de que se disponga y equipamiento de laboratorio.
4. El valor calculado de costos directos e indirectos con los métodos seleccionados para purificar, concentrar y separar las proteínas del lactosuero es \$ 32.500.

13.2. RECOMENDACIONES

1. Aplicar los métodos seleccionados para la purificación, concentración y separación de las proteínas del lactosuero y comprobar su efectividad.
2. Diseñar nuevos procesos industriales a partir del conocimiento de las formas de aprovechar integralmente el lactosuero para diversificar la industria láctea.
3. Caracterizar el subproducto lactosuero para someterlos a procesos de elaboración de nuevos productos industriales comprobando cumplan con las normas de calidad establecidas.

14. BIBLIOGRAFÍA

Trabajos citados

- Albarral, E. C. (2016). *ESTUDIO DEL DISEÑO DE UNA PLANTA DE PROCESADO PARA EL APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO DE QUESERÍA*. Barcelona: UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA.
- Almecija, M. (2007).
- Arozarena, I. (3 de Noviembre de 2015). *Alimentos sin desperdicio*. Obtenido de <https://alimentosindesperdicio.blog/2015/11/03/aprovechamiento-del-lactosuero/>
- Ashhab, A., & Gillor, O. (2014). Biofouling of reverseosmosis membranes under different shear rates during tertiary. *Microbial community composition*, 86-95.
- Berg, J., Tymoczko J, & Striyer, L. (2008). *Bioquímica*. España: Publicacion Reverte.
- Brock, J. (2013). *The physiology of lactoferrina*. Cell Biol., 80. Obtenido de <https://g-se.com/proteinas-cual-es-mejor-1204-sa-E57cfb271d5c1f>
- Bruggen, V. (2008). "Nanofiltration," in *Advanced Membrane Technology and Applications*. España: John Wiley y Sons.
- Bryant, C. y. (1998). consideración de los geles endurecidos en frío derivados de suero desnaturalizado por calor. En C. y. Bryant, *Base molecular de la funcionalidad proteica con especial* (págs. 143 - 151). Trends Food Sci. Technol.
- Burdo, A. (2014). La cromatografía de exclusion. *News Medical Life Sciences*.
- Cadena, M. R. (2010). *Ultrafiltration del suero de queso* y. Honduras: Imprenta Zamorano.
- Calderon Bayona, J. J. (2015). Diseño de planta piloto para la revalorización de lactosuero mediante Tecnología de membranas. *Redalyc*.
- Calderon, J. J. (2015). *Repositorio Universidad Politecnica de Valencia*, 13-14.
- Camacho, M. (12 de Junio de 2010). *Obtención de un concentrado proteico del suero de la leche de vaca utilizando tecnología de membranas*. Obtenido de Bib Digital : <https://doi.org/http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1657>

- Carvalho, A., & Maubois, L. (2010). *Engineering Aspects of Milk and Dairy Products*. New York: Boca Raton.
- CASTELLS, G. M. (s.f.). *Valorización del lactosuero*. Obtenido de file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/lactosuero.pdf
- Chávez, J. E. (2001). *Utilización del ultrafiltrado de suero*. ZAMORANO: Carrera de Agroindustria.
- Costaños , E. (15 de Septiembre de 2015). *CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO*. Obtenido de CIENCIAONTHECREST: <https://cienciaonthecrest.com/2015/08/15/cromatografia-de-intercambio-ionico/>
- Delgado. (Octubre de 2016). *Proceso elaboracion de quesos*. Obtenido de Quesoadictos: <https://quesoadictos.com/>
- Dickson, H., & Kenstish, S. (2015). “*Microfiltration for casein and serum protein separation,*” in *Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation*. Reino Unido: Oxford Uk.
- Dunn, M. (2010). Electroelition of proteins from polyacrylamidegels. *Cordis Resultados de investigaciones de la UE*, 77.
- Falvo, M. (2013). *Proteínas: ¿Cuál es Mejor?* Obtenido de <https://g-se.com/proteinas-cual-es-mejor-1204-sa-E57cfb271d5c1f>
- García, H. (2010). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, e importancia. *Grupo de investigacion de alimentos GRIAL*, 31.
- Gavilanes. (1993). “*Elaboración de requesón a partir de suero de quesería*“. UTA, Ambato.
- Ghosh, R., & Sadavarte, R. (2015). “A technique for drying and storing a protein as a soluble composite thin film on the surface of an ultrafiltration membrane,” . *Journal of Membrane Science*, 256-257.
- Gomez , J., & Sanchez, O. (2019). Alternative for the use of whey. . *Scielo*, 1-2.

- González. (17 de Febrero de 2012). *Elaboración y Evaluación Nutricional de una Bebida Proteica a Base de Lactosuero y Chocho (Lupinus mutabilis) como Suplemento Alimenticio*. Obtenido de <http://dspace.esoch.edu.ec/handle/123456789/1592>
- Gutierrez, F. (13 de Septiembre de 2014). *Industria del Queso*. Obtenido de SCRIBD: <https://es.scribd.com/document/239597762/Industria-Del-Queso>
- Guzman, J. (2006). *Propiedades Nutricionales de las Proteínas del Lactosuero de leche*. Alfa Editores Tecnicos, www.Alfa-editores.com.
- Gyimesy, L. F. (2010). *DESARROLLO POR ULTRAFILTRACIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEINICO A PARTIR DEL LACTOSUERO*. BOGOTA D.C: INSTITUTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.
- Hans, W. (12 de Junio de 2010). *Advanced Kinetic Analysis Using a Lambda Series*. Obtenido de <https://libroelectronico.uaa.mx/capitulo-4-aminoacidos-y/cur-vas-de-titulacion-de-los.html>
- Huertas, R. A. (16 de Abril de 2009). *LACTOSUERO: IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS*. Obtenido de WHEY: IMPORTANCE IN THE FOOD INDUSTRY: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>
- Ibrajim, M., & Nagasawa, H. (2015). "Application of reverse osmosis for reuse of secondary treated urban wastewater Industrial,". *Journal of Membrane Science*, 68-74.
- INEC. (2017). *Estadísticas Agropecuarias*. Obtenido de [ecuadorencifras web site: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Informe_Ejecutivo_ESPAC_201](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Informe_Ejecutivo_ESPAC_201)
- Janson, C. (2011). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. A JOHN WILEY Y SONS. INC .
- Jimenez, P. (2018). Ecuador Sector Ganadero busca recuperarse. *Fepale*.

- Kostanski, L. (27 de Febrero de 2004). *Cromatografía de exclusión por tamaño: una revisión de las metodologías de calibración*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165022X03001829>
- Kujawa, J., & Cerneaux, S. (2015). "Removal of hazardous volatile organic compounds from water by vacuum pervaporation with hydrophobic ceramic membranes. *Journal of Membrane Science*, 11-12.
- Kushibiki. (2001). *effect of on plasma retinol and triglyeeride concentrations, and fatty acid*. J Dairy Res. 68: composition in calves.
- Larisa, G. (2012). *Una revisión sobre la composición del suero y los métodos*. Grecia: Dpto. De Producción Animal, Tech. Instituto Educativo de Larisa.
- Liang, M. C. (2006). En *Asimple and direct isolation of whey components from raw milk by gel filtration chromatography and structural charcterization by Fourier transform* (pág. 69 de 1269). Talanta : Roman spectroscopy .
- Lien, E. (2003). *Infant formulas with increased concentrations of lactoferrina*. Am. J. Clin Nutral .
- Martínez. (2009). *Memorias del Seminario de "Lactosuero el gran alimento. Beneficios en Nutrición y Tecnologías para su Utilización*. Galicia: Centro Tecnológico Lácteo.
- Mehra, R. a. (2004). *A membrane filtration approach to whey protein fractionation* . Oldbury Publishing Limited : The Irish Year Book .
- Militello, V. C. (2004). En *Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy* (págs. 107 - 175). Biophys . Chem., .
- Ministerio de salud. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas.
- Miñi, A., & Paez , J. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración. *Scielo*, 361.
- Moreno , A. (11 de Febrero de 2018). *Una forma de disminuir los impactos ambientaes y diversificacion de pproductos lacteos*. Obtenido de ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/332554062_La_reutilizacion_del_lacto_su

ero_Una forma de disminuir los impactos ambientales y obtener energía alternativa

- Negrillo , L. (2010). *Guía de elaboración de quesos artesanales*. Obtenido de alimentosargentinos.
- O'Connor, P. M. (8 de Octubre de 2010). *Cromatografía de intercambio iónico: principios básicos y aplicación a la purificación parcial de prolil oligopeptidasa soluble de mamíferos*. Obtenido de https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-913-0_12
- Osver, F. E. (Junio de 2013). *Concentración de Suero por NANOFILTRACIÓN y ÓSMOSIS INVERSA*. Obtenido de <https://www.portalechero.com/innovaportal/file/4057/1/concentracion-de-suero-por-oi-y-nf.pdf>
- Pacheco. (2008). *“Química de los alimentos: Proteínas Séricas“*. Obtenido de <http://www.redalimentos.com.ar>
- Parra, R. (2009). Importancia En La Industria De Alimentos. *Facultad Nacional de Agronomía*, 62.
- Parzanese, M. (2008). *Tecnologías para la Industria Alimentaria*. Obtenido de Tecnologías para la Industria Alimentaria: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_13_Lactosuero.pdf
- Pérez. (2008). *“Química de los alimentos: Proteínas Séricas“*. Obtenido de <http://www.redalimentos.com.ar>
- Perez, M. (1992). *effect of lactoglobulina on the activity of pregastric lipase*. *Biophys: Biochim Acta*, 1123.
- Poncelet. (12 de Mayo de 2016). Obtenido de <https://poncelet.es/elaboracion-del-queso>
- Poncelet. (12 de Mayo de 2016). *HISTORIA DEL QUESE, ENCICLOPEDIA DEL QUESO*. Obtenido de ENCICLOPEDIA DEL QUESO: <https://poncelet.es/historia-del-queso>

- Ramires, J., Solis, C., & Velez, C. (2018). Membrane technology: Obtaining Whey Protein. *Scielo*.
- Ramírez. (10 de octubre de 2016). *PROCESO ELABORACION DEL QUESO*. Obtenido de ¿COMO SE HACE? PASO A PASO: https://quesoadictos.com/jmsblog/inicio/7_proceso-de-elaboracion-del-queso-paso-a-paso.html
- Rapley, R. (2008). *Molecular Biomethods Hand Book*. John Walker.
- Reyes, M. (23 de Marzo de 2015). *Cromatografía de intercambio iónico*. Obtenido de Jove: <https://www.jove.com/v/10269/cromatografa-de-intercambio-inico?language=Spanish>
- Rojas, Y. (10 de Abril de 2018). *Metodo Cromatografía*. Obtenido de Redalyc: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/5075/507557607011/html/index.html>
- Rolim, R. (2008). Obtaining oligopeptides from whey: Use of subtilisin and pancreatin. *Scielo*, 15.
- Samaniego. (17 de Noviembre de 2018). *¿Qué es la microfiltración?* Obtenido de <https://www.carbotecnia.info/aprendizaje/filtracion-de-agua-liquidos/que-es-la-microfiltracion/>
- Sambrano. (2005). *Tecnología de membranas: aplicables a la recuperación de productos de corrientes líquidas*. Obtenido de <https://www.portalechero.com/innovaportal/v/3374/1/innova.front/tecnologia-de-membranas:-aplicables-a-la-recuperacion-de-productos-de-corrientes-liquidadas:.html>
- Sanchez, O. (2018). Alternativa para el aprovechamiento del lactosuero. *Scielo*.
- Santamarin, B. (2010). Aprovechamiento del suero de quesería de origen caprino mediante la obtención de concentrados de proteínas séricas y subproductos de clarificación. *Journal of Food Engineering*.
- Sartorius. (2019). *Dispositivos de filtración y purificación de laboratorio*. Obtenido de <https://www.sartorius.com/en/products-es/lab-filtration-purification->

es?gclid=Cj0KCQiAlZH_BRCgARIsAAZHSBmDeo1EdkE_Vg18N9oI71X3gRSX
tx9bg3a4i1PhqsEeHBv8sM4ZptsAgJVEALw_wcB

Sartorius, A. (2019). *Dispositivos de filtración y purificación de laboratorio*. Obtenido de https://www.sartorius.com/en/products-es/lab-filtration-purification-es?gclid=Cj0KCQiAlZH_BRCgARIsAAZHSBmDeo1EdkE_Vg18N9oI71X3gRSXtx9bg3a4i1PhqsEeHBv8sM4ZptsAgJVEALw_wcB

Schwartz, L. (29 de Febrero de 2016). *Diafiltration: A Fast, Efficient Method for Desalting, or Buffer Exchange of Biological Samples*. Obtenido de Pall Life Sciences: http://www4.pall.com/pdf/02.0629_Buffer_Exchange_STR.pdf

Sebastián, R. N. (15 de 12 de 2011). *Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos Fermentativos*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/257890689_Aprovechamiento_Industrial_de_Lactosuero_Mediante_Procesos_Fermentativos

Smithers, C. &. (2006). Technological implications for processing,. Int. Dairy J.,.

Solís. (2005). *Proteínas del Lactosuero*. Obtenido de Proteínas del Lactosuero: <https://www.portalechero.com/innovaportal/v/185/1/innova.front/proteinas-del-lactosuero.html>

Torres, M. (26 de Septiembre de 2018). *El suero de leche ¿ofrece beneficios para la salud de las personas?* Obtenido de El suero de leche ¿ofrece beneficios para la salud de las personas?: <https://www.edicionmedica.ec/secciones/profesionales/-el-suero-de-leche-ofrece-beneficios-para-la-salud-de-las-personas--92904>

Tsakali, E., & Allessandro, A. (05 de 2012). A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products. *Lariza Nea Ktiria*, 3-4. Obtenido de Department of Progettazione e Gestione dei Sistemi Agrozootecnici e Forestali.

Uribe, B. E. (2005). *ESTUDIO DEL PROCESO DE NANOFILTRACIÓN*. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1878/tesisUPV2361.pdf>

- Urtasun, N. (Junio de 2009). *VALORIZACIÓN DEL SUERO DE QUESO. UN DESAFÍO PARA LA CROMATOGRFÍA A*. Obtenido de file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/PURIFICACION%201%20(2).pdf
- Valencia, D. e. (septiembre de 2019). *DIAPORAMA: Filtrado por osmosis inversa*. Obtenido de http://148.215.1.182/bitstream/handle/20.500.11799/108044/secme-11279_1.pdf?sequence=1
- Valentin, P. a. (2005). Lactoferrin. En *An important host defence against microbial and viral attack* (pág. 62 de 2576). Mol . Life Sci.
- Villalobos, A. C. (2 de diciembre de 2006). *TECNOLOGÍAS DE MEMBRANAS EN LA AGROINDUSTRIA LÁCTEA1*. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/437/43717211.pdf>
- Wehbi, Z. P. (2005). Efecto del calor. En Z. P. Wehbi, *tratamiento de desnaturalización de alfa-lactoalbúmina bovina: determinación de parámetros cinéticos y* (págs. 9730 - 9736.). J. Agric. FoodChem.

15. ANEXOS

CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES

NOMBRES: Jefferson Mesías

APELLIDOS: Molina Herrera

CÉDULA DE IDENTIDAD: 055005160-1



LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO: Latacunga, 18 de diciembre de 1995.

EDAD: 24 años

ESTADO CIVIL: Soltero

DIRECCIÓN: La Victoria barrio Mulinlivi
600 metros de la entrada La Victoria.

TELÉFONO(S): 032682133 / 0979082441

E-MAIL: jefferrasta.1995@hotmail.com

FORMACIÓN ACADÈMICA

Estudios Primarios: Unidad Educativa “Dr. Pablo Herrera”

Estudios Secundarios: Instituto Tecnológico Superior “Ramón Barba Naranjo”

Especialidad: Electromecánica

Estudios Superiores: Universidad Técnica de Cotopaxi

(Finalizado el Noveno Semestre de Ingeniería Industrial)

CURRICULUM VITAE**DATOS PERSONALES**

NOMBRES: Marco Roberto
APELLIDOS: Chipantiza Naula
CÉDULA DE IDENTIDAD: 050298618-5



LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO: Salcedo, 04 de diciembre de 1994.

EDAD: 25 años

ESTADO CIVIL: Soltero

DIRECCIÓN: Salcedo Barrio Eloy Alfaro

TELÉFONO(S): 032730513 / 0998176553

E-MAIL: marco.chipantiza6185@utc.edu.ec

FORMACIÓN ACADÈMICA

Estudios Primarios: Escuela Fiscal “General Pintag”

Estudios Secundarios: Colegio Tecnico Industrial “19 DE SEPTIEMBRE”

Especialidad: Instalaciones equipos y máquinas eléctricas.

Estudios Superiores: Universidad Técnica de Cotopaxi

(Finalizado el Noveno Semestre de Ingeniería Industrial)