



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE EXTRACTOS DE MALTA PARA LA ELABORACIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEICO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA

PATRICIA ALEJANDRA NAVARRO ORELLANA

PROFESOR GUÍA

JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE COMISIÓN:

FERNANDO JAVIER REYES BADILLA

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la empresa Maltexco S.A.

SANTIAGO DE CHILE
2018

Recuperación de proteínas del proceso de fabricación de extractos de malta para la elaboración de un concentrado proteico

La búsqueda de fuentes proteicas de origen vegetal ha aumentado en los últimos años, esto debido a la dependencia de proteínas de origen animal y al aumento de la población. Algunos cereales se han estudiado como fuente proteica para salmones, siendo uno de los principales, la cebada. Maltexco, empresa dedicada a la producción de malta de cebada y derivados, en su proceso de extractos de malta, gran masa de proteínas son desaprovechadas, por lo que existe interés en desarrollar un proceso que permita recuperarlas.

Este trabajo tiene como objetivo diseñar un proceso a escala industrial para la recuperación de proteínas del proceso de extractos. A partir de la bibliografía, se tiene que la cromatografía de intercambio iónico es una técnica que logra recuperar una alta masa de proteínas de la cebada, en el proceso del *whisky*, por lo que se estudiará su factibilidad. En la primera parte se estudian diferentes variables del proceso de adsorción en batch y luego se procede a construir una columna. Con los resultados obtenidos de la primera etapa, se alimenta mosto continuamente a la columna de manera de poder determinar su curva de ruptura y capacidad. También se propone recuperar las proteínas en el equipo de hervido.

El proceso diseñado se encuentra entre las etapas de filtrado y hervido del proceso con un mosto tratado con proteasas. La resina con la mayor masas adsorbida de proteínas es la zeolita, alrededor de un 90% con respecto a la inicial. Además que el pH óptimo de adsorción es 4,7 y para la desorción la mayor masa desorbida es utilizando buffer carbonato 0,1 [M] a pH 10,8. Con los resultados anteriores y utilizando la columna, se obtiene que la capacidad de la resina es de 2,1 [g proteína/l resina]. Para procesar los 25 [m³] de mosto utilizando una columna de 0,1 [m] de alto es necesario tener un equipo de 9,4 [m] de diámetro, o bien, 22 columnas con 2 [m] de diámetro, esta última es acorde a equipos de dimensiones industriales. Otra alternativa es cambiar la altura a 0,5 [m], pero la nueva capacidad debe determinarse experimentalmente. En cuanto a la segunda alternativa de recuperación, se tiene que es más compleja y se recupera menor cantidad de proteína.

Para la operación, se sugiere primero lavar la zeolita utilizando agua destilada y ambientarla con buffer acetato pH 4,7, luego alimentar el mosto a la columna a pH 4,7, posteriormente realizar un lavado con buffer acetato 0,1 [M] pH 4,7, para luego realizar la desorción de las proteínas utilizando buffer carbonato 0,1 [M] pH 10,8 y finalmente su regeneración con NaOH y agua destilada.

Para evaluar los productos finales, se tiene que el mosto fue modificado solo en características como turbidez y color, pero bajo en concentración de azúcares. Mientras que el concentrado obtenido recupera el 30% de las proteínas inicial según el método de Kjeldahl y cerca del 100% con el método de Bradford.

Dado esto resultados se considera que es proceso propuesto es aceptable, proponiendo que se continúe trabajando con el objetivo de maximizar el rendimiento. Además, para evaluar su eficiencia y si se puede ser utilizado para la alimentación de salmones se sugiere realizar un proximal de aminoácidos, y compararlos con perfiles conocidos.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciendo a mis padres, por su apoyo, preocupación y cariño durante toda la vida, que a pesar de la distancia física que significo venirme a estudiar a Santiago, todos los días los sentí cerca mío. A mis hermanas, Karem y Camila, gracias por ser mis mejores amigas y compañeras siempre, desde que se vinieron a vivir a Santiago todo ha sido mucho más hermoso y entretenido.

A mi profesor guía Cristian Salgado por permitirme trabajar con él y formar parte de la comunidad PMDC-LAB y por su compromiso con mi trabajo. También a todos los miembros de la comunidad del laboratorio, por las opiniones y comentarios durante todo el proceso de este trabajo. A Fernando Reyes por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por acercarme y conocer más sobre esta área de la ingeniería de procesos. A ambos gracias por su tiempo en las extensas reuniones después de sus horarios laborales.

A la profesora María Elena, muchas gracias por toda la ayuda brindada y por siempre darse el tiempo de contestar mis dudas (que, por cierto, fueron muchas) con mucha amabilidad.

A mis compañeros de tesis en Maltexco, especialmente a Verónica y Carolina, por todas las conversaciones laborales y no laborales que tuvimos, hicieron que mi estadía en la empresa fuera una de las mejores experiencias laborales. También a todas las personas de Maltexco, especialmente a la gente de desarrollo, Camila R. y Elena, y la gente del laboratorio de calidad: Don Peter, Carlitos, Leandro, Mauricio y Mónica, por su gran disposición y ayuda en los momentos que utilicé el laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos de la carrera y plan común, gracias por todas las sesiones de estudio y actividades compartidas, especialmente a la Cami y Tami, con quienes nos acompañamos y ayudamos durante todo este largo proceso.

También muy especialmente a mis tías y primos Orellana, que siempre han estado en junto a mí, muchas gracias por todo el cariño siempre, especialmente a mis pequeñas sobrinitas Josefa y Clarita por ser las más tiernas y siempre sorprenderme con su inocencia y alegría. También a mi pequeño Cruzó, por ser el primero en recibirme en Litueche y con tanta efusividad.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Maltexco S.A.	1
1.2. Extractos de malta	1
1.3. Concentrados proteicos	2
1.4. Proteínas de la cebada	3
1.5. Motivación	3
1.6. Objetivos.....	5
1.6.1. Objetivo general	5
1.6.2. Objetivos específicos.....	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. La cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	6
2.2. La malta.....	8
2.3. Proceso de malteo.....	9
2.4. Extractos de malta	10
2.5. Proceso extractos de malta	11
2.6. Separación de proteínas	14
2.7. Perfil proteico mosto.....	15
2.8. Recuperación de proteínas de la malta	19
2.9. Adsorción.....	20
2.10. Cromatografía de intercambio iónico.....	23
2.11. Escalamiento columnas	25
2.12. Resinas de intercambio iónico.....	27
2.13. Concentrados proteicos para salmones.....	28
3. METODOLOGÍA.....	30
3.1. Metodología general.....	30
3.2. Búsqueda bibliográfica.....	31
3.3. Medición concentración de proteínas	31
3.3.1. Método de Bradford.....	31
3.3.2. Método de Kjeldahl.....	33

3.4. Elaboración mosto de prueba.....	34
3.5. Experimentos de adsorción.....	36
3.5.1. Cinética de adsorción.....	37
3.5.2. Relación mosto zeolita	37
3.5.3. Adsorción a diferentes pH del mosto.....	37
3.5.4. Adsorción con otras resinas.....	38
3.5.5. Adsorción a 70°C	38
3.6. Experimentos de desorción.....	39
3.7. Escalamiento	40
3.8. Evaluación productos finales.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
4.1. Caracterización mosto prueba.....	44
4.2. Cinética de adsorción	45
4.3. Adsorción de proteínas para diferentes pH	46
4.5. Adsorción de proteínas con diferentes resinas.....	47
4.6. Relación mosto-zeolita	49
4.7. Desorción de proteínas.....	50
4.8. Recuperación de proteínas a 70°C.....	54
4.9. Escalamiento.....	56
4.9.1. Alternativa 1: Adsorción en columnas	56
4.9.2. Alternativa 2: Adsorción equipo de hervido	60
4.10. Propuesta final.....	62
4.11. Evaluación productos finales	63
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
6. BIBLIOGRAFÍA.....	69
ANEXOS	74
Anexo A: Proceso elaboración extractos Maltexco	74
Anexo B: Método de Bradford	77
Anexo C: Método de Kjeldahl	78
Anexo D: Caracterización agua de pozo planta Maltexco Talagante	80
Anexo E: Ecuaciones escalamiento columna	81

Anexo F: Memoria de cálculo escalamiento columna de adsorción.....	82
Anexo G: Análisis de precios proceso de adsorción.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Composición química másica promedio de la cebada [19]	7
Tabla 2-2: Principales variedades de cebada trabajadas en Maltexco y su contenido másico promedio de proteína y FAN.....	7
Tabla 2-3: Clasificación simple basada en la solubilidad de las proteínas de la cebada [12] [8]	8
Tabla 2-4: Contenido de aminoácidos importantes en los granos de cebada [% del total de aminoácidos][18]	8
Tabla 2-5: Banda de proteínas identificadas desde SDS-PAGE gel [27].....	18
Tabla 2-6: Concentraciones de cantidades individuales y totales de aminoácidos para mosto y grano gastado producidos en la maceración [27]	19
Tabla 2-7: pI proteínas presentes en el mosto	24
Tabla 2-8: Pauta para el escalamiento de columnas de cromatografía [32]	26
Tabla 2-9: Composición analizada de diferentes ingredientes de prueba para estudio de alimentación a salmones [40]	29
Tabla 3-1: Algunas características de las resinas utilizadas para la adsorción de proteínas en el estudio.....	38
Tabla 4-1: Características del mosto usado en los experimentos	44
Tabla 4-2: Resultados proteína adsorbida y capacidad de la zeolita para diferentes relaciones de mosto y zeolita (n=2)	49
Tabla 4-3: Resultados primer montaje columnas para diferentes granulometrías de zeolita (ND: no determinado).....	56
Tabla 4-4: Resultados mediciones finales realizadas al mosto antes y después de la adsorción	64
Tabla 4-5: Mediciones de concentración de proteínas con el método de Bradford y Kjeldahl a los concentrados proteicos.....	65
Tabla A-1: Temperatura y pH óptimos de algunas de las enzimas de la malta presente durante la etapa de maceración [18].....	75
Tabla B-1: Proteína y agua utilizadas en curva de calibración método de Bradford.....	76
Tabla B-2: Valores obtenidos en la curva de calibración método de Bradford.	76
Tabla D-1: Características fisicoquímicas del agua de pozo Planta Talagante [53].....	80
Tabla G-1: Costos y ganancias para el cambio de pH del mosto.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1: Corte transversal del grano de cebada [17].....	6
Figura 2-2: Diagrama de bloques proceso de malteo [21].....	9
Figura 2-3: Extractos de malta en presentación líquida y polvo de MaltexcoFood [3]	11
Figura 2-4: Diagrama de bloques del proceso de extractos [22].....	11
Figura 2-5: Curva de maceración planta de extractos de malta en Maltexco	12
Figura 2-6: Curva de maceración modificada extractos de malta [25]	16
Figura 2-7: Curva de maceración utilizada en el estudio cervecero [27]	16
Figura 2-8: SDS-PAGE gel de las muestras de mosto. C denota al control y P1-P5 son muestras con adición de proteasas [27].....	18
Figura 2-9: Principios de separación en cromatografía [32]	21
Figura 2-10: Movimiento de la zona de adsorción y desarrollo de la curva de ruptura para un adsorbente de lecho fijo (CA_i : concentración inicial de soluto y CA_j , con $j:1,2,3$ y 4 concentraciones de soluto en el flujo de salida) [24].	22
Figura 2-11: Relación entre la curva de ruptura, la pérdida de soluto en el efluente y la capacidad de columna sin utilizar (CA_i : concentración inicial de soluto y CA' : concentración en el efluente en el punto de ruptura) [24].....	22
Figura 2-12: Ejemplo de curvas de titulación de proteínas [32].....	23
Figura 2-13: Cromatogramas proceso de cromatografía de intercambio iónico usando elución un gradiente de sal (línea roja: concentración de sal y azul la señal medida) [32]	25
Figura 2-14: Sistema de cromatografía ÄKTA pure de la empresa GE Healthcare [35].....	26
Figura 2-15: Columna de cromatografía modelo AxiChrom de la empresa GE Healthcare [35].....	26
Figura 2-16: Interacción zeolita-proteína bajo diferentes condiciones de pH [39]	28
Figura 3-1: Esquema metodología general trabajo.....	30
Figura 3-2: Curva de calibración método de Bradford.....	32
Figura 3-3: Etapas método de Kjeldahl.....	33
Figura 3-4: Equipo Kjeldahl, empresa Gerhardt.....	34
Figura 3-5: Equipo Thermomix Vorwerk utilizado para la molienda y maceración	35
Figura 3-6: Montaje filtración y lavado del macerado [25]	35
Figura 3-7: Centrifuga Universal 17, Hettich.....	36
Figura 3-8: Primer montaje columnas para diferentes granulometrías de zeolita	40
Figura 4-1: Diagrama de bloque proceso de extractos de malta con recuperación de proteínas.....	44

Figura 4-2: Cinética de adsorción proteína en zeolita sin pretratamiento ...	46
Figura 4-3: Adsorción de proteínas para diferentes pH del mosto	47
Figura 4-4 Adsorción de proteínas utilizando diferentes resinas.....	49
Figura 4-5: Proteína adsorbida y capacidad de la resina para diferentes relaciones de mosto y zeolita.....	50
Figura 4-6: Desorción de proteínas utilizando buffer acetato pH 4,7 con diferentes concentraciones de NaCl.....	51
Figura 4-7: Desorción de proteínas utilizando diferentes pH	52
Figura 4-8: Desorción de proteínas con buffer carbonato y diferentes concentraciones de NaCl.....	53
Figura 4-9: Concentrados de proteína obtenidos utilizando diferentes buffer y soluciones de NaOH (1. Buffer acetato pH 4,7 2. Buffer acetato pH 4,7- NaCl 1 [M], 3. 0,1 [M] NaOH, 4. 1 [M] NaOH 5. Buffer acetato pH 5,6 6. Buffer carbonato pH 9, 7. Buffer carbonato pH 10,8 8. Buffer carbonato pH 10,8-NaCl 1 [M])	53
Figura 4-10: Desorción de proteínas utilizando diferentes concentraciones de buffer carbonato pH 10,8.....	54
Figura 4-11: Proteína adsorbida para diferentes temperaturas del mosto...	55
Figura 4-12: Segundo montaje columnas para construir la curva de ruptura del proceso	59
Figura 4-13: Condiciones de operación columna.....	60
Figura 4-14: Curva de ruptura para mosto a pH 5,4	60
Figura 4-15: Proteína recuperada para adsorción y desorción a 70°C.....	61
Figura 4-16: A) mosto antes de adsorción y B) mosto posterior a la adsorción	64
Figura A-1: Diagrama de flujo del proceso de extractos de malta en Maltexco [4].....	74
Figura A-2: Equipo para la molienda en Maltexco [3]	74
Figura A-3: Equipo para la maceración en Maltexco [3]	75
Figura A-4: Filtro prensa Meura en Maltexco [3].....	76
Figura A-5 : Equipo de hervido en Maltexco [3]	76
Figura G-1: Gramos de ácido cítrico para cambiar el pH del mosto	84

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Maltexco S.A.

Maltexco S.A., en sus inicios Malterías Unidas S.A., es una empresa nacional fundada en 1896, dedicada a la producción de cebada malteada y sus derivados, como extractos de malta, harinas, maltas especiales. Los productos elaborados son comercializados en la industria cervecera y alimenticia, tanto a nivel nacional como internacional [1] .

La empresa cuenta con dos subdivisiones: *Patagonia Malt* y *MaltexcoFood*, la primera dedicada a la producción de distintos tipos malta, principal materia prima para la elaboración de cervezas, y la segunda, dedicada a la producción de ingredientes 100% naturales. Los productos son elaborados en cuatro maltarías estratégicamente ubicadas en ciudades del Centro-Sur de Chile: Talagante, Coronel, Cajón y Temuco [1].

Las líneas productivas de *MaltexcoFood* tienen diferentes propósitos: mejoradores, nutricionales, sustitutos y colorantes naturales. Los mejoradores son los que presentan un alto contenido enzimático, siendo capaces de mejorar la productividad de levaduras y sabores, aromas y texturas, ejemplos de estos son los extractos y harina de malta. Por otro lado, los nutricionales se caracterizan por su alto contenido de fibras solubles e insolubles, ser bajos en grasas y contar con alto contenido de β -glucanos, entre estos está la cebada perlada, la harina de cebada perlada y la harina de cebada integral. En cuanto a los sustitutos son aquellos que pueden reemplazar a bajo costo al café, cacao en polvo, entre otros. Finalmente, los colorantes naturales son utilizados como agentes que entregan color a los productos en los que se utilizan, como color caramelo, chocolate y café [2].

El presente proyecto por desarrollar se enmarca en el proceso de fabricación de extractos de malta en Maltexco, en el Departamento de Ingeniería y Desarrollo, ubicado en la comuna de Talagante. El área comercial de la empresa ha encontrado una oportunidad para diversificar los productos comercializados por esta, aprovechando de mejor manera uno de sus principales subproductos del proceso, el que contiene proteínas.

1.2. Extractos de malta

Los extractos de malta son una mezcla de azúcares naturales obtenidos de la hidrólisis enzimática de la cebada malteada. Debido a sus características

de sabor, color y aroma, el extracto de malta se usa en la industria alimentaria con el fin de mejorar las propiedades organolépticas, valor nutricional, textura y vida útil de los productos [3] . La composición de los extractos es de 90-93% de carbohidratos, especialmente maltosa y entre un 3-7% proteínas [3].

El proceso de fabricación de extractos se divide de forma simplificada en seis etapas: molienda, maceración, filtración, hervido, concentración y secado. La principal etapa es la maceración, donde el grano molido es mezclado con agua y enzimas exógenas, para posteriormente ser sometido a un proceso térmico que favorece la acción de enzimas, tanto adicionadas como propias del grano, para la hidrólisis del almidón. El producto de la maceración pasa a un proceso de filtrado, formándose una torta denominada bagazo, principal subproducto del proceso, y una fase líquida, denominado mosto, este último pasa a la etapa de hervido y concentración, con lo que se obtiene un extracto líquido, el que puede pasar por un nuevo secador, permitiendo la salida del producto como polvo. [4].

1.3. Concentrados proteicos

Las proteínas son biomoléculas, compuestas por aminoácidos, que se encuentran en los alimentos de origen animal y vegetal, que cumplen variadas funciones en los organismos vivos, son necesarias para el crecimiento, desarrollo y el mantenimiento del cuerpo, por esto, corresponde a uno de los nutrientes que deben ser incorporados en la dieta de animales y humanos [5]. Por ejemplo, en el caso de un ser humano, el consumo de una persona mayor a 18 años tiene una ingesta recomendada de proteínas de 0,8 [g/kg/día] según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) [5]

Los concentrados proteicos se pueden definir como un ingrediente o como un complemento alimenticio, dependiendo de su uso, que tiene un alto contenido de proteínas. El primer uso y más ampliamente desarrollado, es el tecnológico y se viene empleando desde hace años como ingrediente de alimentos, cumpliendo funciones específicas en distintos productos y procesos. Por ejemplo, como mejoradores de textura, emulsionantes, agentes de aireado y estabilizantes. El segundo, es debido a su calidad nutricional y valor biológico, que son utilizados para aumentar el contenido de proteínas en diversos productos, desde bebidas de alto contenido proteico para deportistas de alto rendimiento, productos para vegetarianos, alimento para animales, entre otros, uso que actualmente está creciendo [6] [7].

Dada la importancia de estos nutrientes en la dieta de diferentes organismos vivos y en la industria de alimentos, los concentrados de proteína tienen un alto valor en el mercado, siendo los más comunes en la actualidad los provenientes de soya, suero y albúmina de huevo, los que tienen porcentaje de proteína variable, entre un 50 a 80%. [6].

La calidad o valor de un concentrado proteico se define en base a la cantidad de proteína total que posee, tipos de aminoácidos que tiene, cuántos de estos son esenciales y en qué proporción se encuentran [5]. También depende quienes lo consumen, ya que los aminoácidos esenciales son diferentes para cada especie.

1.4. Proteínas de la cebada

La cebada contiene aproximadamente un 12% en masa en base seca de proteínas [8], las que contribuyen con diferentes características y funciones en el grano. Por ejemplo, cuando la cebada es malteada y utilizada para elaborar cervezas, las proteínas contribuyen con características como sensación en boca y cuerpo de la cerveza, en la estabilidad de la espuma y en la tendencia de formar turbidez [9]. En el caso del extracto de malta, su contenido de proteína es bajo y no contribuyen al valor comercial del producto, ya que este se debe a su alto contenido de azúcares como la maltosa.

En cuanto a las proteínas de la cebada, existen diferentes investigaciones que sugieren utilizarla para reemplazar en parte la alimentación actual de los salmones, cuya fuente principal de proteínas es la soya y aceite o harina de pescado, esto se debe a que tienen un perfil de aminoácidos parecidos, demostrándose que este tipo de alimento también contribuyen al desarrollo y crecimiento de la especie [10] [11].

Actualmente en la industria cervecera y algunas destilerías, un alto contenido de proteínas de la cebada es comercializados como alimento para animales formando parte de un subproducto de bajo valor, este no es un concentrado como tal, dado el alto contenido de fibras y otros compuestos [12].

1.5. Motivación

Para el 2050, la población mundial se elevará a 9.000 millones de personas, lo que significará un desafío alimentar de forma adecuada al total de la población, donde, por ejemplo, la producción anual de cereales tendría que incrementarse en casi mil millones y la de carne en más de 200 millones

de toneladas para cumplir con la alimentación de la población. Por otro lado, también se tiene que la demanda por alimentos de mejor calidad como la carne y el pescado crece junto con el aumento de la población [13].

Con una tasa de crecimiento anual del 7%, la acuicultura es la rama de más rápido crecimiento en la producción de alimentos de origen animal [14]. En el caso de los salmones, el crecimiento de su producción se encuentra limitado por su alimentación, la que tradicionalmente ha provenido de fuentes animales, y dado que es de peces capturados en la naturaleza, las convierte en recursos naturales finitos y una práctica cuestionable desde una perspectiva de sustentabilidad [15]. Además, agregar que la alimentación corresponde aproximadamente a un 50% del costo de producción de salmones.

Actualmente, las industrias de alimentos que utilizan como materia prima fuentes de alto contenido proteico, pueden generar flujos de residuos que presentan alto contenido de este nutriente, ejemplo son la industria de la carne y la leche. Los efluentes producidos pueden ser enviados a plantas de tratamiento, dirigidos directamente al medio ambiente o sub aprovechadas [14].

En el caso de Maltexco, en el proceso de fabricación de extractos, las proteínas de la cebada están siendo sub aprovechadas, pues están siendo vendidas contenidas en el bagazo. Sin embargo, estas proteínas podrían ser aprovechadas de mejor manera, ya que tienen un alto interés en la industria de salmones y además darle un valor agregado mayor al proceso de extractos. Recuperar todo el contenido proteico de la cebada malteada que ingresa al proceso, aproximadamente 60 mil kg de proteínas, podría generar una ganancia de 118.750 [US\$/mes].

Además, Chile es el mayor productor de salmones a nivel continental y octavo a nivel mundial, constituyendo un pilar fundamental en la estrategia nacional de convertir a Chile en potencia alimentaria, por lo que la elaboración y búsquedas de nuevos productos para favorecer la productividad en esta industria son de gran relevancia [16].

A partir de lo anterior, Maltexco ha comenzado a desarrollar un proyecto de recuperación de proteínas. Este proyecto tiene como objetivo elaborar un concentrado proteico que podría ser utilizado como ingrediente para la elaboración de alimento para salmones.

1.6. Objetivos

El proyecto a desarrollar se llevará a cabo en el marco de los objetivos señalados a continuación.

1.6.1. Objetivo general

Diseñar un proceso industrial de recuperación de proteínas en el proceso de fabricación de extractos de malta en Maltexco S.A.

1.6.2. Objetivos específicos

- Plantear un proceso de recuperación de proteínas que se adapte al proceso de producción de extractos de malta de Maltexco.
- Establecer las condiciones de operación a escala laboratorio para la recuperación de proteínas.
- Caracterizar el producto obtenido y evaluar sus posibles usos en la industria alimenticia.
- Escalar el proceso de recuperación de proteínas, a partir de los resultados obtenidos a escala laboratorio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La cebada (*Hordeum vulgare*)

La cebada es uno de los cereales con mayor presencia en el mundo y tiene una serie de usos, ya sea como grano entero, harina de cebada, malteado para cerveza u otras bebidas. La cebada se clasifica de acuerdo al número de granos en la espiga de la planta, los que pueden ser 2, 4 o 6 hileras [12]. En Maltexco se utiliza cebada de dos hileras, la que proviene de la Patagonia Argentina y de la zona sur de Chile, y tiene como característica un sabor limpio y bajo contenido en proteínas, comparada con las de más hileras [9].

El grano de cebada consta de tres componentes principales: aleurona, embrión y endospermo, como se muestra la Figura 2-1 . El endospermo sirve como almacenamiento de nutrientes para el embrión en crecimiento, su mayor parte está constituido por células de gran tamaño, provistas de gránulos de almidón y proteínas de reserva, esta estructura corresponde al 80% del grano en peso y aporta el mayor porcentaje de proteínas al grano. La aleurona es una capa ubicada al interior del grano, constituida por células de pequeño tamaño, rica en proteínas (aproximadamente un 30% del grano) y exento de granos de almidón. El embrión es el encargado de controlar el proceso de germinación de la planta cuando se reúnen las condiciones requeridas para esta etapa durante el malteo de la cebada [8][12].

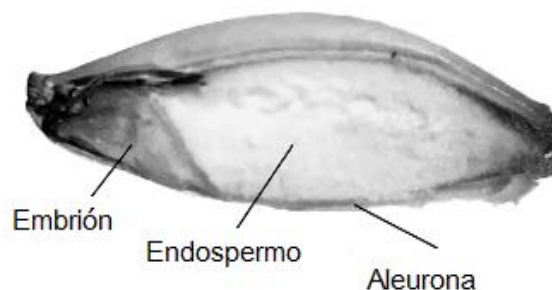


Figura 2-1: Corte transversal del grano de cebada [17]

En la Tabla 2-1 se muestra, en promedio, la composición de la cebada, con respecto a los hidratos de carbono, siendo el principal el polímero de almidón, que se encuentra ubicado en el endospermo y forma dos estructuras distintas, amilosa y amilopectina, el resto de los carbohidratos presentes se encuentra en las paredes del endospermo y corresponde principalmente a polímeros denominados holocelulosa y β -glucanos [12].

En cuanto a las proteínas, en promedio son el 10% de la masa del grano, el cual varía dependiendo del tipo de cebada. En la Tabla 2-2 se muestran los principales tipos de cebada que trabaja Maltexco y su contenido promedio de proteínas y FAN (*Free Amino Nitrogen*), este último es una medida de la concentración de aminoácidos individuales y péptidos pequeños (de una a tres unidades) presentes en la cebada resultante de la degradación de proteínas [18]. Al menos diez de las principales proteínas del grano tienen pesos moleculares en el intervalo de 5-149 [kDa] [17].

Tabla 2-1: Composición química másica promedio de la cebada [19]

Composición	[%]
Humedad	12,5
Proteínas	10,4
Hidratos de carbono totales	68,5
Lípidos	1,5
Fibra	4,5
Cenizas	2,6

Tabla 2-2: Principales variedades de cebada trabajadas en Maltexco y su contenido másico promedio de proteína y FAN

Variedad	Proteína [%]	FAN [mg/100 g]
Traveler	10,9	154,0
Andreiaa	9,4	151,3
Sebastian	11,2	139,7
Scarlet	10,7	149,1

Fuente: Control de calidad Maltexco [20]

A partir de diversos estudios se acepta que la cebada consta de tres grupos principales de proteínas, las que fueron clasificadas de acuerdo a su solubilidad (Osborne), como se muestra en la Tabla 2-3 [12]. Las albuminas y globulinas están presentes en menor proporción en el grano de cebada y ambas se encuentran en las células más externas del endospermo, aleurona y embrión [8]. La mayor parte posee actividad enzimática (amilasas, lipasas, proteasas) y tienen el mejor balance de aminoácidos esenciales, como la lisina [19]. Las hordeínas y glutelinas son la principal proteína de almacenamiento de la cebada y desde un punto de vista de nutrición humana, son pobres, ya que carecen de aminoácidos esenciales. Siendo estas últimas ricas en otros aminoácidos no esenciales, como la prolamina, glicina, ácido glutámico y aspártico.

Tabla 2-3: Clasificación simple basada en la solubilidad de las proteínas de la cebada [12] [8]

Proteína	Soluble en:	Representada en el grano de cebada como:	Distribución másica [%]
Albumina	Agua	Enzimas	12,1
Globulina	Disoluciones salinas diluidas	Enzimas	8,4
Hordeína	Etanol al 70%	Reserva	25,0
Glutelina	Disoluciones alcalinas diluidas	Estructural y reserva	54,5

Los cereales contienen todos los aminoácidos esenciales, pero presentan deficiencia en alguno de ellos, como en la lisina, metionina, treonina, isoleucina y fenilalanina. Caracterizándose por su riqueza en ácido glutámico, prolina y leucina. El contenido de aminoácidos en mayor proporción en el grano de cebada se presenta en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4: Contenido de aminoácidos importantes en los granos de cebada [% del total de aminoácidos][18]

Aminoácido	[%]
Lisina	3,0
Leucina	6,5
Isoleucina	3,5
Valina	5,0
Fenilalanina	5,0
Tirosina	3,0
Treonina	3,5
Metionina	2,5
Ácido glutámico	26,0
Prolina	14,5

2.2. La malta

La cebada malteada o malta corresponde al producto del proceso de malteo, que consiste en una germinación del grano detenido por deshidratación de este. El malteo tiene como objetivo comenzar la degradación de nutrientes, principalmente los almacenados en el endospermo, por acción de enzimas sintetizadas durante este proceso. Como resultado, los granos de malta poseen un bajo contenido de humedad, altas concentraciones de almidón y alto poder diastásico (capacidad enzimática del grano) [12].

Las maltas se agrupan en dos categorías según la forma en la que estas son secadas y usadas en la industria cervecera. Las maltas claras y de alto poder diastásico son denominadas maltas base, algunas de ellas son la Pilsen, Pale Ale y Munich. En cuanto a las maltas que tienen baja o nula actividad enzimática son denominadas maltas especiales y ejemplo de estas son las maltas tostadas y caramelo [9].

Debido a sus características y propiedades la malta tiene múltiples usos, como ser la principal materia prima para la elaboración de cervezas y extractos. En el caso de Maltexco, la malta utilizada para la elaboración de extractos es denominada malta 13, la que tiene aproximadamente un 13% de humedad.

2.3. Proceso de malteo

El proceso de elaboración de la malta consta de tres etapas principales: remojo, germinación y secado, como se muestra en el diagrama de bloque de la

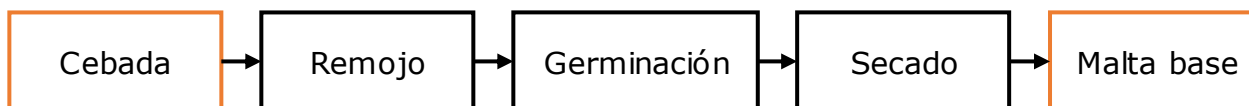


Figura 2-2.

Figura 2-2: Diagrama de bloques proceso de malteo [21]

Antes de iniciar el proceso de malteo, la cebada es limpiada y clasificada, con el objetivo de eliminar impurezas como ramas, granos dañados, hojas, etc. En el caso en que la cebada recepcionada tenga un exceso de humedad esta debe ser secada. La cebada limpia ingresa a la etapa de remojo y se detiene el proceso cuando la humedad alcanzada por los granos es de aproximadamente un 42-45%, ya que es probable que el grano haya comenzado a germinar [12]. Posteriormente la cebada es transferida a las piscinas de germinación.

Durante la etapa de germinación la humedad se mantiene en torno a un 40% y la temperatura alrededor de 15 °C, para que la germinación del grano sea homogénea. Si bien la etapa de crecimiento embrionario comienza en el remojo, la mayor degradación de las reservas de nutrientes es realizada en esta etapa, donde las proteínas sintetizadas en la aleurona digieren las paredes celulares que recubren los gránulos de almidón del endospermo. También se

consumen carbohidratos en procesos respiratorios y parte de los compuestos nitrogenados más simples se utilizan en la síntesis de las proteínas de las raicillas, las que al final del proceso son eliminadas, produciéndose un descenso de aproximadamente un 3% de sustancias nitrogenadas [12].

Un grano de cebada en germinación contiene una gran cantidad de proteasas, de las cuales al menos cinco son endopeptidasas (enzimas capaces de atacar cualquier enlace peptídico). Algunas de estas endopeptidasas tienen un grupo tiol en el centro activo de su molécula, que son inhibidas por las condiciones oxidantes, otras son metaloenzimas, cuyas actividades pueden verse muy inhibidas por quelación del metal que forma parte de su molécula. La cebada en germinación también contiene peptidasas que escinden aminoácidos o péptidos simples de las proteínas, las más importantes son las carboxipeptidasas, su nombre es debido a que atacan a la cadena en el grupo carboxílico libre [12].

El proceso de germinación de la cebada solo puede ser detenido retirando el agua contenida en el grano, por lo que estos deben ser sometidos a secado. Esta etapa final tiene como objetivo detener la desagregación del grano y conservar su actividad enzimática. La deshidratación prolongada y a bajas temperaturas del grano se obtiene una malta clara, en tanto que una deshidratación rápida y a temperaturas altas, maltas oscuras. En Maltexco el proceso de secado se realiza en hornos a través de la inyección de aire a una temperatura máxima de 80 °C y se disminuye la humedad hasta un 4% aproximadamente [12].

2.4. Extractos de malta

Los extractos de malta son una mezcla de azúcares naturales obtenida de la hidrólisis enzimática de la cebada malteada. La composición de los extractos es de 90-93% de carbohidratos, entre los que se destacan maltosa, glucosa y azúcares de cadena larga, mientras que un 3-7% corresponden a proteínas [3].

Debido a sus características de sabor, color y aroma, el extracto de malta se usa en la industria alimentaria con el fin de mejorar las propiedades organolépticas, valor nutricional, textura y vida útil de los productos. Se comercializa en dos presentaciones, líquido y polvo, de este último formato, existen dos tipos, diferenciándose en la granulometría. Además, existe el formato M100 y M60, los que corresponden a 100% malta, y 60% malta y 40% cebada no malteada, respectivamente. En la Figura 2-3 se muestran ambas presentaciones.



Figura 2-3: Extractos de malta en presentación líquida y polvo de MaltexcoFood [3]

2.5. Proceso extractos de malta

La planta de extractos se encuentra ubicada en la ciudad de Temuco, la que utiliza un sistema de producción en lotes, el que produce aproximadamente 4,8 toneladas por batch. El proceso de fabricación es el que se muestra en la Figura 2-4.

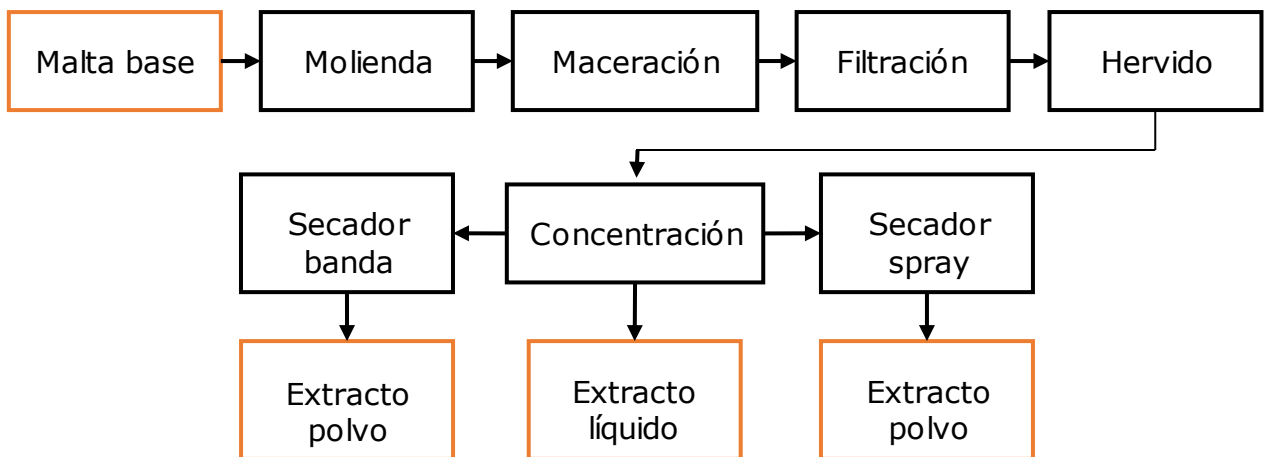


Figura 2-4: Diagrama de bloques del proceso de extractos [22]

La primera etapa es el molido de la malta, con el objetivo de extraer el contenido interno de esta y facilitar la acción de las enzimas sobre el sustrato. La cascarilla obtenida es clave en la etapa de filtración, pues es utilizada como lecho filtrante. Los molinos pueden ser de disco, martillo o rodillo, en el caso de Maltexco, se utiliza una molienda seca en un molino de martillo.

La siguiente etapa es la maceración, consiste en favorecer la acción de los complejos enzimáticos contenidos en la malta, para esto, se utiliza una proporción de grano y agua, acompañado de condiciones de temperatura favorable para los complejos enzimáticos. Un gran número de enzimas

activadas o sintetizadas durante el malteo actúan durante la maceración, sin embargo, las más relevantes son la α -amilasa y β -amilasa que son las que degradan el almidón encontrado en el endospermo y las β -glucanasas que degradan las paredes de los gránulos de almidón. Además de las enzimas propias del grano, durante esta etapa se le adiciona α -amilasa y β -glucanasa, para aumentar la hidrólisis del almidón, junto con cloruro de calcio para favorecer la acción enzimática. Estos serán los compuestos generados y posteriormente extraídos los que le brindarán las características organolépticas y funcionales al producto final.

Existen distintas técnicas de maceración [12], el más sencillo y utilizado en Maltexco, es el método de intervalos de temperaturas, donde se ajustan las condiciones de temperatura y tiempo necesarios para favorecer la acción de las principales enzimas del grano, como se muestra en la Figura 2-5.

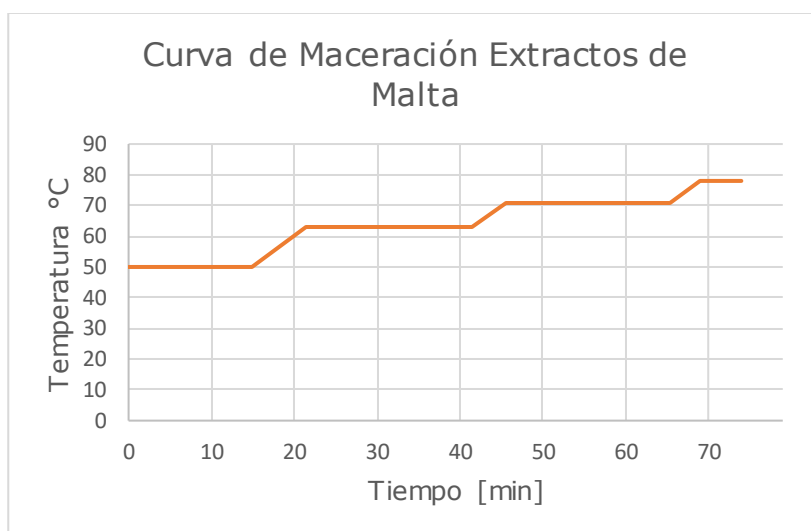


Figura 2-5: Curva de maceración planta de extractos de malta en Maltexco

En el primer escalón de la curva, es para favorecer la acción enzimática de las proteasas y activar la β -glucanasa, luego se aumenta la temperatura hasta 63 °C donde actúan las enzimas más importantes, la α y β -amilasa. Luego, se aumenta a 71 °C donde todavía permanece activa la α -amilasa y se maximiza la extracción de almidón por solubilización, para finalmente alcanzar los 78 °C durante 5 minutos y provocar la total inactividad enzimática. En el Anexo A se resumen las principales enzimas de la malta presentes en la maceración y su temperatura óptima.

El producto obtenido de la maceración se compone de un líquido denominado mosto, que es alto en azúcares, y de granos agotados de malta, conocido como bagazo. La separación entre el mosto y bagazo se realiza en

un filtro prensa, donde la cascarilla del grano forma la torta del filtro. Maltexco utiliza un filtro de prensa Meura, el cual contiene 76 placas y cada una está cubierta en un lado por una tela y posterior membrana. La filtración se realiza a una temperatura promedio de 78°C, siendo un parámetro operacional importante, ya que un aumento de esta equivale a un aumento de la rapidez de filtración, pero a mayor temperatura se extraen más lípidos y taninos de la cáscara, los cuales afectan el sabor del producto [4]. El mosto final fluctúa entre los 19 y 20 grados Brix¹.

El bagazo es el principal subproducto del proceso, el que es rico en proteínas y fibra. Aproximadamente un 70% de las proteínas de la malta son retenidas en el bagazo, mientras que 30% están presentes en el mosto [12]. Por lo que se obtiene un bagazo con una concentración proteica de aproximadamente 40 [mg de proteína/g de bagazo]. Este producto actualmente es vendido como pienso para animales sin ningún tratamiento posterior a la etapa de filtrado, a un valor de \$17 el kilogramos [23].

Terminada la operación de filtración, a la torta formada se le realiza un lavado y una posterior compresión con el fin de aprovechar el máximo producto que queda retenido en la torta. El mosto, luego pasa a una etapa de hervido a 98°C durante 15 minutos, con el objetivo de pasteurizar y esterilizar, para después ser concentrado mediante evaporadores que extrae el agua hasta que se alcance alguna de las siguientes condiciones: obtener la densidad requerida o hasta alcanzar los grados Brix necesario (75 a 80 ° Bx). En el caso en que el producto final sea en polvo, el mosto es ingresado a un equipo de secado, existiendo dos equipos para esto, el secador *spray* y el secador en banda, los que se diferencian prácticamente en la granulometría, siendo la del secado en banda la mayor.

El diagrama de flujos detallado del proceso en planta se puede observar en el Anexo A, donde se observa que existe una entrada adjunta de materia prima de cebada, la cual es molida y macerada de forma paralela al proceso a la producción principal, esto se utiliza debido a que se aumenta la cantidad de almidón y otras sustancias hidrolizables disponibles en el proceso de maceración.

¹ Los grados Brix (°Bx) son una medida de concentración utilizada en la industria cervecera que permiten medir los sólidos disueltos, los que son principalmente azúcares fermentables, dextrinas, entre otros.

2.6. Separación de proteínas

Se han desarrollado diferentes procedimientos para separar y purificar proteínas, ya que estas se presentan naturalmente como mezclas con otras biomoléculas. Para recuperarlas, primero es necesario separarlas de otros tipos de componentes y luego se continúa con una etapa adicional de fraccionamiento o purificación de estas, la que permite obtener una proteína en específico. Para recuperar eficientemente las fracciones de proteínas en mezclas de interés se han elaborado diferentes procesos. A continuación, se presentan alguno de los principales procesos desarrollados:

Centrifugación: es un método convencional para la recuperación primaria de proteínas y es adecuado para la producción a gran escala de partículas o microorganismos. Aunque es un proceso simple, el alto consumo de energía lo hace caro y menos interesante para producción actual a gran escala. Además el rendimiento del proceso muestra una reducción rápida con el decrecimiento del tamaño de partícula [14].

Precipitación: es una de las técnicas más utilizadas para la concentración de proteínas. Es una operación que permite la concentración de una solución mediante la adición de un "agente precipitante". Presenta ventajas como ser fácil de escalar, puede utilizarse de forma continua, y se dispone de muchos agentes precipitantes [14].

Floculación y coagulación: es un proceso donde los componentes de la fase líquida floculan y precipitan más fácilmente, utilizando diferentes tipos de coagulantes que existen, y que se pueden clasificar como inorgánicos, biofloculantes poliméricos y orgánicos. Esta técnica es ampliamente utilizada porque es menos costosa [14].

Sistema de dos fases acuosas (ATPS): estos sistemas están formados por dos fases inmiscibles originadas por la mezcla de dos polímeros o de un polímero y una sal en una solución con alto contenido de agua. Al incorporar proteínas en estos sistemas, estas moléculas mostrarán una preferencia por una u otra fase permitiendo, así su separación. Su uso en procesos de separación ha estado restringido a escala laboratorio y algunas de las razones son la plena comprensión del mecanismo que gobierna la formación de la fase y el comportamiento de la partición del soluto en los procesos ATPS y el costo de los polímeros de fase [24].

Operaciones de membranas (ultrafiltración): se ha establecido como un importante proceso de operación en la concentración de macromoléculas, en

particular en la industria alimentaria. Es una alternativa atractiva, ya que no hay control de temperatura o pH extremos involucrados, lo que hace al proceso más económico y no desnaturalizaría las proteínas [14].

Cromatografía de adsorción: es una técnica utilizada para la separación de proteínas presentes en una misma muestra. El método está basado en la circulación de una fase móvil (que arrastra a la mezcla de compuestos a separar), a través de una fase estacionaria. Dependiendo de la afinidad relativa que por ambas fases tengan los distintos compuestos presentes en la mezcla resultará su separación, el tipo de interacción entre la fase estacionaria y las proteínas dependerá las condiciones de operación del proceso [24].

2.7. Perfil proteico mosto

Aproximadamente un 70% del total de las proteínas de la malta son retenidas en el bagazo, por lo que, para aumentar la solubilidad de estas en agua, se realizó un estudio previo de tratamiento enzimático durante la maceración, en el cual se trabaja con diferentes enzimas, en diferentes concentraciones y temperatura [25].

Del estudio se obtuvo que el mayor grado de solubilización es utilizando la proteasa Prolyve® en polvo, la cual es una mezcla de una endo y exoproteasa, con condiciones óptima de pH 5-6 y temperatura de 50°C [25]. Así mismo, recomienda utilizar un 10% másico de enzima con respecto a la masa de proteínas, además de una modificación a la curva de maceración, obteniendo como óptima la que se muestra en la Figura 2-6. Esta nueva curva, con respecto a la original (Figura 2-5), aumenta el tiempo a una temperatura de 50°C, con el objetivo de que la proteasa alcance su óptimo. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la solubilidad de las proteínas a un 75% con respecto a la proteína inicial [25].

La hidrólisis proteica llevada a cabo por las enzimas modifica no solo el peso molecular de las proteínas, sino que también la carga y exposición de grupos hidrofóbicos y cadenas laterales de aminoácidos reactivos. Estos cambios a nivel molecular dan como resultado una solubilidad alterada, viscosidad, propiedades sensoriales y comportamiento emulsionante y espumante [26]. Además, se tiene que la medida en que las propiedades funcionales de una proteína pueden ser alteradas depende del grado en que la proteína ha sido hidrolizada y la enzima utilizada.

El tratamiento térmico para la elaboración del mosto es similar al de la fabricación de un mosto cervecero, el cual es ampliamente estudiado, ya que durante la maceración se forman los principales componentes que le dan las características a la cerveza. De la literatura se obtiene un estudio enzimático realizado a un mosto cervecero, donde se identifican las diferentes proteínas presentes en un mosto sin proteasa (control) y otros con diferentes tipos de enzimas, que será descrito a continuación [27].

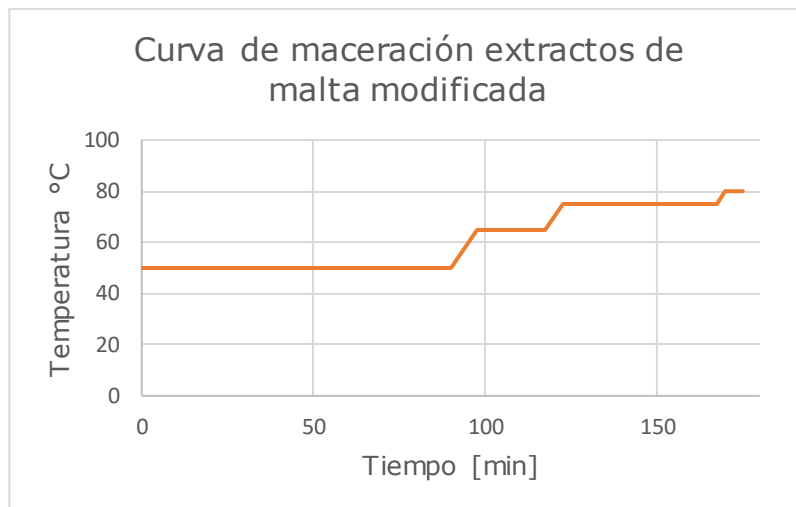


Figura 2-6: Curva de maceración modificada extractos de malta [25]

El mosto utilizado en el estudio se elabora con una relación másica de malta y agua de 1:4, respectivamente y son colocados en el baño de maceración, añadiendo enzima a una concentración de 50 mg de proteasa por cada kilogramo de malta en base seca, el perfil de maceración utilizado es el de la Figura 2-7.

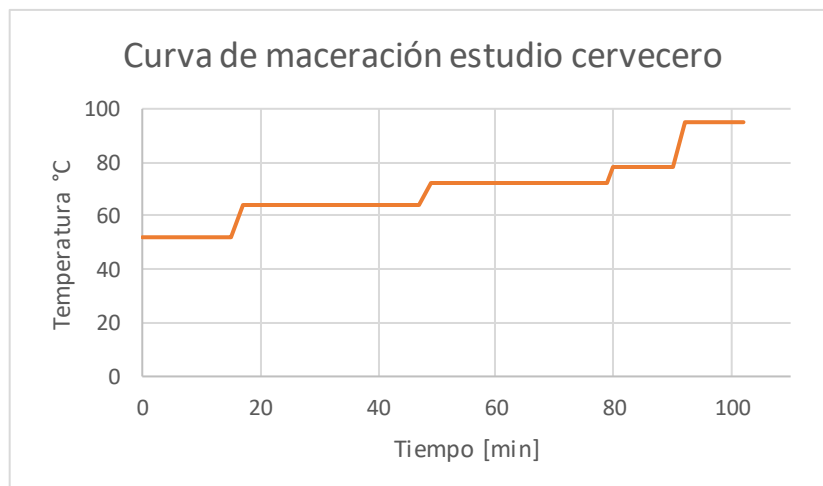


Figura 2-7: Curva de maceración utilizada en el estudio cervecero [27]

La Figura 2-8 es un análisis SDS-PAGE al mosto, donde se muestran resultados para una muestra sin adición de proteasas (C) y con diferentes proteasas (P1-P5) durante la maceración. Del análisis se tiene que las proteínas de bajo 20 [kDa] fueron degradadas cuando las proteasas fueron añadidas en la maceración, pero en un grado muy diferente, dependiendo de la proteasa. Posteriormente se identificaron las proteínas presentes mediante espectrometría de masas, las que se tienen en la Tabla 2-5, donde la banda entre 36,5 y 55,4 [kDa] fueron identificadas como proteína Z.

Algunas de estas proteínas están presentes en la cerveza y se encuentran relacionadas con la formación de espuma y color. Las proteínas más importantes implicadas en la formación de espuma son: la proteína de transferencia de lípidos (LTP1), la proteína Z y varios polipéptidos derivados de hordeína que varían en tamaño desde 10 a 30 [kDa] [28].

Tanto la LTP1 como la proteína Z son abundantes en la semilla de cebada, esta última describe una familia de Serpins (Serin Proteinase Inhibitors) de cebada, una proteína de tipo albúmina que se estima que constituye hasta el 2% de la proteína total de malta [29]. Ambas muestran homología de secuencia de aminoácidos con inhibidores de proteasa y esta puede ser la razón por la que no son degradadas por las proteasas durante los procesos de malteado y maceración, sobreviviendo al hervido del mosto [10].

Las proteínas solubles *Chloroform/metanol* (CM) se determina que están asociadas a la turbidez en la cerveza [29]. Algunas de estas como la inhibidor de α -amilasa/tripsina CMa y CMb, las que han sido identificadas en el precipitado durante el hervido [27].

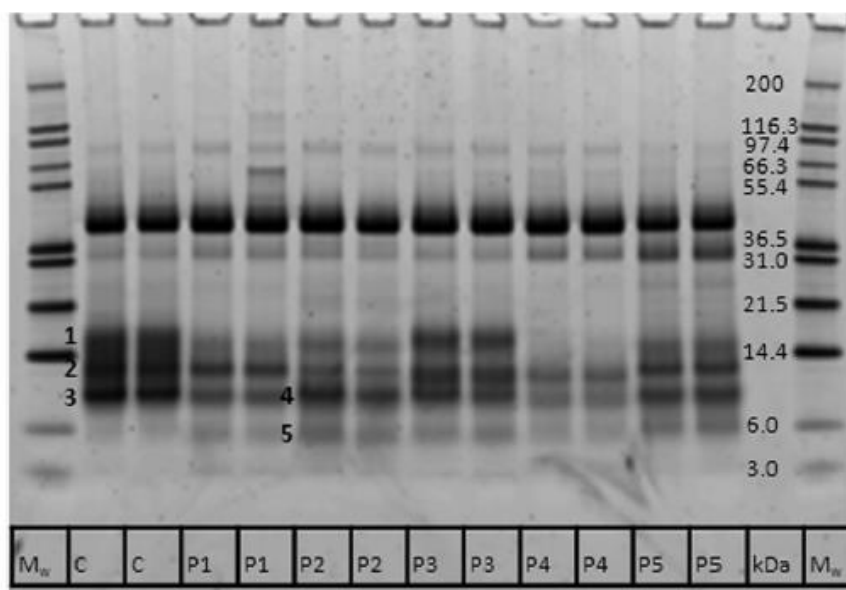


Figura 2-8: SDS-PAGE gel de las muestras de mosto. C denota al control y P1-P5 son muestras con adición de proteasas [27]

Tabla 2-5: Banda de proteínas identificadas desde SDS-PAGE gel [27]

Número de banda	Proteína identificada	Peso [kDa]
1	Inhibidor de tripsina CMe precursor	16,34
	CMd pre proteína (AA 14-146)	17,89
	Inhibidor de α -amilasa/tripsina CMb	17,19
	Inhibidor de α -amilasa/tripsina CMA	16,06
2	Inhibidor de α -amilasa/tripsina CMb	16,06
	Barwin	17,19
	Inhibidor de tripsina CMe precursor	16,34
3	Inhibidor de α -amilasa BDAI-1	17,04
	Inhibidor de α -amilasa/tripsina pUP38	12,41
4	Inhibidor de α -amilasa BDAI-1	17,04
	Proteína de transferencia de lípidos 1	10,14
5	Inhibidor de α -amilasa BDAI-1	17, 04

Finalmente, en la Tabla 2-6 se muestra la composición de aminoácidos del mosto, en la primera columna es la muestra control y en la otra con adición de proteasas, donde las concentraciones individuales de aminoácidos están dadas como porcentaje con respecto a la concentración total y el total de aminoácidos en $[\mu g/ml]$. En ambas, el ácido glutámico y aspártico tienen la mayor concentración, seguida por leucina, valina y alanina.

Tabla 2-6: Concentraciones de cantidades individuales y totales de aminoácidos para mosto y grano gastado producidos en la maceración [27]

Aminoácido	Muestra Control [$\mu\text{g/ml}$]	Muestra con proteasa [$\mu\text{g/ml}$]
Ácido aspártico	10,8	8,2
Ácido glutámico	22,2	24,9
Serina	4,8	4,7
Glicina	5,7	4,9
Histidina	3,4	3,2
Arginina	6,2	6,5
Treonina	4,8	4,6
Alanina	6,6	5,6
Tirosina	4,2	4,5
Valina	7,2	7,2
Isoleucina	4,5	4,9
Leucina	8,1	9,2
Fenilalanina	6,0	7,1
Lisina	5,6	4,5
Total [$\mu\text{g/ml}$]	3748 \pm1	6400\pm200

2.8. Recuperación de proteínas de la malta

Tal como se menciona en la sección anterior, existen diferentes procesos para separar proteínas de una mezcla con otros componentes, en el caso de este trabajo, el objetivo es separar las proteínas principalmente de azúcares (componente de interés del extracto), mediante una técnica que sea escalable industrialmente y económicamente rentable. Específicamente para proteínas provenientes de la malta o cebada, se presentan a continuación dos patentes encontradas en la bibliografía:

En la patente norteamericana US3846397A [30] se describe la recuperación de proteínas del grano gastado o bagazo de malta. Consiste en calentar el bagazo en una solución alcalina para solubilizar las proteínas, solución que posteriormente se separa de los residuos de grano no solubilizados. Luego la solución que contiene la proteína se acidifica para precipitar la proteína soluble.

Esto requiere un gran volumen de material cáustico, puede ser costoso y, además, no todas las proteínas se recuperan el uso de este proceso, ya que sólo las proteínas con pH isoeléctrico inferior a pH neutro precipitarán, mientras que por encima de pH neutro todavía permanecerán en solución.

En la patente WO2016001683A1 [31] se describe la recuperación de proteínas del *Pot Ale*, subproducto líquido de la destilación en el proceso de fabricación del whisky, que tiene un alto contenido de proteína, principalmente del grano de malta, y en menor medida de la levadura de la fermentación. La operación es llevada a cabo en dos procesos, el primero es una centrifugación del *Pot Ale*, para posteriormente introducirlo en una columna de cromatografía de intercambio iónico, utilizando una resina de bajo costo, como la zeolita.

De la información antes mencionada, se tiene que la recuperación de proteínas utilizando la técnica descrita en WO2016001683A1 presenta ventajas por sobre otros procesos, como ser de bajo costo, y ser escalable a nivel industrial, este último es importante al considerar el volumen de producción de la planta de extractos.

2.9. Adsorción

La adsorción es un fenómeno de superficie reversible, donde un soluto (proteína) se concentra en la superficie de un sólido (matriz) por acción de fuerzas intermoleculares entre el soluto y el sólido [24]. Algunos de los tipos de adsorción se muestran en Figura 2-9. Cada uno de estos tipos de operaciones utilizadas en la purificación de proteínas se relaciona con una propiedad fisicoquímica o bioquímica de estas biomoléculas. Por ejemplo, para una de intercambio iónico (IEC), es la carga de las proteínas a diferentes pH y para una de afinidad (AC) es la afinidad biológica con la resina [32].

Una operación típica de adsorción consta de las siguientes etapas [24]:

1. Etapa de **adsorción** o de contacto en la que el soluto se une a la resina de adsorción.
2. Etapa de **lavado** para eliminar el material residual que no se ha adsorbido
3. La etapa de **desorción** o **elución** de adsorbato con un disolvente adecuado, teniendo en cuenta que este debe ser capaz de vencer las fuerzas que mantiene unido a la resina y al adsorbato.
4. Etapa de **regeneración** de la resina, para retomarla a su condición original.

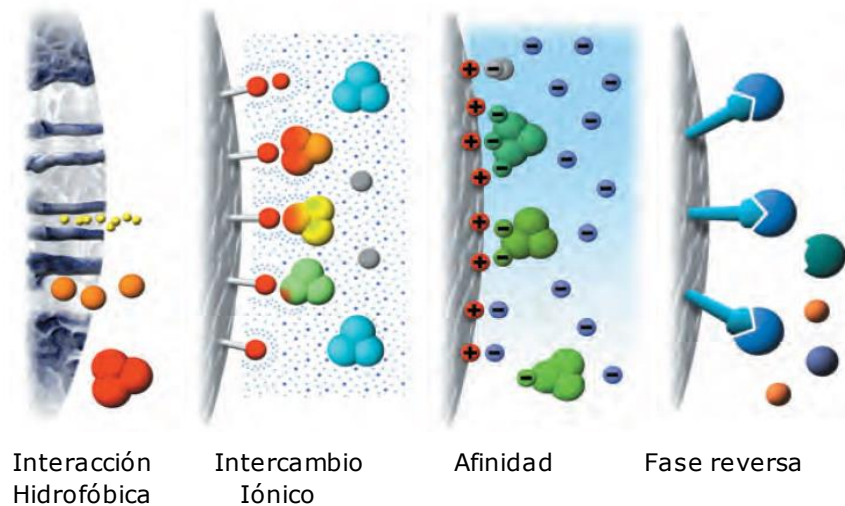


Figura 2-9: Principios de separación en cromatografía [32]

Se han estudiado las relaciones de equilibrio para la adsorción y se tiene que un adsorbato y un adsorbente se encuentran en equilibrio cuando existe una determinada distribución de soluto entre las fases sólido y fluido y no puede ocurrir una adsorción neta superior. Estos datos de equilibrio se denominan isotermas de adsorción, existen varios tipos como la de Langmuir y la isoterma de Freundlich, entre otras [24].

Se han desarrollado diferentes tipos de equipos para las operaciones de adsorción, entre los que se incluyen reactores de lecho fijo, lecho móvil, lecho fluidizado y tanques agitados. De todos ellos, los más utilizados son los adsorbentes de lecho fijo, debido a su mayor área de adsorción por unidad de volumen [24]. Un adsorbente de lecho fijo es una columna o tubo vertical relleno con partículas de adsorbente. En estos, el líquido que contiene el soluto se hace pasar a través del lecho y la cantidad de proteína retenida en la columna aumenta con el tiempo.

En la Figura 2-10 se muestra la operación de un adsorbente de lecho fijo con flujo descendente, al principio, la resina situada en la parte superior adsorbe rápidamente el soluto y la solución pasa a través de la columna libre de soluto, conforme continua el flujo de solución, la zona de adsorción va descendiendo, ya que la resina de la parte superior se va saturando. Por último, la parte inferior de la zona de adsorción alcanza el fondo del lecho, la resina está casi saturada y la cantidad de soluto en el efluente comienza a aumentar de manera apreciable, este punto se le denomina punto de ruptura.

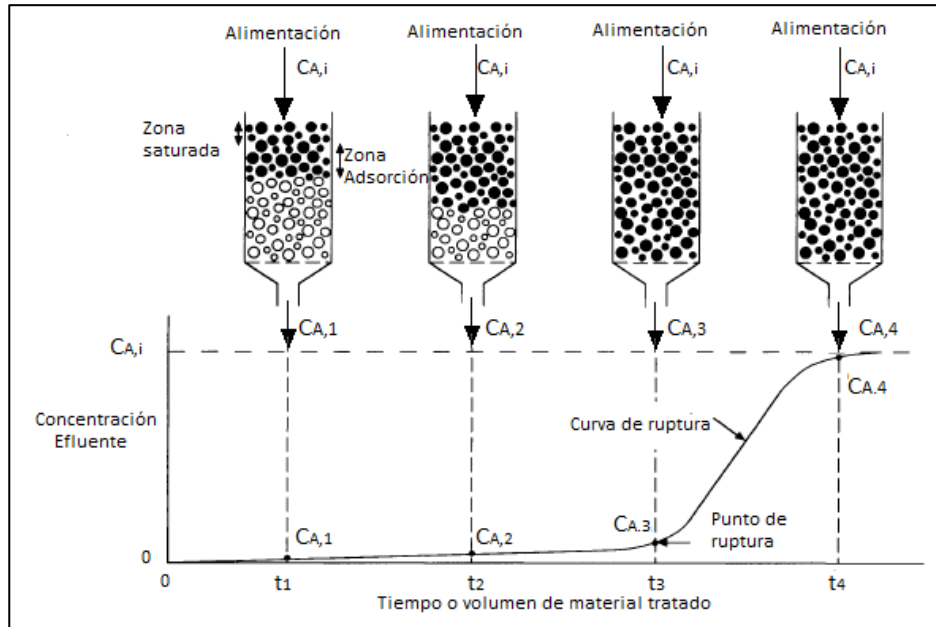


Figura 2-10: Movimiento de la zona de adsorción y desarrollo de la curva de ruptura para un adsorbente de lecho fijo ($C_{A,i}$: concentración inicial de soluto y $C_{A,j}$, con $j: 1, 2, 3$ y 4 concentraciones de soluto en el flujo de salida) [24].

La forma de la curva de ruptura influye fuertemente en el diseño y operación de los adsorbentes de lecho fijo. En la Figura 2-111 se muestra la porción de la curva de ruptura cuando el soluto aparece en el efluente, se tiene que la cantidad de soluto perdido en el efluente viene dada por el área bajo la curva de ruptura, por lo que si se opera hasta que se alcance el equilibrio, se pierde una gran cantidad de adsorbente. En el caso contrario, en que se opera la columna una menor cantidad de tiempo antes de alcanzar la saturación, se desaprovecha una parte de la capacidad del lecho, que está representada por el área sombreada sobre la curva de ruptura.

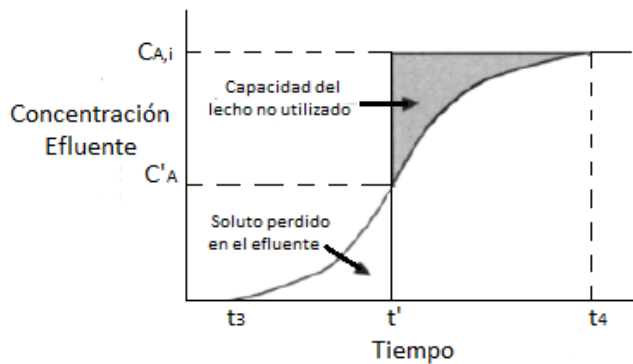


Figura 2-11: Relación entre la curva de ruptura, la pérdida de soluto en el efluente y la capacidad de columna sin utilizar ($C_{A,i}$: concentración inicial de soluto y C'_A : concentración en el efluente en el punto de ruptura) [24]

2.10. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía es un método para separar y aislar componentes de una mezcla. La base de esta técnica es la migración diferencial, es decir, el retardo selectivo de las moléculas de soluto durante su paso a través del lecho de partículas de la resina. Un tipo de cromatografía es la de adsorción, en la que los principios descritos son aplicables a esta operación.

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) es de adsorción y se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos cargados del adsorbente. La IEC se subdivide en cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico, serán retenidas en la columna las proteínas que tengan una carga complementaria a la de la matriz [32]. Los solutos son eluidos cambiando el pH o la fuerza iónica de la fase líquida, siendo los gradientes salinos el método más utilizado para eluir las proteínas.

La carga neta de las proteínas varía con el pH y cada proteína tiene su propia relación carga/pH, lo que se denomina curva de titulación de la proteína. El punto isoeléctrico (pI) es el pH al cual una proteína presenta carga neta igual a cero, es una propiedad de cada molécula y depende de su estructura química (grupos ionizables que posea). En la Figura 2-12 se ilustran varias curvas teóricas de titulación de proteínas, se tiene que para un pH menor al pI de la proteína, esta tendrá carga positiva, mientras que sobre el pI presenta carga negativa.

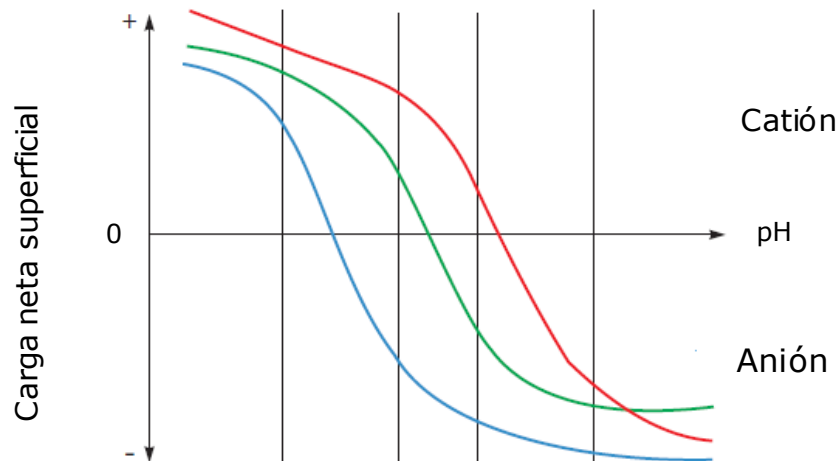


Figura 2-12: Ejemplo de curvas de titulación de proteínas [32]

Por lo tanto, será de interés conocer los puntos isoeléctricos de las proteínas presentes en el mosto, ya que así se podrá conocer la carga de estas cuando se cambie el pH de la solución en la que se encuentran para optimizar la cantidad de proteínas adsorbidas por la resina a utilizar. Así, de las proteínas de la Tabla 2-5, se busca sus puntos isoeléctricos, los que se muestran en la Tabla 2-7.

Tabla 2-7: pI proteínas presentes en el mosto

Proteína identificada	pI teórico	Referencia valor pI
Inhibidor de tripsina CMe precursor	7,5	[33]
CMd pre proteína (AA 14-146)	4,9	[34]
Inhibidor de α -amilasa/tripsina CMb	5,8	[33]
Inhibidor de α -amilasa/tripsina CMA	5,9	[33]
Proteína de transferencia de lípidos 1	6,9	[34]
Barwin	7,8	[33]
Inhibidor de α -amilasa BDAI-1	5,4	[33]
Inhibidor de α -amilasa/tripsina pUP38	5,4	[33]
Proteína Z	5,7	[33]

Arriba se describieron las etapas de un proceso de adsorción en forma general, a continuación, se describe la metodología para un proceso de cromatografía de intercambio iónico.

Equilibrio: corresponde al equilibrio de la fase estacionaria hasta alcanzar las condiciones deseadas, esta etapa es importante cuando la resina se encuentra a condiciones de pH diferentes al de adsorción, lo que ocurre con las resinas comerciales, que por lo general están en un medio acuoso.

Aplicación muestra y lavado: la muestra es usualmente bombeada a través de la columna, la duración del periodo de caga dependerá de las condiciones requeridas, por lo general se utiliza un criterio de pérdida de resina o soluto de interés. El lavado es para que todo el material no unido en la carga de la columna se elimine del sistema, por lo general se utiliza un buffer con el mismo pH que el de la solución.

Elución: durante esta etapa las proteínas son retiradas de la columna. Típicamente se utilizan cambios de pH o gradientes de sal. Siendo el de sal el más utilizado, en específico el cloruro de sodio.

Regeneración: esta etapa final es para remover todas las moléculas aún unidas. Esto además asegura que la capacidad total de la fase estacionaria

esté disponible para la siguiente ejecución de la columna, por lo que se utiliza un buffer con mismo pH de adsorción.

Como las proteínas presentes en una solución tendrán diferentes magnitudes de carga, la cromatografía permite que estas se puedan separar de acuerdo a su velocidad de elución. Una forma de visualizar esto es a través cromatogramas, como se muestra en la Figura 2-133. A medida que la solución de elución sale de la columna, diferentes muestras pasan por un detector, típicamente de conductividad o absorción de luz UV/Visible, que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto, generalmente cada compuesto separado se visualiza como un *peak*.

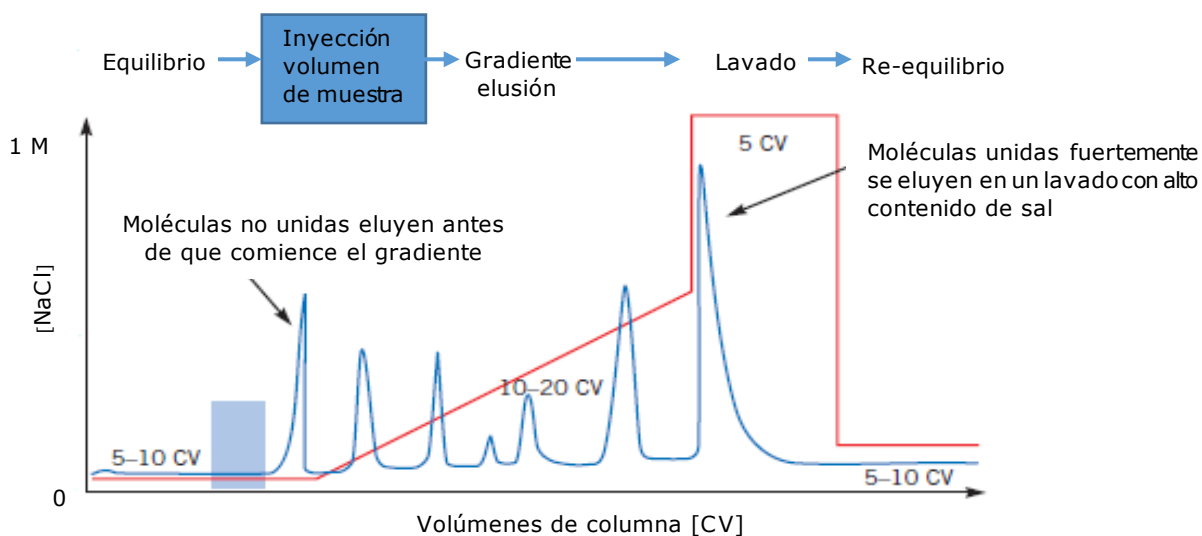


Figura 2-13: Cromatogramas proceso de cromatografía de intercambio iónico usando elución un gradiente de sal (línea roja: concentración de sal y azul la señal medida) [32]

2.11. Escalamiento columnas

El escalamiento de columnas que sean capaces de procesar grandes volúmenes de muestra se realiza a partir de un estudio y optimización a baja escala, para luego utilizar la pauta que se muestra en la Tabla 2-8. Todos los tipos de cromatografía de adsorción se escalan de forma similar, en la Figura 2-14 y Figura 2-155 se muestran columnas utilizadas a escala laboratorio e industrial, respectivamente, para estudiar este tipo de procesos.

Tabla 2-8: Pauta para el escalamiento de columnas de cromatografía [32]

Mantener	Incrementar
Altura del lecho	Volumen de la columna (diámetro columna)
Flujo lineal (cm/h)	Flujo volumétrico (ml/min)
Concentración de la muestra	Carga de la muestra
Volúmenes de gradiente de elución	



Figura 2-14: Sistema de cromatografía ÄKTA pure de la empresa GE Healthcare [35]



Figura 2-15: Columna de cromatografía modelo AxiChrom de la empresa GE Healthcare [35]

2.12. Resinas de intercambio iónico

Uno de los principales aspectos a considerar para el diseño de una columna de cromatografía es la naturaleza y características de la fase estacionaria. Los materiales adsorbentes y de intercambio iónico permitidos para uso alimentario, están regulados por diferentes entidades, como *Food and Drug Administration* de Estados Unidos (FDA). Dentro de los materiales se encuentran: carbón activado, zeolitas, geles de sílice y resinas sintéticas, teniendo diferentes usos, como separación de biomoléculas y remoción de metales [36].

Las resinas en específico utilizadas para la adsorción de proteínas son en su mayor parte materiales orgánicos tales como celulosa, agarosa y sefarosa, que no sólo son costosos comparados con materiales de zeolita, sino que también pueden deteriorarse rápidamente, por ejemplo, bajo alta presión, a alta temperatura y a alto o bajo pH, por lo que para ser utilizados a escala industrial presentan grandes desventajas [36]. Un ejemplo de los precios, se tiene que un kilogramo de zeolita tiene un valor de 10.000 [CLP] (Zeolita del Maule, [37]), mientras que por ejemplo CM Sephadex C-50, resina sintética, 680.000 [CLP] los 100 [g] (Sigma Aldrich, [38]), sin embargo, hay que considerar la capacidades de estas resinas.

Los compuestos de sílice no son costosos y son extremadamente resistentes. Algunos compuestos inorgánicos adsorben los biopolímeros sobre sus superficies y pueden ser adecuados como nuevos materiales portadores cromatográficos para proteínas, ácidos nucleicos y sus conjugados [36].

En la patente antes mencionada se presentan resultados específicos de recuperación de proteínas utilizando materiales como zeolitas y tierra diatomeas a escala laboratorio, las que se caracterizan por tener un alto contenido de óxido de sílice. Los resultados obtenidos muestran altos porcentaje de adsorción y recuperación de las proteínas presentes en la solución de *Pot Ale*, cercano al 90% [10].

Para que el proceso de recuperación de proteínas con fines alimenticios pueda ser aplicado a escala industrial, es necesario utilizar materiales adsorbentes de bajo costo, que puedan ser regeneradas durante varios ciclos, y que en lo posible puedan soportar temperaturas de hasta 80°C. Los mecanismos de adsorción/desorción de proteínas en superficies como zeolita es un complejo controlado por diferentes factores, como las propiedades superficiales del adsorbente, la estabilidad estructural de las proteínas, la fuerza iónica y el pH de los experimentos de adsorción/desorción [39].

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos microporosos cuyas estructuras están formadas por millones de pequeños poros y canales que permiten el movimiento de iones y moléculas. Estas pueden cambiar sus propiedades de superficie con las proporciones de SiO_2/AlO_3 , por ejemplo, razones más bajas generan mayor capacidad de intercambio de iones, y más altos mayores grados de hidrofobicidad [39].

El trabajo de Sakaguchi, 2005 citado en [39], concluye que hay tres principios fisicoquímicos que definen la adsorción, que en la Figura 2-16 se representa:

- (1) Por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la proteína, predomina la adsorción por atracción electrostática.
- (2) En el pI, están involucradas interacciones hidrofóbicas con la estructura mesoporosa tridimensional.
- (3) Por sobre el pI es la suma de repulsión electrostática, la atracción hidrofóbica y la reacción de sustitución del agua sobre el Al con un grupo amino de la proteína.

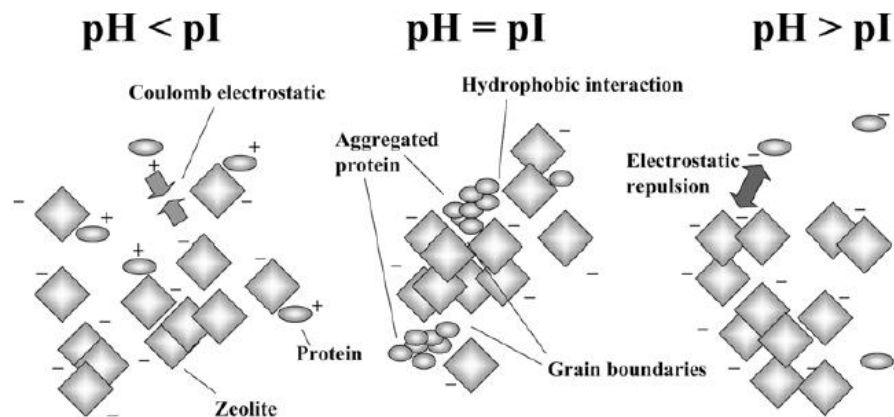


Figura 2-16: Interacción zeolita-proteína bajo diferentes condiciones de pH [39]

2.13. Concentrados proteicos para salmones

La harina o aceite de pescado es la principal fuente de proteínas dietéticas de los peces carnívoros en la acuicultura. Como resultado del incremento de su demanda, ser un recurso limitado y un incremento en su precio, es necesario evaluar fuentes alternativas. Numerosos productos ya han sido probados como posibles reemplazos de la harina de pescado en alimentos acuícolas, incluido subproductos animales y de origen vegetal [11] [40].

Una de los más estudiados son los concentrados de proteína de soja, esto se debe a que es similar en la composición nutricional, tienen un perfil de aminoácidos comparativamente equilibrados y tiene un precio razonable comparado con la harina o aceite de pescado. Sin embargo, tiene un bajo contenido de metionina y contiene algunos compuestos anti nutricionales como inhibidores de proteasas, ácido fítico y saponinas, que pueden tener efectos perjudiciales en la nutrición y crecimiento de los salmones [40]. Otro concentrado estudiado son los de cebada, los que son productos relativamente nuevos, con producción a escala piloto y que algunas investigaciones sugieren que el costo de su producción será menor que el de soja, teniendo ambos un contenido de proteína similar [11].

En la Tabla 2-9 se presenta la composición de tres ingredientes elaborados de diferentes fuentes proteicas, donde se muestra que la composición del concentrado de cebada, tiene una menor concentración de proteína cruda y de aminoácidos individuales comparado con el de soja y de pescado, por esto debe ser utilizado para reemplazar parcialmente uno de estos en la dieta [11].

Tabla 2-9: Composición analizada de diferentes ingredientes de prueba para estudio de alimentación a salmones [40]

100 g kg ⁻¹	Concentrado de soja	Concentrado de cebada	Concentrado de pescado
Materia seca	95,19	94,01	100,0
Proteína cruda	69,30	53,10	70,10
Grasa cruda	0,53	0,53	8,01
Arginina	5,50	3,12	4,20
Histidina	1,95	1,11	1,80
Isoleucina	3,54	1,77	2,80
Leucina	5,52	3,47	4,60
Lisina	4,68	1,88	4,81
Metionina	1,01	0,84	2,00
Treonina	3,04	1,77	2,82
Valina	3,77	2,50	3,42

3. METODOLOGÍA

3.1. Metodología general

La metodología general seguida durante el trabajo en Maltexco se muestra en la Figura 3-1. Primero se realizó una búsqueda bibliográfica de diferentes técnicas y procesos para separar proteínas, utilizado tanto a escala industrial como laboratorio. También se estudió de forma paralela el proceso de fabricación de extractos de malta, para determinar las ventajas y desventajas de cada una.

Una vez determinada la alternativa a estudiar, se procede a estudiar su factibilidad a escala laboratorio, para ello se trabaja en los laboratorios de desarrollo y de calidad en Maltexco Talagante. De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la separación de las proteínas del resto del producto, se procede a caracterizar, tanto al concentrado proteico como al mosto. Finalmente se realiza el escalamiento a nivel industrial y propuesta final. En las secciones siguientes se presenta la metodología específica llevada a cabo para el cumplimiento de los objetivos propuestos.

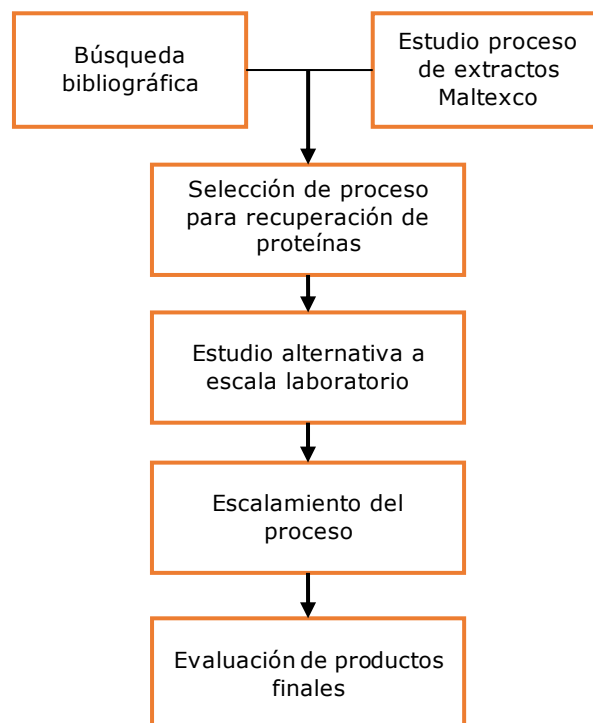


Figura 3-1: Esquema metodología general trabajo

3.2. Búsqueda bibliográfica

Se comenzó con una búsqueda bibliográfica que consistió en relacionar las técnicas de separación de proteínas con el proceso de fabricación de extractos de malta de Maltexco. Para ello se consultó diferentes libros de bioprocesos y patentes comerciales para proteínas en general y de cebada. Posterior a eso se evaluó sus ventajas y desventajas para seleccionar una o más a estudiar a escala laboratorio y posterior escalamiento. Para la selección de la técnica, se utilizan criterios de inversión y operación, capacidad de escalamiento y que tanto, el proceso como producto principal no se vean modificados en cierto rango.

3.3. Medición concentración de proteínas

Para este trabajo se utilizarán los métodos de Bradford [41] y Kjendahl [42] para medir la concentración de proteínas. A continuación, se detallan ambas metodologías.

3.3.1. Método de Bradford

El método de Bradford se basa en la propiedad del colorante Coomassie® azul brillante G-250 de unirse a proteínas, desplazándose su máximo de absorción a 595 [nm]. La absorción de la solución a esta longitud sirve como magnitud de medición para la concentración de proteínas [41]. Para las mediciones se utiliza una solución reactiva lista para su uso (Merck), la que contiene el colorante y otros compuestos como etanol, ácido fosfórico y agua destilada.

Para la cuantificación de las proteínas, primero se realiza una curva de calibración de absorbancia a 595 [nm] versus concentración de proteínas, utilizando una proteína estándar y de concentración conocida, en este caso se utiliza albúmina de suero bovino (BSA, 0,5 [mg/ml], Winkler). Con esta curva de calibración, se puede interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia.

Para las mediciones se utiliza el espectrofotómetro Lambda 25 de la empresa Perkin Elmer, el que, para cada medición realizada, es encendido con anticipación con la finalidad de no tener ruido en las mediciones. Por lo que se enciende 2 horas antes de su uso, de acuerdo con lo sugerido por los analistas del laboratorio. En la Tabla B- se detalla la proteína y agente de dilución (agua destilada), para cada muestra se utilizan 3 [ml] de reactivo de Bradford y cada

una fue realizada en triplicado. Las muestras son agitadas durante 10 segundos en el agitador vortex y se deja que reaccione durante 2 minutos a temperatura ambiente.

En la Figura 3-2 se tiene la curva elaborada para la medición de proteínas utilizando el método de Bradford, además en la Tabla B- se tiene el valor promedio y desviación estándar de cada punto de curva, los cuales fueron en triplicado. Esta curva es utilizada para todas las mediciones que se presentaran en las siguientes secciones.

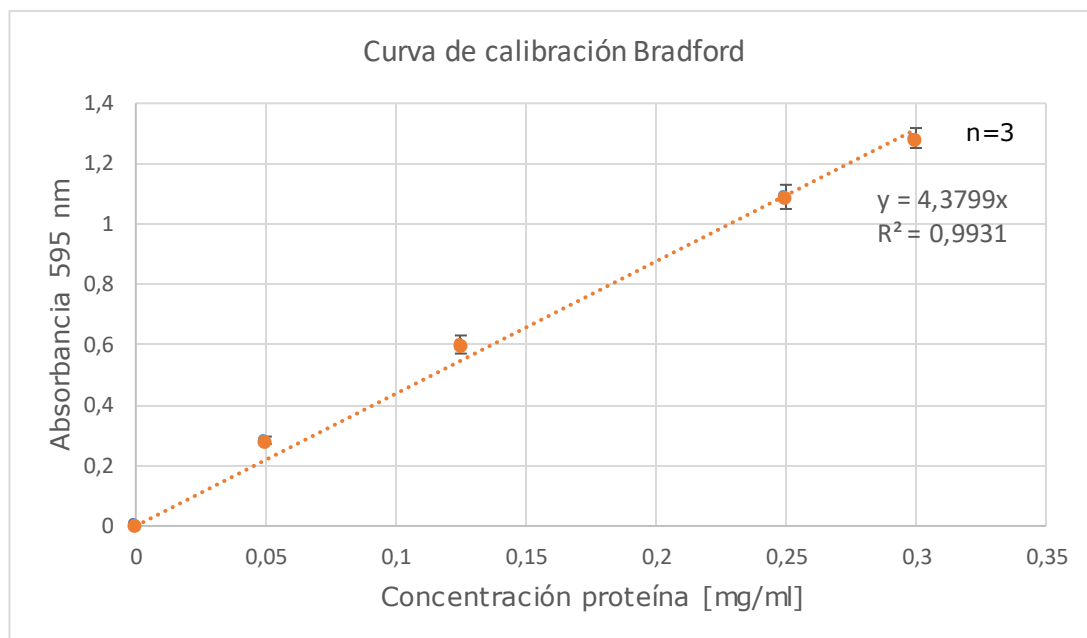


Figura 3-2: Curva de calibración método de Bradford

De la

Figura 3-2 se tiene que la concentración de proteínas en $[g/l]$ se obtiene utilizando la Ecuación 1:

$$C \left[\frac{g}{l} \right] = 0,2283 \cdot A_{595} \quad \text{Ecuación 1}$$

Para las mediciones de proteínas del mosto, se utilizan 300 $[\mu l]$ de este y se le añaden 3 $[ml]$ del reactivo de Bradford. Si la concentración es muy alta (queda fuera del rango del estándar), se toma una alícuota menor para la determinación y se completan los 300 $[\mu l]$ con agua destilada, luego se aplica el factor de dilución.

3.3.2. Método de Kjeldahl

Otro método para medir la concentración de proteínas es el método de Kjeldahl, el cual es estándar para la determinación del contenido proteico en grano, harinas, carnes, y en general, en alimentos [42]. Se caracteriza por el uso de ebullición y utilizar ácido sulfúrico concentrado para realizar la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción de nitrógeno orgánico a amoníaco, este último es determinado por destilación alcalina y titulación, el cual será igual al contenido de nitrógeno de la muestra [42]. El contenido en proteína se puede calcular seguidamente, a través de un factor entre la proteína y el nitrógeno para el alimento específico. El factor 6,25 se aplica en forma generalizada, pero se ha encontrado que en específico para la cebada se utiliza 5,83 [43] .

El método puede ser dividido en cuatro etapas, como se muestra en la Figura 3-3. En esta técnica se utilizan 20 [ml] de una muestra, la cual es concentrada por evaporación, luego se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos de los alimentos en una mezcla con ácido sulfúrico (H_2SO_4) y presencia de un catalizador. Posterior a la digestión y enfriamiento de la muestra, se neutraliza con una base, se utilizó hidróxido de sodio, y esta se pone a destilar. El destilado se recoge en una solución H_2SO_4 y se titula para determinar el contenido de nitrógeno. Las mediciones son realizadas en el equipo Kjeldahl de la empresa Gerhardt montado en el laboratorio de calidad (Figura 3-4). En el Anexo C: Método de Kjeldahl se detalla la metodología y reactivos utilizados.

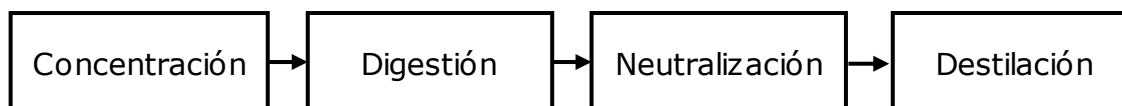


Figura 3-3: Etapas método de Kjeldahl

La concentración de proteínas se calcula como se muestra en la ecuación 2:

$$C \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{n_N \cdot 14 \cdot 5,83}{V} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde,

n_N : moles de nitrógeno [mol]

V : volumen de muestra mosto [L]



Figura 3-4: Equipo Kjeldahl, empresa Gerhardt

3.4. Elaboración mosto de prueba

Para realizar todos los ensayos se utiliza un mosto elaborado con la misma metodología que se detalla a continuación, la cual replica el proceso a escala industrial y considera los resultados obtenidos en el estudio del tratamiento con proteasas durante la maceración [25].

Para el proceso se utilizan 200 [g] de malta de variedad Traveler, los que son molidos en el equipo Thermomix Vorwerk (Figura 3-5) con agitación 7 durante 47 segundos. La malta molida es mezclada con agua, 440 [g] de agua a 50 °C, se utiliza agua de pozo de la planta Talagante para evitar agregar cloruro de calcio al proceso, en el Anexo D: Caracterización agua de pozo planta Maltexco Talagante se encuentra la caracterización del agua utilizada. La mezcla es agitada durante 2 minutos con agitación 2,5 para homogenizarla.

Posteriormente, a la mezcla son adicionadas las enzimas α -amilasa (Veco S.A.) y β -glucanasa (Veco S.A.) en proporciones industriales, lo que para los 200 [g] de malta corresponde a 403 y 201 [μ l] respectivamente. En el caso de la proteasa, la dosis recomendada de Prolyve NP[®] (Lyven)

concentrada, es un 10% con respecto a la masa de sustrato, por lo que se añaden 2 [g].

Se realiza la curva de maceración modificada (Figura 2-6) en el equipo *Thermomix Vorwerk* (Figura 3-5), utilizando durante toda esta etapa agitación 1. El producto obtenido es filtrado utilizando un embudo Buchner con filtro de mismo mallado que el filtro prensa industrial, en un matraz kitasato (Figura 3-6) y una bomba de vacío, modelo BOECO R-300. Los primeros 100 [ml] de filtrado son recirculados y son pasados a través del filtro sin ayuda filtrante, para que se forme un lecho homogéneo, ya que contienen una alta concentración de sólidos. Para la etapa final de lavado, la torta formada en la etapa anterior es lavada dos veces con 200 [g] de agua a 80°C. Durante esta etapa hay que ser cuidadoso con la presión aplicada a la torta, ya que se pueden arrastrar partículas sólidas, las que pueden interferir en la adsorción de las proteínas.

El mosto generado es almacenado a temperatura $\pm 3^{\circ}\text{C}$ en el refrigerador del laboratorio de desarrollo para evitar que se deteriore.



Figura 3-5: Equipo Thermomix Vorwerk utilizado para la molienda y maceración

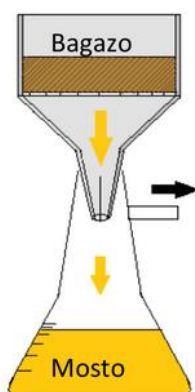


Figura 3-6: Montaje filtración y lavado del macerado [25]

3.5. Experimentos de adsorción

A continuación, se detalla la metodología realizada para la adsorción de proteínas del mosto, para esta primera etapa se realizan solo experimentos en batch. En general todos los experimentos de adsorción siguen la misma metodología.

Se mezclan 1,5 [g] de zeolita de granulometría 0,173 [mm] con 25 [ml] de mosto en un vaso precipitado de 50 [ml], los cuales son puestos en un agitador magnético modelo SCIOLOGEX MS-H-S a 400 [rpm], durante 30 minutos, esperando que llegue al equilibrio. Posteriormente la mezcla se vierte en un tubo Falcón de 50 [ml] para ser centrifugado durante 3 minutos a 4000 [rpm], utilizando la centrifuga Universal 17 (Figura 3-7), esto se debe realizar con precaución para no perder adsorbente. Una vez centrifugada, se mide la concentración de proteína al sobrenadante obtenido utilizando el método de Bradford. El porcentaje de proteína adsorbida se calcula utilizando la Ecuación 3.

$$\% \text{ Proteína}_{\text{adsorbida}} = \left(\frac{c_0 - c}{c_0} \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde c_0 : Concentración proteína inicial $\left[\frac{mg}{ml} \right]$

c : Concentración proteína en el sobrenadante $\left[\frac{mg}{ml} \right]$



Figura 3-7: Centrifuga Universal 17, Hettich

A continuación, se detallan otros experimentos de adsorción realizados, los que presentan algunas variaciones de la metodología anterior y que permiten estudiar otras variables del proceso de adsorción de las proteínas.

3.5.1. Cinética de adsorción

Se realiza una mezcla de zeolita de granulometría 0,173 [mm] y mosto utilizando diferentes tiempos de mezclado entre ambas fases, usando la misma relación de mosto y zeolita definida anteriormente. Los tiempos de mezclados son: 5, 10, 20, 30, 60 y 90 [min], realizándose las mediciones en duplicado. Se mide el porcentaje de proteína adsorbida con Bradford, obteniendo un gráfico de porcentaje de proteína adsorbida en función del tiempo.

Los experimentos anteriores utilizan zeolita fresca, sin embargo, en la patente estudiada ([31]) se realiza un pretratamiento de la resina con el objetivo de eliminar impurezas que podrían afectar la máxima adsorción. Para evaluar si es necesario incluir un pretratamiento en los experimentos posteriores, se repiten las mediciones anteriores, incluyendo esta etapa previa.

Para el pretratamiento se prepara una solución de hidróxido de sodio (Merck) al 1[M], para el primer lavado de la zeolita. Para esto, 1,5 [g] de zeolita de granulometría 0,173 [mm] se mezclan con 25 [ml] de la solución en el agitador magnético SCIOLOGEX MS-H-S durante 5 minutos a 400 [rpm], posteriormente la muestra puesta en un tubo Falcón de 50 [ml] para ser centrifugada, retirando el sobrenadante. Luego se continúa con un lavado con agua destilada, para lo cual al precipitado son añadidos 25 [ml] de agua, utilizando el agitador vortex para mezclar ambas fases en su máxima agitación durante 2 minutos y la muestra es centrifugada nuevamente. Finalmente, se repite el procedimiento utilizando un buffer acetato 0,1 [M] a pH 5,6 preparado previamente.

3.5.2. Relación mosto zeolita

Para el estudio de la relación de mosto y zeolita, se mantiene constante la cantidad de mosto (25 [ml]) y se varía la cantidad de adsorbente. Los gramos de adsorbente utilizados son los siguientes: 0,5, 1,5, 3, 5, y 10, las muestras se realizan en duplicado y con zeolita fresca, tal como se detalla al comienzo. Finalmente se mide la concentración de proteína en el sobrenadante utilizando el método de Bradford. En los experimentos de 5 y 10 [g] de zeolita se aumenta la agitación a 600 [rpm], para que se realice bien el mezclado.

3.5.3. Adsorción a diferentes pH del mosto

Se estudia el efecto del pH de la solución en que se encuentran las proteínas en la adsorción. Para ello se cambia el pH del mosto en un rango

entre 4 y 5,6. El pH es medido utilizando el pHmetro HI 2223, Hanna Instruments. Para cambiar el pH del mosto, se utiliza ácido cítrico (Merck), en una solución al 0,1 [M] con agua destilada y se añade con micropipeta al mosto hasta alcanzar el pH deseado.

También se construye un gráfico de gramos de ácido cítrico utilizado para cambiar el pH del mosto, con el objetivo de posteriormente realizar un análisis del costo asociado a esta modificación.

3.5.4. Adsorción con otras resinas

Una vez determinado el pH en el que se adsorben la máxima cantidad de proteína, se utiliza este valor para estudiar otras resinas de bajo costo. Las otras resinas utilizadas son tierras diatomeas y arena de mar, algunos detalles de estas resinas y la zeolita utilizada se presentan en la Tabla 3-1. El procedimiento de adsorción es el mismo detallado al comienzo de esta sección. En el caso de la arena de mar, se realiza un ensayo adicional con el doble de la cantidad de adsorbente (3 [g]).

Tabla 3-1: Algunas características de las resinas utilizadas para la adsorción de proteínas en el estudio

Resina	Proveedor	Detalles
Zeolita	Zeolita del Maule	Composición química de 64% de SiO_2 y granulometría entre 0-0,173 [mm]
Tierra Diatomeas	Nicolaides	Se utilizan dos tipos: Celite 545 y HyFlo Supercel, ambas con un 92% de SiO_2 . Se diferencian en el tamaño de partículas, del orden de 30 y 40 [μm], respectivamente, dado por el tratamiento industrial para su obtención.
Arena de mar	Merck	Compuesto 100% SiO_2 de escala analítica y tamaño de partícula entre 0,1-0,315 [mm]

3.5.5. Adsorción a 70°C

En los experimentos anteriores por simplificación se hicieron a mosto temperatura ambiente, sin embargo, es importante estudiar la adsorción con un mosto a temperatura de 70°C, que es aproximadamente la temperatura a la que sale el mosto de la etapa del filtrado en planta.

A escala laboratorio, dado que el tiempo de filtrado es alto, la temperatura del mosto final es de aproximadamente unos 50°C, por lo que,

para realizar la adsorción a 70°C, se calienta el mosto en la placa calefactora del agitador magnético SCIOLOGEX MS-H-S, controlando la temperatura con una termocupla. Una vez que el mosto está a 70°C, se le adicionan los 1,5 [g] de zeolita y se repite el procedimiento descrito al comienzo del punto 3.5.

3.6. Experimentos de desorción

Con los resultados obtenidos en la adsorción de las proteínas, se procede a evaluar su desorción, para ello primero se prueba cambiándole la fuerza iónica a un buffer con el mismo pH que el mosto y luego con un cambio de pH. Las soluciones y buffer son preparados en el laboratorio y para todas se utiliza agua destilada. A continuación, se tienen los reactivos utilizados en su preparación:

- Buffer acetato
 - ✓ Ácido acético glacial (Merck)
 - ✓ Acetato de sodio (Merck)
- Buffer carbonato
 - ✓ Bicarbonato de sodio (Winkler)
 - ✓ Carbonato de sodio (Merck)
- Solución de Hidróxido de sodio
 - ✓ Hidróxido de sodio en tabletas (Winkler)

Primero se adsorbió proteína con mosto ajustado a pH 4,7, para posteriormente realizar la desorción con buffer acetato 0,1 [M] pH 4,7 y diferentes concentraciones de NaCl, partiendo con 0,1 [M] hasta 2 [M].

Para la desorción se añade el buffer a los tubos Falcón, que contienen a la zeolita con la proteína previamente adsorbida. La cantidad de buffer añadido es 25 [ml], para mezclarlas se utiliza el agitador vortex en su máxima agitación. Una vez adicionado, se mezcla durante 20 segundos en el agitador y se deja en reposo durante 60 segundos, repitiendo esto tres veces más. Completando el ciclo de mezclado, los tubos son puestos en la centrifuga nuevamente y la proteína recuperada se encuentra en el sobrenadante, por lo que para determinar el porcentaje de proteína desorbida, se mide la concentración de este con el método de Bradford.

El porcentaje de proteína recuperada se calcula como la Ecuación 4.

$$\% \text{ Proteína}_{desorbida} = \left(\frac{c}{c_0} \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde c_0 : Concentración proteína inicial $[mg/ml]$

c : Concentración proteína en el sobrenadante $[mg/ml]$

El mismo procedimiento se realiza ahora cambiando el pH del buffer, para esto se utilizan buffer carbonato a pH 9 y 10,8 y soluciones de NaOH de 0,1 $[M]$ y 1 $[M]$. También se estudia la recuperación cambiando la concentración del buffer, para esto se prepara el buffer carbonato pH 10,8 a tres concentraciones diferentes y se realiza el mismo procedimiento anterior.

3.7. Escalamiento

Una vez determinadas las condiciones de adsorción y desorción de las proteínas, se procede a escalar el proceso. Para esto se estudia la recuperación utilizando columnas de lecho fijo.

Para realizar el montaje de las columnas se utilizó PVC como se muestra en la Figura 3-8. Los tubos tienen de diámetro y largo 3,2 y 45 $[cm]$, respectivamente. En la parte inferior se utilizaron tapas de PVC pegadas con el adhesivo Vinilit, a las que se le realizaron orificios para la salida del flujo.

Primero estas columnas fueron utilizadas para determinar el tamaño de partícula que se utilizaría en el escalamiento, para ello, se empacaron utilizando zeolita de diferente tamaño. Una vez empacadas, se cargaron con una cantidad determinada de mosto y se midió el tiempo en que este tomo en pasar por la columna, utilizando un cronómetro.

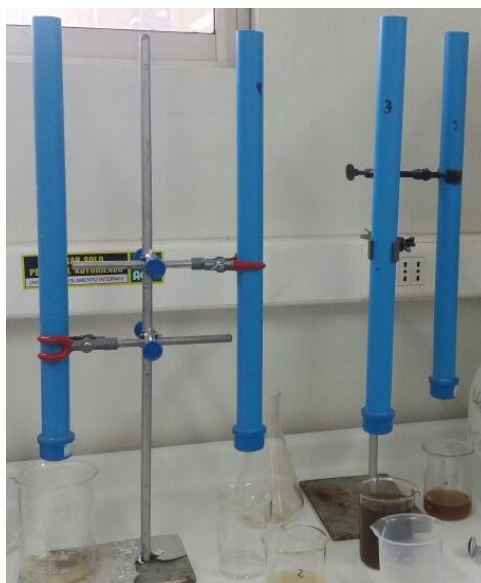


Figura 3-8: Primer montaje columnas para diferentes granulometrías de zeolita

Luego, con el tamaño de partícula determinado, se procedió a medir la capacidad de la resina, para lo cual se utilizaron los resultados de pH de adsorción y desorción obtenidos en los experimentos anteriores. En esta parte la columna fue modificada, cambiándose el largo y sellándose en la parte superior. Además, se utilizó la bomba dosificadora INVIKTA 632 para bombear el mosto a través de la columna, esta cuenta con un regulador de frecuencia, utilizándose a un 20%.

Primero se lavó la zeolita, bombeando agua destilada hasta que disminuyera su turbidez, posteriormente se pasó el mosto, para lo cual se midió su concentración a la salida con el método de Bradford, recolectando cada 80 [ml] una muestra para su medición. Luego se realizó un lavado con buffer acetato 0,1 [M] a pH 5,4, para finalmente una elución utilizando buffer carbonato pH 10,8. Para realizar el escalamiento del proceso, se utiliza un criterio que permita establecer la capacidad de la resina, a partir de la curva de ruptura elaborada y las ecuaciones utilizadas para esto se encuentran en el Anexo E.

También se propone otra alternativa, la cual es realizar la adsorción en un tanque agitado, utilizando el equipo de hervido del proceso industrial. Para evaluar esta alternativa se estudian dos formas posibles de realizar la recuperación de las proteínas, cuales se describen a continuación.

La primera es realizar la adsorción de las proteínas a la temperatura 70 °C con zeolita y posterior desorción con buffer a la misma temperatura, para ello se utilizó el mismo procedimiento antes descrito. La otra alternativa fue mezclar la zeolita con el mosto utilizando el mismo procedimiento, pero luego del tiempo de adsorción hervir el mosto junto la zeolita y posteriormente realizar la desorción. El hervido fue realizado en un agitador con placa calefactora a una temperatura promedio de 97 °C durante 15 minutos, luego de esto la muestra fue centrifugada, para posteriormente ser desorbida con el mismo procedimiento del punto 3.6.

3.8. Evaluación productos finales

Para evaluar el mosto, se realiza la recuperación de las proteínas con los resultados antes obtenidos, a los cuales además se le hizo un análisis de los costos asociados para establecer el óptimo. La adsorción fue realizada en forma batch, ya que, debido a problemas con la bomba, no se pudo replicar los experimentos en columnas. Para esto se utilizó 1 [l] de mosto y la cantidad de resina según la capacidad determinada con la curva de ruptura, los que se mezclaron durante 30 minutos y luego se centrifugó. Posteriormente se

desorbió la proteína utilizando primero buffer carbonato 0,1 [M] a pH 10,8 y posteriormente una solución de NaOH al 1 [M]. Al mosto antes y posterior a la adsorción se le realizaron las siguientes mediciones:

Grados Brix: se utilizan aproximadamente 1 [ml] de mosto, los cuales son puestos en la placa de luz del refractómetro HANNA, para leer los grados Brix por el lente.

Color: se utilizan 3 [ml] de mosto, los que son puestos en cubetas plásticas y se mide su absorbancia a 430 [nm]. El valor obtenido se multiplica por 25, obteniendo los resultados en unidades de EBC. La muestra es previamente filtrada utilizando papel filtro y un embudo. Se mide con el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25.

Turbidez: se utilizan 30 [ml] de mosto, los que son puestos en la cubeta de vidrio del equipo turbidímetro Hach 2100AN IS, las mediciones son realizadas en unidades Nefelométricas de turbidez (NTU).

Concentración de proteína: se mide con el método de Kjeldahl y Bradford.

Para los concentrados, se les midió la concentración de proteína utilizando el método de Kjeldahl y Bradford, con la metodología antes descrita.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se estudia la recuperación de proteínas del proceso de fabricación de extractos de malta, basándose en la patente WO 2016001683A1 [31] de recuperación de proteínas del *Pot Ale* del proceso de producción del *whisky*. Proceso que se realiza utilizando cromatografía de intercambio iónico con resinas de bajo costo como la zeolita.

Se estudia esta patente, ya que al igual que el objetivo de este proyecto, las proteínas de interés provienen de la cebada y por ende pueden tener un comportamiento similar con la zeolita en cuanto a su adsorción. Además, es importante mencionar que utilizar este tipo de resinas, de bajo costo, hace esta técnica más económica con respecto a otras. Por ejemplo, la ultrafiltración o precipitación son métodos de separación dependientes del volumen, por lo que la inversión en estas es más proporcional al volumen de solución procesada que a la cantidad de producto producido. En el caso de la cromatografía de intercambio iónico, es una técnica que depende en mayor medida de la cantidad de proteína adsorbida, la cual viene determinada en principalmente por la resina.

Otras de las ventajas de utilizar la cromatografía de intercambio iónico es que se puede escalar a nivel industrial y permite separar las proteínas entre ellas, lo cual puede ser beneficioso si se tiene una proteína de interés. Por otra parte, la incorporación de esta nueva etapa al proceso actual, se espera que no modifique en cierto rango al producto de interés, principalmente la concentración de carbohidratos, la que corresponde a un 90% de la masa del extracto en polvo.

En la Figura 4-1 se tiene el diagrama de bloque del proceso de extractos, incorporada la etapa de recuperación de proteínas propuesta. El mosto, previamente tratado con proteasas durante la maceración, posterior a la filtración, ingresa a la columna de adsorción por la parte superior, saliendo por la parte inferior un mosto con bajo contenido de proteínas por la parte inferior, para continuar con la siguiente etapa de hervido. Durante el paso por la columna, las proteínas son retenidas por la resina, para posteriormente ser eluidas y recuperadas.

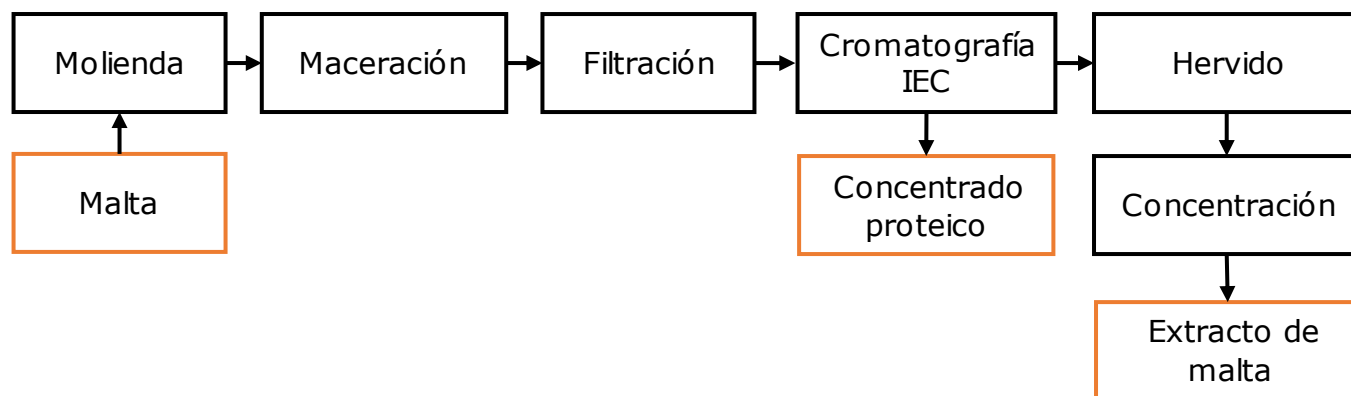


Figura 4-1: Diagrama de bloque proceso de extractos de malta con recuperación de proteínas

4.1. Caracterización mosto prueba

El mosto utilizado para las pruebas experimentales presenta las características fisicoquímicas que se muestran en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Características del mosto usado en los experimentos

pH	5,6±0,1
Densidad	1,062 [g/ml]
Proteína soluble (Bradford)	0,55±0,06 [g/l]
Proteína soluble (Kjeldahl)	17,7 [g/l]
Brix	20±1

De la Tabla 4-1 se tiene que el contenido de proteína medido con el método de Kjeldahl es de aproximadamente 30 veces el de Bradford, esta diferencia entre los resultados se debe a que Bradford responde mejor a las proteínas de más de 3 [kDa] y a los péptidos compuestos por aminoácidos aromáticos (fenilina, tirosina y triptofano) y básicos (arginina, histidina y lisina)[38]. Con la adición de proteasas durante la maceración, el mosto contiene una alta concentración de péptidos de pequeño tamaño, los que pueden no estar cuantificados con este método. Además, el método de Kjeldahl asume que todo el nitrógeno medido son proteínas, los que puede verse alterado por la presencia de vitaminas o lípidos en el mosto.

Entre los diferentes mostos utilizados, la concentración de proteína varía, y esto se debe a que, para la adición de la proteasa, se considera el contenido de proteína promedio del grano, el cual puede ser diferente entre los distintos lotes de producción de malta de la variedad Traveler. Otras variables son las del proceso de elaboración del mosto, principalmente en la etapa de filtración

y lavado, que dependen de la formación de la torta y presión de vacío aplicado, lo mismo para la variación de grados Brix entre los diferentes mostos. Por esto, cuando se estudia la adsorción de las proteínas, se mide la concentración inicial a cada muestra.

La ventaja del método de Bradford es ser un método de rápida medición y con volumen de muestra bajo, por lo que para los experimentos siguientes este método es el utilizado. Mientras que el método de Kjeldahl se utiliza en la parte final para evaluar los productos obtenidos, ya que es un método estándar para el análisis de proteínas utilizado en la industria de alimentos y permite una evaluación más precisa y realista de la eficiencia del proceso.

4.2. Cinética de adsorción

En primer lugar, se estudia la cinética de adsorción de las proteínas en la zeolita, con el objetivo de determinar el tiempo en que el proceso alcanza el equilibrio, definido este último, como el estado en que existe una determinada distribución de soluto entre las fases sólido y líquida que no puede ocurrir una adsorción mayor de soluto.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4-2, la que es elaborada con un mismo mosto de prueba y diferentes tiempos de adsorción o mezclado con la zeolita. Se tiene que la masa adsorbida de las proteínas es cercana al 70% entre los 30 y 60 minutos, no aumentando de forma significativa para tiempos hasta 90 minutos, por lo que se asume que el equilibrio es alcanzado en 30 minutos.

También se estudió el efecto de adicionar una etapa de pretratamiento del adsorbente, tal como se desarrolla en la patente utilizada. Esta etapa comienza con el lavado de la zeolita con una solución de hidróxido de sodio, con el objetivo de eliminar posibles impurezas que podrían impedir la máxima adsorción de las biomoléculas, se continúa con un lavado con agua destilada para eliminar restos de la solución que quedaron del lavado anterior, y finalmente un lavado con buffer con el mismo pH que el mosto, para que la zeolita tenga las condiciones de adsorción, por lo que se utilizó buffer acetato 0,1 [M] a pH 5,6. El tener un lavado final con buffer podría disminuir el tiempo de equilibrio, ya que la resina se encuentra equilibrada al pH de adsorción.

Se obtuvo que con el pretratamiento de la zeolita no aumenta significativamente el porcentaje de adsorción de proteínas, lo que podría deberse a que no existen impurezas en el material, debido a que este es de grado alimenticio y contiene un bajo contenido de impurezas. En cuanto al

tiempo en alcanzar el equilibrio, no se puede asegurar que disminuya, lo que podría estar asociado a que, al humedecer la zeolita, se crea una resistencia adicional para que se produzca la adsorción, además de que es un material poroso y por ende es más difícil que toda el área del material se encuentre disponible para adsorber. Una forma de evaluar este efecto podría ser, luego del lavado, secar las partículas de resina y posteriormente mezclarla con el mosto. Para los ensayos siguientes se utiliza 30 minutos como tiempo de mezclado y zeolita sin pretratamiento.

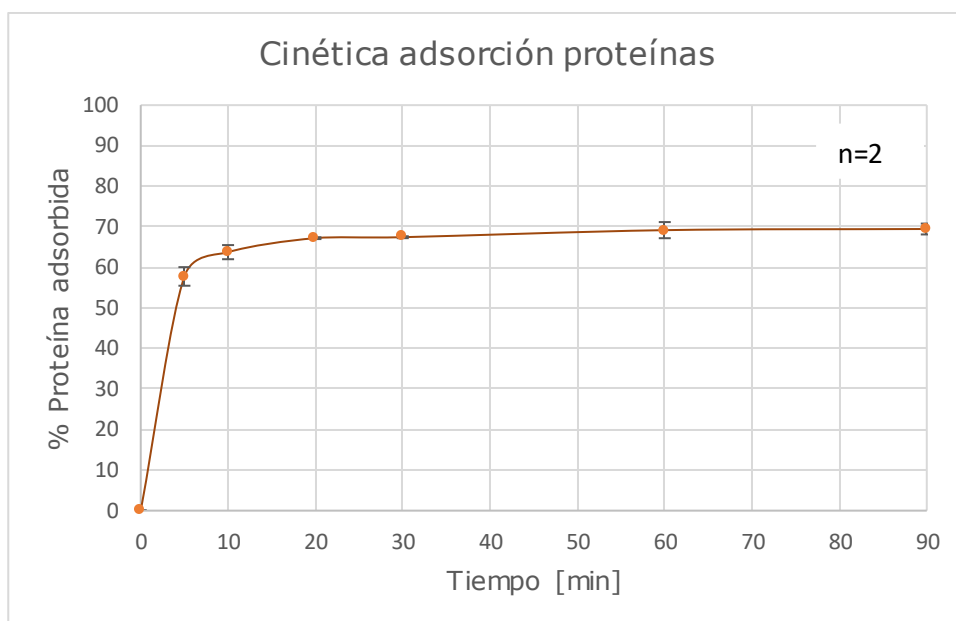


Figura 4-2: Cinética de adsorción proteína en zeolita sin pretratamiento

4.3. Adsorción de proteínas para diferentes pH

Como la carga de las proteínas depende del pH en la solución en que se encuentran, se estudia la adsorción de las proteínas cambiando el pH del mosto, para lo cual se utiliza ácido cítrico, ya que es un ácido orgánico débil, utilizado en la industria de alimentos para disminuir su pH, entre otros usos [44].

Se trabaja con un rango de pH entre 4 y 5,6, debido a la distribución de los puntos isoeléctricos (Tabla 2-7) de las proteínas del mosto. A pH 5,6, original del mosto, un 67% de las proteínas tiene carga positiva, mientras que cuando el pH del mosto desciende, este porcentaje aumenta, teniendo que a pH 4, todas las posibles proteínas presentes, tienen carga positiva y por ende podrán tener interacción electrostática con la zeolita.

Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 4-3, donde se tiene que la adsorción aumenta con respecto a la disminución del pH, tal como se esperaba. Cuando no se modifica el mosto, la adsorción es de un 70%, versus con un ajuste pH que se puede llegar incluso hasta un 90%, este aumento del 20% será atractivo dependiendo de los costos asociados, ya que, si bien la cantidad de proteínas posibles de recuperar aumenta, cambiarle el pH al mosto tiene asociado costos de operación, como el ácido cítrico y el hidróxido de sodio, este último utilizado para ajustar el pH luego de la adsorción.

Finalmente, se hace un análisis estadístico ANOVA de Fisher de varianzas entre las muestras, para evaluar si los resultados presentan diferencia significativa entre sí, utilizando un p-valor de 0,05. Se obtiene que solo para un pH 4 y 4,7 estas no son estadísticamente significativas, por esta razón se recomienda utilizar pH 4,7. Esto puede deberse a que, a estos pH, la resina se satura o hay ciertas proteínas que sus pI son inferior a 4, por lo que tienen carga negativa y por ende, no pueden ser adsorbidas.

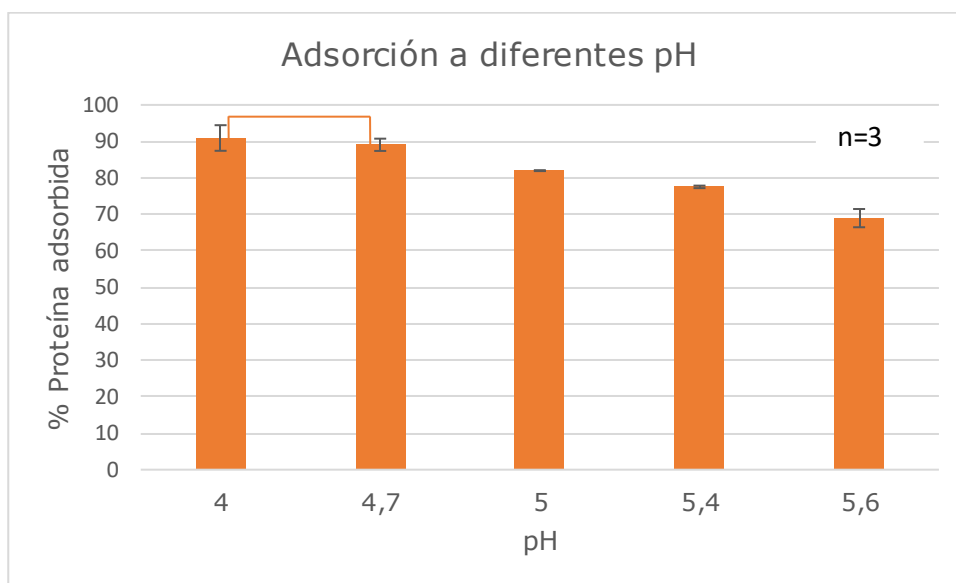


Figura 4-3: Adsorción de proteínas para diferentes pH del mosto

4.5. Adsorción de proteínas con diferentes resinas

Aparte de la zeolita, se prueban otras resinas con el objetivo de evaluar si aumenta el porcentaje de proteína adsorbida, estas tienen en común tener un alto contenido de SiO_2 y ser de bajo costo. Las tierras diatomeas han sido utilizadas para la adsorción de derrames industriales, como por ejemplo de color o trazas de mercurio [45] [46], pero no se reporta su uso como adsorbente de proteínas. También se utiliza arena de mar extra pura de uso

analítico, por su alto contenido de óxido de sílice y porque se han utilizado arenas para modificar adsorbentes basado en polímeros naturales para adsorber colorantes e iones metálicos [47]

Para la realización de estos ensayos se utilizó un mosto con pH ajustado a 4,7. En la Figura 4-4 se muestran los resultados obtenidos, los que, comparados con la zeolita, todos presentan porcentaje de adsorción inferiores. Los mecanismos de adsorción de estos compuestos son complejos y dependen de muchos factores como su porosidad, su capacidad de intercambio iónico y estabilidad frente a condiciones como pH y temperatura, los cuales no son estudiados a profundidad en este trabajo. En el caso de la zeolita si se han reportado en la bibliografía usos como adsorbente, presentando altos niveles de recuperación [39].

La adsorción con tierras diatomeas (Celite y HyFlow) tiene similar porcentaje de adsorción, esto se debe a que presentan características similares, como misma composición química y origen, diferenciándose en tamaño, lo cual viene determinado por su proceso de obtención, específicamente en la parte final de calcinación. También se realiza un análisis estadístico de varianzas entre las muestras, utilizando un p-valor de 0,05. Se obtiene que los resultados con Celite y HyFlow no son estadísticamente significativas.

En el caso de la arena de mar, se realizan dos pruebas diferentes, una que mantiene la relación másica de adsorbente y mosto como las otras pruebas y una con el doble de adsorbente (3 [g]), ya que se obtiene un bajo porcentaje de adsorción en el primer ensayo, lo cual puede deberse a que este es menos poroso que los otros materiales. Los resultados muestran que, al duplicar la cantidad de arena, la recuperación aumenta, sin embargo, sigue siendo inferior a las de las tierras diatomeas y zeolita.

Con estos resultados se descarta estudiar la recuperación de las proteínas del mosto utilizando otras resinas diferentes a la zeolita.

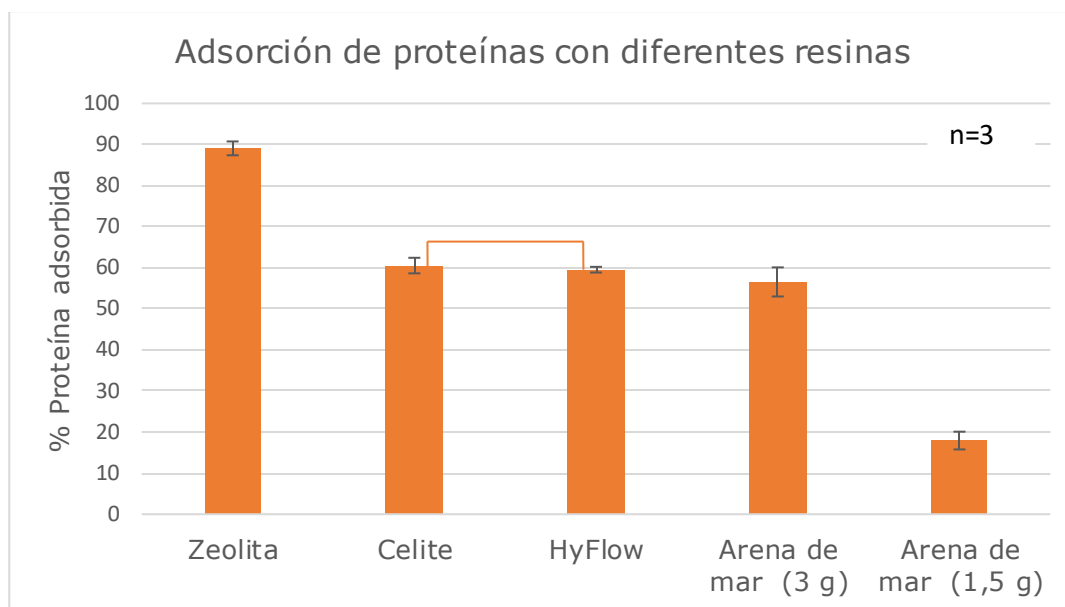


Figura 4-4 Adsorción de proteínas utilizando diferentes resinas

4.6. Relación mosto-zeolita

Otro parámetro de interés es estudiar la adsorción para diferentes relaciones de mosto y zeolita, ya que este determina la cantidad de adsorbente a utilizar y por ende las características de los equipos a escala industrial. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4-2, la cantidad de mosto utilizado para todas las pruebas es de 25 [ml].

Tabla 4-2: Resultados proteína adsorbida y capacidad de la zeolita para diferentes relaciones de mosto y zeolita (n=2)

Zeolita [ml]	Relación mosto/zeolita [ml/ml]	Proteína adsorbida [%]	Capacidad [mg proteína/ml zeolita]
0,8	31,3	60,7±2,0	12,2±0,40
2,3	10,8	71,0±1,5	4,7±0,10
4,5	5,5	83,3±0,7	2,8±0,03
7,5	3,3	86,0±0,3	1,7±0,01
15,1	1,6	87,7±1,6	0,8±0,02

De la Tabla anterior se tiene que a medida que se aumenta la cantidad de zeolita, la proteína adsorbida aumenta, sin embargo, la capacidad de la resina disminuye. Por lo que para determinar el óptimo, se grafican ambos resultados normalizando los valores de la capacidad por el máximo valor obtenido, para que ambos gráficos estén en porcentaje como se muestra en Figura 4-5.

De la intersección se obtiene que para la adsorción en batch, la relación volumétrica óptima de mosto y zeolita es 21,4. Para realizar la operación con lecho fijo probablemente sea menor, ya que el tiempo de residencia de algunas proteínas dentro de la columna sea inferior al de 30 minutos, además de la distribución no uniforme del mosto.

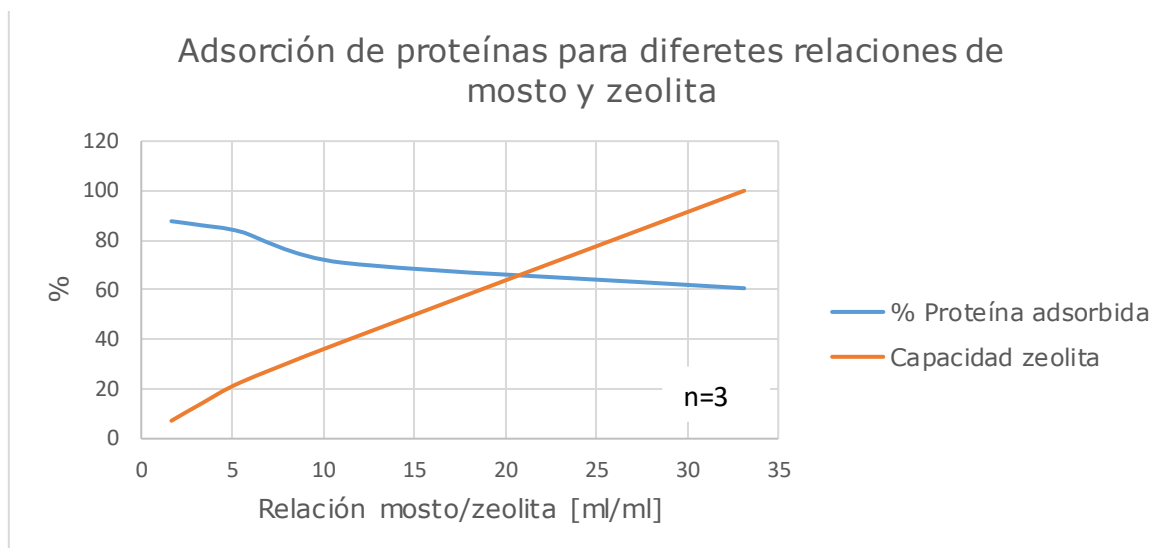
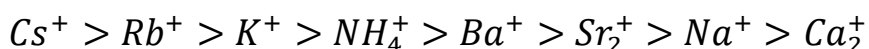


Figura 4-5: Proteína adsorbida y capacidad de la resina para diferentes relaciones de mosto y zeolita

4.7. Desorción de proteínas

Para recuperar las proteínas en la zeolita primero se prueba cambiando la fuerza iónica del buffer, para esto se utilizó diferentes concentraciones de NaCl en el buffer acetato 0,1[M] pH 4,7 y también un blanco utilizando agua destilada. Se utiliza el buffer acetato pH 4,7, ya que el mosto inicial tiene este pH.

En la Figura 4-6 se presentan los resultados obtenidos, se tiene que la recuperación en todos los ensayos es inferior al 10% y no sigue una tendencia con respecto a la concentración de la sal, la cual debería aumentar con el aumento de la fuerza iónica del buffer. Diferentes iones tienen diferente selectividad iónica con la zeolita, por lo que se podría probar con uno que tenga mayor selectividad con esta, a continuación se muestra la selectividad iónica para la zeolita clinoptilolita [10]:



A pesar de que el agua tiene un pH superior al del buffer acetato, esta no tiene la capacidad amortiguadora de pH, por lo que este puede cambiar durante el proceso y por esto la masa de proteína desorbida es inferior al 10%. Debido a que no es posible utilizar este método para desorber las proteínas, se prueba cambiando el pH del buffer.

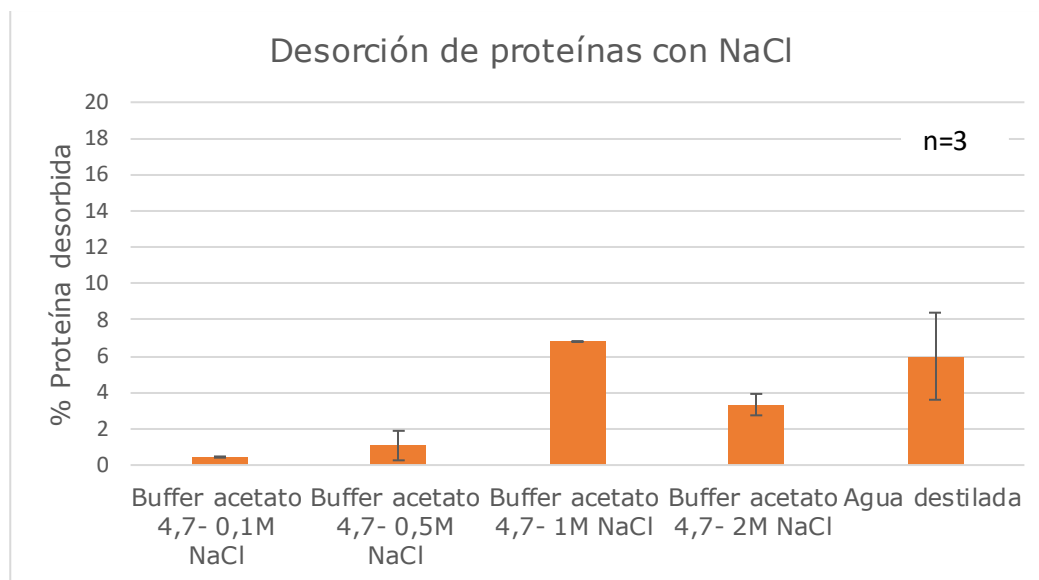


Figura 4-6: Desorción de proteínas utilizando buffer acetato pH 4,7 con diferentes concentraciones de NaCl

Para el cambio de pH se utiliza el buffer carbonato 0,1 [M] a pH 9 y 10,8, además de soluciones de hidróxido de sodio al 0,1 [M] y 1 [M], las que tienen pH 13 y 14, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 4-7. Se tiene que la cantidad de proteína recuperada es superior a los experimentos variando las concentraciones de NaCl y presentando mayor cantidad de proteína desorbida a pH más altos.

La recuperación aumenta, debido a que pH mayores al punto isoeléctrico, las proteínas tendrán carga negativa, por lo que habrá repulsión electrostática entre las proteínas y la zeolita (Figura 2-16). Se realiza un análisis estadístico de varianzas entre las muestras, utilizando un p-valor de 0,05, obteniendo que utilizar una solución de 0,1 [M] de NaOH y el buffer carbonato a pH 10,8 la diferencia no es estadísticamente significativa. Del gráfico se tiene además que a un pH 14, se obtuvo una recuperación mayor al 100%, lo que puede deberse a algunas impurezas de la zeolita o interferencia de altas concentraciones de hidróxido de sodio en el método de Bradford.

Utilizar altas concentraciones de NaOH en procesos industriales tiene ciertas complicaciones, como riesgos para la salud de los trabajadores que

estén en contacto con este, ya que es irritante y corrosivo de los tejidos. Además, puede producir daños en los equipos, dependiendo del material que sea y tiene que tener un buen sistema de almacenamiento. Por lo que se descarta utilizar la solución de pH 14 a escala industrial.

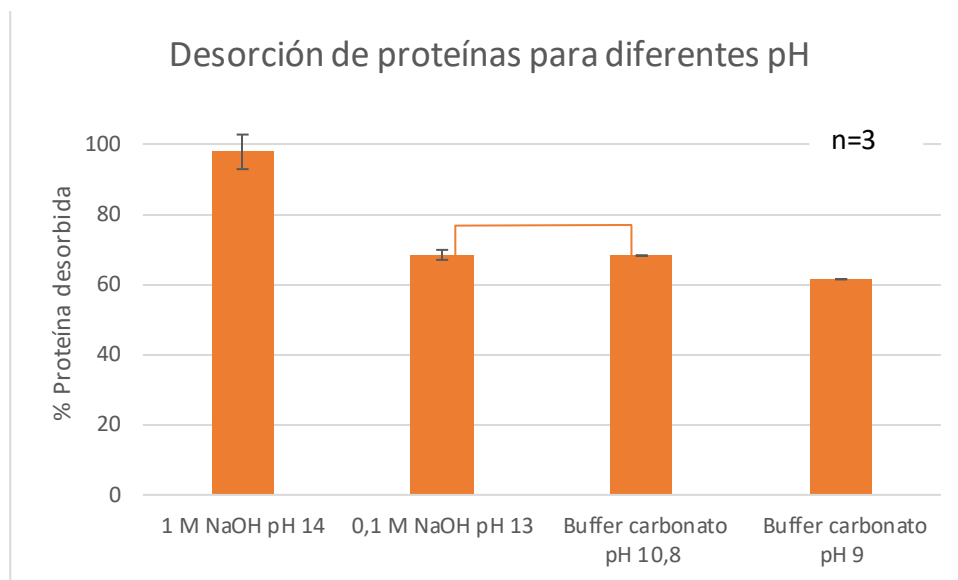


Figura 4-7: Desorción de proteínas utilizando diferentes pH

Finalmente se prueba utilizar el buffer carbonato con pH 10,8 y 9 con diferentes concentraciones de NaCl para evaluar si aumentan los porcentajes de recuperación de proteínas de la Figura 4-7. Esto se realiza para evaluar si el porcentaje de proteína desorbida utilizando buffer carbonato aumenta, puesto que de la Figura 4-6 se tiene una tendencia de subir con la adición de sal al buffer.

Del gráfico de la Figura 4-8 se tiene que utilizando un buffer 9, disminuye la cantidad de proteína recuperada con el aumento de la concentración de sal, mientras que para pH 10,8, aumenta en un 7% utilizando el buffer con 0,5 [M] de NaCl, y vuelve a disminuir al aumentar la concentración al 1 [M]. Dado que la tendencia es a disminuir con la adición de sal en el buffer y sólo en un caso aumento, pero solo un 7%, los mejores resultados se obtienen utilizando buffer carbonato a pH 10,8.

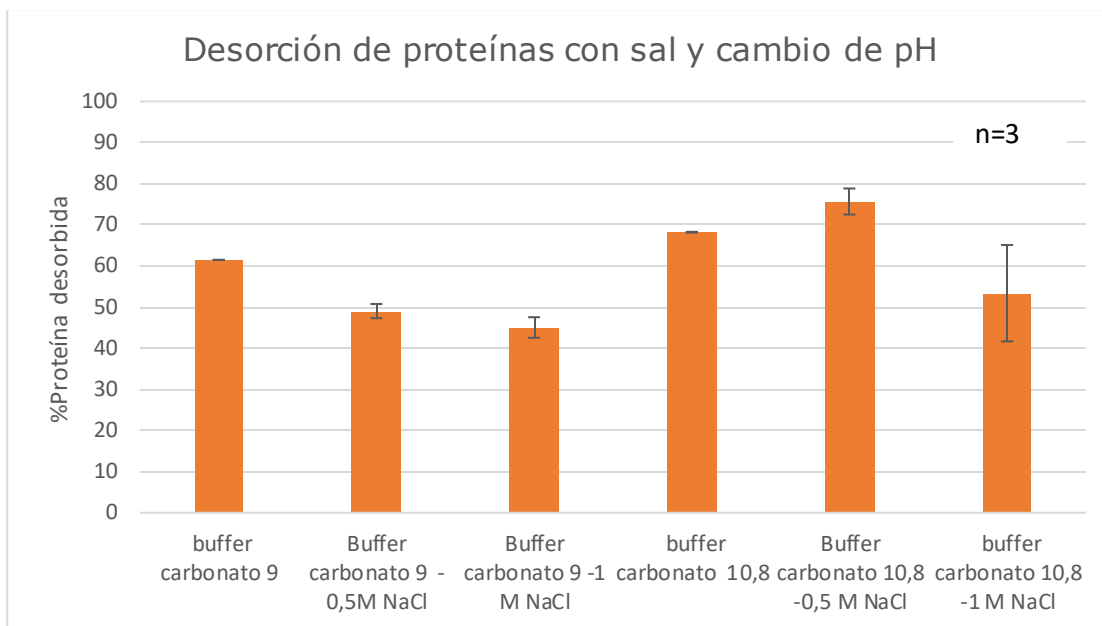


Figura 4-8: Desorción de proteínas con buffer carbonato y diferentes concentraciones de NaCl

También se observó que las muestras que presentaban mayor concentración de proteínas tienen un color más oscuro, como se muestra en la Figura 4-9, lo que podría deberse a que alguna de estas está relacionada con el color del extracto. Sin embargo, no se puede afirmar que el color indica más proteína, ya que se podría deber también a interferencia de los ensayos. Por lo tanto, será relevante evaluar posteriormente la variación de color en el producto final, ya que algunos de los usos del extracto son como materia prima en la elaboración de cervezas, la que se puede ver alterada con esta propiedad.

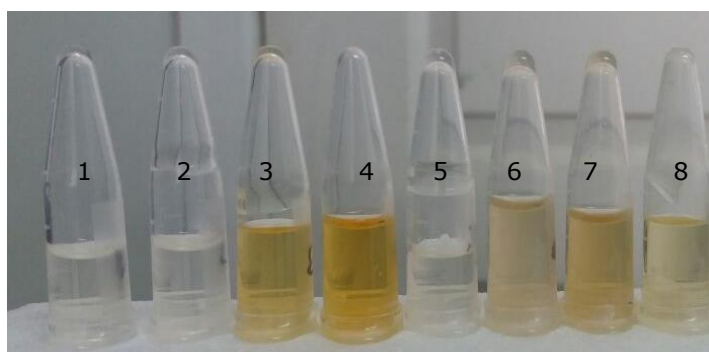


Figura 4-9: Concentrados de proteína obtenidos utilizando diferentes buffer y soluciones de NaOH (**1.** Buffer acetato pH 4,7 **2.** Buffer acetato pH 4,7- NaCl 1 [M], **3.** 0,1 [M] NaOH, **4.** 1 [M] NaOH **5.** Buffer acetato pH 5,6 **6.** Buffer carbonato pH 9, **7.** Buffer carbonato pH 10,8 **8.** Buffer carbonato pH 10,8-NaCl 1 [M])

Otro factor es la concentración del buffer de desorción, la cual en todo lo anterior se utilizó 0,1 [M], pues a mayores concentraciones los componentes

del buffer comienzan a competir con las proteínas. En el gráfico de la Figura 4-10 se muestra los porcentajes de proteína adsorbida para concentraciones de 0,01 [M] y 0,05 [M].

Se obtiene que la cantidad de proteína desorbida disminuye junto con la disminución de la concentración del buffer, debido a que la capacidad amortiguadores de este disminuye. La capacidad del buffer depende de las concentraciones de los componentes y es una medida de la habilidad para resistir un cambio en el pH: entre más concentrados estén los componentes de un amortiguador, mayor será la capacidad del mismo [48].

Existe una diferencia de aproximadamente un 10% entre las concentraciones 0,05 y 0,1 [M], por lo que para evaluar cuál es más conveniente, se sugiere realizar un análisis económico y en base a esto determinar la mejor alternativa.

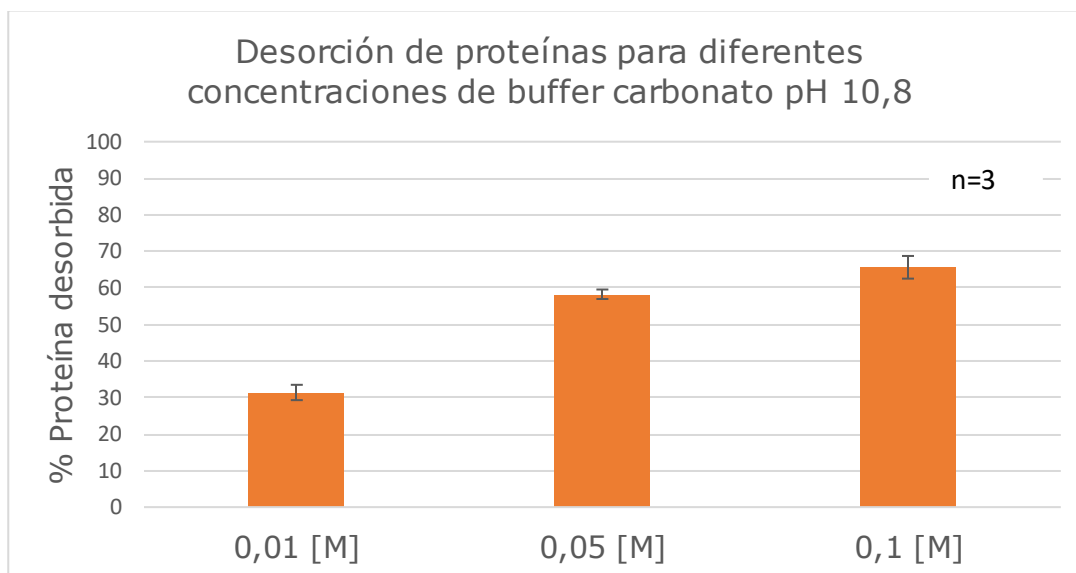


Figura 4-10: Desorción de proteínas utilizando diferentes concentraciones de buffer carbonato pH 10,8

4.8. Recuperación de proteínas a 70°C

Todos los experimentos de adsorción anteriores por simplificación fueron realizados con el mosto a temperatura ambiente, sin embargo, como se muestra en la Figura 4-1, la etapa de adsorción de estas biomoléculas es posterior a la etapa de filtrado, en la que el mosto sale a una temperatura entre 70 y 75 °C, temperatura que puede desnaturalizar las proteínas.

La desnaturalización se define como la pérdida de la estructura nativa de una proteína y se debe a la rotura de los enlaces que mantienen las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias [47]. Por esto, es importante estudiar el efecto de la temperatura en la adsorción, ya que puede provocar cambios en la carga neta de la proteína.

En la Figura 4-11 se muestra un gráfico con el porcentaje de proteína adsorbida para un mosto con pH ajustado a 4,7, a temperatura ambiente y otro a 70°C. La idea de estos ensayos era mantener constante la temperatura a lo largo del proceso, ya que a escala industrial el paso del mosto por la columna se espera que sea rápido y la temperatura no varíe. Además, que entre las etapas de filtración y adsorción no exista un sistema de enfriamiento, debido a que representa otra inversión o un tanque de almacenamiento, que podría contaminarse debido a la alta concentración de azúcares.

Realizando un análisis estadístico con las seis muestras se tiene que los resultados no presentan diferencia estadísticamente significativa. Por lo que con esta temperatura las proteínas siguen manteniendo su capacidad de carga neta y son adsorbidas por la zeolita. Sin embargo, para las pruebas a 70°C resultó difícil mantener la temperatura constante, por lo que utilizando un sistema que permita hacerlo, los resultados pueden variar.

También hay que considerar que el pH del mosto cambia, ya que la constante de acidez del ácido cítrico depende de la temperatura [48]. Cuando se realizaron las pruebas, se midió el pH del mosto (modificado con ácido) a 70°C, donde se obtuvo que este valor sólo descendió 0,2 unidades, por lo que la carga de las proteínas no se ve mayormente alterada, obteniendo similares porcentajes de desorción.

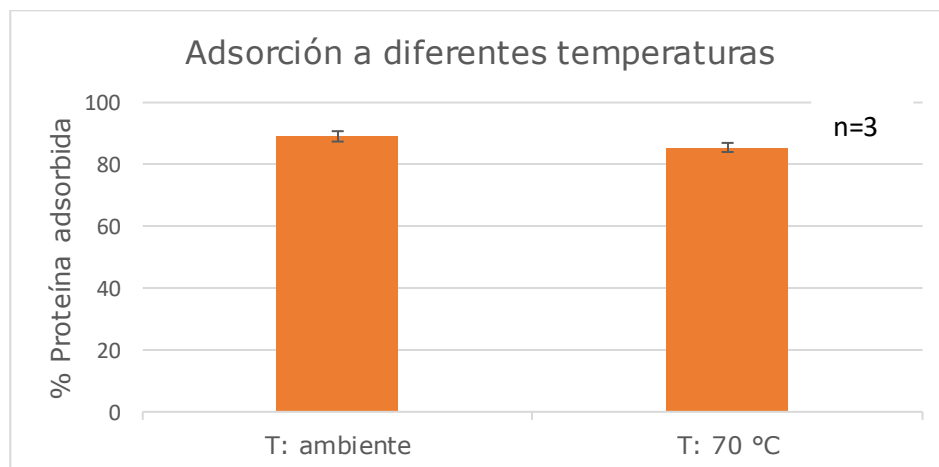


Figura 4-11: Proteína adsorbida para diferentes temperaturas del mosto

4.9. Escalamiento

A escala industrial el proceso será en un reactor de lecho fijo, ya que es el más utilizado, debido a su mayor área de adsorción por unidad de volumen [24]. Este lecho es una columna o tubo vertical relleno con partículas de adsorbente, que de acuerdo con los resultados será zeolita. En estos, el mosto que contiene las proteínas de interés se hace pasar a través del lecho utilizando un sistema de bombeo. Una vez adsorbidas estas proteínas, serán eluidas utilizando cambio de pH de la solución. Finalmente, a través de la columna ingresa una solución que permita regenerar el lecho para su posterior uso.

El tamaño de la columna y capacidad de la resina se determina elaborando una columna a escala laboratorio, la cual se empaca con zeolita y se alimenta continuamente de manera de poder determinar su curva de ruptura. La curva se elabora a partir de las mediciones de la concentración de proteína en el flujo de salida de la columna.

Otra alternativa es hacer la adsorción en batch aprovechando el equipo de hervido de la planta, el cual cuenta con un sistema de agitación para mezclar el mosto y zeolita. La ventaja de esta es que no involucraría realizar una inversión en la construcción de la columna, pero probablemente será más compleja de operar, principalmente en la desorción de las proteínas y además porque aumenta más el tiempo del proceso principal.

4.9.1. Alternativa 1: Adsorción en columnas

Para realizar el escalamiento, primero se montan las columnas para determinar la granulometría de la zeolita a utilizar, pues todos los experimentos anteriores fueron realizados con zeolita micronizada (0,173 [mm] aproximadamente), ya que contenía una menor cantidad de impurezas. Una vez empacadas las columnas se mide el tiempo en que pasa el mosto a través de la columna sólo por gravedad. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Resultados primer montaje columnas para diferentes granulometrías de zeolita (ND: no determinado)

Granulometría [mm]	Mosto [ml]	Zeolita [ml]	Razón mosto/zeolita	Tiempo [min]
0,173	130	66	1,96	ND
0-1,00	250	96	2,60	420±35
1,5-3,0	250	102,5	2,44	370±10
5,0-8,0	250	98	2,55	9±2

Se tiene que para la zeolita más pequeña no se logró determinar el tiempo en pasar el total del mosto, siendo este superior a 8 horas. Se descartó su uso debido a que trabajar con tiempos prolongados en que las proteínas están sin una temperatura adecuada (5 °C), puede generar problemas de deterioro de estas. En cuanto a la zeolita de mayor tamaño, el tiempo de residencia del mosto es muy inferior a los 30 minutos determinados anteriormente para alcanzar el equilibrio, por lo que tampoco es posible utilizar. De los otros dos tamaños, se utiliza la de 0-1,00 [mm], ya que la de 1,5-3,0 es muy superior al tamaño utilizado a escala industrial.

Se realiza un segundo montaje de columna, la que se muestra en la Figura 4-12, debido a que la anterior no estaba sellada y para poder realizar la curva de ruptura, es necesario que el mosto pase continuamente por el lecho, por lo que debe ser bombeado. La altura del lecho es de 0,1 [m] y un volumen de columna de 70,7 [ml].

En la Figura 4-13 se muestra las etapas del proceso realizado y sus condiciones de operación. Una vez empacada la columna con zeolita, se bombea agua destilada para lavar la resina y eliminar partículas pequeñas, hasta que la turbidez del agua disminuya, lográndose esto con 3 [l] de agua, esto debido a que es necesario eliminar estas partículas pequeñas para no contaminar el mosto.

Posteriormente se carga el mosto, el que tiene pH 5,4, recolectándose cada 80 [ml] una muestra a la salida de la columna, para medir su concentración utilizando el método de Bradford y elaborar la curva de ruptura. El objetivo es determinar la capacidad de la resina, por lo que se alimenta hasta que la concentración en el flujo de salida del mosto sea constante y similar a la de la entrada.

De los resultados anteriores se tiene que a pH 4,7 se adsorbe la mayor masa de proteínas, sin embargo, se usa un mosto con pH 5,4 debido a que el objetivo inicial era elaborar curvas para diferentes pH del mosto, pero no fue posible repetir para los otros pH.

Antes de realizar la elución, se lava la columna con buffer acetato pH 5,4, utilizándose para esto 500 [ml], ya que por bibliografía se tiene que como máximo se utilizan 10 volúmenes de columna [50]. Se utiliza un buffer con el mismo pH que el mosto, para que las proteínas no cambien su carga y se mantengan adsorbidas. Finalmente, para la elución se utiliza 660 [ml] de buffer carbonato a pH 10,8, lo que corresponde aproximadamente a 10 CV y es lo común en este tipo de operaciones.

Con los datos de la concentración de proteína, se elabora la curva de ruptura, como se muestra en la Figura 4-14. El criterio para determinar la capacidad de la resina fue imponer que no exista una gran pérdida de soluto en el proceso, ya que, en este primer estudio, no se sabe que tipos de proteínas se están perdiendo y cuál es su aporte en el concentrado proteico. Así, se tiene que se acepta sólo un 30% de pérdida de proteína, y la capacidad de la resina es de 2,1 [*g proteína/l resina*].

El resultado obtenido de la capacidad de la zeolita es bastante bajo comparado con resinas como la Cpto S Impact (General Electric), la cual puede presentar una capacidad de hasta 100 [*g proteína/l resina*][51], es decir casi 60 veces superior, sin embargo, su precio es 70 veces el de la zeolita. La capacidad de la resina Cpto S Impact es la máxima para cualquier tipo de proteína y es obtenida por catálogo del producto, por lo que sería importante hacer un ensayo con las proteínas del mosto y compararlas con la zeolita.

La columna elaborada para esta medición no cuenta con difusores de flujo a su entrada, por lo que se podrían alcanzar capacidades mayores, si se cuenta con un sistema que distribuya el mosto de manera uniforme a lo ancho de la columna. Además, como se señala anteriormente, realizar la curva con pH 4,7 se esperaba obtener una capacidad mayor, ya que la cantidad de proteína adsorbida aumenta con este pH.

Para el escalamiento se consideran los siguientes datos, el desarrollo se encuentra en el Anexo F: Memoria de cálculo escalamiento columna de adsorción.

- Altura del lecho: 0,1 [*m*]
- Capacidad de la resina: 2,1 [*g proteína/l resina*]
- Volumen de mosto: 25.000 [*l*]
- Concentración mosto: 0,58 [*mg/ml*]

Los resultados obtenidos para procesar todo el volumen de mosto en una columna, debe tener un diámetro de 9,4 [*m*], el cual no se corresponde con valores de equipos industriales, donde las columnas más grandes son de diámetros de 2 [*m*] [35]. Para tener dimensiones acordes a estas, es necesario utilizar 22 columnas, para procesar 1.136 [*l*] de mosto cada una.

Las columnas a escala industrial tienen alturas de 15 a 50 [*cm*] [10], pero para poder aumentar su altura es necesario determinar su capacidad a escala laboratorio y posteriormente escalar este valor, pues con lechos más altos se producen problemas con la resina, como deterioro por efecto del peso, por lo

que la capacidad podría variar. De acuerdo a la alta cantidad de columnas obtenidas, se hace necesario repetir el experimento anterior utilizando columnas de altura mayor, para procesar más mosto. En el caso favorable en que se aumente la altura de la columna a 50 [cm] y se mantenga la capacidad de la resina, serían necesario 5 columnas para procesar los 25.000 [l] de mosto.

Algo que no se realizó durante la elución de las proteínas fue la elaboración de cromatogramas, principalmente a que la columna al no contar con un sistema que distribuya uniformemente el flujo en la columna, los *peaks* no estarán definidos. Sería importante elaborar estos cromatogramas, utilizando columnas como la que se muestra en la Figura 2-14, las que están equipadas para realizar el proceso completo de cromatografía, pues podrían separarse proteínas en específico.



Figura 4-12: Segundo montaje columnas para construir la curva de ruptura del proceso



Figura 4-13: Condiciones de operación columna

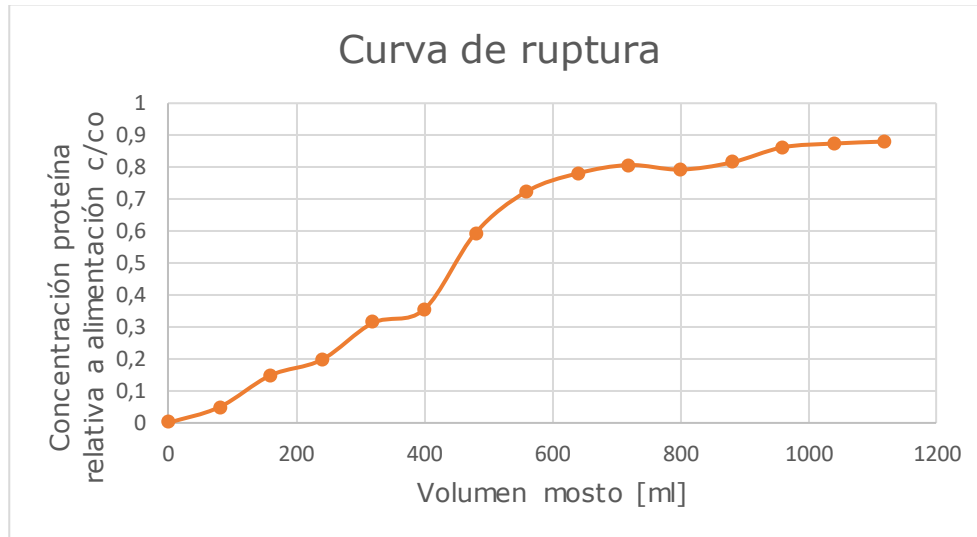


Figura 4-14: Curva de ruptura para mosto a pH 5,4

4.9.2. Alternativa 2: Adsorción equipo de hervido

La otra alternativa para realizar la cromatografía es aprovechando el equipo de hervido de la planta, el cual cuenta con agitación y volumen suficiente (30 [m³]) para mezclar el mosto y zeolita. Se evaluó la adsorción de las proteínas a 70 ° C y posterior desorción con buffer carbonato pH 10,8 a la misma temperatura, dado que, por las concentraciones de azúcar del mosto, es conveniente trabajar con altas temperaturas para que no se contamine el producto con microorganismos. Los resultados se muestran en la Figura 4-15.

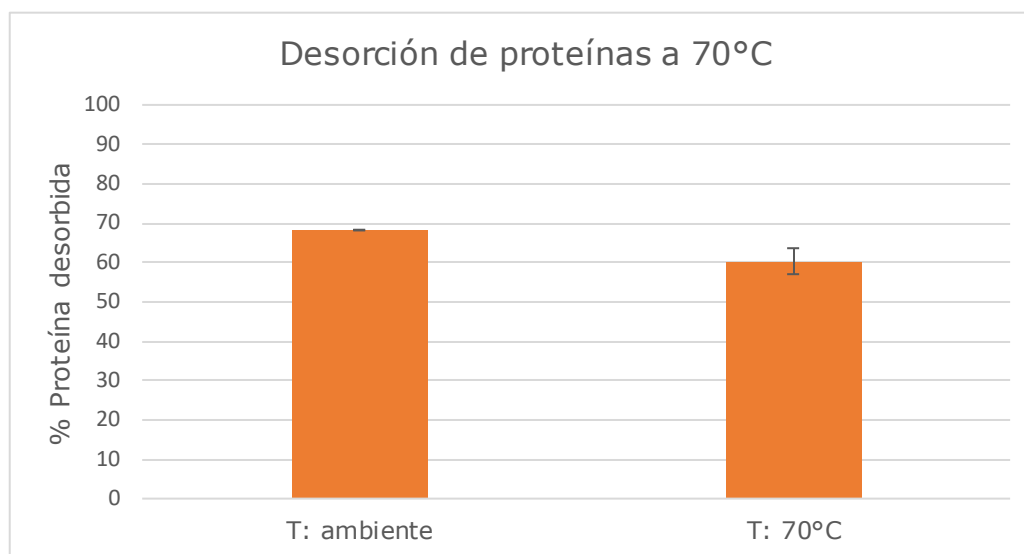


Figura 4-15: Proteína recuperada para adsorción y desorción a 70°C

La proteína recuperada a 70°C es aproximadamente 10% menor comparada con la realizada a temperatura ambiente, lo que podría deberse a que la constante de acidez del ácido carbónico con la temperatura y por ende el pH del buffer también, además otras proteínas pueden haber precipitado por el efecto de la temperatura. Sin embargo, la recuperación igual es alta, comparada con otros ensayos analizados anteriormente.

Sin embargo, dado el alto volumen de mosto, es difícil realizar esta operación a escala industrial solo utilizando el equipo de hervido. Como existen dos etapas de separación, posterior a la adsorción y desorción de las proteínas, será necesario contar con equipos a separación como centrifuga, hidrociclones o filtro, además de un equipo que permita reutilizar la zeolita para procesos posteriores.

Realizar la recuperación de las proteínas en el tanque de hervido y posteriormente realizar el hervido del mosto, se necesitará contar con algún estanque para almacenar el mosto. Una forma de evitar esto es hervir la zeolita junto con el mosto, para que luego de la adsorción y posterior separación, el mosto continúa el proceso de extractos.

Luego de la adsorción durante 30 minutos y hervido de 15 minutos (98°C), se utilizó buffer carbonato pH 10,8 para desorber las proteínas, siendo el porcentaje de proteína recuperada inferior al 17% lo que indica que probablemente muchas proteínas se desnaturalizaron y precipitaran debido a la alta temperatura final.

4.10. Propuesta final

Dada la complejidad de recuperar las proteínas utilizando el tanque de hervido, se propone realizar la separación en columnas, de acuerdo al procedimiento de operación que se detallara a continuación.

Para determinar el pH óptimo del mosto, se hace un análisis simple de costos asociados a la adición ácido cítrico al mosto y posterior adición de NaOH, con respecto a la proteína recuperada y su ganancia, el detalle de los cálculos está en el Anexo G. Se obtiene que el óptimo es utilizar un mosto a pH 4,7. El procedimiento de operación del proceso en columna es el siguiente:

1. Bombear agua a través de la columna, hasta que la medición de pH se estabilice o sino lavar la resina antes, para eliminar todas las partículas pequeñas, que después pueden contaminar al mosto.
2. Realizar una ambientación del lecho, utilizando buffer acetato 0,1 [M] pH 4,7 con 3 volúmenes de columna, de acuerdo con lo recomendado por la literatura.
3. Ajustar el mosto a pH 4,7 y bombearlo a través de la columna
4. Realizar un lavado con buffer acetato 0,1 [M] pH 4,7 con 7 volúmenes de columna.
5. Para la elución utilizar buffer carbonato 0,1 [M] pH 10,8, bombearlo a través de la columna hasta que se recuperen como mínimo un 70% de las proteínas adsorbidas.
6. Finalmente, la regeneración de la resina, utilizando 5 volúmenes de columna de NaOH al 0,1 [M], 3 volúmenes de columna de agua y 3 volúmenes de columna de buffer acetato 0,1 [M] pH 4,7.

El punto 2 es necesario realizarlo a escala industrial, ya que cuando se realizó en la columna se utilizó agua destilada para lavar la zeolita, en el caso en que se utilice agua potable u otro compuesto que tenga un pH diferente al del mosto, será necesario ambientarlo antes de cargarlo.

Algunas de las consideraciones que se debe tener en cuanto a la columna a escala industrial son contar con un buen sistema de distribución de flujo y soporte del equipo, así como también la caída de presión dentro de este, la que no fue medida en estos ensayos, pero que es relevante sobre todo a gran escala. Así como también un diseño higiénico, para que no se produzca contaminación cruzada y dañe a los productos de interés.

En cuanto a factores no cromatográficos que pueden afectar el rendimiento del escalamiento son cambios en la concentración de proteínas en

el mosto, que en el caso en que aumente, se recuperara menos proteína con respecto a la inicial del mosto, para la cual fue diseñada. También en el caso en que se cambie la composición, como por ejemplo con un mosto de avena u otro cereal, ya que estas proteínas pueden tener otros puntos isoeléctricos y no van a tener interacción con la zeolita. Contar también con un sistema para fabricación y almacenamiento de los buffers utilizados que los mantenga fresco durante el proceso.

4.11. Evaluación productos finales

Para este último objetivo se compararán algunas características del mosto antes y después de la adsorción, para lo cual se hace de forma batch en un tanque con agitación, ya que los experimentos en columnas no se pudieron repetir. Para la prueba se utilizaron los resultados obtenidos en las secciones anteriores, los cuales se detallan a continuación.

Se preparó 1 [l] de mosto a pH 4,7 y la cantidad de resina que se utilizó es de acuerdo a la capacidad de adsorción de la zeolita determinada por la operación en la columna. Dada que la capacidad obtenida es de 2,1 [g proteína/l resina], y que la concentración del mosto a utilizar es de 0,48 [mg/ml], la cantidad de resina necesaria es 0,228 [l], se utilizó la misma que para curva de ruptura (0-1 [mm]). El tiempo de mezclado fue de 30 [min] y para la desorción se utilizó 2 [l] de buffer carbonato 0,1 [M] pH 4,7 y posteriormente se hace otra desorción con una solución de NaOH 1 [M].

Los resultados de las características comparadas se muestran en la Tabla 4-4. Se tiene que los grados Brix disminuyeron en un 0,5%, si bien las azúcares no presentan carga neta, en los grupos OH de los carbohidratos se generan cargas parciales, además de que estas moléculas pueden ser retenidas en los poros de la zeolita. Obtener menor contenido de Brix afecta directamente al rendimiento del proceso de extractos, por lo que se estaría produciendo menor cantidad de producto.

Se mide el contenido de proteínas con Bradford, obteniendo que la proteína adsorbida es aproximadamente el 96%, pero tal como se discute al comienzo de la sección, este método subestima la concentración de las proteínas y solo mide en ciertos rangos de tamaño y tipos de aminoácidos, por lo que se realizan las mediciones nuevamente utilizando el método Kjendahl, ya que es el método estándar para alimentos. Con este segundo método, se obtiene que la cantidad de proteína adsorbida es de 5,4 gramos, los que corresponden aproximadamente al 31% de la proteína inicial, lo que es muy inferior a lo medido anteriormente. Con los resultados de Bradford se puede

inferir que al menos casi la totalidad de las proteínas de alto peso molecular son adsorbidas, y que quizás todo los péptidos (de bajo peso molecular), el cual podría ser mucho más comprado con el total, debido a la acción de las proteasas añadidas durante la maceración no fueron adsorbidos. Esto se podría comprobar realizando un análisis SDS-PAGE al mosto, para ver los tipos de proteínas presentes y en que rango de peso se encuentra. Además, adsorber péptidos o aminoácidos puede resultar menos probable, ya que su carga neta será inferior.

Otro parámetros medidos son la turbidez, ya que las proteínas están involucradas en esta característica [12], obteniendo que disminuye más de un 90%, lo cual es bueno, ya que por ejemplo en la cerveza, es una característica indeseada. También se mide la variación de color, ya que visualmente como se muestra en la Figura 4-13 es claro el cambio, obteniéndose una disminución de aproximadamente un 50%, lo cual podría generar problemas, pues uno de los usos de los extractos es proveer un color dorado y caramelo a los alimentos.

Tabla 4-4: Resultados mediciones finales realizadas al mosto antes y después de la adsorción

Parámetro	Mosto inicial	Mosto posterior a la adsorción
Grados Brix	18,1	18,0
Proteína Bradford [mg]	481,8	18,2
Proteína Kjeldahl [mg]	17.217,6	11.818,6
Turbidez [NTU]	254	23,8
Color [EBC]	19,25	9,9

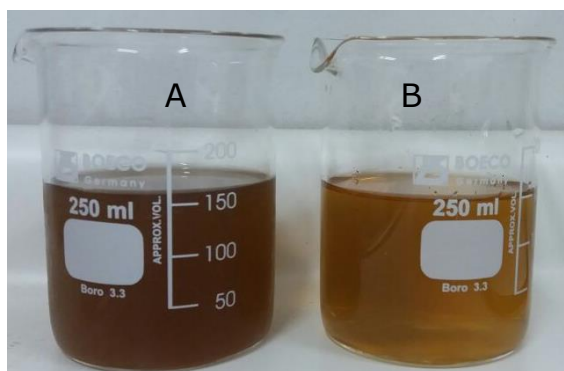


Figura 4-16: A) mosto antes de adsorción y B) mosto posterior a la adsorción

Se mide la concentración de proteínas con ambos métodos a los concentrados proteicos obtenidos (con buffer carbonato y NaOH), los cuales

se presentan en la Tabla 4-5. Considerando los valores de proteína del mosto inicial (Tabla 4-4), se tiene que con la primera desorción se recupera el 18% y 74% según los métodos Kjeldahl y Bradford, respectivamente. Mientras que con la segunda desorción el 12% y 55% con Kjeldahl y Bradford, respectivamente, también se tiene que realizando un balance de masa de la proteína desorbida, esta es superior a la proteína inicial, lo que se puede deber a posibles interferencias del hidróxido de sodio con el reactivo de Bradford.

Dado que los resultados son bastantes diferentes, se recomienda realizar un proximal de aminoácidos, la que por un lado entrega las concentraciones relativas de cada aminoácido y permite obtener su perfil, el cual debe ser semejante al de la Tabla 2-8 para ser utilizado en la alimentación de salmones.

Tabla 4-5: Mediciones de concentración de proteínas con el método de Bradford y Kjeldahl a los concentrados proteicos

Parámetro	Concentrado con buffer carbonato	Concentrado con NaOH
Proteína Bradford [mg]	359,5	268,6
Proteína Kjeldahl [mg]	3120,0	2187,5

Para un mosto normal se tiene que el precio del extracto es 0,8 [US\$/kg] a 80 [Brix], en el caso en que este pase por la columna, el rendimiento del proceso desciende un 0,5%, y con una producción de 4.000 toneladas de extractos al año, la pérdida sería de 20 mil [US\$/año]. En cuanto a los beneficios obtenidos al recuperar las proteínas, se tiene que los 25.000 litros de mosto producidos por batch, se recupera un 30% de la proteína inicial, de acuerdo a lo medido utilizando el método de Kjeldahl, lo que corresponde a una ganancia 280 mil [US\$/año]. Finalmente, en cuanto al costo de los equipos, estos comienzan en 16 mil dólares [52], por lo que la inversión si se utilizan 5 columnas sería recuperable en menos de un año, sin considerar los costos de operación y mantención de la columna.

Otro aspecto a considerar es una etapa siguiente de secado o concentración del concentrado proteico, el que requerirá una cantidad de energía significativa.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El objetivo principal de este trabajo de memoria fue diseñar un proceso a escala industrial para recuperar proteínas en el proceso de fabricación de extractos de malta, por lo que, a partir de la bibliográfica, se propone estudiar la cromatografía de intercambio iónico. El proceso propuesto debe realizarse entre las etapas de filtración y hervido, debido a que es necesario realizar un tratamiento enzimático con proteasas durante la maceración, con el objetivo de aumentar la concentración de proteínas del mosto.

Con el proceso seleccionado, se estudia su factibilidad a escala laboratorio. En la primera parte se estudian las variables de adsorción y desorción de las proteínas, realizando experimentos en batch. Se obtiene que el tiempo en que las proteínas y las zeolitas alcanzan el equilibrio es de 30 minutos y que la máxima adsorción de las proteínas es para un mosto con pH 4,7, siendo la masa adsorbida un 90% de la inicial. Agregar además que se probaron otras resinas, como las tierras diatomeas, pero el más alto resultado de adsorción de las proteínas fue obtenido utilizando zeolita.

Para la desorción se tiene que no es eficiente cambiándole la fuerza iónica al buffer adicionándole sal, pero sí cambiando el pH, es así como se logra más 90% de recuperación utilizando NaOH con pH 14, pero dada las desventajas de utilizar este tipo de soluciones en operaciones industriales, se recomienda utilizar un buffer carbonato 0,1 M a pH 10,8, que se obtiene cerca de 70% de recuperación.

Otra variable estudiada fue la temperatura, obteniendo que la recuperación de las proteínas solo disminuye un 5% cuando el mosto se encuentra a 70°C, por lo que la cromatografía puede ser realizada posterior a la etapa de filtrado, sin necesidad de enfriar el mosto.

Para realizar el escalamiento, se elabora una columna de lecho fijo, utilizando materiales como PVC y una bomba dosificadora. Con esto, se obtiene la curva de ruptura del proceso de adsorción y la capacidad de la resina de 2,1 [*g proteína/l de resina*]. Para determinar las dimensiones de la columna, se mantiene constante la altura del lecho de 0,1 [*m*], obteniendo un radio necesario de 9,4 metros para procesar la cantidad de mosto por batch. Por lo que se recomienda usar 22 columnas en paralelo de 2 metros de diámetro cada una, de acuerdo a los equipos industriales. Otra alternativa es utilizar 5 columnas de 0,5 [*m*] de alto, suponiendo que la capacidad no cambia con la altura, pero debe ser corroborado y medido con una columna en el laboratorio. Agregar que las columnas industriales actuales trabajan con buenos difusores

de flujo en su parte superior, para que el flujo se distribuya de forma uniforme en todo su ancho.

Para las otras etapas de la operación en columna, se recomienda utilizar un buffer acetato a pH 4,7 para lavar el lecho posterior a la adsorción, mientras que para la regeneración de la resina utilizar soluciones de NaOH, agua y buffer acetato a pH 4,7 para ambientarla para otro ciclo de adsorción. Además cuando se utiliza por primera vez la zeolita, realizarle un lavado para eliminar partículas pequeñas e impurezas.

También se estudió la alternativa de realizar la adsorción en el equipo hervido de la planta, obteniendo que es factible realizar el proceso en forma batch, pero están involucrados dos etapas adicionales de separación de la zeolita, las que en laboratorio fue realizada en centrifuga, pero este no es económico. Otra alternativa fue realizar el hervido del mosto junto con la zeolita, pero la proteína recuperada fue inferior al 20%. Por lo que se descartan ambas opciones.

Como este es la primera parte del proyecto, solo se estudió su factibilidad para separar las proteínas del mosto, pero la cromatografía puede ser utilizada para purificar proteínas uso que podría ser aprovechado en el caso que existiera una proteína de interés o en el caso contrario, alguna no deseada para el concentrado obtenido. Para estudiar esta utilidad se recomienda realizar los cromatogramas del ciclo completo del proceso para evaluar los *peaks* detectados.

De acuerdo con el último objetivo, se procede a evaluar algunas de las características de los productos, obteniendo que la cantidad de grados Brix disminuyen en un 0,5%, mientras que el color y turbidez el cambio fue más drástico, del orden del 50% y 90%, respectivamente, siendo el color un caso crítico que podría limitar su uso, por lo que se propone realizar una curva que puede relacionar el color con la proteína adsorbida.

En el caso de concentrado proteico, se mide su concentración utilizando Kjeldahl y Bradford obteniendo una cantidad de proteína recuperada del 31% y 90%, respectivamente, dado los dispar de los resultados, se propone repetir estas mediciones y realizar un análisis SDS-PAGE para determinar el tamaño y tipo de las proteínas presentes. Además, realizar un perfil de aminoácidos al concentrado, para obtener la concentración relativa a cada uno y evaluar su uso como fuente de proteínas para salmones.

Desde un punto de vista económico, la disminución de los grados Brix del mosto al pasar por la columna es mucho menor a los beneficios que se podrían obtener recuperando las proteínas, además el costo sólo de los equipos es posible de recuperar en un horizonte de tiempo menor a un año, pero hay que considerar además otros aspectos importantes, como por ejemplo regeneración de la zeolita y los otros insumos involucrados en el proceso como los buffers y soluciones y los costos de operación.

Por último, se concluye que la columna de cromatografía utilizando zeolita si permite recuperar proteínas, pero menos de la cantidad esperada, considerando los resultados obtenidos con el método de Kjendahl, por lo que es necesario continuar trabajando con el objetivo de maximizar el rendimiento. Y otro aspecto que hay que continuar investigando es una etapa de secado o de concentración del concentrado proteico.

Finalmente, es importante que se trabaje en la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas y de esta forma evitar la dependencia de proteínas de origen animal, la cual con el aumento de la población mundial se está haciendo insostenible. Además esta acción le permite a Maltexco diversificar sus productos y aumentar sus ganancias en el actual proceso de fabricación de extractos de malta.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Maltexco S.A. Historia [en línea]. <<http://www.maltexco.com/#historia>> [consulta: 8 agosto 2017].
- [2] MaltexcoFood. Productos [en línea]. <<http://www.maltexcofood.com/#productos>> [consulta: 8 agosto 2017].
- [3] MaltexcoFood.Extracto de malta [en línea]. <http://www.maltexcofood.com/extracto_malta.html> [consulta: 8 agosto 2017].
- [4] BOZZO, A. 2012. Optimización de proceso en planta productora de extracto de malta. Memoria de Ingeniero Civil Químico. Santiago, Universidad de Chile. 86 p.
- [5] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Capítulo 9: Macronutrientes: Carbohidratos, grasas y proteínas [en línea]. <<http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0d.htm>> [consulta: 20 septiembre 2017].
- [6] ASOCIACIÓN PROFESIONALES DE SALUD Y ALIMENTOS. Los concentrados proteicos, su funcionalidad y la suplementación alimentaria [en línea]. <http://apsal.org/concentrados_proteicos.php> [consulta: 1 septiembre 2017].
- [7] HARTMANN, C. y SIEGRIST, M. 2016. Benefit beliefs about protein supplements: A comparative study of users and non-users [en línea] The Journal Appetite Vol 103 [28 de septiembre de 2017].
- [8] HERNÁNDEZ A. 2010. Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2ª ed. 812 p.
- [9] RAMÍREZ, C. 2016. Estandarización de los procesos de fabricación de cervezas en planta piloto. Memoria de Ingeniero Civil Químico y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile.166 p.
- [10] TRAUB, J. 2015. Protein recovery from whisky by - products : a study of using ion exchange chromatography for the recovery of proteins from pot ale by Julio Enrique Traub Modinger Submitted for the degree of Doctor of Philosophy Heriot - Watt University Institute of Biol. Heriot-Watt University.282 p.
- [11] MARINE, Scanbio. 2016. Evaluation of barley protein concentrate and fish protein concentrate, made from trimmings, as sustainable ingredients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) feeds. Aquaculture Nutrition [en línea]. 10.1111/anu.12250

- [12] HOUGH, J.S. 1982. Biotecnología de la malta y cerveza. Acriba S.A., Zaragoza, España, 185 p.
- [13] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050 [en línea]. <<http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/I>> 2009 [consulta: 29 septiembre 2017].
- [14] GONG, M et al. 2016. Technical Issues Related Waste Sources [en línea]. Elsevier Inc. 0 p. ISBN 9780128023914. 10.1016/B978-0-12-802391-4/00005-7
- [15] SalmonExpert. La Nutrición de salmones se vuelve verde [en línea]. <<https://www.salmonexpert.cl/noticias/la-nutricion-de-salmones-se-vuelve-verde/>> [consulta: 12 septiembre 2017].
- [16] SALMONCHILE. Segundo Informe de Sustentabilidad Industrial del Salmón 2016 [en línea]. <http://www.salmonchile.cl/es/sustentabilidad_2016.php> 2016 [consulta: 1 enero 2017].
- [17] WILLOWS, Robert D et al. Barley Grain Proteomics. En: Proteomics in Food Science [en línea]. Elsevier Inc., 2017, p. 75-88. ISBN 9780128040072. 10.1016/B978-0-12-804007-2.00005-9
- [18] ESSLINGE, H. 2009. Handbook of Brewing: Process, Technology, Markets. Weinheim, Alemania.
- [19] UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO. Composición química de los cereales [en línea]. <http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php?option=com_content&view=article&id=16&Itemid=20&showall=1> 2013 [consulta: 10 octubre 2017].
- [20] DÍAZ, M. Consulta a Jefe de Calidad, Planta Talagante. Variedades de cebada en Maltexco [entrevista]. 2017
- [21] MALTEXCOFOOD. Proceso de Maltexco [en línea]. <http://www.maltexcofood.com/proceso_malteo.html> [consulta: 30 septiembre 2017].
- [22] MALTEXCOFOOD. Proceso Extractos [en línea]. <http://www.maltexcofood.com/proceso_extractos.html> [consulta: 30 septiembre 2017].
- [23] PACHECO, A. Consulta área comercial 2017, Planta Talagante. Precio Bagazo. [Entrevista]. 2017
- [24] DORAN, P. 1995. Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. Acriba S.A. London. 451 p.

- [25] GONZÁLEZ, J.P.. 2017. Solubilización de proteínas a partir de la cebada malteada por hidrólisis enzimática. Memoria de Ingeniero Civil Químico. Valparaíso, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- [26] CELUS, Inge et al. 2007. Enzymatic hydrolysis of Brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea]. 55(21): 8703–8710. ISSN 00218561. 10.1021/jf071793
- [27] LUND, Marianne N et al. 2014. Increased protein – thiol solubilization in sweet wort by addition of proteases during mashing [en línea]. (April): 467–473. 10.1002/jib.155
- [28] EVANS, De y HEJGAARD, J. 1999. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. *Journal of the Institute of Brewing* [en línea]. 105(3): 159–169. ISSN 00469750. 10.1002/j.2050-0416.1999.tb00015.x
- [29] IIMURE, Takashi y SATO, Kazuhiro. 2013. Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. *Food Research International* [en línea]. 54(1): 1013–1020. ISSN 09639969. 10.1016/j.foodres.2012.11.028
- [30] ERNSTER, J. 1970. Process for utilizing barley malt. United States patent US 3846397A
- [31] TRAUB, J. 2014. Protein recovery. WO 2016001683A1
- [32] GE, Healthcare. *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing. Principles and Methods*. 2010.
- [33] PICARIELLO, Gianluca et al. 2017. *Proteomic Analysis of Beer* [en línea]. Elsevier Inc. 383-403 p. ISBN 9780128040577. 10.1016/B978-0-12-804007-2.00023-0
- [34] IIMURE, Takashi et al. 2012. Proteome analysis of the wort boiling process. *Food Research International* [en línea]. 45(1): 262–271. ISSN 09639969. 10.1016/j.foodres.2011.10.033
- [35] Escalamiento de procesos para purificación de proteínas a gran escala: 8 de enero de 2017. 2017. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Centre of Biotechnology and Bioengineering.
- [36] KAMMERER, Judith et al. 2011. Adsorption and ion exchange: Basic principles and their application in food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea]. 59(1): 22–42. ISSN 00218561.

10.1021/jf1032203

- [37] SELAME, I. Lista de Precios.[en línea] En: <ivan.selame@zeolitadelmaule.com> 10 de agosto de 2017.
- [38] SIGMA ALDRICH. CM sephadex C-50 [en línea]. <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c50120?lang=es®ion=CL>> 2018 [consulta: 11 agosto 2017].
- [39] MATSUI, Masayoshi et al. 2015. Adsorption and desorption behavior of basic proteins on zeolites. Separation and Purification Technology [en línea]. 149: 103–109. ISSN 18733794. 10.1016/j.seppur.2015.05.023
- [40] WANG, Ya ru et al. 2017. Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal morphology in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Aquaculture Reports [en línea]. 5: 52–57. ISSN 23525134. 10.1016/j.aqrep.2016.12.005
- [41] S., C. 1919. Protein Assay Technical Handbook [en línea]. 262-263 p. ISBN 9784797328509. 10.1038/103262a0
- [42] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Capítulo 15: Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos [en línea]. <<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S17.htm>> [consulta: 8 septiembre 2017]
- [43] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Chapter 2: Methods of food analysis [en línea]. <<http://www.fao.org/docrep/006/Y5022E/y5022e03.htm>> [consulta: 8 septiembre 2017].
- [44] MUÑOZ, A. Ácido cítrico: Compuesto interesante. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2014[1] Maltexco S.A. Historia [en línea]. <<http://www.maltexco.com/#historia>> [consulta: 8 agosto 2017].
- [45] GRISELDA SOSA Y ANITA ZALTS. Adsorción de colorantes sobre tierras de diatomeas. Un trabajo de laboratorio con enfoque ambiental [en línea]. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2012000400011> 2012 [consulta: 5 septiembre 2017].
- [46] PATIL, Pravin et al. 2017. Chemodosimeter functionalized diatomaceous earth particles for visual detection and removal of trace mercury ions from water. Chemical Engineering Journal [en línea]. 327: 725–733. ISSN 13858947. 10.1016/j.cej.2017.06.138
- [47] LI, P. et al. 2018. Highly selective adsorption of dyes and arsenate from their aqueous mixtures using a silica-sand/cationized-starch composite. Microporous and Mesoporous Materials [en línea]. 263(December 2017):

210–219. ISSN 13871811. 10.1016/j.micromeso.2017.12.025

- [48] MARTÍN S. SILBERBERG. 2000. Química General. 1105 p.
- [49] DEWEY, Bruce Alberts y James. 1994. Biología molecular de la célula. Tercera.
- [50] JOHN M. SIMPSON. 1994. Protein Purification Process Engineering. 390 p.
- [51] GE HEALTHCARE. Product catalog Ion Exchange Chromatography GE. 2018
- [52] Columna de cromatografía. Identificación del producto: 60549444497. [en línea].<https://spanish.alibaba.com/product-detail/chromatography-column-60549444497.html?spm=a2700.8698675.29.6.717cc869aiE5kI>[consulta: 27 marzo 2018]
- [53] DÍAZ M. Ensayo agua de pozo Talagante .[en línea] En: <mdiaz@maltexco.com > 22 de noviembre de 2017.
- [54] PQC-Productos Químicos Chile- Precio ácido cítrico. [en línea] <<http://spqchile.cl/productos-quimicos/%C3%A1cido-c%C3%ADtrico-anhidro-detail.htm>> [consulta: 22 diciembre 2017]

ANEXOS

Anexo A: Proceso elaboración extractos Maltexco

En la Figura A-1 se presenta un diagrama de flujo del proceso de fabricación de extractos de Maltexco y a continuación los principales equipos en planta.

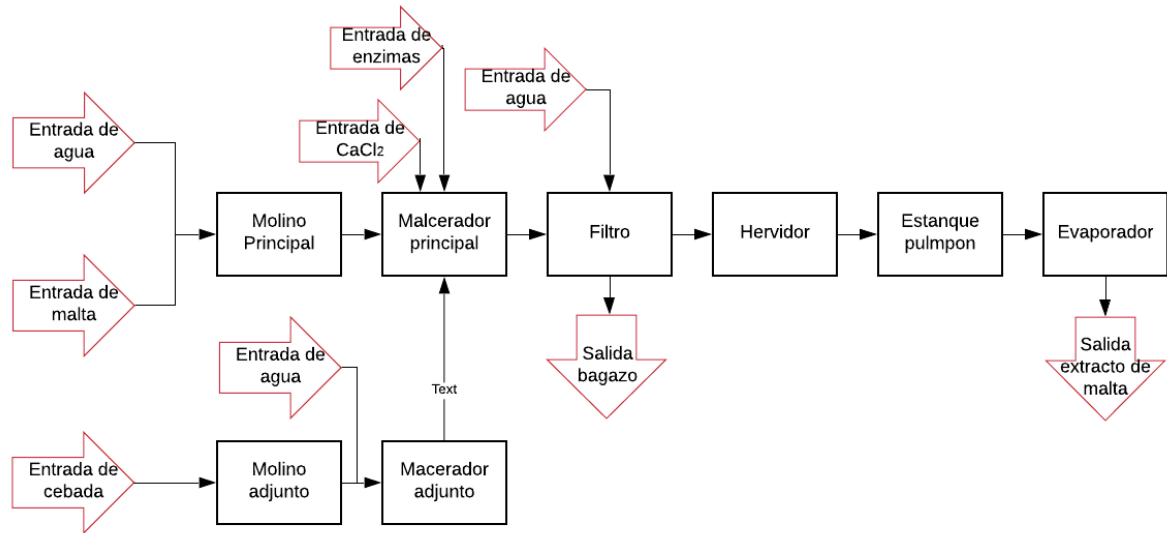


Figura A-1: Diagrama de flujo del proceso de extractos de malta en Maltexco [4]

El molino (Figura A-2) con el que se trabaja tiene una capacidad de 200 [kg/h] de malta y está diseñado para operar con malta y agua, por lo tanto, la carga debe ser coordinada entre la cantidad de malta y el flujo de agua.



Figura A-2: Equipo para la molienda en Maltexco [3]

El macerador principal de la Figura A-3 utiliza una proporción de malta molida y agua de 1:2,2 en relación másica. La cantidad de enzimas de α -amilasa y β -glucanasas adicionadas es de 0,5 y 0,25 litros por batch,

respectivamente. También se le adiciona cloruro de calcio para favorecer la actividad enzimática de la α -amilasa.

En la Tabla A-1 se tienen las principales enzimas de la malta durante la maceración, con sus respectivos pH y temperaturas óptimas.



Figura A-3: Equipo para la maceración en Maltexco [3]

Tabla A-1: Temperatura y pH óptimos de algunas de las enzimas de la malta presente durante la etapa de maceración [18]

Enzima	Temperatura optima [°C]	pH optimo	Sustratos	Productos
Endopeptidasa	45-60	3,9-5,5	Proteínas	Péptidos, aminoácidos libres
Carboxipeptidasa	50	4,8-4,6	Proteínas, péptidos	Aminoácidos libres
Aminopeptidasas	45	7,0-7,2	Proteínas, péptidos	Aminoácidos libres
Dipeptidasas	45	8,8	Dipéptidos	Aminoácidos libres
α -amilasa	65-75	5,6-5,8	Amilosa, amilopectina	Oligosacáridos
β -amilasa	60-65	5,4-5,6	Amilosa, amilopectina	Maltosa
Maltasa	45-40	6,0	Maltosa	Glucosa
Dextrinasa límite	55-65	5,4-5,6	Dextrinas límites	Dextrinas
β -glucano solubilasa	62-65	6,8	Matriz β -glucanos	β -glucanos solubles
Endo 1-3- β -glucanasa y Endo 1-4- β -glucanasa	<60	4,5-4,7	β -glucanos solubles	B-glucanos de bajo peso molecular, celobiosa, laminaibiosa.

El equipo utilizado para la filtración es un filtro Meura (Figura A-4) de 76 placas y a la torta generada se le realiza un lavado con agua a 78 °C a 5 [bar] de presión. Por lo tanto la composición de salida de mosto del filtro varia a lo largo del tiempo, comenzando con un mosto con alta concentración de azucares, la que disminuye progresivamente.



Figura A-4: Filtro prensa Meura en Maltexco [3]

Posterior al filtrado, el mosto es transportado al estanque de hervido, donde es calentado a 98 °C durante 15 minutos.



Figura A-5 : Equipo de hervido en Maltexco [3]

Anexo B: Método de Bradford

Tabla B-1: Proteína y agua utilizadas en curva de calibración método de Bradford

Estándar de proteína [μl]	Agua destilada [μl]
0	300
30	270
75	225
150	150
180	120

Tabla B-2: Valores obtenidos en la curva de calibración método de Bradford

Concentración proteína [mg/ml]	Promedio Absorbancia 595 [nm]	Desviación estándar
0,05	0,284	0,012
0,125	0,601	0,030
0,25	1,090	0,040
0,30	1,285	0,013

Anexo C: Método de Kjeldahl

Los reactivos y procedimiento utilizados para realizar la medición son los siguientes:

- Pastillas Kjeldahl (Merck)
- Ácido sulfúrico 98% (Merck)
- Hidróxido de sodio 40% (Merck)
- Ácido Sulfúrico 0,1N (Merck)
- Hidróxido de sodio 0,1N (Merck)
- Indicador Rojo de metilo

Antes de realizar la digestión, se toman 20 [ml] de muestra y son puestos en un matraz de Kjendahl, luego esta es colocada en el calefactor durante 90 minutos para ser concentrarla mediante evaporación.

• Digestión

Una vez concentrada la muestra se agrega 1 pastilla de Kjeldahl al matraz Kjeldahl y se vierten 20 [ml] de Ácido sulfúrico 98% utilizando una probeta graduada. El líquido interno se torna negro reflejo de la reacción de digestión (liberación de CO_2). Luego se coloca la campanilla en la boquilla del matraz y se lleva a digestión, dejando las perillas de la cocinilla al máximo durante 1 hora y media.

Previamente se debe abrir las válvulas del agua correspondientes al enfriamiento de la bomba de vacío y de enfriamiento del destilador. También se debe encender el extractor de gases para dejar operativo el equipo Kjeldahl.

• Neutralización

Cuando haya pasado el tiempo de digestión de la muestra, se apaga la cocinilla y es dejada en el mismo lugar para que se enfrié, durante aproximadamente 20 minutos.

Una vez enfriada se agregan 200 [ml] de agua destilada y luego 100 [ml] de hidróxido de sodio al 40%, poner de 4 a 6 perlas de ebullición. La muestra ahora tiene un color azul característico.

• Destilación:

Para realizar la destilación, se agregan 30 [ml] de ácido sulfúrico 0,1N en un matraz de Erlenmeyer de 250 [ml].

El matraz de Kjeldahl que contiene la muestra es insertado en el sistema de destilación (parte superior del equipo Kjeldahl) procurando que quede bien

sellado con el tapón. En la parte inferior del destilador hay un tubo de vidrio delgado y hueco por el cual desciende el líquido condensado, este tubo debe ser sumergido en el ácido del matraz de Erlenmeyer. Se abre la perilla de calentamiento del destilador a máxima potencia para que la ebullición sea rápida y se espera a que la muestra ebulle por un periodo de entre 15 a 30 minutos. El matraz de Erlenmeyer se llena entre 175 a 200 [ml] y se cierra la perilla de calentamiento.

• Titulación

A la muestra recepcionada con el matraz de Erlenmeyer se agregan 3 gotas de rojo de metilo.

Y en este punto puede generarse 2 escenarios:

- La muestra se torna rosada en cuyo caso se considera que el volumen de ácido es de 30 [ml] a ser considerados en la titulación.
- La muestra se torna color amarillo en cuyo caso se agrega tanto ácido sulfúrico 0,1N hasta asegurar que la muestra se torne color rosado. Consideramos que el volumen de ácido es de 30 [ml] + el volumen agregado, los que deben ser considerados en la titulación.

Una vez que la muestra este de color rosado, el matraz es puesto bajo el dispensador de Hidróxido de Sodio 0,1N. Se agrega el hidróxido 0,1N hasta que el líquido cambie a color amarillo, agitando constantemente el matraz de Erlenmeyer. Se registra la cantidad de Hidróxido de sodio como volumen de gasto.

Fórmulas para el cálculo de proteínas en mosto:

$$n_{ac} = M_{ac} \cdot V_{ac}$$

$$n_g = M_g \cdot V_g$$

$$n_{NH3} = n_{ac} \cdot 2 - n_g$$

$$n_N = n_{NH3}$$

$$C \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{n_N \cdot 14 \cdot 5,83}{V}$$

Nomenclatura:

n_{ac} : Moles de ácido 0,1N [mol]

n_N : Moles de nitrógeno [mol]

n_g : Moles de gasto de hidróxido [mol]

V: Volumen de muestra de mosto [ml]

M_{ac} : Molaridad del ácido [M]

M_g : Molaridad del hidróxido [M]

V_{ac} : Volumen de ácido [l]

V_g : Volumen de gasto de hidróxido [ml]

n_{NH3} : Moles de amoníaco [mol]

Anexo D: Caracterización agua de pozo planta Maltexco Talagante

A continuación, se presentan los análisis fisicoquímicos (Tabla D-1) del agua de pozo de la planta Maltexco de Talagante, la cual es la utilizada en la elaboración del mosto para la realización de las pruebas. La Tabla tiene valores obtenidos en una caracterización del agua realizada por una empresa externa.

Tabla D-1: Características fisicoquímicas del agua de pozo Planta Talagante [53]

Característica	Valor	Unidad
pH	7,55 (15,3 °C)	[–]
Turbiedad	<0,5	UNT
Conductividad	560	[$\mu S/cm$]
Cloruro	138,4	[mg/ml]
Fluoruro	<0,14	[mg/ml]
Nitrato	7,130	[mg/ml]

Anexo E: Ecuaciones escalamiento columna

Para realizar el escalamiento de la columna de adsorción se debe determinar la capacidad de la resina (C [g proteína/ l resina]) de forma experimental, en una columna alimentada continuamente de manera de poder determinar su curva de ruptura. La altura de la columna (H [m]) se conserva para el escalamiento.

De acuerdo a las condiciones del proceso, se tiene el volumen de mosto (V_m [m^3]) y la concentración de proteínas (c [g proteína/ l mosto]), se tienen la masa de proteína (P [kg]) del mosto en Ecuación E-1.

$$P = V_m \cdot c \quad \text{Ecuación E-1}$$

El volumen de resina (V_r [l]) para adsorber el total de proteína (P) está determinado por su capacidad, como se muestra en el Ecuación E-2.

$$V_r [m^3] = \frac{P}{C} \quad \text{Ecuación E-2}$$

El volumen de columna (CV [m^3]) es el que se muestra en la ecuación siguiente, con r [m] el radio de la columna.

$$V_r [m^3] = H \cdot \pi \cdot r^2 \quad \text{Ecuación E-3}$$

Igualando las últimas ecuaciones, se tiene que el radio de la columna es:

$$r = \sqrt{\frac{P}{C \cdot H \cdot \pi}}$$

Anexo F: Memoria de cálculo escalamiento columna de adsorción

Para el escalamiento se debe considerar los siguientes datos:

- Altura del lecho (H): 0,1 [m]
- Capacidad de la resina (C): 2,1 [g proteína/l resina]
- Volumen de mosto (Q): 25 [m³]
- Concentración mosto (c): 0,58 [g/l]

Con esto, la cantidad de proteína del mosto es de 14.500 [g], y considerando la capacidad de la resina, es necesario utilizar 6.904,7 [l] de zeolita.

Manteniendo la altura (H) constante e incrementando el radio de la columna (r), se tiene:

$$\pi \cdot (r)^2 \cdot H = 6.904,7 [l]$$

$$r = 4,7 [m]$$

Dividendo el volumen de mosto en 5, se tiene que la cantidad de resina necesaria, para 5.000 [l] de mosto es 1380 [l] y manteniendo la altura (H) constante e incrementando el radio de la columna (R), se tiene:

$$\pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot H = 1380,9 [l]$$

$$D = 2,1 [m]$$

Anexo G: Análisis de precios proceso de adsorción

Para la elección del pH del mosto, se realiza un breve análisis de precios, para esto se utiliza la siguiente información:

- Precio ácido cítrico: 1.140 [CLP/kg] [53]
- Precio venta proteína: = 2 [US\$/kg] [31]
- Concentración proteínas: 19 [g/l]
- 1 Batch=25.000 [l]
- Precio NaOH: 754 [CLP/kg]

Además, se define la Ganancia como:

$$Ganancia = Proteína_{desorbida} \left[\frac{kg}{batch} \right] \cdot 1267,7 \left[\frac{\$}{kg} \right] - Costo_{ads} \left[\frac{\$}{batch} \right] - Costo_{ajuste\ de\ pH}$$

El costo de ajuste de pH es solo para cuando el pH del mosto es menor a 5 y se debe subir a 5 luego de la adsorción.

Tabla G-1: Costos y ganancias para el cambio de pH del mosto

pH mosto	Proteína adsorbida [kg/batch]	Costo de adsorción [\$/batch]	Proteína desorbida [kg/batch]	Costo ajuste pH [\$/batch]	Ganancia [\$/batch]
4	431,9	328,2	328,24	1.342,1	341.524,6
4,7	423,05	321,5	321,51	3.013,9	379.022,4
5	389,4	295,9	295,95	0	372.758,3
5,4	372,9	283,4	283,47	0	362.530,0
5,6	327,5	248,9	248,94	0	323.62,6

El costo de adsorción es lo que se necesita de ácido cítrico para cambiarle el pH al mosto, para esto se utiliza el siguiente gráfico:

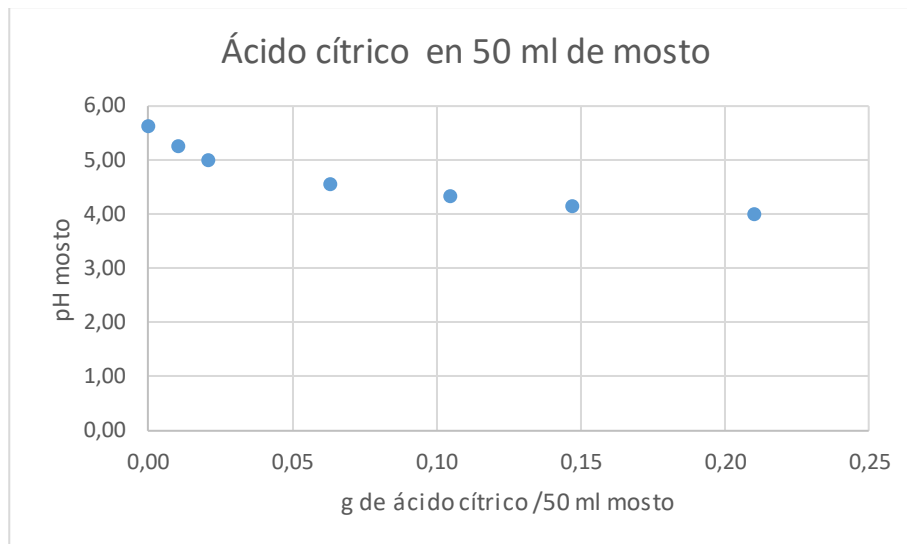


Figura G-1: Gramos de ácido cítrico para cambiar el pH del mosto

Mientras que para calcular la cantidad de NaOH se utilizaron las tres constantes de acidez del ácido cítrico, el que es poliprótico y está parcialmente disociado ($pK_1=3,128$, $pK_2=4,761$ y $pK_3=6,396$) para calcular la concentración de H^+ y posteriormente se calcula la cantidad de iones OH^- necesario, y dado que esta es fuerte, se considera disociación total.