

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**EXTRACCIÓN A ESCALA DE LABORATORIO DEL COMPLEJO DE
PROTEÍNAS PRESENTES EN LAS MEMBRANAS
INTERSTICIALES DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE
GALLINA (*Gallus Domesticus*) MEDIANTE EL PROCESO DE
HIDRÓLISIS ALCALINA**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
QUÍMICA**

ERIKA LORENA URBANO VARGAS
per_ikita19@hotmail.com

DIRECTORA: JENNY CUMANDÁ RUALES NÁJERA Ph.D.
jenny.ruales@epn.edu.ec

Quito, Abril 2015

© Escuela Politécnica Nacional (2015)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Erika Lorena Urbano Vargas, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Erika Lorena Urbano Vargas

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Erika Lorena Urbano Vargas,
bajo mi supervisión.

Jenny Ruales Ph.D.
DIRECTOR DE PROYECTO

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por iluminar mi camino y permitirme alcanzar esta meta.

A mis padres, Mónica y Washington por su paciencia y apoyo incondicional.

A mis hermanos, Evelyn y Danilo por siempre estar a mi lado.

A Walter, por ser amor y respaldo en momentos oportunos.

Un agradecimiento especial a la Doctora Jenny Ruales, por darme la oportunidad y guía para llevar a cabo este proyecto.

DEDICATORIA

Todo mi esfuerzo y entrega en este proyecto lo dedico a las personas más importantes en mi vida, mi familia.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
GLOSARIO	xiii
RESUMEN	xvi
INTRODUCCIÓN	xviii
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Generalidades de la cáscara de huevo de gallina	1
1.1.1. Modelo de biomineralización	1
1.1.2. Composición química	2
1.1.3. Funciones	2
1.1.4. Organización estructural	3
1.1.5. Proceso de formación	7
1.1.6. Usos y aplicaciones para los residuos de cáscara de huevo de gallina	10
1.1.6.1. Usos de la fracción cáscara sin membranas	11
1.1.6.2. Usos de la fracción membranas intersticiales	13
1.2. Estudio de las membranas intersticiales	15
1.2.1. Caracterización y función	15
1.2.2. Composición química	18
1.2.3. Perfil de aminoácidos	21
1.2.4. Descripción y usos de los principales constituyentes de la membrana de cáscara de huevo de gallina	22
1.3. Métodos de obtención de proteína a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina	23
1.3.1. Estudio de los procesos de separación entre la cáscara y membranas	23
1.3.1.1. Separación química por disolución de la fase mineralizada	23
1.3.1.2. Separación física por diferencia de densidades	25
1.3.1.3. Separación por tratamiento con microondas	30
1.3.2. Hidrólisis alcalina como método de solubilización de compuestos proteicos	31
1.3.2.1. Reacción de hidrólisis alcalina en proteínas	31
1.3.2.2. Hidrólisis de membranas intersticiales	33
2. PARTE EXPERIMENTAL	39
2.1. Determinación del proceso de separación entre la cáscara y las membranas intersticiales de los residuos de cáscara de huevo de gallina	39
2.1.1. Materia prima y tratamientos preliminares	39
2.1.2. Separación de las membranas intersticiales por diferencia de densidades a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina triturados	40

2.2.	Caracterización física y química de la cáscara con membranas, cáscara aislada y membranas aisladas	42
2.3.	Estudio de la extracción por hidrólisis alcalina de las proteínas presentes en las membranas intersticiales	45
2.3.1.	Diseño experimental	45
2.3.2.	Determinación del progreso de la hidrólisis a través del método colorimétrico con reactivo de Biuret	48
2.4.	Determinación de los procesos de acondicionamiento y de secado para el complejo proteico hidrolizado	50
2.4.1.	Acondicionamiento del pH	50
2.4.2.	Concentración de proteínas por ósmosis inversa	51
2.4.3.	Recuperación del hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales por liofilización	53
2.5.	Caracterización química del complejo proteico hidrolizado obtenido	53
2.5.1.	Determinación de las proteínas presentes en el producto final por electroforesis	54
2.5.2.	Perfil de aminoácidos por HPLC	55
2.6.	Desarrollo del diseño a escala piloto con base en las mejores condiciones obtenidas para la reacción de hidrólisis	55
2.7.	Estimación de los costos del diseño de planta	56
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1.	Proceso de separación entre cáscara y membranas	57
3.1.1.	Evaluación de las alternativas para el proceso de separación	57
3.1.2.	Comparación del proceso de separación patentado con respecto al implementado	59
3.1.3.	Rendimiento del proceso de separación por diferencia de densidades	61
3.2.	Análisis de caracterización de las fracciones: cáscara con membranas, cáscara aislada y membranas intersticiales aisladas	63
3.2.1.	Análisis de granulometría	63
3.2.2.	Análisis proximal, concentración de calcio y valor calórico	66
3.2.3.	Perfil de aminoácidos para la fracción membranas intersticiales	69
3.3.	Proceso de recuperación de proteínas a partir de membranas intersticiales	71
3.3.1.	Comparación del proceso de recuperación de proteínas patentado con respecto al implementado	71
3.3.2.	Análisis estadístico del diseño experimental aplicado al proceso de extracción de proteínas por hidrólisis alcalina	73
3.3.2.1.	Selección del tiempo de reacción de hidrólisis	73
3.3.2.2.	Estudio del efecto de la concentración de hidróxido de sodio y temperatura de reacción sobre el grado de hidrólisis	75

3.3.2.3. Características del mejor tratamiento	85
3.4. Caracterización del producto final	87
3.4.1. Análisis de humedad, proteína y cenizas	87
3.4.2. Determinación de proteínas por electroforesis	92
3.4.3. Perfil de aminoácidos	94
3.5. Planteamiento de un proceso alternativo para la recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina	96
3.6. Diseño a escala de planta piloto del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina	98
3.6.1. Capacidad o tamaño de la planta	99
3.6.2. Descripción detallada del proceso	99
3.6.3. Balance de masa	104
3.6.4. Dimensionamiento y selección de los equipos principales	106
3.6.5. Balance de energía	108
3.6.6. Diagrama de tuberías e instrumentación y descripción de la filosofía de control	110
3.6.7. Distribución de los equipos en planta o “layout”	112
3.7. Estimación de costos	112
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	118
4.1. Conclusiones	118
4.2. Recomendaciones	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXOS	131

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en biorremediación	11
Tabla 1.2.	Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en la industria cosmética	11
Tabla 1.3.	Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en el campo nutricional	12
Tabla 1.4.	Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana a nivel industrial	12
Tabla 1.5.	Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en el campo médico	13
Tabla 1.6.	Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en el campo médico	14
Tabla 1.7.	Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en la ingeniería de tejidos	14
Tabla 1.8.	Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en nanotecnología y biorremediación	15
Tabla 1.9.	Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en el campo cosmético	15
Tabla 1.10.	Composición de muestras de membrana de cáscara de huevo de gallina en base húmeda	18
Tabla 1.11.	Constituyentes proteicos típicos de las membranas testáceas de cáscara de huevo de gallina	20
Tabla 1.12.	Proteínas totales y perfil de aminoácidos presentes en las membranas intersticiales aisladas de cáscara de huevo de gallina	21
Tabla 1.13.	Condiciones del diseño experimental para el tratamiento con microondas de huevos de gallina	30
Tabla 1.14.	Composición resultante para concentrados de proteína solubilizada por diferentes procedimientos	37
Tabla 1.15.	Perfil de aminoácidos para el concentrado-hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales	38

Tabla 3.1.	Evaluación de los métodos de separación de los componentes de los residuos de cáscara de huevo de gallina	57
Tabla 3.2.	Registro de pesos de las fracciones obtenidas antes y después del proceso de separación por densidades	61
Tabla 3.3.	Análisis de granulometría para la fracción de cáscara de huevo con membranas	63
Tabla 3.4.	Análisis de granulometría para la fracción de cáscara sin membranas	64
Tabla 3.5.	Análisis de granulometría para la fracción de membranas intersticiales aisladas	65
Tabla 3.6.	Análisis proximal para la residuos de cáscara de huevo de gallina triturados	66
Tabla 3.7.	Análisis proximal para la fracción de cáscara de huevo sin membranas	67
Tabla 3.8.	Análisis proximal para la fracción de membranas intersticiales aisladas	68
Tabla 3.9.	Tabla comparativa para el perfil de aminoácidos de las membranas intersticiales	70
Tabla 3.10.	Porcentajes de proteína hidrolizada calculados	74
Tabla 3.11.	Tabla ANOVA para el grado de hidrólisis	76
Tabla 3.12.	Coefficientes de regresión y de determinación para el modelo ajustado	79
Tabla 3.13.	Estimación de la media global y de los efectos para el grado de hidrólisis	81
Tabla 3.14.	Tabla de medias para el grado de hidrólisis con intervalos de confianza LSD	82
Tabla 3.15.	Análisis de humedad, proteína y cenizas para el producto final	88
Tabla 3.16.	Balance de masa para los procesos de hidrólisis alcalina y centrifugación	90
Tabla 3.17.	Balance de masa para los procesos de neutralización, ósmosis inversa y liofilización	90
Tabla 3.18.	Concentración de aminoácidos para el producto hidrolizado y liofilizado	95

Tabla 3.19.	Flujo de energía requerido para la reacción de hidrólisis alcalina	109
Tabla 3.20.	Flujo de energía retirado por la chaqueta de enfriamiento en los procesos de reacción por acondicionamiento de pH.	109
Tabla 3.21.	Inversión total de capital para la planta piloto de tratamiento de RCHG	115
Tabla AIII.1.	Aleatorización de las 27 observaciones para el diseño experimental 3^2	141
Tabla AIII.2.	Planteamiento de las hipótesis nulas y alternativas a probarse a través del método ANOVA	143
Tabla AIV.1.	Construcción de la curva de calibración para el método de Biuret	145
Tabla AV.1.	Características de la membrana AFC99 del módulo de ósmosis inversa Micro 240	147
Tabla AIX.1.	Datos de la concentración medida por espectrofotometría	158
Tabla AXII.1.	Valores de los parámetros para el diseño del tanque de sedimentación de RCHG	179
Tabla AXIII.1.	Valores obtenidos para la estimación calórica de la reacción de hidrólisis	184
Tabla AXIV.1.	Cantidad de productos generados debido a la reacción de neutralización	186
Tabla AXIV. 2.	Valores utilizados y obtenidos para la estimación calórica de la reacción de precipitación de proteínas	188
Tabla AXIV.3.	Cantidad de productos generados debido a la reacción de neutralización	189
Tabla AXIV.4.	Valores obtenidos para la estimación calórica de la reacción de neutralización	190
Tabla AXV.1.	Rango de factores para convertir los costos del equipo a nivel de planta a inversión en capital fijo	192
Tabla AXV.2.	Estimación del costo FOB del sistema de sedimentación para RCHG	194
Tabla AXV.3.	Precios de los equipos principales obtenidos por cotizaciones	195

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.1.	Fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM), de la estructura de la cáscara de huevo de gallina	3
Figura 1.2.	Fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM), de las membranas de la cáscara de huevo de gallina	4
Figura 1.3.	Esquema de la estructura de la capa en empalizada que forma parte de la cáscara de huevo de gallina	5
Figura 1.4.	Fotografías de microscopio electrónico de barrido de los poros presentes en la capa en empalizada	6
Figura 1.5.	Esquema de la formación del huevo de gallina en el oviducto	8
Figura 1.6.	Esquema y fotografía de la ubicación y estructura de las membranas testáceas del huevo de gallina	16
Figura 1.7.	Fotografías de microscopio electrónico de barrido de la membrana externa de cáscara de huevo	17
Figura 1.8.	Estructura general de las glicoproteínas	19
Figura 1.9.	Estructura general de un proteoglicano	20
Figura 1.10.	Disolución de la cáscara de huevo de gallina en HCl de distintas concentraciones a 20°C	24
Figura 1.11.	Esquema del funcionamiento del equipo para la separación física de las membranas intersticiales y cáscara a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina	25
Figura 1.12.	Descripción de los componentes del agitador de brazo de arrastre	28
Figura 1.13.	Descripción del equipo para la separación física de las membranas y cáscara a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina	29
Figura 1.14.	Esquema del mecanismo de reacción de hidrólisis sobre el enlace peptídico	32
Figura 1.15.	Proceso de extracción de proteínas a partir de membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina	34
Figura 3.1.	Proceso implementado para la separación de partículas de cáscara y membranas	59

Figura 3.2.	Diagrama de flujo del proceso de concentración de proteínas a partir de RCHG implementado	72
Figura 3.3.	Gráfica de efectos principales para el factor grado de hidrólisis	77
Figura 3.4.	Diagrama de Pareto estandarizado para el grado de hidrólisis	78
Figura 3.5.	Superficie de respuesta estimada para el grado de hidrólisis	80
Figura 3.6.	Gráfico de medias para la concentración de NaOH con intervalo LSD	83
Figura 3.7.	Gráfico de medias para la temperatura de reacción con intervalo LSD	83
Figura 3.8.	Gráfico de interacciones de medias de acuerdo con la prueba LSD con 95,00 % de confianza	85
Figura 3.9.	Secuencia de cambios en las membranas intersticiales durante el progreso de la reacción de hidrólisis a 45,0 °C y 5,00 % de NaOH	86
Figura 3.10.	Cambios en el grado de hidrólisis con el tiempo para 45,0 °C y 5,00 % de NaOH	87
Figura 3.11.	Placa de gel de gradiente 8-25 de poliacrilamida con marcadores de proteínas y muestras	93
Figura 3.12.	Diagrama de bloques del proceso alternativo para recuperación de proteínas a partir de RCHG a nivel de laboratorio	97
Figura 3.13.	Diagrama de bloques del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (BFD)	100
Figura 3.14.	Diagrama de flujo del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (PFD)	101
Figura 3.15.	Hoja de flujos y corrientes del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (FLOWSHEET)	105
Figura 3.16.	Diagrama de tuberías e instrumentación del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (P&ID)	111

Figura 3.17.	Distribución de los equipos en planta del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (LAYOUT)	113
Figura AI.1.	Proceso y equipos utilizados para la trituración de residuos de cáscara de huevo de gallina	132
Figura AI.2.	Proceso y equipos utilizados para el secado de los residuos de cáscara de huevo de gallina triturados	133
Figura AI.3.	Proceso y equipos utilizados para la separación por diferencia de densidades de residuos de cáscara de huevo de gallina	134
Figura AI.4.	Proceso y equipos utilizados para la separación y secado de las fracciones cáscara sin membranas y membranas intersticiales	135
Figura AII.1.	Equipos e instrumentos utilizados para la trituración de membranas para el proceso de hidrólisis	136
Figura AII.2.	Equipos e instrumentos utilizados para el proceso de hidrólisis y centrifugación	137
Figura AII.3.	Equipos e instrumentos utilizados durante el proceso de acondicionamiento de pH	138
Figura AII.4.	Equipo y resultados antes y después del proceso de ósmosis inversa	139
Figura AII.5.	Fotografías de producto final obtenido después del proceso de liofilización	140
Figura AV.1.	Diagrama del equipo de ósmosis inversa Micro 240	146
Figura AV.2.	Fotografía del equipo de ósmosis inversa Micro 240	147
Figura AVI.1.	Liofilizador STOKES con detalle de sus principales componentes	149
Figura AVI.2.	Componentes del interior de la cámara de liofilización	150
Figura AVI.3.	Interfaz Hombre – Máquina (HMI) para monitoreo de los parámetros del proceso de liofilización	150
Figura AVII.1.	Equipo PhastSystem para electroforesis	151
Figura AVII.2.	Unidad de separación y control	151
Figura AVII.3.	Unidad de revelado	151
Figura AVIII.1.	Uso del aplicador de muestras del equipo PhastSystem	155

Figura AIX.1.	Curva de calibración elaborada con suero de albúmina bovina	159
Figura AX.1.	Curva de valoración para el hidrolizado de proteína de membranas intersticiales de RCHG	161
Figura AX.2.	Fotografías de los cambios en el hidrolizado por cambios en el pH	161
Figura AXII.1.	Correlaciones entre el C_D para partículas esféricas y el Re	173
Figura AXII.2.	Proporciones geométricas para el sistema de agitación	175
Figura AXII.3.	Correlaciones empíricas de Re_a vs N_p para agitadores de uso común	176
Figura AXII. 4.	Composición de las corrientes para el tanque de separación de RCHG	177
Figura AXV.1.	Costo FOB para el 2002 de sistemas de agitación	193
Figura AXV.2.	Costo FOB para el 2002 de recipientes de almacenamiento y de mezcla	193

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Proceso de extracción de las membranas intersticiales	132
ANEXO II	
Proceso de extracción de proteínas por hidrólisis alcalina	136
ANEXO III	
Diseño factorial 3^2	141
ANEXO IV	
Protocolo para la cuantificación de proteínas por colorimetría con reactivo de Biuret	144
ANEXO V	
Descripción del equipo de ósmosis inversa	146
ANEXO VI	
Descripción del equipo de liofilización	148
ANEXO VII	
Equipo Phast System [®] para electroforesis	151
ANEXO VIII	
Protocolo para la determinación de pesos moleculares por SDS-PAGE	152
ANEXO IX	
Monitoreo de la reacción de hidrólisis alcalina	158
ANEXO X	
Curva de valoración para el hidrolizado de proteína de membranas intersticiales	161
ANEXO XI	
Hojas de especificaciones técnicas de los equipos principales	162

ANEXO XII

Criterios de diseño para el separador de RCHG por diferencia de densidades 172

ANEXO XIII

Balance de energía en el reactor de hidrólisis alcalina 180

ANEXO XIV

Reactores de acondicionamiento de pH para el hidrolizado de proteína de membranas intersticiales 185

ANEXO XV

Estimación del capital de inversión fija 191

GLOSARIO

Aminoazúcar o aminosacárido: Es un compuesto formado por una molécula de glucosa que contiene un grupo amino (NH_2) en lugar de un grupo hidroxilo (OH) (Ara, 2004, p.232).

Electroforesis: Es una técnica para la separación de proteínas con base en su carga neta, en un campo eléctrico (Lomonte, 2007, p. 78).

Enzimas proteolíticas o proteasas: Son enzimas que degradan a las proteínas hasta sus aminoácidos constitutivos por hidrólisis. Estas enzimas reconocen y fijan pequeñas secuencias parciales del sustrato y luego hidrolizan enlaces relativamente específicos entre ciertos residuos de aminoácidos (Koolman y Röhm, 2004, p.176).

Escleroproteínas: Son proteínas de estructura fibrosa que desempeñan funciones estructurales y de protección, a esta clase pertenecen la queratina, el colágeno y la elastina (Hicks, 2001, p. 469).

Extracto etéreo: Corresponde al porcentaje de sustancias que se extraen con éter etílico, como son los lípidos, ceras, alcoholes, pigmentos y ácidos grasos orgánicos (Caravaca et al., 2003, p. 252).

Gel de gradiente: Es un gel separador de proteínas de concentración heterogénea, donde la poliacrilamida va aumentando a lo largo del gel, es utilizado para separaciones de muestras con pesos moleculares muy variados (Lomonte, 2007, p. 95).

Glicoproteínas: Proteínas que resultan de la unión de una fracción proteica y una fracción glucídica como son: osas, desoxiosas, hoxosaminas y ácidos siálicos (Hernández y Sastre, 1999, p. 67).

Glicosaminoglicanos o mucopolisacáridos: Son cadenas de polisacáridos extremadamente largas en las cuales los grupos hidroxilo no glicosídicos están sustituidos por grupos amino (Müller, 2008, p. 22).

Liofilización: Es un proceso de secado mediante sublimación utilizado con el fin de reducir pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles (Ramírez, 2006, p.1).

Método de Biuret: Se basa en la formación de un complejo coloreado violeta-púrpura, entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos de las proteínas en medio básico, que presenta un máximo de absorción a 540 nm (Fernández y Galván, 2006, p. 1).

Polipéptidos: Son largas cadenas de aminoácidos, los mismos que se unen entre sí a través de enlaces peptídicos o enlaces amidas, que corresponden a la unión entre un grupo amino y un grupo carbonílico (Müller, 2008, p. 33).

Proteínas conjugadas o heteroproteínas: Proteínas que resultan de la unión de estructuras polipeptídicas con compuestos de naturaleza química diferente: glúcidos, lípidos, metales etc. (Hicks, 2001, p. 469).

Proteínas simples u holoproteínas: Proteínas que por hidrólisis no liberan más que aminoácidos o derivados de los aminoácidos (Hicks, 2001, p. 467).

Proteoglicano: Son macromoléculas formadas por la unión de glicosaminoglicanos a proteínas (Hernández y Sastre, 1999, p. 68).

Secado por aspersion (Spray drying): En este proceso, el material de alimentación es líquido y entra atomizado hacia una cámara por la que circula aire caliente, con lo que el líquido se evapora dejando solo las partículas sólidas (Terrizano, 2002, p. 295).

Secado por contacto de paletas (Paddle drying): Es un proceso de secado en el cual el material húmedo se seca en un canal o cilindro cerrado mientras se mezcla por un conjunto de agitadores de paletas montados horizontalmente (Baker, 1997, p.125).

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue extraer el complejo proteico presente en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina (abreviado como RCHG) mediante el proceso de hidrólisis alcalina, para lo cual, en la etapa inicial de la investigación, se aplicó el método de separación por diferencia de densidades, para aislar la fase proteica (membranas) de la fase mineral (cáscara). Con la separación de los constituyentes de los RCHG, se realizaron análisis de caracterización para cada una de las fases, los cuales determinaron que las membranas intersticiales son una fuente significativa de proteína, puesto que contienen alrededor de 71,19 % p/p de proteína, mientras que la fase mineral contiene altas concentraciones de calcio, ya que alcanza valores de 94 mg de Ca / g material.

Para el proceso de solubilización de proteínas por hidrólisis alcalina, se estudió la influencia estadística sobre el factor de respuesta: grado de hidrólisis, de los factores de diseño: concentración de hidróxido de sodio y temperatura de reacción, en los niveles: 1,00 %, 3,00 %, 5,00 % y 45,0 °C, 52,5 °C y 60,0 °C, respectivamente. El grado de hidrólisis fue definido como el porcentaje de proteína hidrolizada detectada por colorimetría con reactivo de Biuret. El diseño experimental utilizado fue del tipo factorial 3^2 , de manera que se llevaron a cabo 9 tratamientos con 2 réplicas cada uno. El análisis estadístico determinó que el mejor tratamiento para el proceso de hidrólisis alcalina fue 5,00 % p/p para la concentración de solución de hidróxido de sodio y 45,0 °C como temperatura de reacción, puesto que permitió alcanzar un grado de hidrólisis superior al 80,00 %.

El hidrolizado de proteína de membranas intersticiales fue sometido a centrifugación, seguido de etapas de acondicionamiento de pH, concentración por ósmosis inversa y secado por liofilización. El producto final fue un concentrado en polvo de proteína hidrolizada de membranas de cáscara de huevo, con una concentración de 49,94 % de material proteico.

Adicionalmente, se conceptualizó el diseño de un proceso a nivel de planta piloto que obedece a métodos alternativos, y permite la obtención de un producto final con niveles de concentración de hasta el 93,00 % de proteína, con lo que se marca un importante antecedente para futuras investigaciones. El diseño desarrollado, además del producto principal, permite la recuperación de dos subproductos con valor comercial: albúmina técnica y cáscara de huevo aislada.

INTRODUCCIÓN

La cáscara de huevo de gallina (abreviada como CHG) históricamente se ha considerado como un desperdicio o residuo sólido. Valdés (2007) define a los residuos sólidos como “aquellas sustancias o materiales que se han generado por una actividad productiva o de consumo, de los que hay que desprenderse por no ser de utilidad para la fábrica o establecimiento que los generó” (p. 10).

Los RCHG son comúnmente eliminados en vertederos, sin ningún tratamiento previo. La aplicación directa en el suelo de grandes cantidades de estos residuos ha traído graves problemas ambientales, ya que contaminan el aire. Al descomponerse en vertederos, los RCHG liberan a la atmósfera metano, gas cuya capacidad de aportar al calentamiento global es 21 veces más alta que el CO₂. Debido a este problema ambiental, la EPA (Agencia de Protección Ambiental) de EEUU, a fines de los años 90, identificó a los RCHG como el desecho número 15 en la lista de problemas de contaminación debidos a las industrias alimenticia y de incubación (Glatz, Miao y Rodda, 2011, p. 216; Sonenklar, 1999).

La generación masiva de estos residuos se da por parte de: plantas de incubación y criaderos de gallinas, industrias de repostería, fábricas productoras de salsas, pastas y ponches, a las que se suman las industrias que procesan al huevo para vender los componentes de interés (albúmina y yema), en forma congelada, líquida, pasteurizada o en polvo. De acuerdo con el último censo avícola realizado por el MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca) conjuntamente con la Corporación Nacional de Avicultores (CONAVE), en el Ecuador existe una producción anual de alrededor de 2 500 millones de huevos comerciales, los mismos que producen aproximadamente 14 900 toneladas anuales de RCHG, de los que se estima, el 90,00 % se deposita sin ningún tratamiento en los rellenos sanitarios (CONAVE, 2006).

La subida de los costos de eliminación de residuos, y las normativas y concienciación medioambientales, han conducido a las empresas generadoras de

RCHG a la búsqueda de alternativas sostenibles para la gestión de estos desechos. Los métodos tradicionalmente usados por estas industrias, para convertir sus residuos en productos de valor añadido, son la generación de: compost, fertilizante, agentes de calcificación para la enmienda de las tierras, biogás, productos alimenticios y piensos para animales (Glatz et al., 2011, p. 217).

El tratamiento y la utilización eficaz de los residuos biológicos han ganado notoriedad en la sociedad actual, por lo que los métodos tradicionales de recuperación y aprovechamiento de los RCHG se han llevado a niveles más elevados. Estudios realizados en los últimos 15 años han demostrado que los RCHG pueden convertirse en materia prima de gran valor agregado, capaz de aportar desde minerales como el calcio hasta proteínas como el colágeno, al ser sometidos a procesos de extracción y purificación (Long, Adams, DeVore y Franklyn, 2008, p. 14).

Son de especial interés las membranas que se encuentran pegadas a la cáscara, debido al gran valor que aportan por su naturaleza proteica. Dichas estructuras conocidas como membranas intersticiales representan el 3,00 % del peso total de las RCHG y presentan una composición de alrededor de 35,00 % en colágeno (Long et al., 2008, p. 14). El valor potencial del colágeno de membranas de cáscara de huevo de gallina es enorme, especialmente para el campo médico, donde el colágeno purificado puede venderse en alrededor de 1 000 dólares por gramo (MacNeil, 2001, p. 4).

El presente estudio presenta un proceso de tratamiento para recuperar proteínas a partir de los RCHG, a manera de un concentrado liofilizado de proteínas hidrolizadas de membranas intersticiales, cuyo método no tradicional de obtención y sus múltiples usos le otorgan un valor comercial elevado.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. GENERALIDADES DE LA CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA

1.1.1. MODELO DE BIOMINERALIZACIÓN

La cáscara del huevo de gallina, ave que pertenece a la especie *Gallus gallus*, subespecie *domesticus*, representa aproximadamente del 9,00 al 12,00 % del peso total de un huevo, lo que significa alrededor de 5 a 7 g y constituye un sistema biomineralizado que consta de dos fases o matrices: una orgánica y otra mineral cristalina o inorgánica (Barroeta, Izquierdo y Pérez, 2010, p. 7; Fernández y Arias, 2010, p. 1).

La fase orgánica está compuesta principalmente por proteínas, lípidos, proteoglicanos y glicoproteínas y constituye alrededor del 3,00 al 3,50 % del peso total de la cáscara. Mientras que, la fase mineral corresponde al 95,00 %, aproximadamente del peso de la cáscara. Esta fase es el resultado del depósito de minerales, entre ellos el calcio, que son secretados en solución por células particulares del organismo de la gallina, los mismos que cristalizan y se estructuran juntos según un plan de construcción definido (Fernández y Arias, 2010, p. 1; Lammie, Bain y Wess, 2005, p. 722).

Debido a las propiedades estructurales y mecánicas de la cáscara, en la que la interacción de las fracciones orgánica e inorgánica dan como resultado un material de un grado inherente de flexibilidad con comportamiento de "rotura frágil", algunos autores definen a la cáscara de huevo de gallina como una biocerámica (Rodríguez, Kalin, Nys y García, 2002, p. 396).

La formación de la fase mineral se da en un medio acuoso, a relativamente bajas temperaturas y es regulada por determinados componentes de la matriz orgánica. El proceso de precipitación de minerales que forman la cáscara se caracteriza por

un control espacio – temporal preciso de su secuencia de eventos, lo que permite que la mineralización se realice solamente en los sitios en los que es requerida. La velocidad de depósito de la fase inorgánica, en la gallina, es de alrededor de 5 g de calcio por día, lo que hace del proceso de calcificación de la cáscara de huevo de gallina uno de los modelos de biomineralización más rápidos conocidos en la naturaleza (Fernández y Arias, 2010, p. 1; Li et al., 2011, p. 8743).

1.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La cáscara de huevo de gallina químicamente está compuesta de 1,60 % de agua, 3,30 % de materia orgánica y 95,10 % de minerales, de los cuales: 93,60 % corresponden a carbonato de calcio (CaCO_3) en su forma morfológica como calcita, 0,80 % de carbonato de magnesio (MgCO_3) y 0,73 % de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Fernández y Arias, 2010, p. 2; Solomon, 1999, p. 7).

Cordeiro y Hincke (2011) reportaron que el 39,00 % de la composición de la cáscara de huevo corresponde a calcio elemental. Aunque el calcio es el mineral predominante, los investigadores encontraron también cantidades útiles de otros microelementos como el fósforo y el magnesio (p. 3).

1.1.3. FUNCIONES

La función principal de la cáscara del huevo es la de proteger y albergar el embrión de la agresión externa, una función que debe ser compatible con la rotura fácil desde el interior para permitir la eclosión del embrión. Además, su estructura permite el intercambio por difusión de agua y gases entre el embrión y el medio ambiente durante el desarrollo extrauterino y reduce la probabilidad de penetración bacteriana (Board y Fuller, 1994, p. 33; Nys, Gautron, García y Hincke, 2004, p. 549).

La cáscara de huevo actúa también como una fuente de calcio para el crecimiento del embrión, su estructura porosa facilita la movilización de calcio para alimentar al embrión por disolución de microcristales de calcita. Por otra parte, las funciones

de control de temperatura y camuflaje, están asociadas con las moléculas de porfirina, las mismas que le confieren el color marrón característico a la cáscara (Board y Fuller, 1994, p. 33; Nys et al., 2004, p. 550).

1.1.4. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL

La cáscara de huevo se compone de cinco capas, morfológicamente distintas, que se fabrican de forma secuencial durante el paso del huevo a través del oviducto. Desde el exterior hacia el interior estas capas son: cutícula, capa en empalizada, capa mamilar, membrana externa y membrana interna. Una fotografía de microscopio electrónico de barrido de estas estructuras se muestra en la Figura 1.1 (Rose y Hincke, 2009, p. 2708).

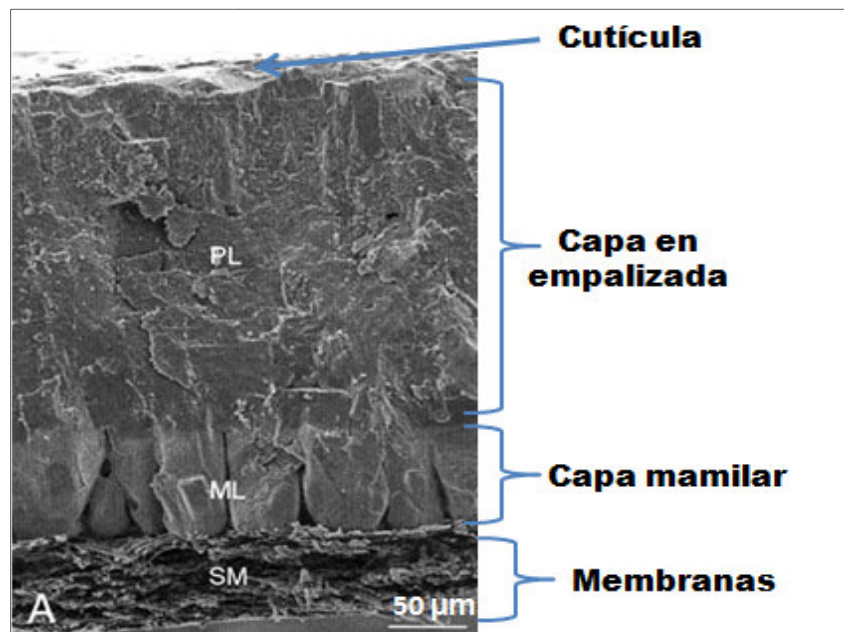


Figura 1.1. Fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM), de la estructura de la cáscara de huevo de gallina (Rose y Hincke, 2009, p. 2708)

En la Figura 1.2 se muestra la estructura de las membranas exterior e interior de la cáscara de huevo, a través de una fotografía de microscopio electrónico de barrido (Rose y Hincke, 2009, p. 2708).

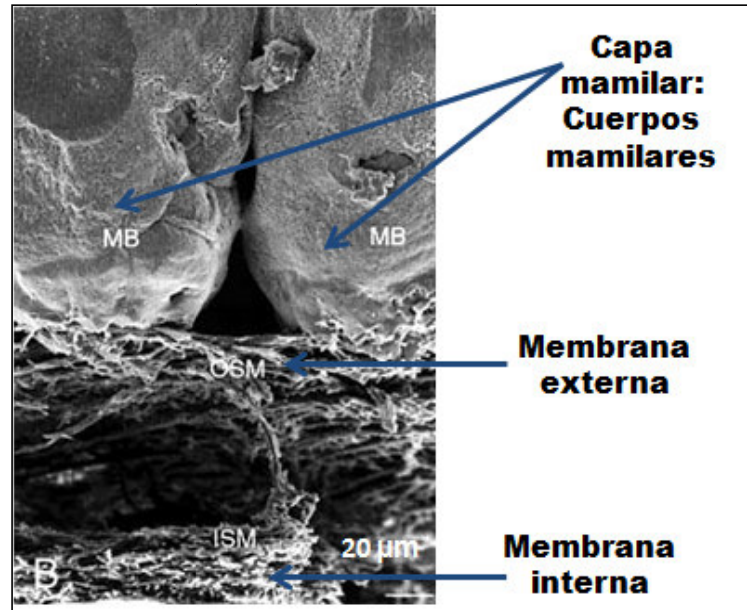


Figura 1.2. Fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM), de las membranas de la cáscara de huevo de gallina
(Rose y Hincke, 2009, p. 2708)

Los componentes que conforman las cinco capas se depositan sucesivamente a manera de una línea de ensamblaje, a medida que el huevo avanza a lo largo del oviducto. Sus características y funciones específicas se detallan a continuación:

Cutícula

La cutícula se deposita sobre la superficie de la cáscara durante la fase final de formación del huevo, se distribuye de manera desigual y su espesor varía desde 0,5 hasta 12,8 μm . En ella se encuentran en gran mayoría los pigmentos (moléculas de porfirinas) responsables de la coloración de la cáscara (Board y Fuller, 1994, p. 1; Fernández y Arias, 2010, p. 6).

La cutícula se compone de 85,00-87,00 % de proteína, 3,50-4,40 % de carbohidratos, 2,50-3,50 % de lípidos y 3,50 % de cenizas. Cumple con dos funciones, la principal es la reducción de la pérdida de agua y la secundaria es cumplir con el rol de primera línea de defensa contra la penetración bacteriana. La

cutícula tiene una vida útil efectiva de 96 h, después de la oviposición (Board y Fuller, 1994, pp. 2-4; Martel, Du y Hincke, 2012, p. 2697).

Capa en empalizada

Esta capa corresponde a la capa más gruesa de la cáscara de huevo, con un espesor aproximado de 200-350 μm . Su nombre se debe a la estructura de columnas que forman los cristales de calcita, con una organización paralela a manera de un cerco o vallado (Fernández y Arias, 2010, p. 5).

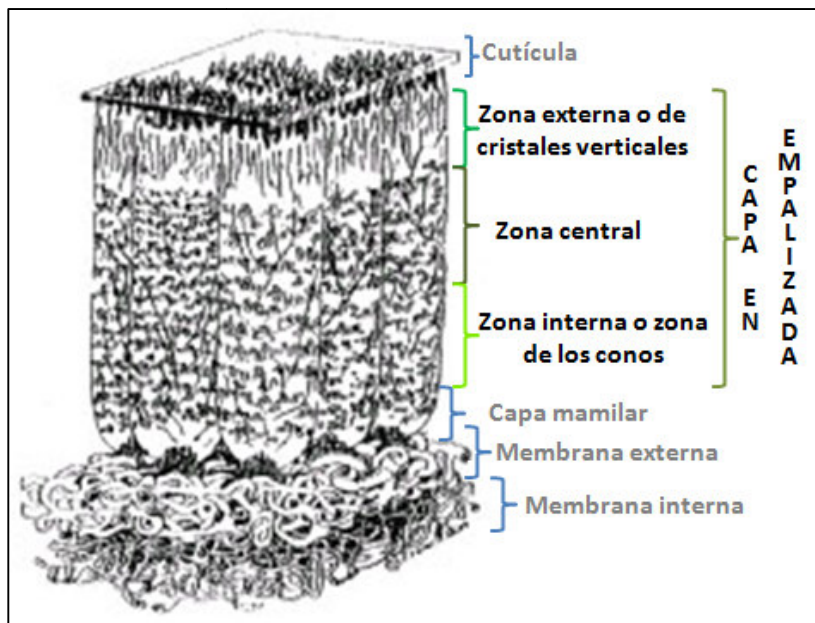


Figura 1.3. Esquema de la estructura de la capa en empalizada que forma parte de la cáscara de huevo de gallina (Fernández y Arias, 2010, p. 2)

Estudios morfológicos y cristalográficos han determinado la existencia de tres zonas, las mismas que se muestran en el esquema de la Figura 1.3 y se describen a continuación:

Zona interna o zona de los conos: Es la zona más interna y está formada por cristales de calcita, que no presentan una orientación definida.

Zona central: En esta zona, los cristales de calcita adoptan una cierta orientación vertical y entre ellos se encuentran abundantes agujeros vesiculares, que varían en número y tamaño.

Zona externa o de cristales verticales: Esta zona tiene un grosor de 3-8 μm y en ella, la cristalización cambia de dirección hacia una orientación vertical (Board y Fuller, 1994, p. 5; Fernández y Arias, 2010, p. 5).

La capa en empalizada posee poros, tal como lo indica la Figura 1.4, los cuales permiten el intercambio gaseoso y resultan de la falta de sellamiento entre columnas cristalinas vecinas.

Los poros atraviesan verticalmente esta capa. Tienen forma de embudo con su base amplia dirigida hacia la superficie y presentan un diámetro de 6 μm en el extremo que enfrenta las membranas de la cáscara y de 65 μm en el extremo que enfrenta la cutícula. Se estima que el número de poros varía entre 100-300 por cm^2 de cáscara, lo que constituye desde 7 000 hasta 15 000 poros (Barroeta, 2002, p. 47; Fernández y Arias, 2010, p. 5).

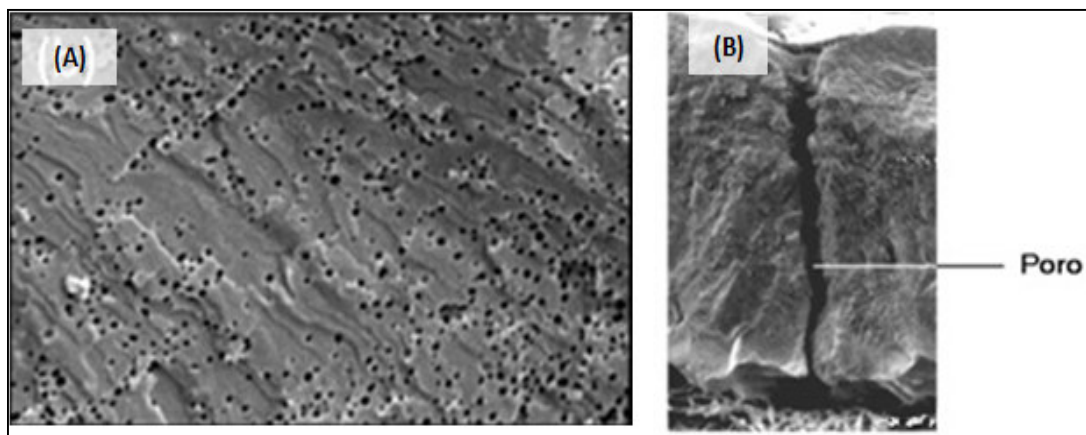


Figura 1.4. Fotografías de microscopio electrónico de barrido de los poros presentes en la capa en empalizada: (A) Vista de los poros con resolución de 2 μm en un corte longitudinal de la cáscara de huevo (B) Vista de uno de los poros con resolución de 50 μm en un corte transversal de la cáscara de huevo de gallina
(Hassan, Rangari, Rana, Jeelani, 2013, p. 1311)

Capa mamilar

La capa mamilar tiene un grosor aproximado de 100 μm . Está formada por las mamilas o también conocidas como perillas mamilares, que constituyen pequeñas masas de material orgánico distribuidas de manera discreta en toda la capa y que se hallan unidas a la superficie externa de la membrana externa. Es a partir de las mamilas que se inicia la mineralización por el depósito de cristales de calcita, constituyéndose de esta manera la base de las columnas cristalinas de la capa en empalizada (Fernández y Arias, 2010, p. 4; Fernández, Escobar, Lavelin, Pines y Arias, 2003, p. 172).

El primer contacto entre la membrana externa y la capa mamilar se hace por las fibras de la membrana que penetran en las perillas mamilares hasta una profundidad de 20 μm , con lo que se genera un anclaje con la matriz orgánica. La capa mamilar está constituida por cristales pequeños de calcita, puesto que los cristales columnares más grandes forman la región en empalizada (Board y Fuller, 1994, p. 19; Rodríguez et al., 2002, p. 396).

Membranas externa e interna

Las membranas de la cáscara de huevo de gallina que también son conocidas como membranas intersticiales, membranas testáceas o fárfaras, constituyen la materia primordial de experimentación en la que se basa la presente investigación, por lo tanto, se dedica el subcapítulo 1.2 para un estudio detallado de estas estructuras.

1.1.5. PROCESO DE FORMACIÓN

La formación de la cáscara de huevo supone un gran esfuerzo fisiológico por parte de la gallina, ya que, durante un periodo de 21 a 23 h, todos los componentes requeridos son sintetizados y transportados hasta un lugar de formación específico en el oviducto, para luego disponerse en la secuencia, cantidad y orientación adecuada (Barroeta, 2002, pp. 46-48).

En la Figura 1.5, se muestran las distintas partes del sistema reproductor de la gallina, sus funciones y el tiempo que toma cada etapa de la formación de los constituyentes del huevo. Las zonas donde ocurre la aparición de las membranas y la cáscara han sido resaltadas.

Parte Anatómica (cm)		Funciones	Tiempo	
Ovario	7 Folículos		Formación de gametos	150 días
		Deposito de yema	10 días	
Oviducto	9 Infundíbulo	Fecundación M. Vitelanas	20 min	
	33 Magno	Deposito Albumen	3 h 30 min	
	10 Istmo	Membranas testáceas	1 h 15 min	
	10 Útero	Hidratación Albumen Formación cáscara	21 h	
	10 Vagina Cloaca	Ovoposición	1 h 30 min	

De 24 a 26 horas

Figura 1.5. Esquema de la formación del huevo de gallina en el oviducto (Barroeta, 2002, p. 48)

El oviducto aviar es un órgano tubular, responsable de la formación del huevo por la secreción de los componentes que rodean la yema. Morfológica y funcionalmente, tal como lo indica la Figura 1.5, el oviducto puede dividirse en cinco regiones: infundíbulo, magno, istmo, (que contiene al istmo rojo o glándula tubular de la cáscara), útero o glándula de la cáscara propiamente dicha y vagina. El istmo rojo y el útero están implicados en la formación de la cáscara de huevo. Las membranas intersticiales se forman en el istmo, mientras que las capas mineralizadas de la cáscara se forma en el útero; estos procesos demoran 1 h con 15 min y 21 h, respectivamente (Fernández y Arias, 2010, p. 7; Fernández, et al., 2003, p. 171).

El proceso de formación de las capas que componen la cáscara de huevo de gallina inicia cuando el huevo en formación llega al istmo. Aquí las glándulas tubulares se encargan de rodear al albumen con secreciones proteicas en forma de largos filamentos, los mismos que constituirán las dos membranas. Son estas glándulas las responsables de la producción de colágeno tipo X, principal constituyente de las membranas intersticiales. Esta secreción inicia 3,5 h después de la ovulación, alcanza su máxima producción a las 5 h y luego disminuye hasta desaparecer a las 6 h (Fernández y Arias, 2010, p. 8 y Barroeta, 2002, p. 52)

Las fibras de colágeno adquieren paulatinamente una superficie uniforme y se ubican exclusivamente en estructuras que nunca mineralizan, que son las membranas, lo que sugiere que esta proteína tendría un efecto inhibitorio a la mineralización. Aunque las membranas de la cáscara de huevo no participan directamente en el proceso de mineralización de la cáscara, su presencia es indispensable para su formación (Fernández y Arias, 2010, p. 8; Barroeta, 2002, p. 53).

Aproximadamente a las 5,5 h después de la ovulación, el huevo en formación se encuentra en el extremo distal del istmo rojo, donde se forma la capa mamilar. Al abandonar esta región, el huevo alcanza la glándula de la cáscara, aquí tiene el mayor tiempo de permanencia, de 18 a 22 h, y es donde se produce, la mineralización de la cáscara. En el útero, el huevo se encuentra en una solución sobresaturada de carbonato cálcico que se va depositando, en forma de calcita, alrededor y sobre las fibras que constituyen la membrana testácea externa. Durante este proceso ya se van definiendo los poros que atravesarán la cáscara. A las 12 h post-ovulación, continúa una fase de calcificación rápida que da lugar a la capa en empalizada. Durante las dos últimas horas de formación de la cáscara, se detiene la mineralización y se inicia el depósito de la cutícula. Luego del depósito de ésta, la glándula de la cáscara se contrae y expulsa el huevo hacia la vagina. Finalmente, y luego de 1,5 h, aproximadamente, nuevas contracciones producen la expulsión del huevo completamente formado a través de la vagina (Barroeta, 2002, p. 53; Fernández et al., 2003, p. 172).

1.1.6. USOS Y APLICACIONES PARA LOS RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA

En los últimos 15 años, la atención se ha centrado en la utilización de diversos biomateriales naturales, tales como: la quitina del exoesqueleto de los insectos, el quitosano o “chitosan” presente en las “cáscaras” de los camarones, y el colágeno presente en los residuos de cáscara de huevo de gallina; desechos que a menudo se pueden obtener a muy bajo precio. La atención se debe a que estos compuestos se derivan de materiales sintetizados por los animales, por lo que muestran algunas afinidades para los seres humanos y, por lo tanto, estarán disponibles para su uso en alimentos y materiales médicos y cosméticos (Cheng, Takenaka, Aoki, Murakami y Aoki, 2009, p. 373).

La cáscara del huevo de gallina y sus membranas son materiales de desecho baratos y abundantes, cuyos usos tradicionales son como alimento para animales, como cal sustituta o como fertilizante. Sin embargo, la separación de este residuo en sus constituyentes minerales (cáscara) y proteicos (membranas), permite el desarrollo de diferentes aplicaciones para cada material, dando lugar a productos de mayor valor agregado (Cordeiro y Hincke, 2011, p. 1).

Las compañías de ovoproductos (derivados del huevo de gallina), durante más de 10 años, han invertido en la investigación y desarrollo de procesos que permitan la extracción de productos con potencial aplicación comercial a partir de sus residuos. El alcance de estos estudios ha dado lugar a un sinnúmero de usos tanto para las membranas intersticiales como para la cáscara limpia.

Muchos de ellos han sido desarrollados de manera exitosa y rentable, de tal forma que actualmente se encuentran como aplicaciones patentadas. A su vez, las investigaciones realizadas han marcado precedentes importantes para futuros e innovadores usos de estos residuos.

1.1.6.1. Usos de la fracción cáscara sin membranas

Los beneficios para la salud del consumo de cáscara de huevo de gallina en polvo, como un suplemento de calcio, han demostrado resultados significativos y beneficios por reducción de la pérdida ósea. Los estudios clínicos con mujeres posmenopáusicas y en personas con osteoporosis u osteopenia mostraron que la ingesta de calcio en polvo extraído de la cáscara de huevo gallina se asocia con un aumento en la densidad mineral ósea (DMO) de la cadera y de la columna lumbar (Cordeiro y Hincke, 2011, p. 3).

Los usos adicionales en el campo médico y en otros campos, junto con algunas aplicaciones futuras de la cáscara de huevo de gallina sin membrana, se describen a partir de la Tabla 1.1 hasta la Tabla 1.5.

Tabla 1.1. Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en biorremediación

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Remoción de metales pesados del agua	La cáscara de huevo pulverizada resultó muy eficaz para adsorber los colorantes aniónicos a partir de muestras de agua y también para la adsorción de metales pesados tales como iones de Fe (III) de soluciones acuosas
Remoción de metales pesados de suelos utilizando cáscara pulverizada	Los suelos contaminados con metales pesados pueden ser también remediados por el uso de cáscara de huevo pulverizado. Una patente informa que la mezcla de cáscara de huevo pulverizada con suelo contaminado con Cr, Cd y Cu, puede reducir su concentración

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 3-5)

Tabla 1.2. Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en la industria cosmética

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Limpiador facial	La cáscara de huevo a manera de micropartículas ha sido utilizada como producto cosmético, a manera de un agente de limpieza facial

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 3-5)

Tabla 1.3. Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en el campo nutricional

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Vinagre enriquecido en calcio	El calcio presente en la cáscara de huevo se puede extraer, al sumergir las partículas de cáscara en vinagre durante unos 3 días. Luego filtrar y utilizarlo para ensaladas
Suplemento de calcio	Un proceso de calentamiento fue desarrollado para obtener polvo de cáscara de huevo para su uso como un suplemento en alimentos
Síntesis de carbonato de calcio	Un proceso utiliza ácido clorhídrico de grado alimenticio para extraer carbonato de calcio sin metales pesados en su composición
Síntesis de glutamato de calcio	La cáscara de huevo en polvo es también una fuente para la síntesis de compuestos como el glutamato de calcio que se puede utilizar como suplemento de calcio, sustituto de la sal y agente aromatizante
Síntesis de fosfatos monocalcico y dicalcico	Fosfatos monocalcico y dicalcico se produjeron usando la cáscara de huevo para su uso como suplementos de calcio y fosfato en la alimentación de animales de granja
Síntesis de calcio orgánico	Fumarato de calcio y maleato de calcio, con una buena absorción por el cuerpo humano, fueron obtenidos a partir de la cáscara de huevo

(Cordeiro y Hincke, 2011, p. 3 y Campos, 2010, p. 18)

Tabla 1.4. Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana a nivel industrial

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Fertilizante	Pequeñas cantidades de cáscara son suficientes para tener un impacto positivo sobre el proceso de fertilización
Relleno para materiales compuestos	Un material de relleno se forma a manera de un compuesto de polipropileno con cáscara de huevo triturada
Tiza	De características similares a la tiza para dibujar en la pizarra, pero con la diferencia que no agrieta la piel como la hace la tiza común
Recubrimiento de papel para impresión por inyección de tinta	El carbonato de calcio presente en la cáscara de huevo debido, a su estructura de macroporos, mejora el brillo y densidad óptica de las tintas y, en general, la calidad de impresión
Producción de hidrógeno puro	El carbonato de calcio presente en la cáscara, en una futura aplicación, podría intervenir en el proceso de generación de combustible a base de hidrógeno, ya que constituye uno de los materiales más absorbentes de la naturaleza y puede retener el dióxido de carbono para generar hidrógeno puro

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 1-3; Yoo, Hsieh, Zou y Kokoszka, 2009, p. 6416 y Campos, 2010, p. 18)

Tabla 1.5. Usos y aplicaciones de la cáscara de huevo sin membrana en el campo médico

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Extracción de polipéptidos para el crecimiento de osteoblastos	Una extracción química de polipéptidos activos a partir de tejido de cáscara de huevo blando y duro fue patentada para su aplicación en la estimulación del crecimiento de los osteoblastos. Esto sugiere un posible medicamento oral para el tratamiento de trastornos óseos.
Síntesis de polvo cerámico con contenido de nanopartículas de hidroxiapatita	La producción de polvo cerámico que contiene partículas de nano-hidroxiapatita de la cáscara de huevo calcinado para su uso como un sustituto óseo es objeto de una aplicación futura
Implantes y prótesis como sustituto de tejido óseo	La hidroxiapatita producida a partir de la cáscara de huevo presenta características similares al tejido óseo

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 3-5)

1.1.6.2. Usos de la fracción membranas intersticiales

Las membranas de huevo de gallina son una fuente de componentes bioactivos, los mismos que están presentes en cantidades significativas en comparación con otras fuentes conocidas. Sus aplicaciones en los campos biomédico, de alimentos y cosméticos se ven afianzadas por pruebas en las que se demostró la baja respuesta autoinmune y de reacciones alérgicas en humanos (Cordeiro y Hincke, 2011, p. 5).

Las membranas de cáscara de huevo aisladas se han utilizado como un suplemento dietético. De acuerdo a estudios, la ingestión de glicosaminoglicanos y proteínas de las membranas ha resultado ser beneficiosa para las articulaciones y la salud de los tejidos conectivos. Los ensayos clínicos realizados demostraron que los pacientes con osteoartritis de rodilla, al recibir una dosis de 500 mg de membranas intersticiales diariamente, experimentaron una notable reducción en el dolor y rigidez articular (DeVore, Long, Osborne, Adams y Franklin, 2007, pp. 1-3).

Algunas características de las membranas como la estructura porosa interconectada, la capacidad de transporte de nutrientes y la prevención ante la

penetración de bacterias, sugieren su uso como un biomaterial. Una reciente aplicación ha desarrollado un apósito biológico para promover la curación de heridas totalmente libres de infección (Torres, Troncoso, Piaggio e Hajar, 2010, pp. 3687-3688).

Los usos anteriormente mencionados y algunas aplicaciones futuras de las membranas intersticiales se describen desde la Tabla 1.6 hasta la Tabla 1.9.

Tabla 1.6. Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en el campo médico

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Extracción de ácido hialurónico	El ácido hialurónico presente en la membrana de la cáscara de huevo, al ser aislado, puede usarse para el tratamiento de la osteoartritis y enfermedades periodontales
Extracción de componentes bioactivos	A través de la evaluación del efecto inhibidor de componentes aislados de las membranas intersticiales se observaron propiedades anti-inflamatorias
Tratamiento de la hipertensión	Algunos compuestos extraídos de la hidrólisis enzimática de la membrana de la cáscara de huevo se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión
Tratamiento de trastornos gastrointestinales	En algunos casos, el polvo de membrana de cáscara de huevo extraído por medio de un método sencillo que mantiene los compuestos nutricionales originales se utilizan para el tratamiento de trastornos gastrointestinales
Bio-plataforma de inmovilización	Las membranas son fáciles de combinar con diversas biomoléculas como enzimas, proteínas y anticuerpos, por lo que pueden ser utilizadas para inmovilizar las biomoléculas y con ello mantener su actividad en latencia

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 3-5 y Tang, Li, Kang, Zhong y Zhang, 2009, pp. 200-201)

Tabla 1.7. Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en la ingeniería de tejidos

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Yeso adhesivo para tratar heridas	La membrana de cáscara de huevo fresca puede ser utilizada como un adhesivo de tejido antimicrobiano
Recubrimientos para heridas	Las fibras hechas a partir de membrana de cáscara de huevo se han desarrollado por un método de electrohilado, con lo que se obtiene fibras que se adhieren fuertemente a la piel para luego formar parte de ella

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 1-3)

Tabla 1.8. Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en nanotecnología y biorremediación

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Soporte de poros nanométricos	Las membranas pueden ser usadas como soporte para la formación de un fotocatalizador de poros nanométricos de carbono con adición de TiO ₂ . Puede aplicarse con éxito para degradar contaminantes orgánicos en las aguas residuales industriales
Bio-plantilla o bio-soporte	Las membranas intersticiales pueden usarse como un soporte natural que permita el desarrollo de nanoestructuras metálicas, las cuales se usan a manera de bloques de construcción para dispositivos electrónicos
Separador de iones metálicos	Las membranas se unen a iones metálicos y otras moléculas de carga positiva con lo que se posibilita su separación

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 1-5)

Tabla 1.9. Usos y aplicaciones de las membranas intersticiales en el campo cosmético

USO/APLICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Crema o maquillaje en polvo	Se utilizó hidrolizado de membrana de cáscara de huevo para producir cosméticos que, debido a su contenido de colágeno, evitan la formación de arrugas de la piel, además presentan como beneficios adicionales el mejoramiento de la elasticidad y el grosor de la piel. En un estudio se determinó que una forma soluble de bio-crema / loción bio-agua, que mejora la apariencia de la piel, se puede producir mediante la combinación de ácido láctico con membrana de cáscara de huevo pulverizada
Cosmético para prevenir arrugas	

(Cordeiro y Hincke, 2011, pp. 4-5)

1.2. ESTUDIO DE LAS MEMBRANAS INTERSTICIALES

1.2.1. CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN

Las membranas de la cáscara de huevo de gallina se conocen también como membranas testáceas, membranas intersticiales o fárfaras y corresponden a las capas más internas de la cáscara.

Juntas tienen un espesor aproximado desde 65 hasta 96 μm . Se encuentran dispuestas en dos capas, una interna de 15-26 μm de espesor, que está en contacto con la albúmina y otra externa de 50-70 μm de grosor, que está situada entre la zona mineralizada de la cáscara y la membrana interna. Estas dos membranas están en íntimo contacto en toda su extensión, excepto a nivel de la cámara de aire, como lo indica la Figura 1.6. El contacto entre las membranas interna y externa, se describe como un enlace irregular y tenue (Board y Fuller, 1994, p. 19; Fernández y Arias, 2010, pp. 2-3; Tang et al., 2009, p. 200).

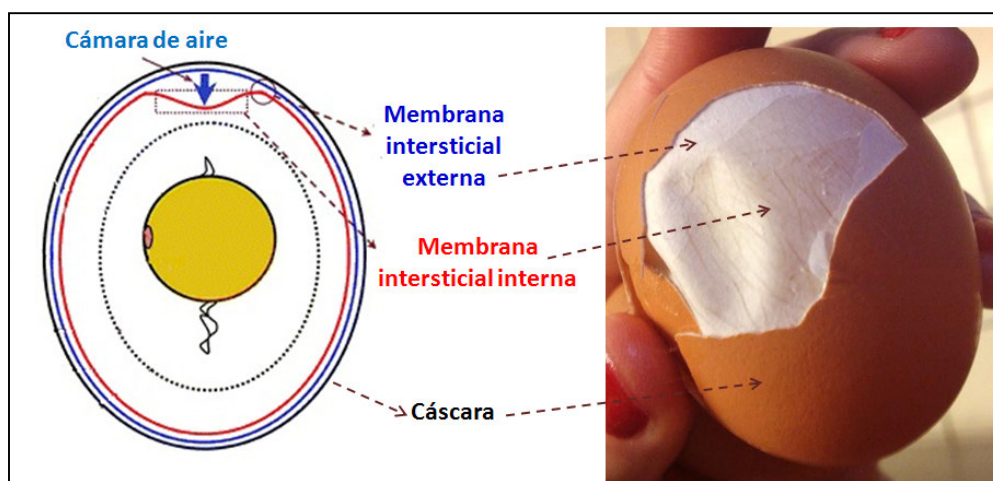


Figura 1.6. Esquema y fotografía de la ubicación y estructura de las membranas testáceas del huevo de gallina (Lee et al., 2009, p. 3609)

Cada membrana está formada por una red de fibras orgánicas dispuestas sobre la albúmina en una disposición paralela a la superficie de la cáscara, tal como lo muestra la Figura 1.7.

La membrana externa tiene intersticios más grandes que las dimensiones bacterianas (superior a 5 μm) y está formada por fibras gruesas, con un espesor promedio de 1-3 μm . Mientras que la membrana interna es más porosa y está conformada por fibras delgadas. El diámetro de las fibras internas es en promedio de 0,9 μm , con un máximo de 1,5 μm (Arias, Fernández, Dennis y Caplan, 1991, p. 39; Board y Fuller, 1994, p. 19).

Las membranas testáceas representan en promedio el 3,00 % del total del peso de la cáscara, lo que significa que, de cada 100 g de residuos de cáscara de huevo de gallina, 3 g corresponden a las membranas intersticiales (Barroeta, 2002, p. 47).

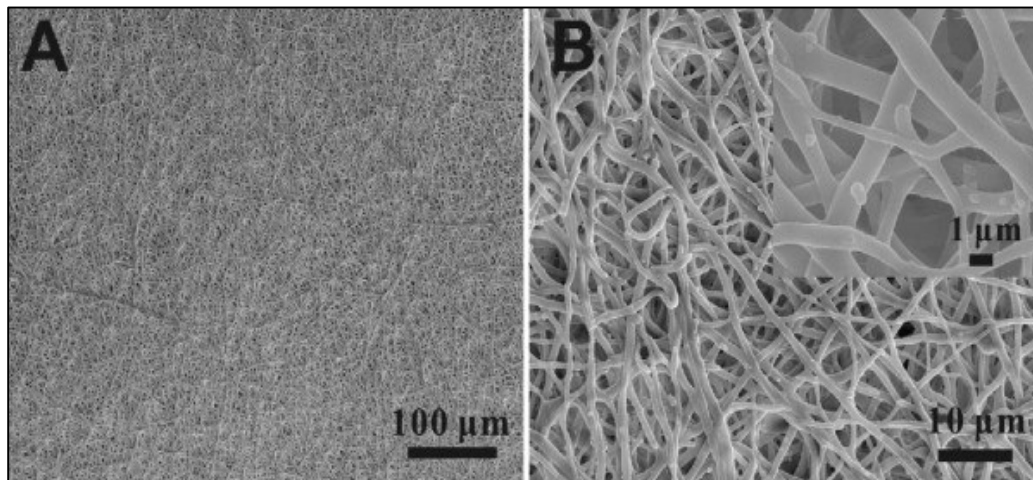


Figura 1.7. Fotografías de microscopio electrónico de barrido de la membrana externa de cáscara de huevo: (A) con resolución de 100 µm y (B) con resoluciones de 10 y 1 µm (Yu, et al., 2012, p. 465)

Debido a su estructura de malla, ambas membranas desempeñan un papel importante en obstruir la invasión de microorganismos e impedir la contaminación microbiana. La membrana interna es la barrera más efectiva en la prevención de la penetración de bacterias, la cáscara ocupa el segundo lugar y la membrana externa es la de menor efectividad. Sin embargo, las membranas son capaces de imponer sólo una barrera temporal para el movimiento interior de las bacterias. Estudios realizados indicaron que las membranas podrían proporcionar restricción mecánica por un período de hasta 20 h (Board y Fuller, 1994, pp. 70-80).

Las membranas tienen también la función de soporte de la estructura mineral que se constituye como la cáscara; ambas están involucradas en el movimiento del ión calcio desde la cáscara y en el proceso de difusión de gases. Se ha informado que las fárfaras son semipermeables, propiedad gracias a la cual las moléculas pequeñas son permeadas de manera selectiva (Board y Fuller, 1994, pp. 79, 80; Nakano, Ikawa y Ozimek, 2003, p. 510).

Las membranas de la cáscara juegan un papel de control en la determinación de la conformación y la composición de la cáscara. La localización y la conformación de sus componentes proteicos son esenciales para guiar el patrón de la deposición de los cristales de la cáscara (Arias et al., 1991, p. 38).

1.2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La parte orgánica de las membranas de la cáscara, en base seca, está constituida por 3,00 % de lípidos, 2,00 % de polisacáridos y 95,00 % de proteínas, de acuerdo con lo que establecen estudios realizados en el laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Universidad de Chile (Fernández y Arias, 2010, p. 3).

En otro estudio realizado por DeVore et al. (2007), se determinó la composición química de las membranas intersticiales en base húmeda; para esto, se realizó un proceso de deshidratación parcial luego del aislamiento de las membranas. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la Tabla 1.10 (pp. 4-5).

Tabla 1.10. Composición de muestras de membrana de cáscara de huevo de gallina en base húmeda

Componente	Porcentaje (%)
Agua	13,90
Proteína	82,20
Lípidos	2,70
Carbohidratos	0,60
Cenizas	0,60

(DeVore et al., 2007, pp. 4,5)

La fracción proteica de las membranas testáceas contiene colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. En un corte transversal se observa que cada fibra está compuesta por un núcleo rico en colágeno, el cual se encuentra rodeado por un manto rico en glicoproteínas y proteoglicanos. Los núcleos de las fibras de la

membrana exterior contienen predominantemente colágeno tipo I, mientras que los de la membrana interior contienen los tipos I y V. El colágeno de tipo X también se ha identificado en ambas capas y funciona como un inhibidor a la mineralización para prevenir que la clara y la yema sean mineralizadas (Fernández et al., 2003, p. 172; Li et al., 2011, p. 8743).

El manto de proteoglicanos y glicoproteínas es importante en la determinación de las propiedades viscoelásticas de las membranas ya que confieren la capacidad de adoptar la consistencia de un gel sólido con buena resistencia a las fuerzas de compresión. Tanto las glicoproteínas como los proteoglicanos se clasifican como heteroproteínas (Hicks, 2001, pp. 469-470; Stryer, 1995, p. 276). La Figura 1.8 esquematiza la organización de las glicoproteínas. En las fárforas se ha detectado en cantidades significativas la presencia de glucosamina, que corresponde a la fracción glucídica de las glicoproteínas presentes en el manto.

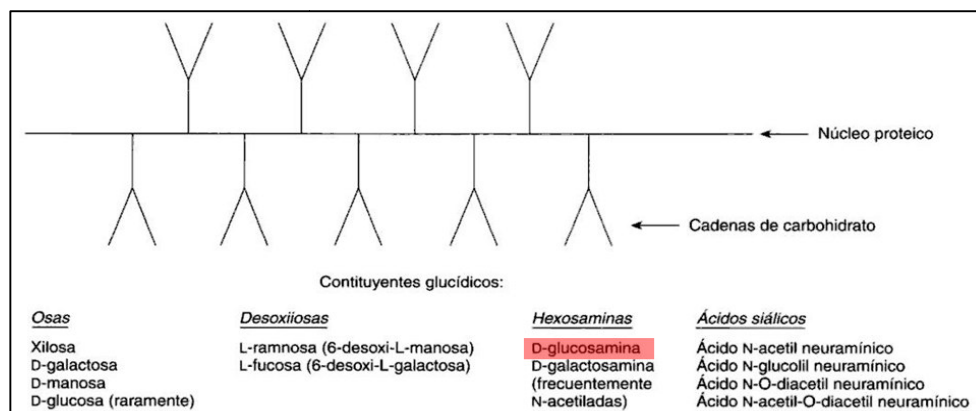


Figura 1.8. Estructura general de las glicoproteínas
(Hernández y Sastre, 1999, p. 67)

Los proteoglicanos presentes en el manto de las fibras de las membranas testáceas consisten en unidades hechas de 95,00 % de glicosaminoglicanos, o mucopolisacáridos y 5,00 % de proteína. La molécula central organizadora del proteoglicano es el ácido hialurónico; a partir de esta cadena central se proyectan las largas proteínas del proteoglicano, las mismas que sirven de punto de anclaje de numerosas cadenas del polisacárido condroitina (Hernández y Sastre, 1999, p. 68; Stryer, 1995, p. 275).

La Figura 1.9 indica la configuración de los componentes de los proteoglicanos.

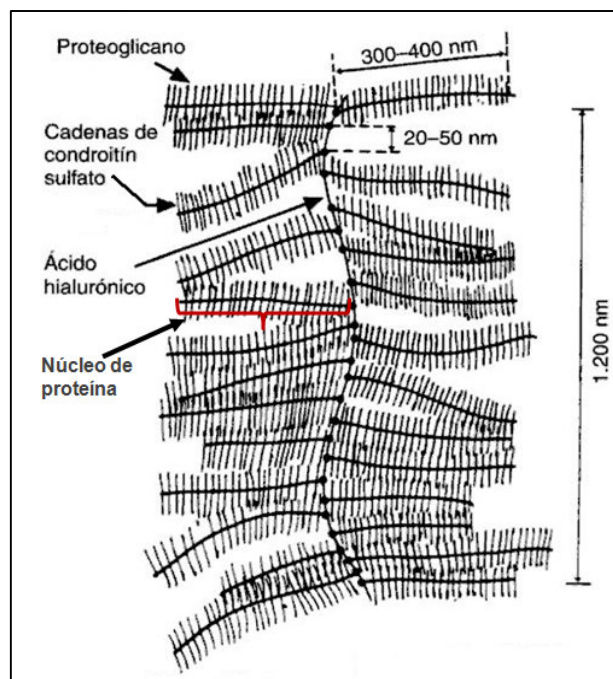


Figura 1.9. Estructura general de un proteoglicano
(Hernández y Sastre, 1999, p. 69)

Long et al. (2008) publicaron una composición detallada de las proteínas, glicosaminoglicanos y polisacáridos que se hallan presentes en las membranas de cáscara de huevo. Para su cuantificación, los investigadores implementaron ensayos como colorimetría, test ELISA y cromatografía (p. 2). Los resultados se muestran en la Tabla 1.11.

Tabla 1.11. Constituyentes proteícos típicos de las membranas testáceas de cáscara de huevo de gallina

Constituyente	Porcentaje (%)
Colágeno	35
Glucosamina	10
Condroítina	9
Ácido Hialurónico	5 – 10
Otros compuestos proteícos	36 – 41

(Long et al., 2008, p. 13)

1.2.3. PERFIL DE AMINOÁCIDOS

En lo que respecta a los aminoácidos presentes en las membranas de cáscara de huevo, son varios los resultados publicados, puesto que los porcentajes dependen del tipo de proceso de separación entre cáscara y membranas que se ha implementado.

La Tabla 1.12 constituye un cuadro que reúne los resultados de las composiciones de aminoácidos obtenidas a través del análisis de diferentes muestras de membranas aisladas.

Tabla 1.12. Proteínas totales y perfil de aminoácidos presentes en las membranas intersticiales aisladas de cáscara de huevo de gallina

		MacNeil ¹	Vlad ²	Long et al. ³	Nakano et al. ⁴
		Porcentaje (%)			
Proteína Total		85,00	90,08	-----	-----
Aminoácidos	Lisina (Lys)	3,35	3,21	2,88	3,50
	Histidina (His)	3,48	3,38	2,79	4,20
	Arginina (Arg)	6,46	6,89	5,33	5,75
	Treonina (Thr)	4,60	5,19	4,42	6,90
	Ácido Glutámico (Glu)	9,70	11,91	8,23	11,50
	Prolina (Pro)	9,34	10,79	8,23	11,80
	Glicina (Gly)	4,94	5,43	3,99	10,85
	Cisteína (Cys)	8,50	6,72	6,01	-----
	Valina (Val)	6,30	6,02	5,13	7,55
	Metionina (Met)	3,09	3,50	2,85	2,30
	Isoleucina (Ile)	3,19	2,91	2,01	3,35
	Leucina (Leu)	4,30	4,19	3,85	5,20
	Tirosina (Tyr)	1,73	1,57	1,33	1,95
	Fenilalanina (Phe)	1,65	1,60	1,48	1,55
	Triptófano (Trp)	-----	3,64	2,51	-----
	Ácido Aspártico (Asp)	-----	7,98	7,01	8,60
Alanina (Ala)	-----	2,46	2,00	4,35	
Serina (Ser)	-----	5,05	4,28	9,20	

(¹McNeil, 2005, p. 10; ²Vlad, 2007, p. 5; ³Long et al., 2008, p. 13 y ⁴Nakano et al., 2003, p. 512)

En el proceso llevado a cabo por MacNeil (2005), el aislamiento entre cáscara y membranas se dio a través de un método físico denominado separación por diferencia de densidades (p. 10). Vlad (2007) aisló las membranas con una solución ácida (p. 5). Por su parte, Long et al (2008) realizaron la separación a través de una combinación de procesos físicos y químicos, con la trituración de los residuos y posterior dilución de la cáscara con ácido de baja concentración (p. 13). Nakano et al (2003) extrajeron las membranas con un método químico, al someter a los residuos a una mezcla de ácidos diluidos (p. 512).

1.2.4. DESCRIPCIÓN Y USOS DE LOS PRINCIPALES CONSTITUYENTES DE LA MEMBRANA DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA

El Colágeno se clasifica como una holoproteína y pertenece a la clase de las escleroproteínas. Constituye la proteína más abundante del organismo humano, con una proporción de casi un 25,00 % del contenido proteico total. Se encuentra en estructuras tisulares como la piel, huesos, cartílagos, ligamentos, tendones, córnea y en el tejido conectivo. El colágeno presenta una gran diversidad estructural; existen alrededor de 27 tipos de colágenos, todos ellos compuestos de moléculas que contienen tres cadenas de polipéptidos, las mismas que se entrelazan para formar una triple hélice larga y rígida, similar a una cuerda. Las ligeras diferencias en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos establecen la existencia de los diversos tipos de colágeno (Alberts et al., 2004, p. 704; Budavari, O'Neil, Smith y Heckelman, 1989, pp. 387-388; Müller, 2008, p. 124).

La secuencia de aminoácidos del colágeno es remarcadamente regular, puesto que presenta de manera repetitiva los residuos de aminoácidos: prolina, glicina e hidroxiprolina (Stryer, 1995, p. 262). Entre sus aplicaciones se encuentra el uso en injertos de piel, cirugía plástica, la reparación de la córnea, implantes de prótesis, etc. (MacNeil, 2001, p. 4, Long, 2008, pp. 2,3).

La Glucosamina es una aminoazúcar o aminosacárido que actúa como parte constitutiva de las glicoproteínas. Sus principales funciones son de formación y reparación del cartílago articular. Se halla presente en los cartílagos, tendones y

ligamentos, a los cuales les confiere las propiedades de elasticidad y flexibilidad. Al ser aislado es utilizado como suplemento para el tratamiento de dolencias articulares (Ara, 2004, p. 232).

La Condroitina constituye un mucopolisacárido de alta densidad que, en su forma de sulfato de condroitina, es parte de los proteoglicanos. Se encuentra en el tejido cartilaginoso, en la córnea y en la piel. La condroitina es responsable, en gran parte, de dar al cartílago articular resistencia contra la compresión. Junto con la glucosamina, el sulfato de condroitina, constituye un componente integral de las medicinas alternativas que se utilizan para tratar la osteoartritis (Ara, 2004, p. 233; Budavari et al., 1989, p. 344; Hernández y Sastre, 1999, p. 65).

El Ácido hialurónico es un glicosaminoglicano estructural, formado por la repetición de unidades disacáridas de ácido glucorónico y glucosamina. Se encuentra en el cartílago y la piel. Es responsable del aumento de la resistencia a la compresión en algunos tejidos. Debido a la alta capacidad de hidratación, se usa a gran escala en las cremas cosméticas. Otros usos son para el tratamiento de la artritis reumatoide y osteoartritis y para la cicatrización de heridas (Hernández y Sastre, 1999, p. 63).

1.3. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA

1.3.1. ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE SEPARACIÓN ENTRE LA CÁSCARA Y MEMBRANAS

1.3.1.1. Separación química por disolución de la fase mineralizada

La separación de las membranas intersticiales y la cáscara, a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina, se puede lograr por disolución de la cáscara con ácidos. En un estudio realizado por Benítez, Sarno y Delfino (2000), se utilizó HCl

a diferentes concentraciones, entre 0,15 N y 1,68 N, a 20 °C, por un lapso máximo de 90 min. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 1.10 (pp. 1-4).

De acuerdo con los datos de la Figura 1.10, se tiene que la solución de mayor concentración de HCl (1,68 N) no es la que permite un mayor porcentaje de dilución de la cáscara, aún cuando se someta a la cáscara a mayor tiempo de exposición.

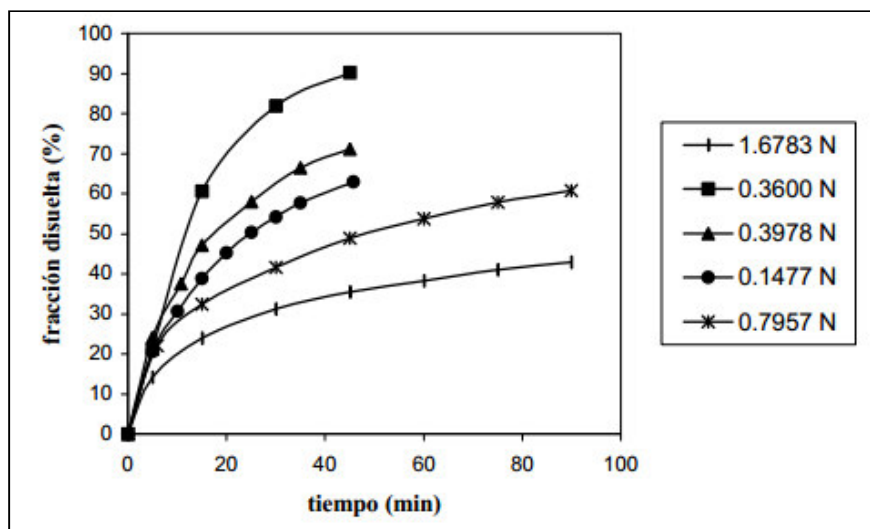
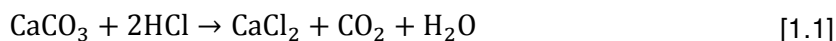


Figura 1.10. Disolución de la cáscara de huevo de gallina en HCl de distintas concentraciones a 20°C (Benítez et al., 2000, p.2)

El proceso de reacción llevado a cabo, es el que se describe en la Ecuación [1.1].



El monitoreo de la cantidad de cáscara disuelta se realizó mediante titulación de calcio con soluciones valoradas de EDTA (ácido etilendiaminotetracético). El mayor porcentaje de calcio disuelto correspondió al tratamiento de concentración de 0,36 N de ácido clorhídrico y tiempo de 45 min, siendo este un “comportamiento anómalo”, puesto que se esperaba mayor cantidad de calcio disuelto con alta concentración de HCl y menor tiempo (Benítez et al., 2000, p. 1).

A pesar de estos resultados, este proceso es efectivo; sin embargo, los ensayos resultaron en la aparición de precipitados de sales y en la afectación de las proteínas presentes en las membranas intersticiales.

1.3.1.2. Separación física por diferencia de densidades

MacNeil (2001) planteó un método y desarrolló un equipo (ambos patentados), a través de los cuales logró, de una manera sencilla y económica, la separación de la porción de membranas intersticiales y la porción de “mineral duro” o de cáscara limpia, a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina. De este modo, facilitó el uso de cada una de las corrientes en diferentes aplicaciones, ofreciendo a la vez un beneficio económico por los productos resultantes (p. 1).

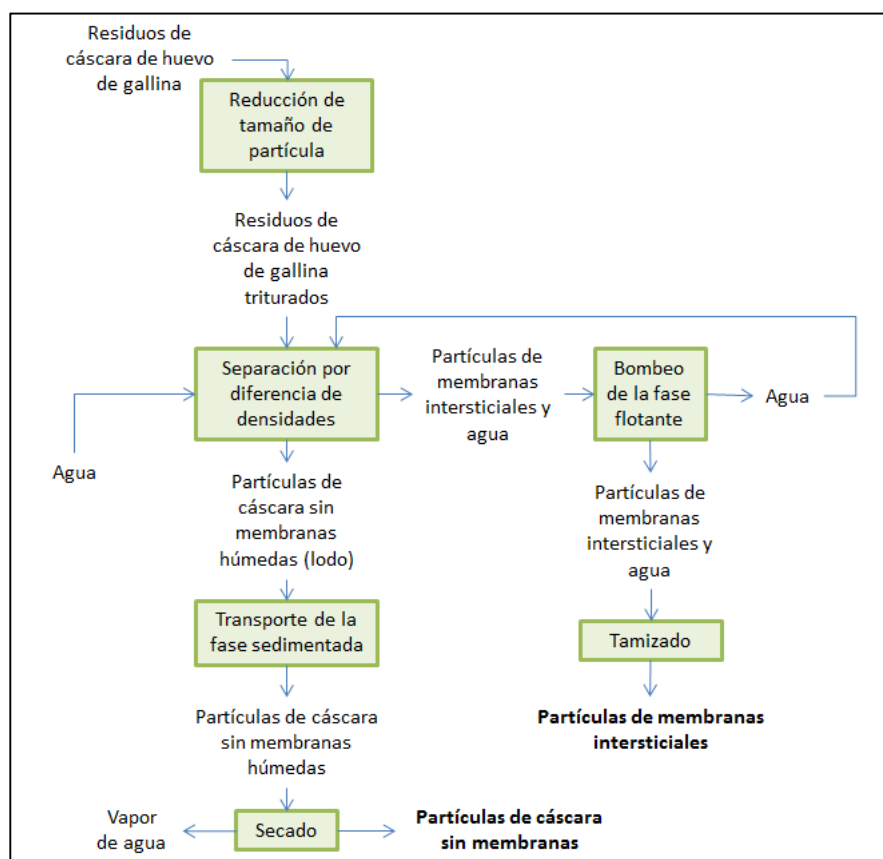


Figura 1.11. Esquema del funcionamiento del equipo para la separación física de las membranas intersticiales y cáscara a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (MacNeil, 2001, pp. 1-6)

El método de separación planteado por MacNeil (2001) se esquematiza en el diagrama de flujo de la Figura 1.11, e inicia con el procesamiento de los residuos de cáscara de huevo (RCH), a fin de producir pequeñas partículas. Durante este tratamiento, las partículas de residuos de cáscara de huevo son parcialmente desgastadas, con lo cual, la estructura de unión entre las membranas y las cáscara se rompe pero no completamente. A continuación, las partículas de RCH se transportan a un tanque que contiene agua y, a medida que son alimentadas, estas experimentan fuerzas turbulentas en el líquido, debido a un brazo de agitación instalado en el tanque, lo que causa que las porciones de membranas y cáscara se separen totalmente. Dado que las partículas de membrana son muy ligeras, tienden a permanecer atrapadas en la parte superior del líquido, desde donde son bombeadas para ser tamizadas. Mientras que, las partículas de cáscara de huevo “limpias” se depositan en el fondo del tanque donde también se recogen y se secan (pp. 1-6).

El equipo desarrollado por MacNeil (2001) se muestra en la Figura 1.13 y se trata de un sistema de procesamiento continuo que consta esencialmente de tres sistemas: el primero, un sistema de separación por diferencia de densidades, el segundo, un sistema de recuperación de las partículas de membranas intersticiales y el tercero, un sistema de recuperación de partículas de cáscara aislada (pp. 5-7). Cada uno de los sistemas consta de varios elementos que cumplen con funciones particulares y que se describen a continuación:

- Componentes del sistema de separación por diferencia de densidades

Los residuos de cáscara de huevo de gallina se reciben en una tolva de alimentación, desde donde son guiados hacia un dispositivo de reducción, el cual disminuye el tamaño de partícula de los residuos a un rango entre 0,5-4 mm. El rango planteado permite obtener una fracción de partículas de membranas intersticiales con la menor cantidad posible de polvo de cáscara, puesto que con tamaños de partícula más pequeños, se genera gran cantidad de polvo de cáscara, el cual tiende a pegarse a la membrana y flotar junto con ella.

El dispositivo de reducción consta de un motor y una cabeza de corte, esta última consiste en un conjunto de cuchillas de acero inoxidable que no solamente proporciona una acción de corte sino que a su vez proporciona un efecto abrasivo que rompe parcialmente la estructura de unión entre las membranas y la cáscara, lo que facilita su separación. Las partículas son transportadas a través de un conducto, el cual las deposita en la parte media de un tanque de fondo plano, lleno de agua potable a temperatura ambiente, cuyo volumen depende de parámetros como la altura mínima de fluidización.

La separación total de las membranas y cáscara se da por diferencia de densidades, gracias a la turbulencia creada en el tanque, a través de un agitador de brazo de arrastre, el cual tiene incorporado un motor que provoca una agitación a velocidades muy lentas, la suficiente para lograr la flotabilidad de las partículas de membranas intersticiales y la sedimentación de las partículas de cáscara.

- Componentes del sistema de recuperación de partículas de membranas intersticiales

Este sistema comienza con conductos de 2 a 2,5 pulgadas (5 a 6,4 cm) que se extienden por debajo de la superficie de agua, en la parte superior del tanque de fondo plano, lo suficientemente alejados del conducto de alimentación de RCHG. Su función es el transporte de las partículas de membrana que, debido a la turbulencia creada por el agitador y por su peso liviano, tienden a permanecer en el agua por un tiempo largo sin sedimentarse.

Para transportar las partículas de membranas el sistema cuenta con una bomba de succión de agua que es de tipo centrífuga. El agua y las membranas succionadas desembocan en una banda transportadora con tamiz, que permite retener las partículas de membranas y deja pasar el agua, la cual es recirculada. Las partículas de membranas húmedas son recolectadas en un tanque, para procesos posteriores como secado, refrigeración o congelación.

- Componentes del sistema de recuperación de partículas de cáscara aislada

Este sistema está conformado por el fondo falso con hendidura anexado al tanque de fondo plano, el cual recibe las partículas de cáscara (abreviado como PC) que por su mayor peso, tienden a sedimentarse. Las PC caen hacia el doble fondo, a través de la ranura, gracias al brazo de barrido del agitador. Uno de los lados de este brazo está provisto de una hoja flexible de caucho que actúa como escobilla y se encarga de “barrer” las partículas sedimentadas. El otro lado tiene un cepillo y su función es liberar las partículas de membranas intersticiales que se han asentado. La Figura 1.12 muestra estos componentes, los mismos que se muestran integrados en el sistema descrito en la Figura 1.13.

Por la hendidura del fondo falso atraviesa un primer tornillo sinfín, que transporta las partículas de cáscara alojadas en la ranura hacia un segundo transportador de tornillo, que se encuentra inclinado y eleva las partículas de cáscara hacia una tolva que las alimenta a un sistema de secado, el cual incluye un transportador de banda, donde caen las partículas para ser secadas por radiación o con aire caliente. La temperatura que alcanza este sistema es de 100 °C. Cuando las partículas de cáscara salen de la unidad de secado son recolectadas y almacenadas para posteriores usos.

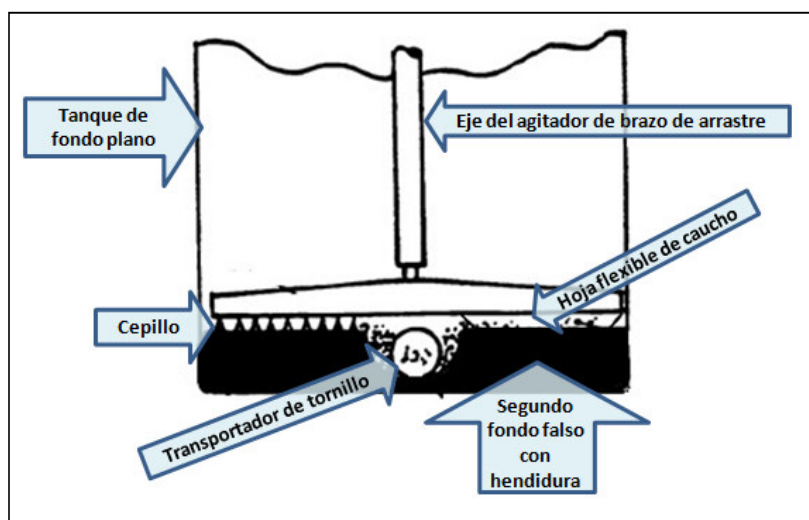


Figura 1.12. Descripción de los componentes del agitador de brazo de arrastre (MacNeil, 2001, p. 3)

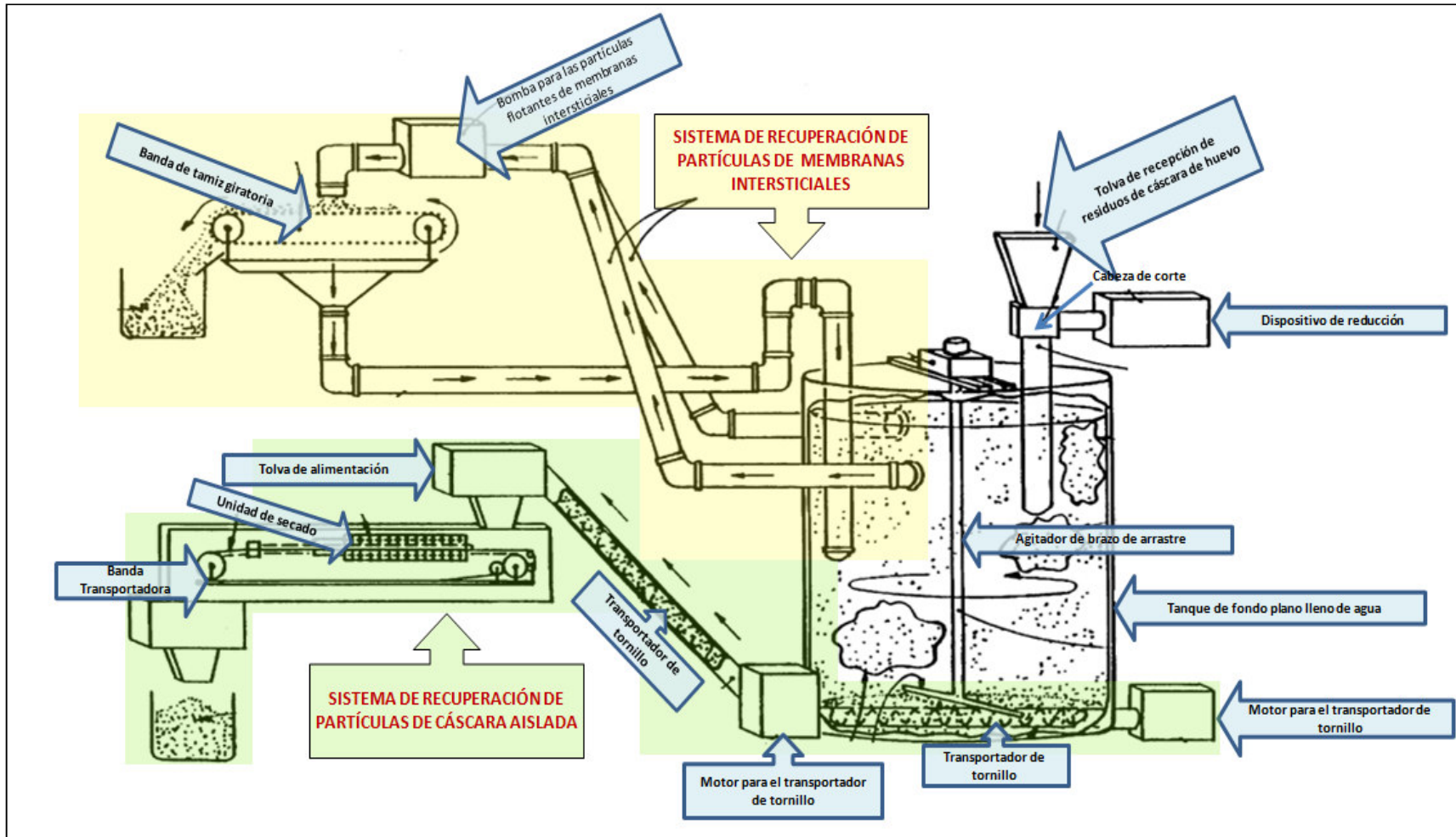


Figura 1.13. Descripción del equipo para la separación física de las membranas y cáscara a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (MacNeil, 2001, p. 2)

1.3.1.3. Separación por tratamiento con microondas

La eficacia del tratamiento con microondas en la separación de la cáscara y las membranas de huevo de gallina fue analizada, a través de una investigación realizada por Hussain (2009), la cual se basó en la siguiente hipótesis: “La separación de la cáscara de huevo y las membranas por microondas dependería del hecho de que la membrana tiene un mayor contenido de humedad, lo que daría lugar a una mayor absorción de las ondas electromagnéticas por parte de las membranas. Esta diferencia en el contenido de humedad resultaría en un calentamiento diferencial que conduce a la expansión de las membranas, lo que debilitaría la interacción física entre cáscara y membranas; de ese modo, facilitarían su separación” (p. 59).

El efecto del tratamiento con microondas fue analizado en términos de la reducción de la energía de enlace; es decir, la energía total requerida para separar las membranas y la cáscara, expresada en mJ (miliJoules). Para ello, se planteó un diseño experimental con tres factores de tres niveles cada uno, tal como se indica en la Tabla 1.13. Para cada tratamiento se realizaron 3 réplicas.

Tabla 1.13. Condiciones del diseño experimental para el tratamiento con microondas de huevos de gallina

FACTORES	NIVELES
Tiempo de remojo en agua a temperatura ambiente (h)	0
	24
	48
Temperatura (°C)	40
	50
	60
Densidad de Potencia (W/g)	1,0
	1,5
	2,0

(Hussain, 2009, p. 62)

Para el estudio se incluyó un grupo de control constituido por huevos no tratados, en cada uno de los cuales se determinó la energía de enlace promedio, dato que luego fue usado para realizar una comparación entre cada uno de los tratamientos aplicados.

El tratamiento con microondas fue realizado, colocando un huevo con una pequeña abertura en el extremo que contiene la cámara de aire, dentro de un horno de microondas convencional. El tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada fue determinado por estudios preliminares. La temperatura fue medida por la pequeña abertura, utilizando un termopar. Después de aplicar el tratamiento con microondas, la albúmina y la yema del huevo fueron descartadas. Finalmente, se cortó una tira de cáscara de dimensiones 30 x 10 mm a lo largo del ecuador del huevo, para el análisis de resistencia, cuya medición fue realizada en una máquina de ensayo de tracción (Hussain, 2009, pp. 62-64).

Los resultados de esta experiencia demostraron que existe una diferencia estadísticamente significativa en la energía de enlace entre los huevos con tratamiento con microondas y los huevos no tratados (Hussain, 2009, p. 56).

El estudio de Hussain comprobó la reducción de la fuerza de enlace entre la cáscara y las membranas a través de un tratamiento con microondas. Sin embargo, su uso para la separación de grandes cantidades de residuos de cáscara de huevo, desde cierto punto vista, no resulta práctico debido a la necesidad de adicionar procesos que permitan la separación rápida y definitiva de los constituyentes de dichos residuos.

1.3.2. HIDRÓLISIS ALCALINA COMO MÉTODO DE SOLUBILIZACIÓN DE COMPUESTOS PROTEÍCOS

1.3.2.1. Reacción de hidrólisis alcalina en proteínas

En términos generales, la hidrólisis se define como una reacción química en la cual una molécula de agua interactúa con otros compuestos de los cuales

resultan otros nuevos, más simples. La hidrólisis provoca la descomposición de compuestos orgánicos complejos, a través del desplazamiento del grupo saliente de la molécula original por el grupo OH del agua, cuya unión se hace a través de un enlace covalente (Larson y Weber, 1994, p. 103).

En las proteínas, la reacción de hidrólisis consiste en la ruptura del enlace peptídico que une los aminoácidos. Esta reacción puede lograr la aparición de cadenas de péptidos de diversos tamaños, puesto que las cadenas fragmentadas pueden volver a ser divididas. La hidrólisis de proteínas puede conducirse hasta la degradación completa en sus aminoácidos constituyentes.

La Figura 1.14 muestra como se lleva a cabo la reacción de hidrólisis sobre el enlace peptídico de una proteína.

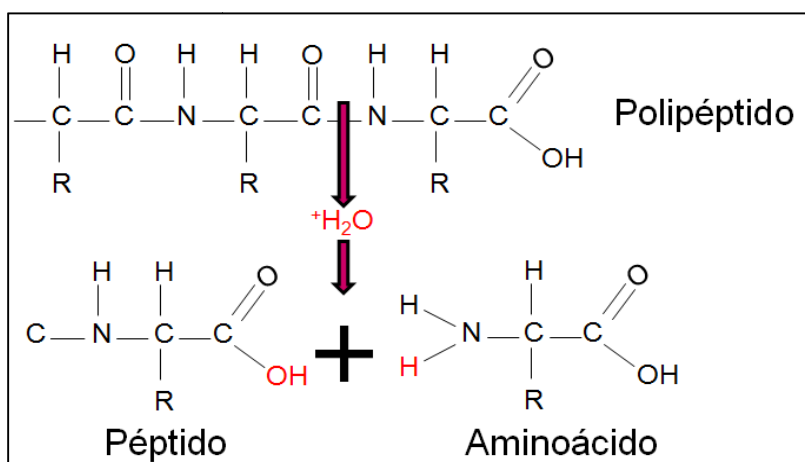


Figura 1.14. Esquema del mecanismo de reacción de hidrólisis sobre el enlace peptídico (Müller, 2008, p. 33)

Como se observa en la Figura 1.14, el grupo OH se une covalentemente al grupo carbonílico de la cadena peptídica, mientras que el átomo de H se une al grupo amino y, con ello, conforma al aminoácido que ha sido segmentado.

El proceso de hidrólisis en las proteínas puede ser químico o enzimático. En los hidrolizados químicos se emplean condiciones ácidas o alcalinas drásticas. En la hidrólisis alcalina se emplea por lo general hidróxido de sodio. Esta base actúa

como catalizador de la reacción. Por lo tanto, la velocidad de reacción de hidrólisis se verá afectada dependiendo de la concentración de la solución de hidróxido de sodio que se emplee (Larson y Weber, 1994, p. 105).

1.3.2.2. Hidrólisis de membranas intersticiales

Strohbehn, Etzel y Figgis (2012) establecieron y patentaron un proceso a través del cual se concentró el material proteínico presente en las membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina, por medio de su solubilización por hidrólisis alcalina (pp. 1-8).

El proceso permitió a los autores obtener un producto final con una composición de proteína solubilizada alta, sin el uso de enzimas proteolíticas como: peptidasas, tripsina y colagenasas.

La composición fue esencialmente libre de olores, con un contenido de cenizas de menos del 10,00 % en peso y un contenido de proteína de al menos 90,00 %, que incluye una mezcla de proteínas solubilizadas que no se han desnaturalizado y conservan su actividad biológica.

De acuerdo con los autores, el proceso es aplicable a nivel industrial, es de bajo costo y mantiene al mismo tiempo tanto la pureza como la actividad de la proteína solubilizada, lo que lo hace rentable.

El proceso de hidrólisis alcalina, para la solubilización de proteínas de las membranas intersticiales, tiene la ventaja adicional de que la composición proteica resultante puede ser utilizada como una fuente para el aislamiento y purificación de proteínas específicas como el colágeno.

Un esquema general del proceso propuesto por Strohbehn et al. se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 1.15.

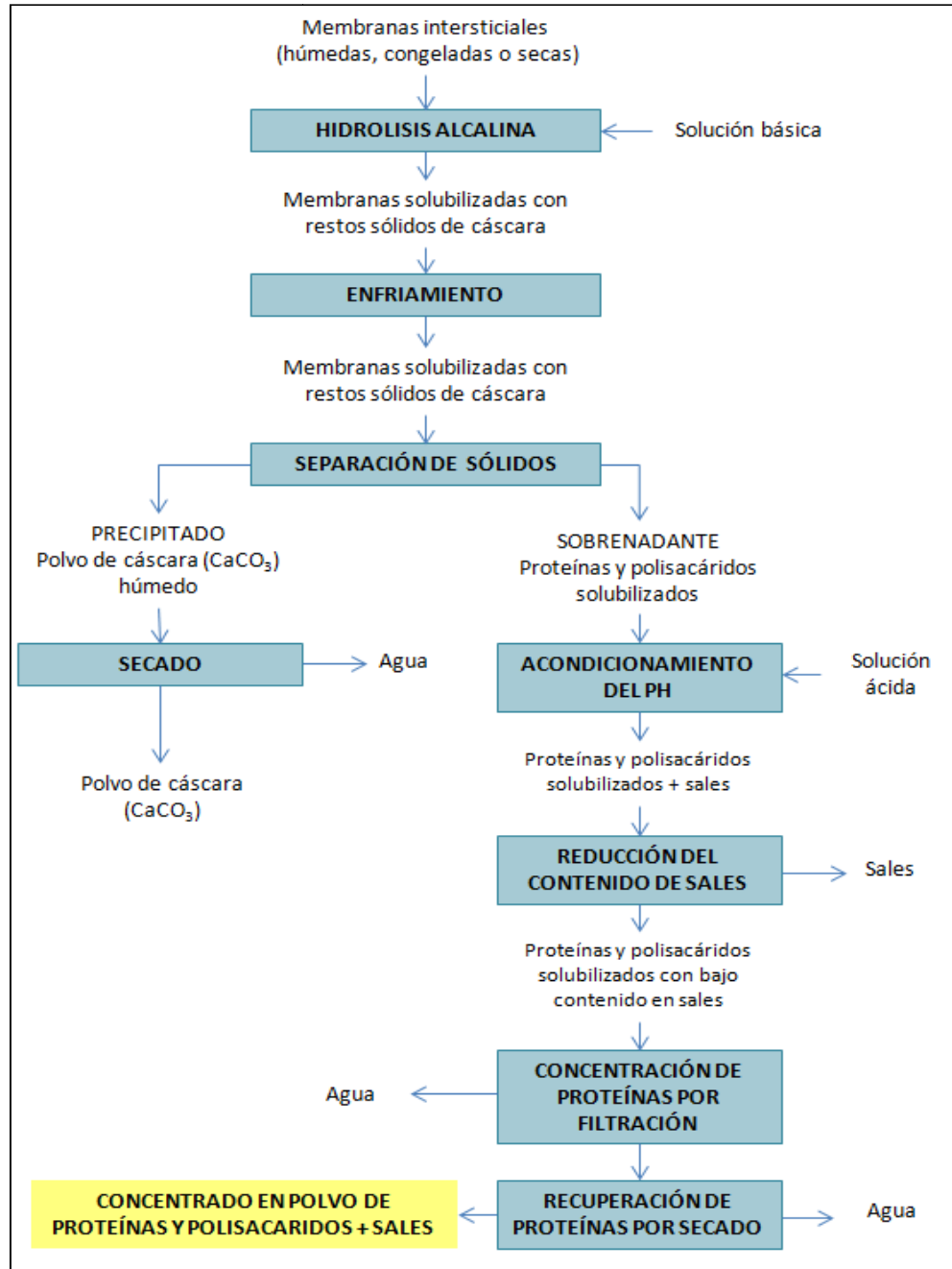


Figura 1.15. Proceso de extracción de proteínas a partir de membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina (Strohbehn et al., 2012, pp. 1-6)

El producto final, que corresponde a un concentrado de proteínas, puede obtenerse a través de diferentes formas o formulaciones. Algunos pasos se pueden realizar consecutiva, simultáneamente, en un orden diferente u omitirse.

Además, para el proceso en cada una de sus etapas, se pueden implementar diversas técnicas y métodos, tal como lo sugieren Strohbehn et al. (2012) a continuación:

- Hidrólisis Alcalina

Diferentes soluciones básicas son adecuadas para el proceso de hidrólisis. Las soluciones comúnmente empleadas son hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, e hidróxido de calcio. La concentración de la solución básica puede estar en un rango entre 5,00 % y 12,00 % en peso. El uso de concentraciones menores a 5,00 % reduce la cantidad de cenizas en el producto final. La temperatura de reacción puede ser entre 30,0 °C y 65,0 °C; sin embargo, los mejores resultados se han obtenido con temperaturas cercanas a 50,0 °C. El tiempo de reacción puede ser tan largo como sea necesario para lograr el resultado deseado; puede ir de 3 h a 24 h, dependiendo de la combinación de concentración de solución básica y temperatura de reacción aplicadas y de la incorporación o no de agitación (Strohbehn et al., 2012, p. 10).

La elección de las condiciones de concentración de solución básica y rango de temperatura de reacción, tiene que obedecer al siguiente objetivo: obtener la solubilización de las membranas con menor cantidad de sales, en un tiempo de reacción menor a 12 h.

El progreso de la reacción de hidrólisis debe realizarse con intervalos de tiempo seleccionados. Puede hacerse a través de métodos colorimétricos o con la técnica de análisis de niveles de nitrógeno por precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).

- Enfriamiento

La temperatura del producto hidrolizado puede ser ajustada desde 2 °C hasta alrededor de 18 °C. Preferentemente, alrededor de los 2 °C y los 7 °C. El enfriamiento ayuda a la conservación del material proteico solubilizado.

- Separación de sólidos

Los métodos de filtración para separación de sólidos que se pueden implementar son: centrifugación, ultracentrifugación, filtración, microfiltración, decantación o combinaciones de técnicas de separación. Las técnicas de filtración pueden ser: por gravedad, a presión, al vacío, por lotes, por membranas, filtros prensa, filtración continua, o cualquier combinación adecuada (Strohbehn et al., 2012, pp. 10-11).

- Acondicionamiento del pH

Se puede ajustar el pH usando cualquier solución de ácido adecuada. Las soluciones ácidas comúnmente utilizadas son: de ácido acético, oxálico, fosfórico, cloroacético, cítrico, fórmico, benzoico, oxálico, succínico, propiónico clorhídrico, nítrico, sulfúrico, perclórico, clórico, fosfórico, sulfuroso o combinaciones de los mismos. El rango de pH puede estar entre 6,8 y 8,0 preferentemente a pH 7.

- Reducción del contenido de sales

Esta etapa es importante puesto que si el contenido de sal o mineral en el sobrenadante no se reduce, este se convertirá en ceniza en la composición resultante. Las sales o los minerales pueden ser eliminados a partir del sobrenadante utilizando un procedimiento adecuado, por ejemplo, filtración por membranas, diálisis o intercambio iónico.

- Concentración de la proteína por filtración

La concentración se realiza hasta que el contenido de sólidos se encuentre en un rango entre el 15,00 % y el 30,00 %. Con esta composición se hace posible la recuperación de los sólidos a través de un proceso de secado adecuado. Para esta etapa se utiliza una de las formas de filtración por tecnología de membranas como la ósmosis inversa. La selección del tamaño de la membrana debe basarse

en aquella, que permita obtener una composición enriquecida para un tamaño particular de proteína o proteínas.

- Recuperación de la proteína por secado

Con el fin de obtener un producto final en polvo, la etapa de secado puede realizarse por aspersión (spray drying), liofilización, por contacto de paletas (paddle drying), al vacío, crioconcentración, pulverización, en tambor u otras formas de secado evaporativo. La etapa de secado por liofilización puede llevarse a cabo en un intervalo de temperatura entre 30 °C hasta 40 °C (Strohbehn et al., 2012, p. 11).

Strohbehn et al. (2012) aplicaron determinadas combinaciones de técnicas para cada una de las etapas del proceso planteado y luego analizaron la composición final del producto hidrolizado obtenido. Los resultados de estas aplicaciones se muestran en la Tabla 1.14 (pp. 14,15).

Tabla 1.14. Composición resultante para concentrados de proteína solubilizada por diferentes procedimientos

Procedimientos aplicados de concentración de proteínas por hidrólisis alcalina aplicados			Composición
A	B	C	% p/p
92,59	94,10	90,18	Proteína Total
5,00	4,27	5,14	Humedad
6,51	6,67	8,09	Cenizas
32,17	23,70	15,93	Colágeno
1,59	1,27	2,00	Ácido hialurónico

(Strohbehn et al., 2012, pp. 14, 15)

Las condiciones de operación para la reacción de hidrólisis de los tres procedimientos de la Tabla 1.14 fueron las mismas. Se utilizó una solución de hidróxido de sodio al 5,00 % y se llevó a cabo la reacción a 50,0 °C durante un tiempo aproximado de 3,0-4,0 h. Las diferencias de los procedimientos radicaron en los procesos de filtración y concentración implementados. Para el

procedimiento A, la separación de sólidos se hizo con un filtro de 500 μm y la concentración de proteína se realizó con una membrana de 10 kDa. Mientras que para el procedimiento B, los sólidos se separaron con un filtro de tamaño de poro de 250 μm y la proteína se concentró con una membrana de 100 kDa. Finalmente, para el procedimiento C, solo se utilizó una membrana de 10 kDa para la concentración de proteínas, descartando el paso de separación de sólidos. Para la recuperación de la proteína en polvo, todos los procesos utilizaron como método el secado por aspersión (Strohbehn et al., 2012, pp. 14,15). El perfil de aminoácidos que se muestra en la Tabla 1.15 corresponde a la aplicación del procedimiento B, con el cual se obtuvo la mayor cantidad de proteínas.

Tabla 1.15. Perfil de aminoácidos para el concentrado-hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales

Aminoácido	% p/p
Lisina	5,99
Histidina	3,23
Arginina	6,58
Treonina	3,08
Ácido Glutámico	14,61
Prolina	9,85
Glicina	4,38
Valina	7,51
Metionina	3,79
Isoleucina	3,47
Leucina	4,72
Tirosina	1,72
Fenilalanina	1,57
Triptófano	3,53
Ácido Aspártico	8,33
Alanina	2,25
Serina	3,3
Cisteína	2,47
Hidroxiprolina	0,22

(Strohbehn et al., 2012, p. 14)

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. DETERMINACIÓN DEL PROCESO DE SEPARACIÓN ENTRE LA CÁSCARA Y LAS MEMBRANAS INTERSTICIALES DE LOS RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA

2.1.1. MATERIA PRIMA Y TRATAMIENTOS PRELIMINARES

Los residuos de cáscara de huevo de gallina (RCHG), fueron adquiridos de la división GUSTADINA[®] de la empresa PRONACA S.A., ubicada en el sector de Chiche, perteneciente al cantón Puembo, en la provincia de Pichincha, Ecuador.

En la planta Puembo, opera la sección de cascado de huevos para la producción de huevo pasteurizado, y es a través de esta línea de producción, que se obtuvo la cantidad de materia prima necesaria para el desarrollo del presente estudio.

Los residuos de cáscara de huevo adquiridos en PRONACA S.A. corresponden a huevos de cáscara marrón que provienen de criaderos pertenecientes a la empresa anexa, INDAVES[®]. Al tratarse de huevos de los que se conoce su origen y formación, se tiene la garantía de que la materia prima es homogénea en lo que se refiere a composición química, puesto que la alimentación de todas las aves es la misma. Adicionalmente, debido a procesos de limpieza y desinfección propios de la empresa, los huevos no tienen presencia de contaminantes como heces de gallina o tierra de criadero, lo que asegura que inclusive los RCHG no presenten dichos contaminantes.

Los RCHG fueron recolectados en fundas plásticas y luego almacenados en gavetas cerradas para su transporte desde Puembo hasta el Departamento de Biotecnología y Alimentos (DECAB) en la Escuela Politécnica Nacional. Las gavetas fueron pesadas con ayuda de la balanza marca Fidelity Measurement, de

capacidad 500 kg y sensibilidad de 0,1 kg para luego ser almacenadas en refrigeración (4°C) en uno de los cuartos fríos de la planta piloto del DECAB.

Para la limpieza de los restos de albúmina, se tomaron cargas de 4 kg de RCHG y se lavaron con agua potable; se escurrieron los sobrantes de albúmina y yema junto con el agua y se repitió este proceso dos veces más, con el fin de retirar la mayor cantidad posible de albúmina, yema y otros residuos.

2.1.2. SEPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS INTERSTICIALES POR DIFERENCIA DE DENSIDADES A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA TRITURADOS

Con los RCHG lavados se realizó el proceso de trituración, para lo cual se utilizó un desintegrador marca RITZ, modelo RP-8-K-115, en cuya tolva de alimentación se colocaron cargas de aproximadamente 4 kg de cáscara lavadas. Para asegurar el tamaño de partícula deseado, el proceso de trituración se repitió una vez más. El desintegrador operó a 3 510 rpm y, luego de la doble fase de trituración, se provocó la reducción de los residuos a un tamaño de partícula menor a 5 mm. Una fotografía del equipo montado para la fase de trituración se muestra en la Figura A1.1 del Anexo I.

Los RCHG triturados y húmedos fueron colocados en bandejas, con el fin de someterlas a un proceso de secado. La operación de secado se llevó a cabo en una estufa, marca SELECTA, de capacidad 100 °C y sensibilidad 1 °C. El proceso se realizó a 30 °C durante un periodo de 12 h. La operación de secado a bajas temperaturas se realizó con el fin de evitar que las proteínas presentes en las membranas inicien un proceso de descomposición debido a la humedad. La Figura A1.2 muestra fotografías del equipo de secado.

Los procesos de lavado, trituración y secado de alrededor de 60 kg de RCHG fueron realizados durante 5 días, a razón de 3 batchs por día (4 kg/batch). Durante este periodo de trabajo, los RCHG triturados y secos obtenidos

diariamente fueron almacenados en una gaveta con tapa, en un ambiente seco y ventilado. Una vez que todo el lote de RCHG pasó por estas tres operaciones, fue pesado en la balanza marca Fidelity Measurement y, se tomó una muestra de 150 g aproximadamente para realizar análisis de caracterización.

Para el proceso de separación por diferencia de densidades, se instaló un sistema parecido al propuesto por MacNeil (2001) y que se muestra en la Figura 1.13; para ello se utilizaron los equipos y materiales disponibles en la planta piloto del DECAB (p. 2). El sistema tanque – agitador estuvo conformado por una olla de volteo marca LEGION, modelo TRN-20, de capacidad 10 L y un agitador de pala plana u hoja sencilla, de velocidad regulable, marca FISHER SCIENTIFIC CO., modelo 43. Se muestra una fotografía de este sistema y del proceso realizado en la Figura A1.3 del Anexo I.

Al sistema se alimentaron cargas de 2 kg de residuos triturados, a continuación se llenó el tanque con alrededor de 8 L de agua y luego se generó turbulencia a través del agitador. Inicialmente, el agitador se ajustó a 360 rpm, lo que provocó la completa separación de las membranas intersticiales que se encontraban pegadas a la cáscara y que, debido a los procesos de trituración, estaban parcialmente desprendidas. Luego, se reguló la velocidad para que descendiera a 140 rpm, condición que fue suficiente para provocar la aparición de dos fases, una inferior y otra superior. La inferior se conformó de las partículas de cáscara aisladas que sedimentaron debido a su densidad y la fase superior estuvo compuesta por las partículas de membranas intersticiales, cuya baja densidad provocó que flotaran.

La extracción de la fase con membranas se hizo con ayuda de una manguera colocada en la parte superior del tanque, la misma que transportó el agua y las membranas hacia un tamiz con un tamaño de poro de 0,85 mm (ASTM No. 20), el cual retuvo las partículas de membranas intersticiales. Se presentan fotografías de este proceso se presentan en la Figura A1.1.

El proceso de separación por densidades se repitió dos veces más, para cada carga, con el fin de conseguir la extracción de las partículas de membranas que por alguna razón quedaron pegadas o se precipitaron y así recolectar toda la cantidad de membranas posible.

Las membranas aisladas y húmedas recolectadas en el tamiz, al igual que las partículas de cáscara sin membranas que quedaron sedimentadas en el tanque agitado, fueron colocadas sobre bandejas en forma separada, para luego someterlas a un proceso de secado a 30 °C, durante 12 h. La operación de secado fue realizada en la estufa marca SELECTA. Las fracciones cáscara sin membrana y membranas intersticiales secas fueron almacenadas en recipientes de plástico cerrados.

Una vez que todos los RCHG triturados fueron procesados, se pesó la cantidad de membranas intersticiales secas obtenidas, en la balanza portátil marca NAVIGATOR OHAUS, modelo N0D110 de capacidad 8,1 kg y sensibilidad 0,5 g. Mientras que la cantidad de cáscara sin membranas secas, fue pesada en la balanza Fidelity Measurement.

Con el peso de las membranas intersticiales obtenidas y el peso inicial de residuos de cáscara de huevo de gallina procesados, se calculó el rendimiento del proceso de separación por densidades.

2.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LA CÁSCARA CON MEMBRANAS, CÁSCARA AISLADA Y MEMBRANAS AISLADAS

Para realizar los análisis de caracterización se recolectaron muestras de 150 g aproximadamente, de cada fracción. La toma de las muestras de las diferentes fracciones se realizó con la aplicación del método de reducción por cuarteo manual, establecido en la norma INEN 1233 (INEN, 1995).

Con las muestras secas de 150 g, obtenidas de cada fracción, se realizaron los siguientes análisis: tamaño de partícula, humedad al vacío, concentración de proteína, cantidad de cenizas, carbohidratos totales, extracto etéreo, valor calórico y concentración de calcio. Para todos estos análisis se realizó una réplica. Adicionalmente y de manera exclusiva, para las membranas intersticiales se realizó un análisis de composición de aminoácidos.

- Tamaño de partícula

Se determinó el tamaño de las partículas mediante el método descrito en la norma INEN 517 (INEN, 1981). Se utilizó una serie de 6 tamices marca NEWARK, con tamaños de poro números: 4, 8, 10, 20, 40 y 50, que cumplen con la especificación ASTM E-11. La retención de muestra en cada uno de los tamices se dio con ayuda del equipo de vibración marca TYLER.

- Humedad al vacío

El porcentaje de humedad se estableció con la aplicación del método AOAC 925.10 (Horwitz y Latimer, 2007, 32.1.03, p. 1). El secado se realizó en la estufa de vacío marca HERAEUS HANAU, modelo RVT 360.

- Cantidad de cenizas

La cantidad de cenizas se determinó con la aplicación del método AOAC 923.03 (Horwitz y Latimer, 2007, 32.1.05, p. 2). Para la calcinación se utilizó la mufla marca LINDBERG, modelo 59344.

- Extracto etéreo

El resultado obtenido a través del análisis de extracto etéreo constituye una buena aproximación del contenido en grasa de los alimentos. Este parámetro fue establecido con el empleo del método AOAC 920.85 (Horwitz y Latimer, 2007,

32.1.13, p. 5). Para el procedimiento se utilizó una unidad de extracción por solvente marca VELP SCIENTIFICA, modelo SER 148.

- Concentración de proteína

El contenido de proteína se determinó mediante la aplicación de la técnica Kjeldahl, que se establece en el método AOAC 2001.11 (Horwitz y Latimer, 2007, 4.2.11, p. 33). Para el procedimiento se utilizó la unidad de digestión marca TECATOR y el equipo de destilación marca SELECTA. Para transformar la cantidad de nitrógeno detectada a proteína total se usó el factor general de Jones 6,25 (FAO, 2003, p. 9).

- Carbohidratos totales

El porcentaje de carbohidratos totales se calculó por diferencia. Para lo cual se consideró la suma de los porcentajes de los parámetros de humedad, cenizas, proteína y extracto etéreo (FAO, 2003, pp. 12-17).

- Valor calórico

El valor energético en calorías determinado para las diferentes fracciones se hizo tomando en cuenta los valores de los parámetros de extracto etéreo, proteína y carbohidratos totales, a los cuales se les multiplicó por factores de conversión de energía específicos (FAO, 2003, pp. 23-27).

- Concentración de calcio

El análisis de cantidad de calcio fue realizado de acuerdo con el método validado DECAB 01 (DECAB, 2007). Para la lectura se utilizó el espectrofotómetro de absorción atómica marca PERKIN ELMER, modelo 3300, previo a una digestión de la muestra por microondas.

- Análisis de aminoácidos para la fracción membranas intersticiales

A través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se determinó la concentración de los aminoácidos: ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, histidina, lisina y arginina.

Para este análisis de caracterización, se utilizó el método desarrollado por el INIAP, en el cual la muestra de membranas intersticiales fue sometida a una digestión ácida con HCl 6 N, por 22 h, a 110 °C, con lo que se logró la descomposición de la proteína presente en la muestra en sus aminoácidos constitutivos. A continuación, el ácido fue evaporado en un rotavapor y el residuo seco, que contiene los aminoácidos, fue disuelto con tampón citrato a pH 2,2 para finalmente ser inyectado al equipo de HPLC (INIAP, 1985).

Para la determinación de la concentración de triptófano se utilizó el método colorimétrico de Opienska-Blauth (Villegas, Ortega y Bauer, 1985, pp. 12-14).

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Ecuador.

2.3. ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN POR HIDRÓLISIS ALCALINA DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LAS MEMBRANAS INTERSTICIALES

2.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar el efecto de la concentración de la solución de hidróxido de sodio y de la temperatura de reacción sobre el proceso de hidrólisis alcalina de membranas intersticiales, se aplicó un diseño experimental del tipo factorial 3^2 .

Se trabajó con dos factores de diseño, cada uno con tres niveles: concentración de solución de hidróxido de sodio: 1,00, 3,00 y 5,00 % p/p y temperatura de reacción de hidrólisis: 45,0, 52,5 y 60,0 °C. Los niveles de las variables se establecieron con base en los criterios descritos en el trabajo de Strohbahn et al. (2012, p. 10).

Se realizaron 2 réplicas por cada uno de los 9 tratamientos, con lo que se tuvo un total de 27 experimentos realizados uno al día y de manera aleatoria. La aleatorización de los experimentos se muestra en el Anexo III, con la Tabla AIII.1.

El factor de respuesta fue el porcentaje de proteína hidrolizada al que se denominó grado de hidrólisis. El grado de hidrólisis se reportó como porcentaje y fue determinado con la Ecuación 2.1.

$$\text{GH} = \frac{\text{Phi}}{\text{Pto}} \times 100 \% \quad [2.1]$$

Donde:

GH: porcentaje de proteína hidrolizada

Phi: cantidad de proteína en g detectada en diferentes intervalos de tiempo por colorimetría durante el proceso de hidrólisis alcalina.

Pto: cantidad de proteína total en g presente en la muestra cruda determinada por el análisis de caracterización de concentración de proteína.

El diseño factorial 3^2 aplicado en el presente estudio permitió explicar el comportamiento del grado de hidrólisis, a través de determinados parámetros que forman parte de un modelo estadístico específico.

El modelo estadístico del diseño factorial 3^2 se describe a través de la Ecuación AIII.1 y sus elementos se establecen y definen en el Anexo III, junto con otras características.

El estudio estadístico de los datos experimentales se hizo a través del método de análisis de varianza (ANOVA), para probar la siguiente hipótesis ¿Existen efectos estadísticamente significativos de los factores concentración de NaOH y temperatura de reacción sobre la variable de respuesta grado de hidrólisis?

Para responder a la hipótesis planteada y demostrar qué factor tuvo significancia estadística sobre la variable de respuesta, se realizó el procedimiento de la prueba de hipótesis, de acuerdo al cual para cada efecto se plantearon dos hipótesis: la nula y la alternativa.

Los criterios en los que se basa la técnica ANOVA, junto con el planteamiento de las hipótesis nulas y alternativas para los efectos individuales y de interacción de los factores concentración de NaOH y temperatura de reacción de hidrólisis, se muestran en el Anexo III.

El cálculo de los valores de los parámetros establecidos en el modelo estadístico de la Ecuación AIII.1, además del análisis de efectos estadísticamente significativos de los factores de diseño sobre la variable de respuesta, se realizó con ayuda del programa STATGRAPHICS Centurion®.

El criterio estadístico bajo el cual el programa STATGRAPHICS Centurion®, acepta o rechaza la hipótesis nula es el valor p. El valor p se define como la probabilidad de ocurrencia de que la hipótesis nula sea verdadera.

El programa STATGRAPHICS trabaja con un nivel de confianza predeterminado del 95,00 % (o nivel de significancia $\alpha = 0,05$). Para que exista un efecto estadísticamente significativo de uno de los factores de diseño sobre la variable de respuesta, es necesario que el valor p determinado a través del ANOVA sea menor a 0,05 (Gutiérrez, 2008, p. 241).

2.3.2. DETERMINACIÓN DEL PROGRESO DE LA HIDRÓLISIS A TRAVÉS DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO CON REACTIVO DE BIURET

Reactivos

- Hidróxido de sodio, 99,00 %, Merck
- Sulfato de cobre anhidro, 99,00 %, Merck
- Tartrato de sodio y potasio, $\geq 99,00$ %, Sigma Chemical Company
- Ioduro de potasio, 99,80 %, Mallinckrodt
- Suero de albúmina bovina, $\geq 98,00$ %, Sigma Aldrich

Materiales

- Erlenmeyers de 125 y 250 mL
- Vasos de precipitación de 100 mL
- Tubos de ensayo de vidrio de 10 mL
- Micropipetas automáticas de 10, 100 y 1 000 μL
- Puntas de plástico para micropipetas
- Matraces de aforo de 1 000 mL
- Probetas de 100 mL
- Tubos de plástico para microcentrífuga de 1,5 mL
- Tubos de plástico para centrifuga de 50 mL

Equipos:

- Molino eléctrico para granos Cuisinart, modelo DCG-20BKN
- Balanza analítica Mettler Toledo, modelo AG 204, 210 g, 0,0001 g
- Baño termostático con agitación Precision Scientific, 99,9 °C, 200 rpm, 0,1 °C, 5 rpm
- Espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu, modelo 160-A
- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415 D
- Agitador vórtex Gemmy, modelo VM-300
- Centrífuga Thermo Scientific, modelo IEC CL31R

Método

Como procesos previos a la hidrólisis alcalina, se trituraron los conglomerados de membranas intersticiales en un molino de granos de café, tal como se muestra en la Figura All.1 del Anexo II y luego se preparó una cantidad suficiente de las soluciones de hidróxido de sodio al 1,00 %, 3,00 % y 5,00 % p/p, requeridas para el desarrollo del diseño experimental.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en un baño termostático agitado, para lo cual se colocó, en un erlenmeyer de 125 mL, 1,5 g de membranas aisladas con 75 mL de hidróxido de sodio, de manera tal que se cumplió con la relación mg de membranas aisladas / mL de solución de hidróxido de sodio: 20:1. Lo anteriormente expuesto se realizó para cada una de las 27 experimentaciones requeridas por el diseño experimental. El orden de experimentación se realizó de acuerdo con los datos expuestos en la Tabla AIII.1, con base en la cual, se colocó la solución de hidróxido de sodio correspondiente y se ajustó el baño termostático a la temperatura requerida. La agitación fue de 90 rpm.

El progreso de la reacción de hidrólisis fue medido a través del método de cuantificación de proteínas por colorimetría con el reactivo de Biuret. Para la preparación del reactivo de Biuret se utilizó hidróxido de sodio, sulfato de cobre, ioduro de potasio y tartrato de sodio y potasio, de acuerdo al método descrito por Gutiérrez (2005), el mismo que se encuentra en el Anexo IV, parte A (p. 50).

Para medir la concentración de proteínas se aplicó el protocolo de colorimetría con reactivo de Biuret, descrito en el Anexo IV parte B. Para cada uno de los 27 días de experimentación se elaboró una curva de calibración con estándar de albúmina de suero bovino de concentración 20 mg/mL. La lectura de los valores de absorbancia, tanto de la curva de calibración como de las muestras hidrolizadas, se realizó a 540 nm (Fernández y Galván, 2006, pp. 1-6).

La concentración de proteína debido al proceso de hidrólisis fue monitoreada cada 30 min, tiempo en el cual se tomó una alícuota de 1 mL. La alícuota fue colocada en un tubo Eppendorf de 1,5 mL de capacidad y se sometió a

microcentrifugación. Las condiciones de operación de la microcentrífuga fueron 9 800 rpm durante 5 min. Las alícuotas fueron tomadas hasta que la concentración de proteínas dada por espectrofotometría no presentaba cambios significativos, por lo que el proceso de hidrólisis se realizó durante 5,5 h.

Los resultados obtenidos fueron tratados mediante un análisis estadístico, a través del cual se seleccionó el mejor tratamiento. Una vez completado este paso, se repitió el proceso de hidrólisis alcalina, esta vez, en erlenmeyers de 250 mL, donde se conservó la proporción 20:1, con lo que, en cada erlenmeyer se colocaron 5 g de membranas aisladas con 250 mL de solución de hidróxido de sodio.

Una vez concluido el proceso de hidrólisis, el producto obtenido se centrifugó en tubos de 50 mL, bajo condiciones de 9 800 rpm y 18 °C. Este proceso se dio con el objetivo de retirar los restos sólidos de cáscara de huevo de gallina. Finalmente se recolectó el sobrenadante y se reservó en un recipiente plástico en refrigeración (8 °C), para los posteriores procesos.

En el Anexo II, se muestran fotografías del proceso de extracción de proteínas implementado.

2.4. DETERMINACIÓN DE LOS PROCESOS DE ACONDICIONAMIENTO Y DE SECADO PARA EL COMPLEJO PROTEÍCO HIDROLIZADO

2.4.1. ACONDICIONAMIENTO DEL pH

El acondicionamiento de pH se hizo con una solución de HCl 0,5 N (Ácido Clorhídrico, 36,50-38,00 %, reactivo ACS, J.T. Baker) y su monitoreo se realizó con el pHmetro marca WTW, modelo 330i, con electrodo marca SENTIX, modelo 41, de rango de medición de pH de 1,00 hasta 14,00 y con una sensibilidad de 0,01. La medición del pH se hizo a temperatura ambiente (18 °C). El pH se

acondicionó desde un valor aproximadamente de 13 hasta un valor de 7, con el fin de obtener un producto final de pH neutro.

Adicionalmente, la neutralización se hizo con el objetivo de preparar al hidrolizado para la siguiente etapa, que consiste en la concentración de sólidos por ósmosis inversa. El acondicionamiento del pH permitió proteger a la membrana del equipo de ósmosis inversa, puesto que esta presenta rangos de resistencia química para valores menores a 12. Cabe destacar que los componentes de interés no precipitaron debido al cambio de pH, ya que su pH de precipitación se encuentra por debajo de 7.

2.4.2. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR ÓSMOSIS INVERSA

Con el hidrolizado acondicionado se procedió a realizar la concentración de los péptidos y polipéptidos presentes en el producto diluido, a través del uso de una de las tecnologías de membranas, en este caso el filtrado por ósmosis inversa. Esta operación tuvo como objetivo incrementar la cantidad de sólidos hasta aproximadamente el 15,00 %, preservando la cantidad y actividad de los componentes de interés.

Para este procedimiento se utilizó el módulo de filtración a escala de laboratorio marca SEMATEC, modelo micro 240, con tanque de alimentación de 5 L de capacidad y membrana de poliamida marca AQUIOUS, código AFC99. El diagrama de este equipo, además de la caracterización detallada de sus componentes, se encuentra en el Anexo V.

Para conocer la cantidad de agua que aproximadamente se debía retirar para que el volumen de hidrolizado retenido tenga una concentración en sólidos del 15,00 %, se realizó el balance de masa correspondiente.

El equipo trabajó con un volumen de hidrolizado de alrededor de 3,5 L. Se operó con una presión transmembranaria (PTM) de 48 bar o 700 psi, la misma que se

mantuvo estable a través de la manipulación de la válvula de regulación. Se trabajó con un flujo de permeado de 0,4-0,6 L/h, para lo cual, se ajustó la velocidad de circulación provocada por la bomba de pistones, marca CAT PUMPS, modelo 1051, a través del tablero de control automático LESSON SPEEDMASTER en el que se estableció una frecuencia de 37,8 Hz.

Las condiciones de operación para la concentración de proteína hidrolizada de membranas intersticiales en el módulo de ósmosis inversa, fueron elegidas de acuerdo a datos establecidos en estudios con suero de leche que se han realizado en el DECAB, en los que se utilizó ósmosis inversa como método de concentración de proteínas.

La temperatura del hidrolizado en el tanque de alimentación se mantuvo entre 20 y 25 °C a través de la regulación del flujo de agua en el intercambiador de calor. El monitoreo se realizó con el termómetro digital, marca MULTITHERMOMETER, modelo BOE-311, con sensibilidad de -50 °C a 300 °C, el cual se mantuvo sumergido en el tanque de alimentación durante todo el proceso. La conservación de un rango de temperatura bajo, del hidrolizado en el tanque de alimentación evitó la afectación de las proteínas.

Las medidas de temperatura y del flujo de permeado se tomaron cada 10 min durante la primera hora de operación y luego cada 30 min para las siguientes horas. El equipo se mantuvo en recirculación durante 4 h aproximadamente; en ese tiempo se extrajeron alrededor de 2 L de agua. El retenido final fue envasado en un recipiente plástico y almacenado en refrigeración para ser utilizado en procesos posteriores

Una vez finalizado el proceso, se realizó el lavado de la membrana, con el fin de conservar la calidad y su permeabilidad original. Esto se llevó a cabo con la aplicación de los protocolos descritos en los instructivos de operación desarrollados por el DECAB.

2.4.3. RECUPERACIÓN DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANAS INTERSTICIALES POR LIOFILIZACIÓN

El proceso de liofilización se llevó a cabo en el equipo marca STOKES, modelo 902-001-8, cuyos componentes se describen en el Anexo VI.

Como procedimiento previo al uso del liofilizador, se prepararon cargas del hidrolizado de alrededor de 150 g, las cuales fueron empacadas en fundas de plástico tipo ziploc, para luego someterlas a congelación a una temperatura de alrededor de -17 °C. El congelamiento del hidrolizado fue realizado durante 12 h.

Una vez encendido y acondicionado el equipo de liofilización, se colocaron en la bandeja de la balanza trozos del hidrolizado congelado. Las cargas introducidas por día fueron aproximadamente de 120-150 g. El proceso de sublimación fue llevado a cabo durante 6-7 h.

Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes:

- El "set point" para la temperatura del aceite de calentamiento que circula por los intercambiadores de placa, fue de 40 °C. Esta temperatura no afecta a las proteínas hidrolizadas presentes en la muestra (Stryer, 1995, p. 269)
- Temperatura del producto o de la muestra: 40,01 °C ± 0,11
- Temperatura de sublimación: -28,48 °C ± 1,18
- Presión de vacío: 0,059 mm Hg

2.5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL COMPLEJO PROTEICO HIDROLIZADO OBTENIDO

El producto final, que constituye un liofilizado de hidrolizado de membranas de cáscara de huevo de gallina, fue caracterizado inicialmente a través de los análisis de humedad al vacío, concentración de proteína y cantidad de cenizas, para los que se utilizaron los métodos descritos en la sección 2.2.

2.5.1. DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN EL PRODUCTO FINAL POR ELECTROFORESIS

Con el objetivo de conocer el tipo de proteínas presentes en la muestra hidrolizada y liofilizada de membranas intersticiales, se llevó a cabo la técnica de electroforesis utilizando el equipo Phast System[®], el mismo que se muestra en el Anexo VII.

Para este análisis se siguieron los pasos estipulados en el protocolo: “Determinación de pesos moleculares de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida sodedecil sulfato SDS-PAGE”, el mismo que se muestra en el Anexo VIII (Wyckoff, Rodbard y Chrambach, 2004, pp. 460-465).

Para la técnica se utilizaron geles de poliacrilamida con gradiente 8–25, marcadores o estándares de proteínas de bajo, alto y amplio espectro de pesos moleculares, tal como se detalla en el Anexo VIII.

De acuerdo al protocolo, las muestras a ser analizadas deben tener una concentración de proteínas dentro de un rango específico, por lo cual, se prepararon soluciones de proteína hidrolizada de concentraciones 5, 7 y 10 mg de proteína / mL de buffer para muestra.

Las condiciones de operación del equipo Phast System[®] para la etapa de separación fueron:

- Temperatura de la cámara de separación 15 °C
- Voltaje inducido en la cámara de separación 100 V
- Corriente inducida en la cámara de separación 19,8 mA
- Potencia inducida en la cámara de separación 1,9 W

Para la etapa de revelado, se utilizó como solución de tinción azul de coomasie.

Una vez finalizados los procesos de separación por electroforesis y revelado de los geles de poliacrilamida, se analizaron los resultados obtenidos comparando

las bandas de los estándares o marcadores de proteínas con las bandas obtenidas de las muestras.

2.5.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS POR HPLC

La determinación de la composición de los aminoácidos presentes en el producto final fue realizada en el INIAP, para la cual se utilizaron las metodologías descritas en la sección 2.2.

2.6. DESARROLLO DEL DISEÑO A ESCALA PILOTO CON BASE EN LAS MEJORES CONDICIONES OBTENIDAS PARA LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS

El diseño a escala de planta piloto del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (RCHG), se basó en una producción de 100 kg/día de RCHG, flujo de residuos que desprende una empresa productora de mayonesa representativa de la provincia de Pichincha.

Para el dimensionamiento del reactor de hidrólisis se utilizaron las mejores condiciones de concentración de solución de hidróxido de sodio y de temperatura de reacción de hidrólisis, obtenidas gracias al análisis estadístico realizado en la parte experimental a nivel de laboratorio. Mientras que para los equipos en los que no ocurre un proceso de reacción, las dimensiones se obtuvieron con base en los flujos de procesamiento requerido y con la ayuda de catálogos de algunas empresas especializadas en el tratamiento de residuos de la industria alimenticia.

Se realizó el balance de masa del proceso y con ello se preparó el diagrama de flujos y corrientes o “flow-sheet”. Se realizaron los balances de energía para los procesos de reacción de hidrólisis y de neutralización. Se construyeron los diagramas de bloques del proceso (BFD), de flujo del proceso (PFD), de tuberías e instrumentación (P&ID) y de distribución de equipos en planta o “lay-out”.

Se prepararon también las hojas de especificaciones de los principales equipos requeridos para el proceso desarrollado.

La nomenclatura y simbología de los diagramas se basó en lo estipulado en las normas ISA S5.1-S5.3 y la manera como se estructuraron los diagramas estuvo de acuerdo con los criterios que sugieren Turton et al., (2012, pp. 6-26).

2.7. ESTIMACIÓN DE LOS COSTOS DEL DISEÑO DE PLANTA

La estimación de los costos de la planta piloto de recuperación de proteína hidrolizada a partir de RCHG, se basó en los equipos principales necesarios para el proceso. Se solicitaron cotizaciones a empresas como MOBA, OVOBEL e INCOLOR, de acuerdo a las especificaciones técnicas requeridas.

La estimación de la inversión del capital fijo, del costo de equipos auxiliares y de la inversión para el capital de operación se realizó en función de los equipos principales por el método de “factores por experiencia” establecidos de acuerdo a criterios bibliográficos (Holland y Wilkinson, 1999, p. 70).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PROCESO DE SEPARACIÓN ENTRE CÁSCARA Y MEMBRANAS

3.1.1. EVALUACIÓN DE LAS ALTERNATIVAS PARA EL PROCESO DE SEPARACIÓN

A lo largo de la sección 1.3.1, se realizó un estudio para tres métodos, a través de los cuales se logra la separación de las membranas intersticiales y la cáscara a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina. Las características de las alternativas analizadas fueron evaluadas a través de una matriz de decisión, la misma que se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Evaluación de los métodos de separación de los componentes de los residuos de cáscara de huevo de gallina
(Valor de puntaje: Bajo = 1; Medio = 2; Alto = 3)

CRITERIOS DE EVALUACIÓN	MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS INTERTICIALES Y CÁSCARA A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA		
	Tratamiento químico con HCl	Tratamiento físico por diferencia de densidades	Tratamiento con microondas
	PUNTAJE		
Gasto de reactivos	3	1	1
Diseño y construcción de equipos especializados	2	2	3
Alteración de las proteínas presentes en las membranas intersticiales	3	1	2
Generación de sustancias residuales	3	1	1
Tiempo requerido para el procesamiento de gran cantidad de RCHG	3	1	3
Necesidad de tratamientos posteriores para completar la separación	3	1	3
TOTAL	17	7	13

Los criterios de evaluación planteados en la Tabla 3.1 permitieron realizar una evaluación comparativa entre los métodos de separación químico, físico y por microondas. La escala de evaluación utilizada es cuantitativa y presenta 3 niveles que son: requerimiento bajo, medio y alto, a los que se les asignó los números 1, 2 y 3, respectivamente. Bajo esta forma de evaluación, el método que reúna el puntaje más bajo es el más adecuado para ser implementado, puesto que constituye el más económico debido a su nivel bajo en requerimientos.

Con el análisis del puntaje obtenido con la matriz de decisión, se identificó que el tratamiento físico o método por diferencia de densidades es el que permite el procesamiento de grandes cantidades de residuos de cáscara de huevo de gallina, de una manera práctica, económica y con el menor efecto sobre las membranas intersticiales.

Para el tratamiento químico mediante la disolución de la fase mineral con HCl diluido se tuvo el puntaje más alto. El método químico es el que menos se ajusta a las condiciones requeridas; sus principales inconvenientes son:

- Alto consumo de HCl, debido a las grandes cantidades de residuos de cáscara de huevo de gallina que se requieren procesar.
- Requerimiento de tiempo elevado para el proceso de solubilización de la fase mineral, que puede ser reducido a través del aumento de concentración de la solución de HCl, pero esto eleva los costos y aumenta el grado de afectación a las proteínas presentes en las membranas intersticiales.
- La transformación del carbonato de calcio presente en la cáscara de huevo de gallina en cloruro de calcio y dióxido de carbono requiere de procesos adicionales para ser retirados de las membranas intersticiales, lo que eleva los costos en el procesamiento a nivel de planta.

El tratamiento por microondas presentó un puntaje alto en lo que respecta al nivel de requerimientos. El método de separación por microondas, al constituir un proceso a través del cual se reduce la fuerza de enlace entre las membranas y la cáscara, presenta características muy útiles como pre-tratamiento. El uso de microondas puede ser aplicado como proceso previo a la separación por

diferencia de densidades. Sin embargo, no resulta conveniente para el procesamiento de grandes volúmenes de residuos.

Bajo este contexto y de acuerdo con los resultados de la Tabla 3.1, se seleccionó e implementó durante el desarrollo experimental del presente estudio el tratamiento físico, por ser el método que mejor se adapta a las condiciones requeridas para la separación efectiva de la cáscara y las membranas.

3.1.2. COMPARACIÓN DEL PROCESO DE SEPARACIÓN PATENTADO CON RESPECTO AL IMPLEMENTADO

El proceso aplicado presenta algunas diferencias con respecto al proceso patentado, hecho que se visualiza al comparar los diagramas de bloques que se muestran en la Figura 1.11 y en la Figura 3.1.

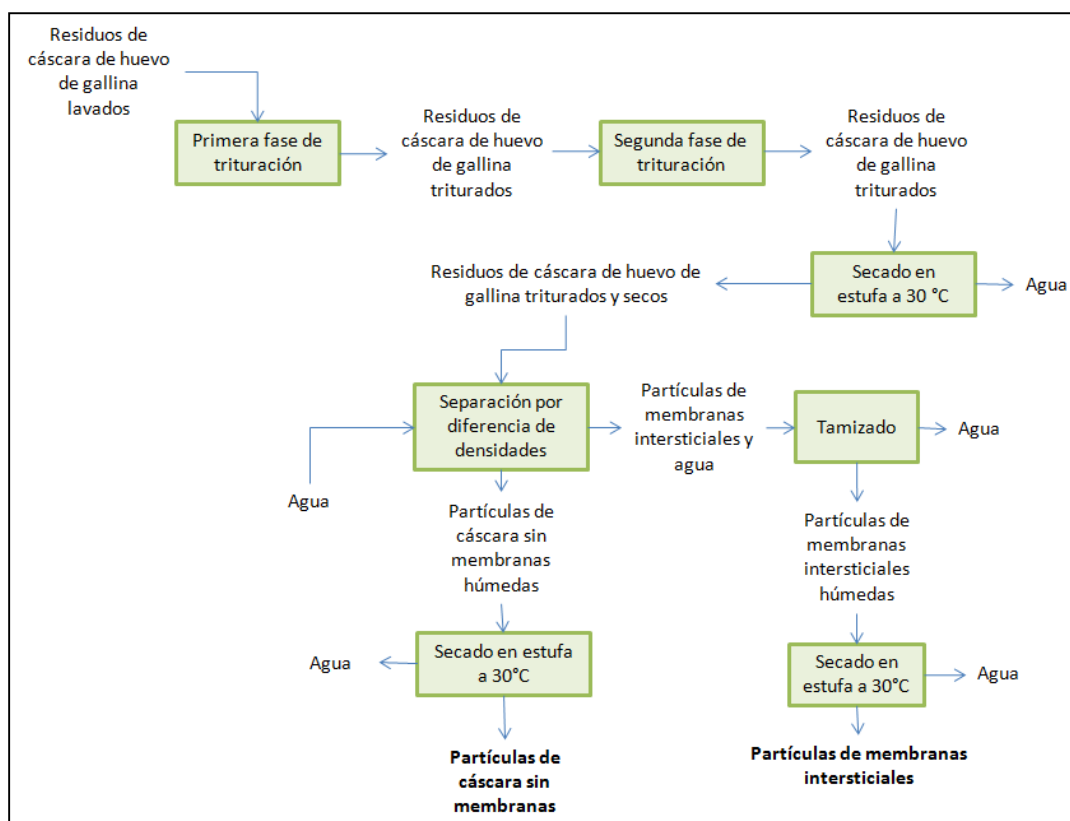


Figura 3.1. Proceso implementado para la separación de partículas de cáscara y membranas

El proceso implementado en la presente investigación, para la separación por diferencia de densidades, se basó en la patente desarrollada por MacNeil (2001), la misma que se describe a lo largo de la sección 1.3.1.2 (pp. 5-7).

La principal diferencia entre el proceso llevado a cabo y el patentado radica en el modo de alimentación y extracción de los residuos de cáscara de huevo de gallina. En el equipo desarrollado por MacNeil que se muestra en la Figura 1.13, el proceso se lleva a cabo a manera de un sistema continuo; sin embargo, su construcción no fue realizada. En su lugar, se planteó un sistema tipo batch o por lotes con los equipos disponibles en la planta piloto del DECAB.

En el proceso implementado en el presente estudio, la etapa de reducción de tamaño de partícula se dividió en dos fases de trituración, lo que permitió conseguir un tamaño de partícula de 0,85 mm para aproximadamente el 50,00 % de los residuos de cáscara de huevo. El rango de tamaño de partícula obtenido con la doble trituración se muestra a manera de un perfil granulométrico más adelante. Sin embargo, el tamaño obtenido con el procedimiento aplicado se encuentra dentro del rango recomendado en la patente que corresponde a un tamaño de partícula entre 0,50-4,00 mm (MacNeil, 2001, p. 5).

Una segunda diferencia importante con respecto al proceso patentado es la adición de una etapa de secado de los RCHG triturados antes y después de la separación por diferencia de densidades, lo que ayudó a la cuantificación de las pérdidas y también al cálculo del rendimiento del proceso.

La etapa de secado permitió el uso de la técnica de cuarteo para el muestreo adecuado de cada una de las fracciones obtenidas, las mismas que se sometieron a análisis de composición, cuyos resultados se muestran y analizan más adelante.

El rendimiento del proceso, al igual que la pérdida de humedad debido al proceso implementado, se estudia en secciones posteriores.

3.1.3. RENDIMIENTO DEL PROCESO DE SEPARACIÓN POR DIFERENCIA DE DENSIDADES

Los pesos obtenidos de residuos de cáscara de huevo de gallina antes y después del proceso de separación por diferencia de densidades y luego de la aplicación de la etapa de secado, al igual que el cálculo del rendimiento del proceso implementado, se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Registro de pesos de las fracciones obtenidas antes y después del proceso de separación por densidades

			UNIDADES	VALOR
ANTES DEL PROCESO DE SEPARACIÓN POR DIFERENCIA DE DENSIDADES	RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA	Peso húmedo recibido de PRONACA con gavetas, fundas y albúmina	kg	66,20
		Peso seco luego de los procesos de lavado, trituración y secado	kg	37,28
		Peso de gavetas, fundas, albúmina y pérdidas	kg	28,92
DESPUÉS DEL PROCESO DE SEPARACIÓN POR DENSIDADES	MEMBRANAS INTERSTICIALES AISLADAS	Peso obtenido luego del proceso de secado	g	688,53
		Rendimiento teórico*	%	3,00
		Rendimiento obtenido	%	1,85
	CÁSCARA AISLADA Y MEMBRANAS INTERSTICIALES NO SEPARADAS	Peso obtenido luego del proceso de secado	kg	36,59

* (Barroeta, 2002, p. 47)

Del total de RCHG recibidos de PRONACA, el 56,31 % que corresponde a un peso de 37,28 kg, fueron recuperados como residuos triturados y secos, lo que implica que el 34,32 % del peso recibido corresponde al agua, albúmina y yema con los que los residuos salieron de la planta de cascado de PRONACA, y que fueron retirados durante la etapa de lavado. Dentro de este porcentaje se encuentran también las pérdidas asociadas a los procesos de lavado y trituración aplicados.

El rendimiento teórico que se presenta en la Tabla 3.2 constituye el porcentaje que representan las membranas intersticiales del peso total de los residuos de cáscara de huevo de gallina. De acuerdo con Barroeta (2002), este porcentaje es del 3,00 % (p. 47). Bajo este contexto, se esperaba extraer un total de 1,12 kg de membranas intersticiales a partir de 37,28 kg de RCHG, esto con un proceso de separación 100,00 % efectivo.

El proceso de separación aplicado tuvo un rendimiento del 61,56 %, puesto que permitió la recuperación de 688,53 g de membranas. Las partículas de membranas testáceas que no lograron ser recuperadas, durante el proceso de separación por diferencia de densidades, quedaron atrapadas en el fondo del tanque junto con las partículas de cáscara.

Las pérdidas de las partículas de membranas en la corriente que sedimenta se deben al uso de un equipo cuya configuración y estructura, aún cuando permitió la separación por diferencia de densidades, no obedecía a un diseño específico en el que la altura, el diámetro y la velocidad de agitación cubran los requerimientos particulares en lo que respecta a la velocidad de sedimentación y el tamaño de partícula de los residuos de cáscara de huevo de gallina procesados. De acuerdo al equipo planteado en la patente de MacNeil (2001), que se describe en la Figura 1.12, la separación se mejora con el uso de un tanque de doble fondo plano con hendidura y un agitador con brazo de arrastre (p. 3).

Cabe destacar que la cantidad de residuos de cáscara de huevo de gallina, procesados durante el desarrollo de la presente investigación, no justificaba la inversión en el diseño y construcción de un equipo como el patentado, por lo que se prefirió el uso de equipos similares, disponibles en la planta piloto del DECAB. Sin embargo se plantea la pauta para futuras investigaciones en las que se pueda profundizar en la optimización del proceso de separación por diferencia de densidades para residuos de cáscara de huevo de gallina.

3.2. ANÁLISIS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES: CÁSCARA CON MEMBRANAS, CÁSCARA AISLADA Y MEMBRANAS INTERSTICIALES AISLADAS

3.2.1. ANÁLISIS DE GRANULOMETRÍA

Los resultados de los tamaños de partícula alcanzados por los RCHG, luego de la aplicación de la doble fase de trituración, se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Análisis de granulometría para la fracción de cáscara de huevo con membranas

Número de tamiz No.	Tamaño de poro (mm)	Porcentaje de masa retenida (%)
4	4,75	0,74 ± 0,20
8	2,36	19,16 ± 2,43
10	2,00	5,61 ± 1,08
20	0,85	47,68 ± 1,24
40	0,43	21,39 ± 1,87
50	0,30	2,71 ± 0,21
fondo	< 0,30	2,72 ± 0,18

$\bar{x} \pm s$ ($n = 2$)

Alrededor del 94,00 % de los residuos triturados se encuentran dentro del rango sugerido por MacNeil (2001), es decir entre 0,50-4,00 mm, (p. 5). De acuerdo con este resultado, el proceso de reducción de tamaño de partícula implementado fue adecuado para preparar a los residuos para la etapa de separación por diferencia de densidades.

El 5,43 % de los residuos fueron triturados hasta un tamaño de partícula menor a 0,50 mm, esta fracción de los residuos, debido a su tamaño tan reducido, se adhiere fácilmente a las membranas, puesto que su comportamiento durante el proceso de separación por diferencia de densidades es el de flotar junto con las membranas en lugar de sedimentar hacia el fondo del tanque.

De acuerdo con los datos de la Tabla 3.3, para los residuos de cáscara de huevo de gallina triturados, el tamaño de partícula que prevalece corresponde al rango entre 0,85 mm y 2,00 mm (partículas de tamaño mayor e igual a 0,85 mm y menor a 2,00 mm) y corresponde al 50 % de los residuos triturados, aproximadamente.

Los residuos que no lograron ser triturados hasta el rango requerido, con un tamaño de partícula mayor o igual a 4,75 mm, es decir constituyen tan solo el 0,74 %. Esta cantidad de residuos, debido a su tamaño, sedimentan de mejor manera, y lo hacen junto con las membranas pegadas a ellos, puesto que sin una reducción adecuada del tamaño de partícula no se logra debilitar el enlace que une las membranas con la cáscara, por lo que quedan adheridas; de esta manera, se identifica una fuente de pérdida en el proceso de recuperación de membranas.

Una vez realizado el proceso de separación por diferencia de densidades, las fracciones obtenidas partículas de cáscara sin membranas y partículas de membranas intersticiales aisladas, fueron sometidas también a un análisis de tamaño de partícula, cuyos resultados se indican en la Tabla 3.4 y en la Tabla 3.5, respectivamente. El análisis comparativo de estos resultados con los de la Tabla 3.3 permite reconocer los cambios que se han dado en las distribuciones granulométricas de los productos aislados, respecto a los residuos alimentados al proceso de separación.

Tabla 3.4. Análisis de granulometría para la fracción de cáscara sin membranas

Número de tamiz No.	Tamaño de poro (mm)	Porcentaje de masa retenida (%)
8	2,36	10,42 ± 0,91
10	2,00	7,57 ± 0,96
20	0,85	64,27 ± 0,59
40	0,43	15,71 ± 1,29
50	0,30	1,46 ± 0,08
fondo	< 0,30	0,59 ± 0,06

$\bar{x} \pm s$ ($n = 2$)

Para el caso de la fracción de cáscara sin membranas, alrededor del 98,00 % de las partículas tuvieron un tamaño mayor a 0,43 mm, con el predominio del tamaño de partícula en el rango de 0,85 mm a 2,00 mm, lo que coincide con los residuos alimentados, tal como lo indica la Tabla 3.4. Sin embargo, al comparar los valores de la Tabla 3.3 con los de la Tabla 3.4 se observan dos aspectos: el primero, una reducción de las partículas de cáscara con mayor tamaño, es decir las del rango mayor a 2,36 mm y el segundo, un aumento de las partículas con tamaño en el rango de 0,85 mm a 2,36 mm.

El aumento de partículas con tamaño menor se debe a que el agitador utilizado durante el proceso de separación por diferencia de densidades, al ser del tipo hoja sencilla o pala plana, tal como lo muestra la Figura A1.3 del Anexo I, provoca una trituración adicional durante la agitación. Se observa también una reducción en la cantidad de partículas de tamaño menor a 0,43 mm, lo que corresponde al 2,00 %, tal como lo indican los datos de la Tabla 3.4. Las partículas de cáscara con tamaño menor a 0,43 mm, debido a su tamaño reducido, son las que migraron y flotaron junto con las membranas, siendo separadas junto con ellas. Estas partículas son las responsables de la presencia de cenizas en la fracción de membranas intersticiales.

En la Tabla 3.5 se muestran los resultados del análisis de granulometría realizado para la fracción de membranas intersticiales aisladas.

Tabla 3.5. Análisis de granulometría para la fracción de membranas intersticiales aisladas

Número de tamiz No.	Tamaño de poro (mm)	Porcentaje de masa retenida (%)
4	4,75	52,29 ± 5,04
8	2,36	24,65 ± 1,98
10	2,00	4,69 ± 1,02
20	0,85	11,30 ± 0,97
40	0,43	3,84 ± 0,90
fondo	< 0,43	3,22 ± 1,07

$\bar{x} \pm s$ ($n = 3$)

Con la aplicación de los procesos de separación por diferencia de densidades y secado en estufa, las partículas de membranas intersticiales, debido a su estructura de láminas pequeñas y delgadas, se pegaron entre sí y formaron conglomerados con tamaño de partícula mayor a 4,75 mm. La formación de conglomerados se observó en más del 50,00 % de las membranas trituradas y secas, tal como lo indica la Tabla 3.5; sin embargo, la parte no aglutinada se distribuyó en un 45,00 % para el tamaño de partícula mayor e igual a 0,43 mm y menor a 4,75 mm, que corresponde al rango sugerido por MacNeil (2001, p. 5).

El 7,06 % corresponde a un tamaño de partícula menor e igual a 0,85 mm; en este rango se encuentran las partículas de cáscara que migraron a manera de polvo hacia las membranas, durante el proceso de separación.

3.2.2. ANÁLISIS PROXIMAL, CONCENTRACIÓN DE CALCIO Y VALOR CALÓRICO

En la Tabla 3.6 y en la Tabla 3.7 se exhiben los resultados de la composición química, la concentración de calcio y el valor calórico obtenidos a través del análisis realizado sobre muestras de: residuos de cáscara de huevo de gallina triturados y secos, y partículas de cáscara de huevo sin membranas, respectivamente.

Tabla 3.6. Análisis proximal para la residuos de cáscara de huevo de gallina triturados

ANÁLISIS	UNIDAD	VALOR
Humedad al vacío	% p/p	1,29 ± 0,14
Concentración de proteína		3,33 ± 1,07
Cantidad de cenizas		94,62 ± 0,37
Extracto etéreo		0,49 ± 0,08
Carbohidratos totales por diferencia		0,62 ± 0,88
Valor calórico	kcal/100g	19,88 ± 0,79
Concentración de calcio	mg Ca/g material	62,70

$\bar{x} \pm s$ (n = 2)

Tabla 3.7. Análisis proximal para la fracción de cáscara de huevo sin membranas

ANÁLISIS	UNIDAD	VALOR
Humedad al vacío	% p/p	1,17 ± 0,15
Concentración de proteína		3,06 ± 0,05
Cantidad de cenizas		95,46 ± 0,67
Extracto etéreo		1,22 ± 0,20
Carbohidratos totales por diferencia		0,00
Valor calórico	kcal/100g	16,48 ± 0,18
Concentración de calcio	mg Ca/g material	94,05

$$\bar{x} \pm s (n = 2)$$

La composición de humedad, proteína, grasa cruda (o extracto etéreo), carbohidratos y cenizas es similar en las partículas de cáscara con membranas y en las partículas de cáscara sin membranas. La similitud se debe al predominio de la fase mineral, en ambas fracciones.

Los parámetros de humedad, proteínas y cenizas para las partículas de cáscara de huevo con membranas son congruentes con los valores reportados por Fernández y Arias (2010), que se determinan en la sección 1.1.2 y que establecen una humedad menor al 2,00 %, con presencia de materia orgánica como proteínas de alrededor del 3,00 % y 95,00 % de sales minerales que, al ser materiales que no arden ni se evaporan, ante la combustión forman cenizas (p. 3).

La cantidad de proteínas presentes en las fracciones se deben exclusivamente a la presencia de las membranas testáceas; es bajo este criterio que se esperaba que el valor de este parámetro para la fracción de partículas de cáscara aisladas sea mucho menor que para la fracción de cáscara con membranas.

El valor de 3,06 % de proteínas en una muestra en la que solo se esperaba hallar partículas de cáscara verifica la presencia de las membranas no separadas, que ponen en evidencia el rendimiento de 61,56 % del proceso de separación aplicado.

Debido a los bajos niveles de proteína y a la escasa presencia de grasa y carbohidratos, las partículas de cáscara antes y después del proceso de separación no constituyen una fuente de energía, tal como lo muestran las magnitudes alcanzadas por las muestras en el parámetro de valor calórico. En su lugar, ambas fracciones constituyen recursos ricos en calcio, con valores representativos de este mineral que se reportan en la Tabla 3.6 y en la Tabla 3.7.

El resultado esperado en la concentración de calcio se cumple, puesto que, para la fracción de partículas de cáscara sin membranas, se detectaron 94,05 mg de Ca por g de material, que es superior a los 62,70 mg de Ca por g de material, detectados en la fracción de partículas de cáscara con membranas.

En la Tabla 3.8, se muestran los resultados de la composición química, la concentración de calcio y el valor calórico obtenidos a través del análisis realizado sobre muestras de partículas de membranas intersticiales aisladas.

Tabla 3.8. Análisis proximal para la fracción de membranas intersticiales aisladas

ANÁLISIS	UNIDAD	VALOR
Humedad al vacío	% p/p	11,61 ± 0,34
Concentración de proteína		71,19 ± 0,00
Cantidad de cenizas		15,88 ± 0,42
Extracto etéreo		0,90 ± 0,03
Carbohidratos totales por diferencia		0,43 ± 0,01
Valor calórico	kcal/100g	290,46 ± 0,03
Concentración de Calcio	mg Ca/g material	19,93

$$\bar{x} \pm s (n = 2)$$

A través de la aplicación del método Kjeldahl, se comprobó que las membranas aisladas contienen una concentración alta de proteína, que constituye aproximadamente el 72,00 % en peso. Sin embargo, al comparar este resultado con los que se citan en la Tabla 1.12, que corresponden a los obtenidos en los análisis realizados por los investigadores MacNeil y Vlad, se observa que la

cantidad de proteína obtenida es menor a la esperada. La concentración de proteína esperada en las membranas testáceas se encuentra en el rango de 85,00 % - 90,08 % (MacNeil, 2001, p.10; Vlad, 2007, p.5). La menor concentración de proteína se debe a la presencia de cenizas, que alcanzan alrededor del 16 % en peso y provienen de las partículas de fase mineral que migraron.

Las membranas aportan significativamente al incremento en el valor calórico. Su concentración alta en proteínas hace de las membranas intersticiales una fuente representativa de energía, al ser consumidas como alimento.

La concentración de calcio en la muestra de membranas aisladas cumple con el comportamiento esperado; es decir, la menor concentración de calcio de entre todas las fracciones analizadas. Sin embargo, su presencia revela la migración de partículas de la fase mineral, correspondientes a los tamaños más pequeños que floraron durante la separación por diferencia de densidades.

3.2.3. PERFIL DE AMINOÁCIDOS PARA LA FRACCIÓN MEMBRANAS INTERSTICIALES

Los resultados del análisis de concentración de aminoácidos realizado en la presente investigación para una muestra de membranas intersticiales, se muestran en la Tabla 3.9. Adicionalmente, se realiza una comparación del perfil de aminoácidos obtenido, con algunas fuentes bibliográficas.

Puesto que son varias las referencias bibliográficas es posible establecer un “rango teórico” para la concentración de cada aminoácido. Es así como por ejemplo, para el residuo lisina, la concentración esperada está en el rango de 2,88-3,50 % p/p.

El análisis realizado por HPLC en este estudio, determina una concentración de 3,41 % p/p para la lisina, que está dentro de los parámetros esperados. Bajo esta

lógica, se tiene que la concentración del 95,00 % de los aminoácidos analizados se encuentra dentro de los rangos establecidos en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Tabla comparativa para el perfil de aminoácidos de las membranas intersticiales

Aminoácido	Estudio	MacNeil ¹	Vlad ²	Long et al. ³	Nakano et al. ⁴
	% p/p				
Lisina	3,41	3,35	3,21	2,88	3,50
Histidina	3,46	3,48	3,38	2,79	4,20
Arginina	6,15	6,46	6,89	5,33	5,75
Treonina	4,65	4,60	5,19	4,42	6,90
Ácido Glutámico	10,93	9,70	11,91	8,23	11,50
Prolina	8,47	9,34	10,79	8,23	11,80
Glicina	5,19	4,94	5,43	3,99	10,85
Cisteína	-----	8,50	6,72	6,01	-----
Valina	6,11	6,30	6,02	5,13	7,55
Metionina	3,39	3,09	3,50	2,85	2,30
Isoleucina	3,16	3,19	2,91	2,01	3,35
Leucina	3,94	4,30	4,19	3,85	5,20
Tirosina	1,73	1,73	1,57	1,33	1,95
Fenilalanina	1,99	1,65	1,60	1,48	1,55
Triptófano	0,02	-----	3,64	2,51	-----
Ácido Aspártico	7,60	-----	7,98	7,01	8,60
Alanina	2,45	-----	2,46	2,00	4,35
Serina	3,82	-----	5,05	4,28	9,20

(¹McNeil, 2005, p. 10; ²Vlad, 2007, p. 9; ³Long et al., 2008, p. 13; ⁴Nakano et al., 2003, p. 512)

De los resultados de la Tabla 3.9 se observa que las membranas se caracterizan por poseer altas concentraciones de ácido glutámico, prolina y ácido aspártico, que en conjunto representan el 27,00 % de la composición aminoacídica.

Los aminoácidos de interés son la prolina, glicina y el ácido glutámico, por estar relacionados en la formación y estructuración del colágeno. La prolina, junto con la glicina, son residuos constitutivos de la cadena de polipéptidos del colágeno, mientras que el ácido glutámico interviene en la síntesis de distintos aminoácidos, entre ellos la prolina e hidroxiprolina, ambos componentes del colágeno. Con lo

anteriormente expuesto, se observa la presencia de concentraciones significativas de colágeno (Reeds, Burrin, Stoll y Jahoor, 2000, p. 981).

El alcance de la presente investigación contempló una caracterización generalizada de las membranas intersticiales, en lo que respecta a su composición química. A través del perfil de aminoácidos se logró una mayor profundidad en el estudio de la composición proteica y se obtuvo pruebas de la presencia de colágeno, marcando precedentes importantes en la investigación de la revalorización de residuos de cáscara de huevo de gallina.

3.3. PROCESO DE RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE MEMBRANAS INTERSTICIALES

3.3.1. COMPARACIÓN DEL PROCESO DE RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS PATENTADO CON RESPECTO AL IMPLEMENTADO

El diagrama de bloques que se expone en la Figura 3.2 corresponde al proceso seleccionado y desarrollado a partir de las sugerencias expuestas por Strohbahn et al. (2012) y que se detallan a lo largo de la sección 1.3.2.2 (pp. 1-6). Para el proceso implementado, algunas etapas se realizaron de manera simultánea y otras se omitieron, lo que se observa al comparar a la Figura 3.2 con la Figura 1.15.

La obtención del producto final, un concentrado en polvo de proteínas extraídas de membranas intersticiales de cáscara de huevo, es el resultado de la selección de métodos y tecnologías adecuadas, entre las que se destacan la ósmosis inversa y la liofilización.

El uso de ósmosis inversa permitió que de manera simultánea se realicen las etapas de reducción de contenidos de sales y concentración de proteínas, mientras que a través de la liofilización se logró la eliminación del agua del

producto hidrolizado, sin afectar a las proteínas, que son compuestos muy sensibles a la temperatura.

Esquemas de cada una de las etapas que conforman el proceso de recuperación de proteínas a partir de membranas intersticiales se muestran en el Anexo II a partir de la Figura AII.1 hasta la Figura AII.5.

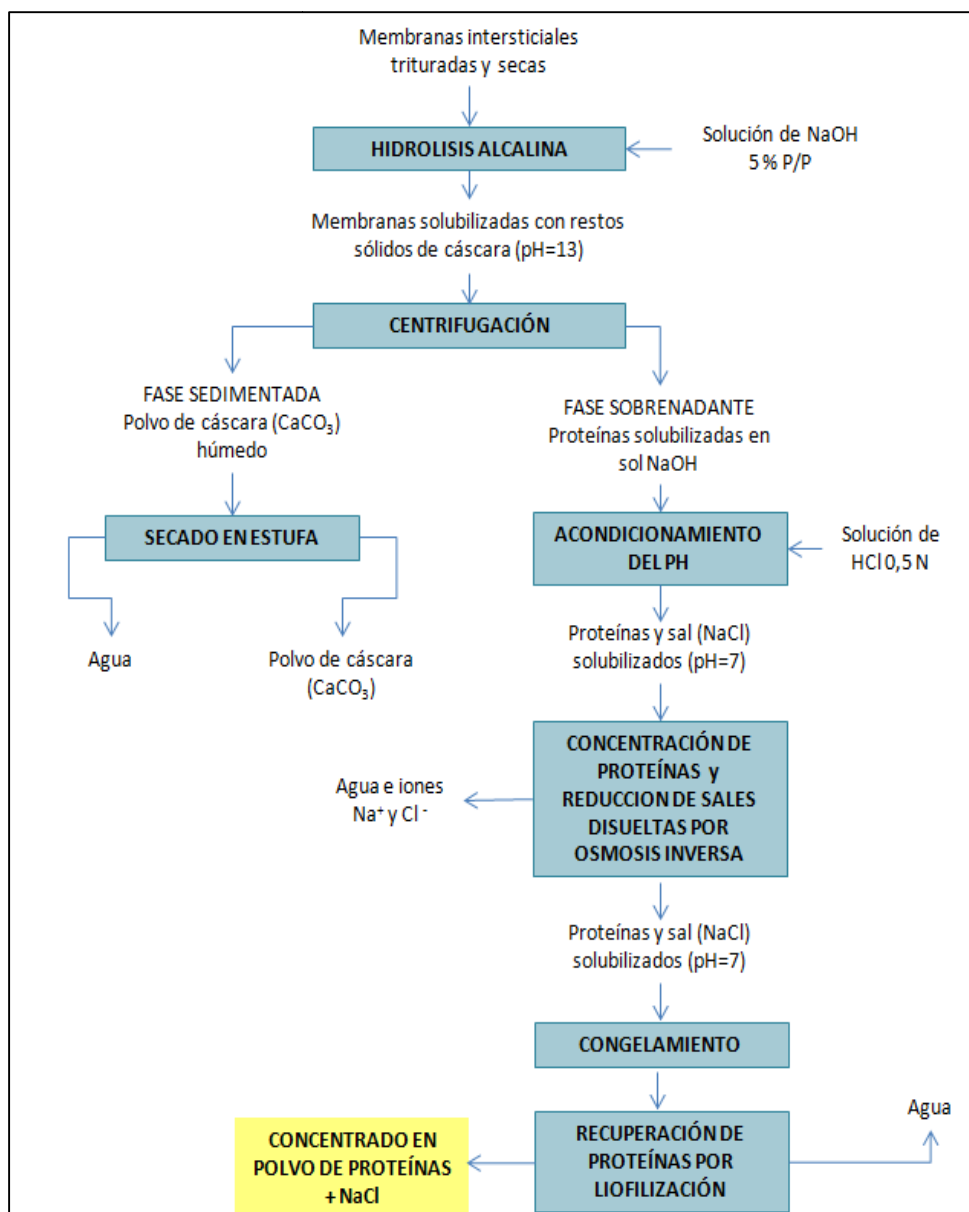


Figura 3.2. Diagrama de flujo del proceso de concentración de proteínas a partir de RCHG implementado

3.3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL APLICADO AL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR HIDRÓLISIS ALCALINA

3.3.2.1. Selección del tiempo de reacción de hidrólisis

El diseño factorial 3^2 aplicado para el proceso de hidrólisis alcalina permitió determinar si existe o no un efecto significativo de la concentración de la solución de hidróxido de sodio y de la temperatura de reacción de hidrólisis sobre el factor de respuesta grado de hidrólisis, que corresponde a la relación entre la proteína hidrolizada y la proteína total presente en muestras de membranas intersticiales.

La cantidad de proteína hidrolizada se dedujo a partir de los datos obtenidos para el avance de la reacción de hidrólisis, a través de la lectura con el espectrofotómetro de las muestras tomadas cada 0,5 h. Con este dato se calculó el factor de respuesta “grado de hidrólisis”, mediante la Ecuación 2.1.

Los datos tomados durante el desarrollo del diseño experimental, ejemplos de cálculo y un ejemplo de la curva de calibración utilizada para el monitoreo, se presentan en el Anexo IX.

En la Tabla 3.10 se muestran los resultados calculados del grado de hidrólisis, para cada una de las 27 experimentaciones realizadas.

El monitoreo del progreso de la reacción de hidrólisis se realizó durante 5,5 h, obteniéndose un total de 11 observaciones para cada uno los ensayos. Para aplicar el análisis estadístico, se seleccionó el grupo de datos perteneciente a los grados de hidrólisis alcanzados a las 3,5 h de hidrólisis que se resalta en la Tabla 3.10.

La selección de este conjunto de datos experimentales se debe a que un tiempo de 3,5 h es suficiente para obtener valores superiores al 90 % en el grado de hidrólisis, tal como se observa en la Tabla 3.10, donde este comportamiento se ve

reflejado en 6 de las experimentaciones llevadas a cabo. Esto sugiere el alcance de la completa solubilización de las membranas intersticiales.

Tabla 3.10. Porcentajes de proteína hidrolizada calculados

Día	NaOH (% p/p)	Temp. (°C)	Tiempo de hidrólisis (h)										
			0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5
			% de proteína hidrolizada										
1	1	45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,21	5,21	5,21	6,20	6,20
2	5	52,5	20,49	31,64	49,10	59,51	62,11	66,56	67,68	68,05	70,28	71,02	71,77
3	5	45	19,85	30,56	33,63	44,72	55,06	69,22	76,87	80,32	80,32	84,14	84,91
4	1	52,5	8,12	8,12	8,12	11,70	12,03	12,68	12,68	13,98	14,63	14,96	16,26
5	5	60	37,69	80,20	81,58	81,58	84,69	88,14	89,18	89,18	89,87	93,33	97,13
6	3	45	14,01	17,67	22,08	24,64	26,84	27,94	30,15	31,25	33,81	37,85	40,78
7	3	60	9,31	38,17	53,09	80,65	81,95	82,92	83,25	83,25	85,52	93,95	97,19
8	3	52,5	13,29	18,38	24,83	29,92	36,37	40,45	50,29	62,17	79,14	82,54	95,78
9	1	60	10,18	11,59	11,95	13,01	15,13	16,90	17,97	17,97	18,67	19,74	25,75
10	5	45	29,87	49,79	51,27	59,02	80,42	94,44	95,55	104,77	104,77	106,25	108,09
11	3	52,5	13,10	24,70	27,97	33,77	41,75	47,92	58,07	60,25	63,15	83,10	87,82
12	1	52,5	4,99	7,46	7,46	7,46	7,77	9,94	10,25	10,25	11,49	12,10	15,20
13	5	60	51,53	81,42	87,40	87,77	88,52	91,88	92,26	95,62	96,37	98,24	99,73
14	3	45	14,06	15,62	17,97	21,87	23,04	26,94	29,29	29,68	30,07	35,14	36,31
15	1	60	15,84	16,60	17,35	17,35	18,10	21,11	24,12	28,26	28,63	29,39	32,02
16	1	45	2,71	3,36	5,66	5,98	6,64	6,64	6,97	6,97	7,62	7,62	7,95
17	3	60	9,06	50,53	67,12	78,57	81,73	92,39	93,58	93,58	96,34	98,31	99,50
18	5	52,5	32,61	50,49	67,03	90,27	93,79	94,84	95,19	97,66	100,48	101,53	104,70
19	5	60	8,75	86,80	88,16	88,16	90,20	90,54	93,25	93,59	94,95	95,29	99,36
20	1	52,5	7,98	7,98	8,93	9,56	10,19	11,14	11,14	11,46	11,46	12,72	17,78
21	5	45	22,88	30,12	50,69	60,22	69,74	91,07	92,60	95,65	95,65	99,07	100,60
22	3	52,5	25,81	27,31	32,57	38,59	40,84	50,99	60,01	65,65	75,04	81,05	89,32
23	5	52,5	13,97	24,25	32,61	84,34	84,66	85,95	85,95	87,87	89,16	92,69	95,59
24	1	60	4,96	14,53	16,06	16,44	16,83	19,50	20,65	20,65	22,18	25,63	29,84
25	1	45	0,70	1,98	6,14	6,46	6,78	8,06	8,06	10,30	10,30	12,86	13,50
26	3	45	8,05	16,06	21,06	22,73	27,74	30,08	31,75	32,08	33,41	35,75	40,09
27	3	60	13,20	22,52	32,61	50,81	80,19	82,69	86,63	93,08	93,08	94,87	97,74

Con la elección del tiempo de 3,5 h, se tiene como ventaja que es el menor tiempo en el que se somete al material proteico a calentamiento y con el que se obtiene el mayor nivel de proteína extraída.

Adicionalmente, con la selección de este tiempo para la reacción de hidrólisis se descartan ciertos valores que se encuentran por fuera del rango máximo de concentración, pues en la Tabla 3.10 se reportan grados de hidrólisis que van más allá del 100 %. Esta situación sucede en tiempos mayores a 3,5 h y con concentración de NaOH de 5 % p/p. Esta conducta puede deberse a errores del tipo experimental-instrumental, producidos en las lecturas realizadas por el espectrofotómetro.

Se prueba la existencia de un efecto estadísticamente significativo de los errores experimentales sobre el diseño factorial 3^2 implementado a través del análisis estadístico realizado en la sección 3.3.2.2.

3.3.2.2. Estudio del efecto de la concentración de hidróxido de sodio y temperatura de reacción sobre el grado de hidrólisis

Con ayuda del programa STATGRAPHICS Centurion[®], se realizó un estudio estadístico para el diseño factorial 3^2 . El estudio se basó en el método de análisis de varianza y en el procedimiento de la prueba de hipótesis, fundamentos que se detallan en el Anexo III.

El planteamiento de las hipótesis de interés se muestra en la Tabla AIII.2 y los parámetros estadísticos, a través de los cuales se aceptó o rechazó una hipótesis nula, se presentan en la Tabla 3.11, que corresponde al análisis de varianza desarrollado por el programa STATGRAPHICS Centurion[®].

A través de la evaluación del parámetro valor-p, cuyas magnitudes se muestran en la última columna de la Tabla 3.11, se determinó que solo los efectos principales son estadísticamente significativos sobre el factor de respuesta, con un nivel de confianza del 95,00 %.

Tabla 3.11. Tabla ANOVA para el grado de hidrólisis

Descomposición de efectos	Fuente de variabilidad	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efecto principal A (parte lineal)	A: Concentración de NaOH	25049,2000	1	25049,2000	167,55	0,0000
Efecto principal B (parte lineal)	B: Temperatura de Reacción	2798,5200	1	2798,5200	18,72	0,0003
Efecto principal A (parte cuadrática)	AA	365,3520	1	365,3520	2,44	0,1329
Efecto de interacción (parte lineal)	AB	89,8174	1	89,8174	0,60	0,4469
Efecto principal B (parte cuadrática)	BB	103,6670	1	103,6670	0,69	0,4144
	Error total	3139,5500	21	149,5020		
	Total (corr.)	31546,1000	26			

Los efectos principales corresponden a los debidos a cada factor de diseño de manera individual. En la Tabla 3.11, se representan con las letras A y B y el resultado obtenido se interpreta de la siguiente manera: existe un efecto estadísticamente significativo de la concentración de solución de hidróxido de sodio y la temperatura de reacción sobre el grado de hidrólisis. Bajo este contexto se tiene que el cambio en el nivel de los factores concentración de NaOH y temperatura de reacción da lugar a un cambio significativo en el comportamiento del factor de respuesta grado de hidrólisis.

Adicionalmente, para un diseño factorial 3^2 , el programa STATGRAPHICS realizó la descomposición de los efectos principales en sus partes lineal y cuadrática. Esta descomposición otorga al diseño aplicado una ventaja frente a los diseños experimentales 2^k , puesto que, permite un estudio más profundo del efecto, al dar la oportunidad de conocer si dicho efecto es lineal o de curvatura (Gutiérrez, 2008, p. 247).

Para estudiar un efecto lineal basta con probar el factor en dos niveles, mientras que para estudiar un efecto cuadrático son necesarios al menos tres niveles; es decir que, con la aplicación del diseño factorial 3^2 fue posible determinar si el comportamiento de la variable de respuesta es o no lineal en el rango de variación de los factores estudiados (Gutiérrez, 2008, p. 239). En el diseño aplicado, el tercer nivel para cada factor de diseño correspondió al punto medio de los rangos establecidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 3.11 y en función de las magnitudes alcanzadas por el valor-p para las partes lineal y cuadrática de cada efecto principal, se tiene, para un nivel de confianza del 95,00 %, que, el comportamiento estadísticamente significativo es del tipo lineal y no cuadrático para ambos factores de diseño. Este comportamiento se respalda a través de la gráfica de efectos principales que se presenta en la Figura 3.3.

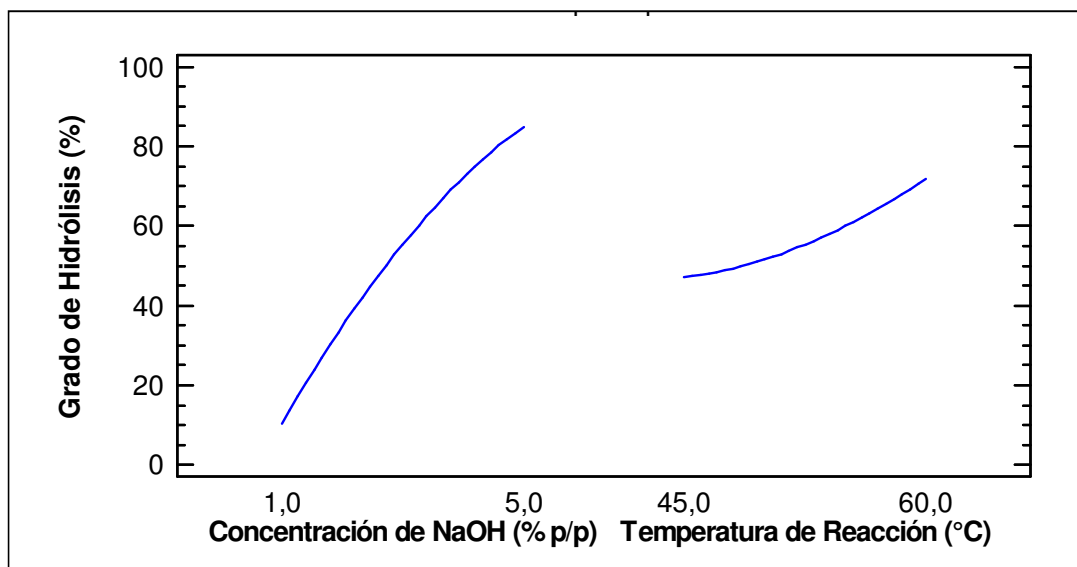


Figura 3.3. Gráfica de efectos principales para el factor grado de hidrólisis

Como se observa en la Figura 3.3, la representación de cada efecto principal, permite comprender el comportamiento de cada factor de diseño sobre la variable de respuesta. El predominio del efecto lineal, relacionado con los valores obtenidos en la tabla ANOVA, es evidente, ya que las líneas tienen una curvatura

apenas perceptible. En lo que respecta al comportamiento, se observa que a mayor concentración de solución de hidróxido de sodio y a mayor temperatura de reacción se obtiene un mayor grado de hidrólisis

Entre las herramientas que ofrece el programa STATGRAPHICS se encuentra el diagrama de Pareto, el cual se muestra en la Figura 3.4. Esta gráfica permite la visualización y determinación de los efectos que tienen un mayor impacto sobre la variable de respuesta.

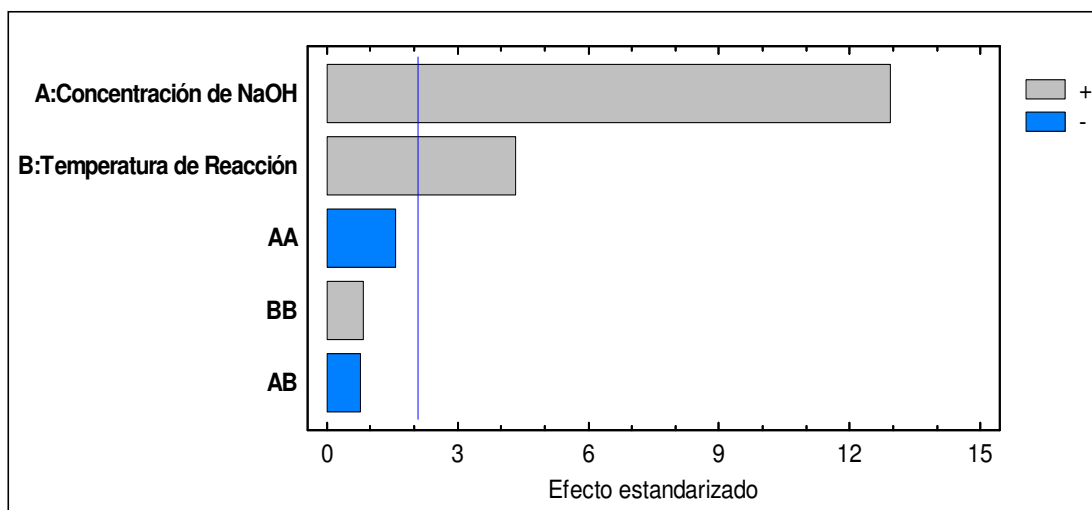


Figura 3.4. Diagrama de Pareto estandarizado para el grado de hidrólisis

Como se analizó anteriormente, ambos factores de diseño tienen efecto estadísticamente significativo sobre el grado de hidrólisis. Sin embargo, al comparar ambos efectos a través del diagrama de Pareto, es notorio que la concentración de solución de hidróxido de sodio es el factor con mayor incidencia sobre el grado de hidrólisis.

Otra herramienta muy útil que ofrece el programa STATGRAPHICS es el ajuste de los datos experimentales a un modelo de regresión, cuya finalidad es la de predecir el valor del factor de respuesta para diferentes valores de los factores estudiados (Gutiérrez, 2008, p. 177).

Los coeficientes estimados que componen la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos experimentales se muestra en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Coeficientes de regresión y de determinación para el modelo ajustado

		Magnitud
Coefficientes de Regresión	Constante	69,4962
	A: Concentración de NaOH	39,9326
	B: Temperatura de Reacción	-5,5494
	AA	-1,9508
	AB	-0,1824
	BB	0,0739
Coefficientes de Determinación	R ²	90,0477 %
	R ² _{aj}	87,6781 %

La ecuación de regresión del modelo ajustado es la que se presenta en la Ecuación [3.1] y con ella se hace posible predecir el comportamiento del grado de hidrólisis.

$$\text{Grado de Hidrólisis} = 69,496 + 39,933 \text{ Concentración de NaOH} - 5,549 \text{ Temperatura de Reacción} - 1,951 (\text{Concentración de NaOH})^2 - 0,182 (\text{Concentración de NaOH})(\text{Temperatura de Reacción}) + 0,074 (\text{Temperatura de Reacción})^2 \quad [3.1]$$

La visualización del modelo ajustado dado por la Ecuación [3.1] se consigue con el gráfico de superficie de respuesta, que se muestra en la Figura 3.5 y se encuentra representado por la malla de color azul que se extiende sobre toda la región experimental.

Cada una de las 27 observaciones del diseño experimental está representada también en la Figura 3.5 a través de puntos verdes sobre pequeñas líneas rojas. Las curvas de nivel o isolíneas, presentadas como áreas de diferentes colores en la base, corresponde a la gráfica de contornos, donde cada sector o curva de nivel representa las combinaciones de concentración de hidróxido de sodio y

temperatura de reacción donde el grado de hidrólisis es el mismo (Gutiérrez, 2008, pp. 179, 180).

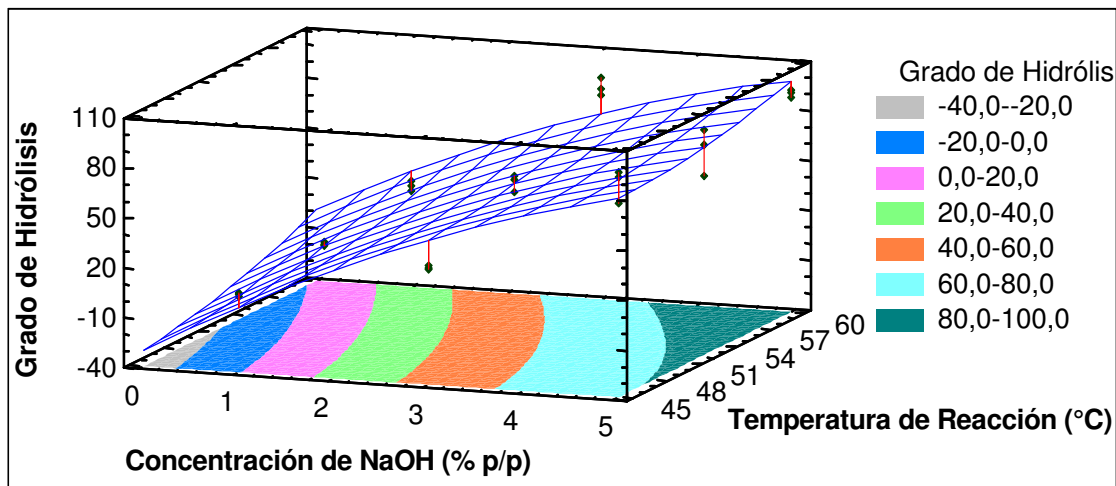


Figura 3.5. Superficie de respuesta estimada para el grado de hidrólisis

La precisión de la predicción obtenida depende de la calidad del modelo de regresión, la cual se mide a través de dos parámetros estadísticos que corresponden al coeficiente de determinación R^2 y el coeficiente de determinación ajustado R^2_{aj} ; estos valores se muestran en la Tabla 3.12.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la regresión, el estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica el 90,05 % de la variabilidad en el grado de hidrólisis.

Gutiérrez (2008) recomienda que el estadístico R^2_{aj} debe alcanzar una magnitud mayor o igual al 70,00 %, puesto que con este valor se puede asegurar estadísticamente que el efecto de los valores no estudiados y el efecto de errores experimentales son pequeños en comparación con el efecto de los factores estudiados (p. 179). Para el modelo de regresión obtenido para el grado de hidrólisis, el coeficiente R^2_{aj} es 87,68 %, con lo que se asegura el predominio de los efectos debidos a los factores de diseño seleccionados.

Otro aspecto importante obtenido a través del programa STATGRAPHICS es la estimación de los parámetros que definen el modelo estadístico con el que cumple un diseño factorial 3^2 y que se presentó en la Ecuación AIII.1. Los valores estimados para la media global del grado de hidrólisis y los efectos principales y de interacción se muestran en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13. Estimación de la media global y de los efectos para el grado de hidrólisis

Parámetros del modelo estadístico	Efecto	Valor estimado	Error estándar
Media global de la variable de respuesta (μ)	Promedio	55,3422	5,2617
Efecto del factor A sobre la variable de respuesta (γ)	A: Concentración de NaOH	74,6089	5,7639
Efecto del factor B sobre la variable de respuesta (δ)	B: Temperatura de Reacción	24,9378	5,7639
Efecto de interacción de los factores A y B sobre la variable de respuesta ($\gamma\delta$)	AB	-5,4717	7,0593

Con el análisis estadístico realizado al diseño factorial 3^2 , se determinó que el mayor porcentaje para el grado de hidrólisis se consigue con la combinación de los niveles más altos de concentración de hidróxido de sodio y temperatura de reacción, tal como lo demuestra la gráfica de superficie de respuesta de la Figura 3.5. Sin embargo, a través del ANOVA no se determinó cuál nivel y cuál tratamiento causa las diferencias estadísticamente significativas detectadas. Para cubrir esta interrogante se aplicó la técnica de comparaciones múltiples también conocida como prueba de rango múltiple, la misma que probó la igualdad de todos los posibles pares de medias, de los factores de diseño.

El programa estadístico utilizado, permitió la aplicación de la prueba de rango múltiple para los datos del presente estudio a través del procedimiento LSD (Least Significant Difference) de Fisher, que constituye la diferencia mínima que debe haber entre dos medias muestrales para poder considerar que dos tratamientos

son diferentes (Gutiérrez, 2008, p. 75). Por lo tanto, si dos intervalos de confianza se superponen, se considera que sus medias son estadísticamente iguales para un 95,00 % de confianza.

La Tabla 3.14 muestra la media del grado de hidrólisis de manera individual para cada uno de los niveles de concentración de hidróxido de sodio y de temperatura de reacción, a su vez, indica la media del factor de respuesta para la interacción de los factores de diseño. Adicionalmente, muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su medición y exhibe un intervalo de confianza alrededor de cada media, basado en el procedimiento LSD de Fisher.

Tabla 3.14. Tabla de medias para el grado de hidrólisis con intervalos de confianza LSD

	Nivel	Casos	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Concentración de NaOH	1	9	13,0056	2,1378	8,5142	17,4970
	3	9	58,1133	2,1378	53,6219	62,6047
	5	9	87,6144	2,1378	83,1230	92,1059
Temperatura de Reacción	45	9	41,8278	2,1378	37,3364	46,3192
	52,5	9	50,1400	2,1378	45,6486	54,6314
	60	9	66,7656	2,1378	62,2741	71,2570
Concentración de NaOH por Temperatura de Reacción	1-45	3	6,7467	3,7028	-1,0327	14,5260
	1-52,5	3	11,3567	3,7028	3,5773	19,1360
	1-60	3	20,9133	3,7028	13,1340	28,6927
	3-45	3	30,3967	3,7028	22,6173	38,1760
	3-52,5	3	56,1233	3,7028	48,3440	63,9027
	3-60	3	87,8200	3,7028	80,0407	95,5993
	5-45	3	88,3400	3,7028	80,5607	96,1193
	5-52,5	3	82,9400	3,7028	75,1607	90,7193
	5-60	3	91,5633	3,7028	83,7840	99,3427

Las comparaciones múltiples de medias de cada factor de diseño tomando en cuenta el efecto de interacción, se realizó de manera separada en cada nivel del

otro factor. La prueba de rango múltiple para la concentración de NaOH se aprecia a través de la Figura 3.6, mientras que para la temperatura de reacción se observa en la Figura 3.7.

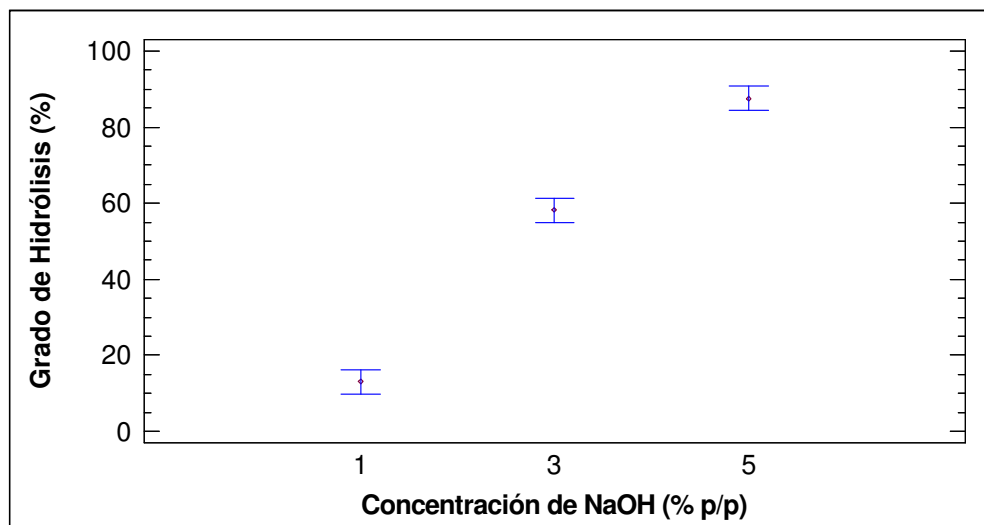


Figura 3.6. Gráfico de medias para la concentración de NaOH con intervalo LSD

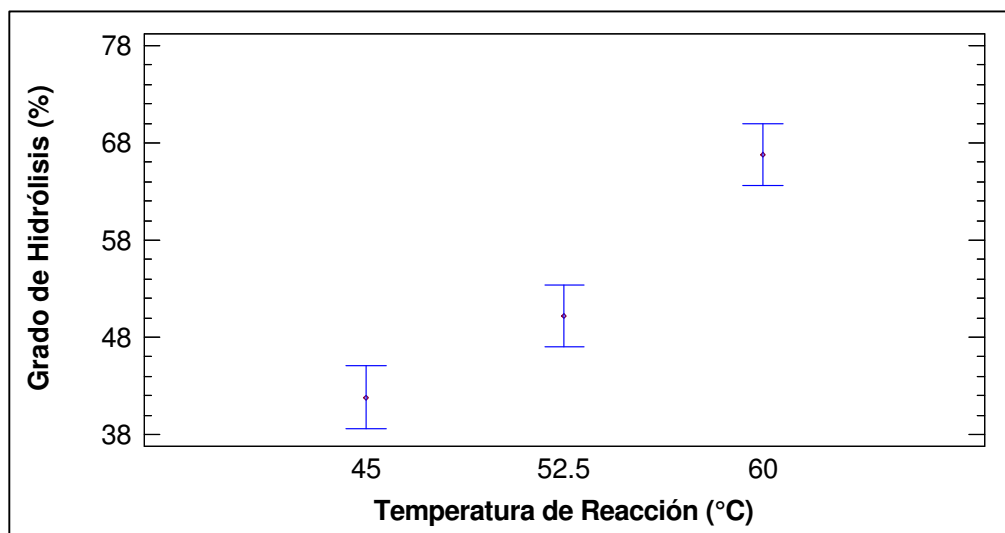


Figura 3.7. Gráfico de medias para la temperatura de reacción con intervalo LSD

Se aprecia en la Figura 3.6, que dentro de cada uno de los niveles de concentración de NaOH, el cambio de temperatura no provoca un cambio

representativo del grado de hidrólisis, puesto que los intervalos de confianza son estrechos, para un 95,00 % de confianza.

Con el nivel 5,00 % de concentración de NaOH, el uso de las temperaturas de reacción 45,0 °C, 52,5 °C y 60 °C, permite la obtención del valor del grado de hidrólisis más alto, ubicado entre el 83,00 % y el 92,00 %, aproximadamente. Para el caso de la temperatura de reacción, los valores más altos para el grado de hidrólisis se consiguen con la temperatura de 60 °C, lo que es apreciable en la Figura 3.7, sin embargo, las magnitudes alcanzadas son menores y se ubican entre el 62,00 % y el 72,00 %, aproximadamente.

De acuerdo con las gráficas de medias, se ratifica que la concentración de NaOH es el factor que provoca el efecto de mayor impacto sobre el grado de hidrólisis, y permite la obtención de los mayores grados de hidrólisis cuando se usa su nivel más alto, con lo que el mejor tratamiento corresponde a una combinación de un determinado nivel de temperatura con el 5,00 % de concentración en la solución de NaOH.

Para determinar el nivel de temperatura que defina el mejor tratamiento, se hizo uso de la gráfica de interacción con los intervalos LSD sobrepuestos, a través del programa STATGRAPHICS. Esta gráfica se muestra en la Figura 3.8 y muestra que para los niveles extremos de concentración de NaOH, los intervalos de confianza para las medias de las tres temperaturas de reacción se traslapan, lo que indica que son estadísticamente iguales.

Con el resultado obtenido se hace posible aplicar cualquiera de los tres niveles de la temperatura de reacción de hidrólisis, puesto que estadísticamente el grado de hidrólisis que se consiga será el mismo.

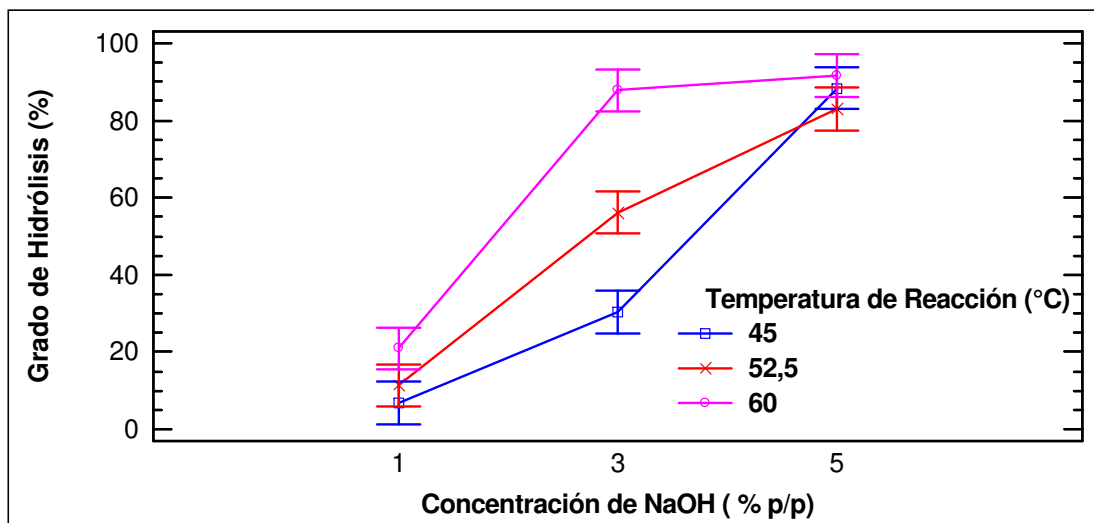


Figura 3.8. Gráfico de interacciones de medias de acuerdo con la prueba LSD con 95,00 % de confianza

Frente al resultado de que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los niveles: 45 °C, 52,5 °C y 60 °C del factor temperatura de reacción, se aplica como criterios de elección la temperatura que provoque el menor daño a las proteínas presentes en las membranas intersticiales y que reduzca el gasto energético. Con este razonamiento se selecciona la temperatura más baja. De esta manera, el mejor tratamiento dentro de la región experimental estudiada, constituye la combinación: 5,00 % p/p para la concentración de hidróxido de sodio y 45,0 °C para la temperatura de reacción.

3.3.2.3. Características del mejor tratamiento

Las experimentaciones llevadas a cabo bajo las mejores condiciones de operación, determinadas a través del estudio estadístico, se caracterizan por cambios en el color de la solución de hidróxido de sodio y en la apariencia de las membranas intersticiales. Dichos cambios están asociados con el comportamiento debido a la migración de las proteínas por el proceso de hidrólisis reportado a través del análisis de colorimetría y reflejado en la curva grado de hidrólisis vs tiempo. Estas propiedades particulares se analizan con la ayuda de la Figura 3.9 y la Figura 3.10.

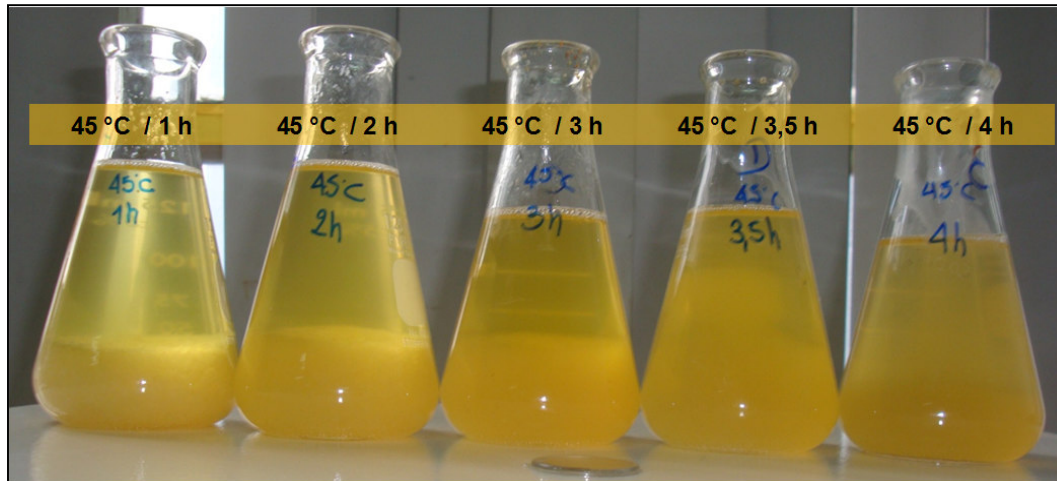


Figura 3.9. Secuencia de cambios en las membranas intersticiales durante el progreso de la reacción de hidrólisis a 45,0 °C y 5,00 % de NaOH

En la Figura 3.9 se muestra una fotografía de los cambios que se dan en las membranas intersticiales durante el transcurso de la reacción de hidrólisis. Como es evidente, la solubilización total de las membranas se alcanza a las 3,5 h lo que coincide con los altos grados de hidrólisis reportados en la Tabla 3.10. Los cambios en el color de la solución de hidróxido de sodio, como era de esperarse, parten desde un color amarillo pálido que se intensifica con el tiempo.

El someter a tiempos más prolongados a las membranas no se hace necesario, puesto que la solubilización se completa a las 3,5 h, con lo que se ratifica la selección de este tiempo como el adecuado para el análisis estadístico.

El comportamiento de la concentración de proteína con el tiempo, durante el proceso de hidrólisis alcalina, monitoreado durante un tiempo aproximado de 5,5 h, se describe a través de la Figura 3.10. La construcción de la gráfica constituye el promedio de los grados de hidrólisis calculados para las experimentaciones con el mejor tratamiento y cuyos valores se encuentran en la Tabla 3.10.

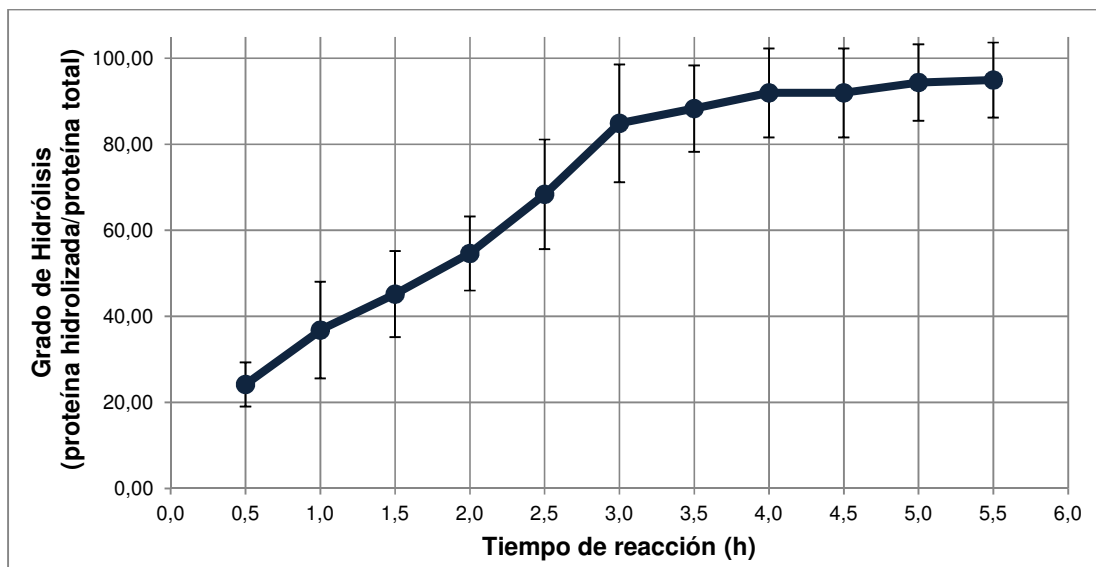


Figura 3.10. Cambios en el grado de hidrólisis con el tiempo para 45,0 °C y 5,00 % de NaOH
($\bar{x} \pm s$ ($n = 3$))

En la Figura 3.10 se observa una fase rápida de extracción de proteína durante las primeras 3 h de reacción, en donde el grado de hidrólisis alcanza valores superiores al 80,00 %. En tiempos mayores a 3,5 h, usando el método colorimétrico con reactivo de Biuret, se detecta un incremento en la cantidad de proteína hidrolizada.

El aumento en el grado de hidrólisis en tiempos mayores a 3,5 h, no se considera significativo. En la Figura 3.10, se aprecia la estabilización del factor de respuesta, lo que marca el fin del proceso de hidrólisis y con ello la solubilización completa de las membranas intersticiales.

3.4. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL

3.4.1. ANÁLISIS DE HUMEDAD, PROTEÍNA Y CENIZAS

En la Tabla 3.15 se presentan los resultados de los análisis realizados sobre muestras del producto final obtenido, que corresponden a muestras liofilizadas de

concentrado de proteína hidrolizada de membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina. A través de los análisis realizados en las membranas intersticiales, quedó establecido que no constituyen fuentes representativas de carbohidratos y grasas, por lo que para el producto final se realizaron únicamente los análisis de humedad, cantidad de proteínas y contenido de cenizas.

Tabla 3.15. Análisis de humedad, proteína y cenizas para el producto final

ANÁLISIS	UNIDAD	VALOR
Humedad al vacío	% p/p	7,98 ± 0,04
Concentración de proteína		49,94 ± 0,62
Cantidad de cenizas		32,02 ± 0,06

$$\bar{x} \pm s (n = 2)$$

Como se aprecia en la Tabla 3.15, el porcentaje de humedad es bajo y se debe al proceso de liofilización aplicado. La elección de esta tecnología como método de secado permitió preservar la estructura y calidad de los compuestos de interés, es decir, de la proteína hidrolizada.

El valor reportado para la concentración de proteína total corresponde aproximadamente al 50,00 % de la composición del producto final. Pese a que este valor es alto, tiene una magnitud menor a la esperada, ya que al realizar un proceso de concentración de proteína, se esperaban porcentajes de proteína superiores al 71,20 %, reportado en el análisis de caracterización de las membranas intersticiales.

El no haber alcanzado niveles superiores al 71,00 % en la concentración de proteínas implica que se dieron pérdidas y a la existencia de interferencias de componentes no deseados que no lograron ser retirados adecuadamente. La aparición de estos factores de pérdida e interferencia se dio lugar durante la aplicación de los diferentes procesos llevados a cabo después de la hidrólisis; estos procesos son el acondicionamiento del pH y la concentración por ósmosis inversa.

Durante el proceso de acondicionamiento del pH, la neutralización con ácido clorhídrico dio lugar a la aparición de cloruro de sodio. La cantidad de sal generada por la reacción de neutralización es la que determina el porcentaje de cenizas reportado en la Tabla 3.15. El valor esperado respecto a este parámetro se exhibe en la Tabla 1.14 y corresponde tan solo al 6,00 % de la composición.

Al comparar el 32,00 % de cenizas detectadas en el producto final obtenido en el presente estudio con el registrado en los análisis realizados por Strohbehn et al., (2012, pp. 14-15), es evidente que los procesos seleccionados y llevados a cabo en la presente investigación no son suficientes para dar lugar a un producto dentro de los rangos esperados.

La cantidad de cenizas detectada disminuyen el porcentaje de proteína en el producto final y sugiere el uso de procesos adicionales que reduzcan la cantidad de sales.

El proceso de concentración de proteína por ósmosis inversa se identifica como la etapa en la que ocurrieron pérdidas significativas de proteína hidrolizada. La acción mecánica provocada durante la recirculación del retenido (concentrado de proteína), simuló un proceso de “batido”, con el cual pequeñas burbujas de aire se introdujeron en la malla formada por la unión de las proteínas, dando lugar a espuma, que no pudo ser recuperada en su totalidad.

La Tabla 3.16 y la Tabla 3.17 muestran los cambios en la composición de las membranas intersticiales a través de su paso por los diferentes procesos implementados y representan un balance de masa estimado para cada uno de los procesos realizados.

Tabla 3.16. Balance de masa para los procesos de hidrólisis alcalina y centrifugación

Hidrólisis Alcalina				Centrifugación							
Membranas intersticiales	Composición			Hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales	Composición			Hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales centrifugado (sobrenadante)	Composición		
	Componentes	g	% p/p		Componentes	g	% p/p		Componentes	g	% p/p
	Proteínas	3,56	71,19		Proteínas	3,56	2,18		Proteínas	3,56	2,19
	Cenizas	0,79	15,88		Cenizas	0,79	0,48		Agua	150,75	92,94
	Agua	0,58	11,61		Agua	150,75	92,44		Hidróxido de sodio	7,90	4,87
	Carbohidratos y grasas	0,07	1,32		Carbohidratos y grasas	0,07	0,05		Total	162,21	100,00
Total	5,00	100,00	Hidróxido de sodio	7,90	4,85						
Solución de hidróxido de sodio	Hidróxido de sodio	7,90	5,00	Total	163,07	100,00					
	Agua	150,17	95,00								
	Total	163,07	100,00								

Tabla 3.17. Balance de masa para los procesos de neutralización, ósmosis inversa y liofilización

Neutralización con HCl 0,5 N				Concentración por ósmosis inversa				Secado por liofilización			
Hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales acondicionado	Composición			Concentrado de hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales (retenido)	Composición			Concentrado en polvo de proteínas hidrolizadas de membranas intersticiales	Composición		
	Componentes	g	% p/p		Componentes	g	% p/p		Componentes	g	% p/p
	Proteínas	3,56	0,64		Proteínas	3,56	14,02		Proteínas	3,56	86,00
	Agua	542,01	97,29		Agua	21,59	85,00		Agua	0,33	8,00
	Cloruro de sodio	11,56	2,07		Cloruro de sodio	0,25	0,98		Cloruro de sodio	0,25	6,00
Total	557,13	100,00	Total	25,40	100,00	Total	4,14	100,00			

Para 5 g de membranas intersticiales que se someten a hidrólisis alcalina con 150 mL de solución de hidróxido de sodio al 5,00 % p/p, se logra la solubilización de las membranas intersticiales que contienen 3,56 g de proteínas. Con la solubilización los fragmentos de cáscara de huevo (cenizas) sedimentan, de manera que pueden ser retirados fácilmente a través de centrifugación. Con el proceso de centrifugación se estima la separación de 0,86 g de sólidos sedimentados, que corresponden a las cenizas y los compuestos no proteicos. El sobrenadante recuperado que contiene las proteínas solubilizadas se somete a neutralización con HCl 0,5 N.

De acuerdo con el balance de masa estimado, se espera que a través del proceso de acondicionamiento de pH se generen 11,56 g de cloruro de sodio. La sal se encuentra disuelta junto con las proteínas solubilizadas, y el producto obtenido en esta etapa, que corresponde al hidrolizado de proteínas de membranas intersticiales acondicionado, presenta una composición en la que hay más sales que proteínas, en una relación 3:1 (g de NaCl : g de proteína), tal como lo indica la Tabla 3.17.

Con el proceso de concentración por tecnología de membranas, se estima retirar 530 g de agua e iones Na^+ y Cl^- , de manera que se logre concentrar al 15,00 % en sólidos a la solución que contiene a las proteínas. El resultado esperado para este proceso es la recuperación de los 3,56 g de proteínas y un contenido muy bajo de NaCl. De acuerdo con Quero (2007), el tamaño de partículas promedio para las proteínas es de 0,01 μm , mientras que para los iones Na^+ y Cl^- , el tamaño es mucho menor, alrededor de 0,0001 μm , por lo que es lógico esperar que el cloruro de sodio migre junto con el agua y se retire como permeado (p. 8).

En el secado por liofilización, se estimó retirar alrededor de 21 g de agua, de manera que la composición del producto final se ajuste a un contenido de 6,00 % en cenizas y una concentración de hasta el 86,00 % de proteína.

Con el balance de masa teórico establecido, se puede realizar una comparación entre la composición del producto final obtenida y la esperada, es decir, entre la

Tabla 3.15 y la Tabla 3.17. Se esperaba que el proceso de concentración de proteínas por tecnología de membranas conserve las proteínas en su totalidad. Sin embargo, el efecto de “batido” debido a la recirculación provocó pérdidas de proteína a manera de espuma, de manera que, la concentración al 15,00 % en sólidos contenía mayor cantidad de cloruro de sodio con respecto al valor esperado, con lo que en lugar de tener 6,00 % en cenizas se llegó hasta un valor de 32,00 %.

3.4.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS

En la Figura 3.11, se presenta una fotografía que muestra los resultados de la aplicación de la técnica de electroforesis sobre muestras del producto liofilizado-hidrolizado de membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina. Adicionalmente, adjunto a la fotografía se detalla una leyenda que indica los tipos de marcadores de proteínas utilizados y las concentraciones de las muestras inyectadas en el gel.

La concentración de las muestras introducidas en el gel de poliacrilamida obedeció a los criterios establecidos en el protocolo del Anexo VIII, donde se establece al rango entre 5-10 mg/mL de proteína, como la cantidad requerida para realizar el análisis de determinación de pesos moleculares por electroforesis.

Entre los resultados esperados para las muestras, se encontraba la aparición de bandas correspondientes a los segmentos de proteína, resultantes del desenrollamiento y ruptura de la triple hélice del colágeno, debidos al proceso de hidrólisis. Para las muestras se esperaban pesos moleculares distribuidos en el rango entre 30 y 100 kDa.

Sin embargo, como se aprecia en la Figura 3.11, existe la ausencia de bandas en las tres muestras inyectadas, lo que sugiere la presencia de algún tipo de interferencia durante el desarrollo de la electroforesis. El factor de interferencia

más probable es el alto contenido en sales presentes en las muestras, puesto que alrededor de un tercio de su composición corresponde a sal de cloruro de sodio.

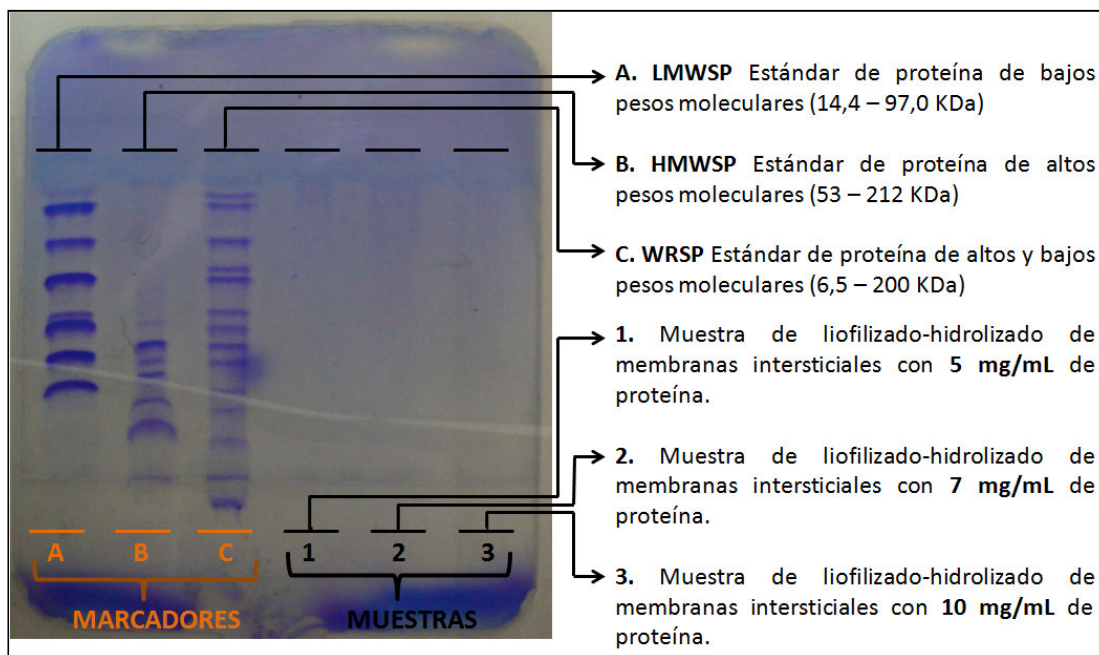


Figura 3.11. Placa de gel de gradiente 8-25 de poliacrilamida con marcadores de proteínas y muestras

De acuerdo con See, Olley y Jackowski (1985), para la correcta determinación de pesos moleculares a través de electroforesis, se requiere que las proteínas se enlacen a cantidades adecuadas de sodio dodecil sulfato (SDS). La cantidad de SDS unido a las proteínas depende de la fuerza iónica presente en la solución de SDS-proteína. Aumentos en la fuerza iónica debidos a la presencia de sales disminuye la cantidad de SDS que se enlaza a los polipéptidos y provoca una migración anómala. Cuanto mayor sea la concentración de sal en la muestra, más lenta es la movilidad o migración de las proteínas, dando lugar a bandas difusas (pp. 382,383).

Bajo este contexto, la determinación fallida de los pesos moleculares para las muestras sometidas a electroforesis está asociada a la presencia de la gran cantidad de cloruro de sodio y su influencia en la falta de formación de los enlaces SDS-proteína que posiblemente evitó el desarrollo adecuado de una densidad de

carga uniforme y con ello, la separación no logró efectuarse. La reducción de enlaces SDS-proteína, debida a la cantidad de cloruro de sodio presente en las muestras, marcarían el comportamiento obtenido en el análisis de electroforesis realizado.

3.4.3. PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Al no ser posible la identificación de las proteínas presentes en las muestras a través de la determinación de sus pesos moleculares por electroforesis, se recurrió a la aplicación de un análisis de perfil de aminoácidos como método para la determinación indirecta de las proteínas presentes en las muestras. La Tabla 3.18, que se presenta más adelante, tabula los resultados del perfil de aminoácidos y permite hacer una comparación tanto con la materia prima (membranas intersticiales) como con los datos bibliográficos.

Se obtiene una perspectiva general del comportamiento de los aminoácidos en el producto hidrolizado liofilizado se obtiene al comparar el perfil de aminoácidos del producto final con el de las membranas intersticiales antes del proceso de hidrólisis alcalina. Estos datos se encuentran en la primera y segunda columna de la Tabla 3.18 respectivamente. Tomando en cuenta que el producto final presenta una concentración total de proteína de aproximadamente 50,00 %, lo lógico es que los porcentajes de aminoácidos sean menores con relación a los obtenidos al analizar las membranas intersticiales, este comportamiento es el que se cumple en los resultados obtenidos. Sin embargo los aminoácidos de interés que constituyen los precursores del colágeno, como la prolina y el ácido glutámico, aunque reducidos siguen siendo los componentes con mayor predominio en la composición del producto hidrolizado.

La comparación de los resultados experimentales con los datos de bibliografía se realiza con la ayuda de la tercera columna de la Tabla 3.18. De acuerdo con Strohbehn et al. (2012), el perfil de aminoácidos con el que debe cumplir un producto hidrolizado y seco de membranas intersticiales cuya concentración en proteínas es de alrededor del 94,00 %, es similar al que se tabula. En este perfil

se conserva el predominio de los aminoácidos de interés prolina y ácido glutámico, los cuales llegan a constituir alrededor del 25,00 % de la composición del producto final (p.14).

Tabla 3.18. Concentración de aminoácidos para el producto hidrolizado y liofilizado

Aminoácido	Presente estudio ¹		Strohbehn et al. ²
	Producto hidrolizado y liofilizado	Materia prima	Producto hidrolizado y liofilizado
	% p/p		
Lisina	1,58	3,41	5,99
Histidina	3,71	3,46	3,23
Arginina	4,89	6,15	6,58
Treonina	3,20	4,65	3,08
Ácido Glutámico	9,30	10,93	14,61
Prolina	8,32	8,47	9,85
Glicina	4,42	5,19	4,38
Valina	5,21	6,11	7,51
Metionina	2,68	3,39	3,79
Isoleucina	2,54	3,16	3,47
Leucina	3,29	3,94	4,72
Tirosina	1,44	1,73	1,72
Fenilalanina	1,56	1,99	1,57
Triptófano	0,58	0,02	3,53
Ácido Aspártico	6,60	7,60	8,33
Alanina	2,25	2,45	2,25
Serina	2,74	3,82	3,30

(¹ Análisis realizados en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-INIAP)

(² Strohbehn et al., 2012, p. 14)

3.5. PLANTEAMIENTO DE UN PROCESO ALTERNATIVO PARA LA RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA HIDROLIZADA A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA

A través del proceso llevado a cabo en el presente estudio, que se esquematiza en el diagrama de bloques de la Figura 3.2, y de acuerdo con los resultados de los análisis de caracterización del producto final, la concentración de proteína que se alcanza es del 50,00 % p/p. Se identifica como la principal fuente de pérdida del material proteico la etapa de concentración por ósmosis inversa. Mientras que la etapa de acondicionamiento de pH genera gran cantidad de sales que bajo la configuración planteada y realizada se acumula en el producto final y con ello reducen la concentración de proteína.

La selección de procesos alternativos para estas dos etapas plantea la posibilidad de una configuración que permita alcanzar un nivel superior al 71,20 % en la concentración de proteína, al permitir la recuperación total de las proteínas eliminando la fuente de pérdida. El proceso con nuevas alternativas para las etapas anteriormente mencionadas se conceptualiza en el diagrama de bloques de la Figura 3.12.

Dentro de los cambios que se plantean para el proceso alternativo se encuentra la precipitación de las proteínas, mediante la etapa de acondicionamiento del pH con HCl 0,5 N. A través de un análisis de laboratorio realizado para el hidrolizado de proteína de membranas intersticiales, se obtuvo el comportamiento del hidrolizado frente a cambios del pH, lo que se muestra en el Anexo X, con la Figura AX.1, que corresponde a la curva de valoración (pH vs mL de HCl añadidos). Con la curva de valoración se determinó el pH de precipitación, el cual corresponde a 5,6. La valoración con HCl se realizó hasta alcanzar un pH de 1, con lo cual se constató que no hubo mayor precipitación ni cambios significativos en la turbidez y apariencia de la solución de proteína hidrolizada precipitada.

Con la proteína precipitada, la solución que contiene cloruro de sodio y exceso de ácido clorhídrico solubilizados puede ser fácilmente retirada mediante un proceso de filtración al vacío, a través de un filtro con tamaño de poro de 10 μm o menor, con lo que se logra recuperar el precipitado a manera de una torta húmeda. Con este cambio, el uso de ósmosis inversa que utiliza membranas con tamaño de poro reducido se ve desplazado, puesto que la proteína dejó de estar solubilizada, con lo que son suficientes procesos como la filtración al vacío o el uso de módulos de microfiltración para recuperarla.

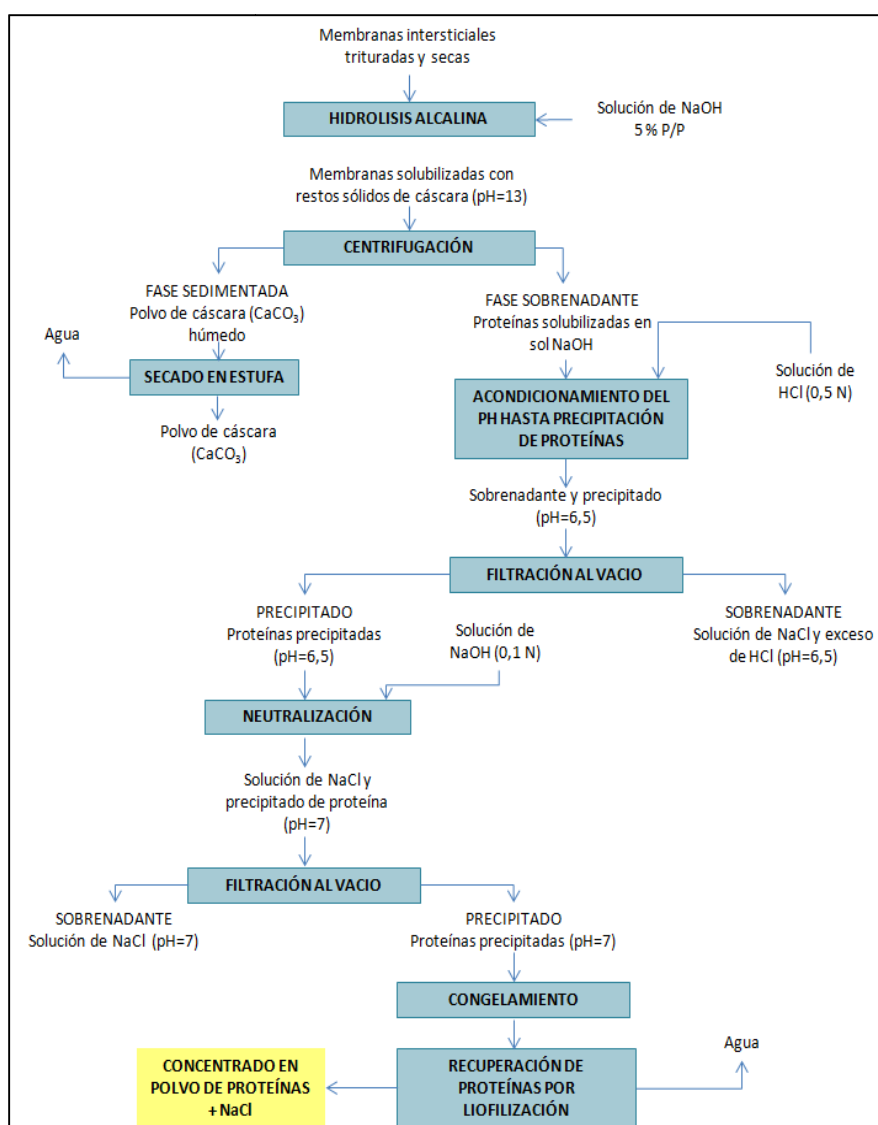


Figura 3.12. Diagrama de bloques del proceso alternativo para recuperación de proteínas a partir de RCHG a nivel de laboratorio

A continuación, para el proceso alternativo, se resuspende el precipitado con agua destilada para someterlo a una segunda etapa de acondicionamiento de pH, esta vez con hidróxido de sodio diluido (0,1 N), con el fin de llegar a condiciones de pH neutras. Nuevamente se recupera la torta húmeda por filtración, para continuar con el proceso de recuperación de proteínas por congelación y posterior liofilización.

En comparación con el proceso implementado en el presente estudio, el proceso alternativo, mediante la precipitación de las proteínas, permite un retiro efectivo del cloruro de sodio que se encuentra solubilizado, puesto que al alcanzar el pH de precipitación solo las proteínas sedimentan y la sal permanece diluida en la fase sobrenadante que rodea al precipitado.

Con base en las etapas planteadas para el proceso alternativo, teóricamente se corrigen las fuentes de pérdida de proteína. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la precipitación de las proteínas es consecuencia de la desnaturalización de las mismas. La desnaturalización de proteínas por precipitación provoca en ellas cambios en las propiedades hidrodinámicas, disminución de solubilidad y pérdidas en sus propiedades biológicas (Campos, 2010, p. 79).

3.6. DISEÑO A ESCALA DE PLANTA PILOTO DEL PROCESO DE RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA HIDROLIZADA A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA

El diseño de la planta piloto se conceptualiza bajo el criterio de obtener un concentrado de proteína hidrolizada de membranas intersticiales con una cantidad de proteína superior al 71,20 % p/p. Con este objetivo y sobre la base de los resultados obtenidos debido al proceso implementado en la presente investigación, se realiza un diseño básico a partir del proceso alternativo que se detalló y analizó a lo largo de la sección 3.5.

3.6.1. CAPACIDAD O TAMAÑO DE LA PLANTA

La elección del tamaño de la planta se basó en una investigación de campo realizada en PRONACA, que constituye la empresa a través de la cual se adquirió la materia prima necesaria para el desarrollo del presente estudio. De acuerdo a los datos proporcionados en esta industria, la demanda semanal de huevos es de alrededor de 95 000 unidades. La generación de residuos de cáscara de huevo de gallina para la planta Pumbo de PRONACA es de 100 kg/día, aproximadamente. Por lo tanto, los equipos de la planta piloto fueron dimensionados con base en este flujo de alimentación de residuos.

Cabe destacar que las grandes cantidades de residuos que desprende el proceso se destinan principalmente para abono, ya que la empresa no cuenta con un sistema de aprovechamiento de estos residuos. Así, el diseño que se plantea constituye una opción de aprovechamiento de residuos de cáscara de huevo de gallina que brinda el beneficio de la generación de un producto final con valor agregado.

El diseño de la planta piloto se concibe como un anexo para las instalaciones ya existentes en la sección de cascado en la planta Pumbo de PRONACA. Bajo esta perspectiva, construcciones adicionales, como las necesarias para cubrir los requerimientos de agua y vapor de calentamiento para la planta piloto, no se hacen necesarias, puesto que se obtienen a través de las instalaciones de servicios auxiliares con las que ya cuenta la industria.

3.6.2. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL PROCESO

El proceso para la recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina a nivel de planta piloto es esquematizado a través de las operaciones unitarias establecidas en el diagrama de bloques (BFD) de la Figura 3.13. Mientras que los equipos requeridos, al igual que la identificación de las corrientes que se obtienen a lo largo del desarrollo de cada etapa, se presentan en el diagrama de flujo de procesos (PFD) de la Figura 3.14.

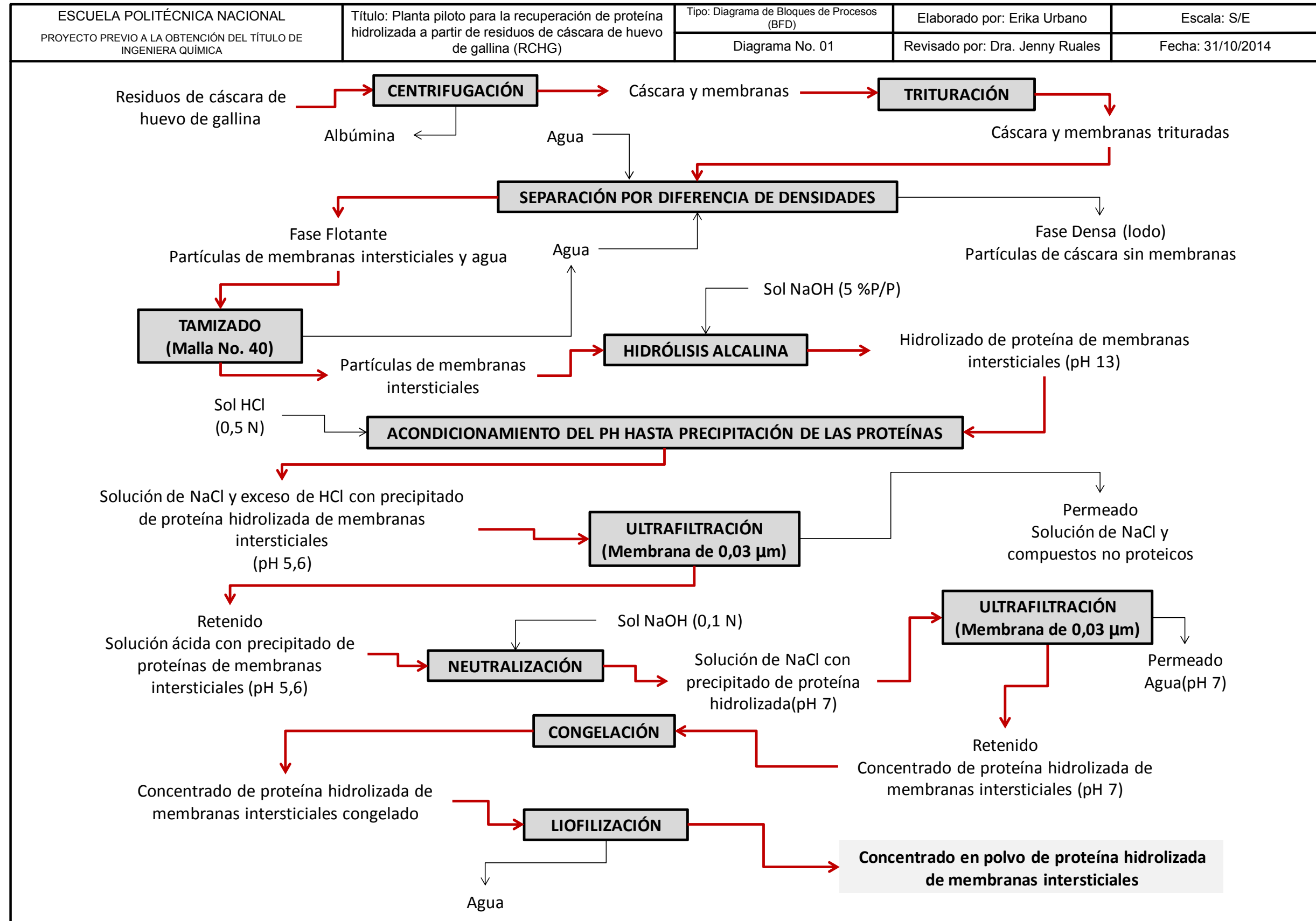


Figura 3.13. Diagrama de bloques del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (BFD)

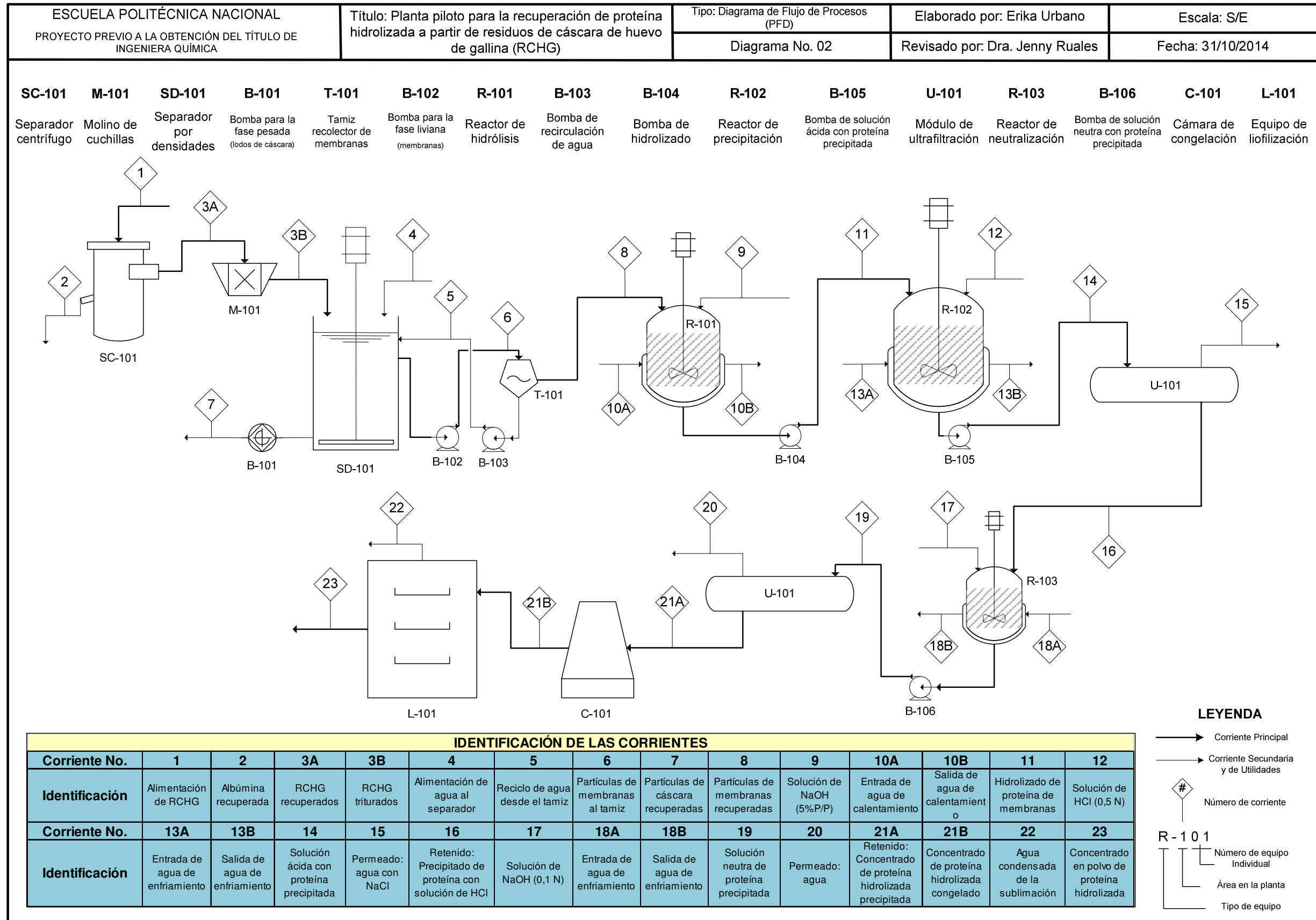


Figura 3.14. Diagrama de flujo del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (PFD)

El proceso inicia con la alimentación de los residuos de cáscara de huevo de gallina (1) hacia una centrífuga automática que permite la recuperación de albúmina (2) y compacta los residuos de cáscara de huevo reduciendo su volumen hasta en un 75,00 % (3A). La recuperación de albúmina se logra hasta un 98,00 % y se convierte en un material aprovechable que toma el nombre de “albúmina técnica”, útil en aplicaciones no alimentarias como el papel a la albúmina utilizado en fotografía.

Los residuos de cáscara de huevo de gallina compactados (3A) ingresan a un molino de cuchillas con tamiz de tamaño de poro 0,5 mm que reduce los residuos a partículas de tamaño uniforme (3B).

Las partículas de residuos de cáscara de huevo de gallina (3B) se alimentan, junto con una corriente de agua (4), a un tanque agitado de sedimentación, especialmente diseñado para provocar la sedimentación solo de las partículas de cáscara, las mismas que se extraen con una bomba de lodos instalada en el fondo del tanque (7). Debido a la agitación y a la baja densidad, las partículas de membranas intersticiales permanecen flotando y, junto con agua (6), son extraídas del tanque hacia un tamiz con tamaño de poro 0,425 mm que retiene las partículas de membranas y deja pasar el agua, la misma que se recircula y ayuda a mantener el nivel en el tanque (5). Las partículas de cáscara de huevo sin membranas, recuperadas a manera de lodos (7) del proceso de separación por diferencia de densidades, al igual que la albúmina recuperada, constituye un material aprovechable, cuyos múltiples usos se detallaron en la sección 1.1.6.1.

La masa húmeda de membranas intersticiales retenidas en el tamiz (8) ingresa en un reactor del tipo enchaquetado con sistema de agitación; junto a las membranas se alimenta una solución de hidróxido de sodio al 5,00 % p/p (9). El proceso de reacción de hidrólisis es batch y requiere de 3,5 h para lograr la solubilización de las membranas con una temperatura de 45 °C, de acuerdo con los datos obtenidos a través del diseño experimental llevado a cabo en el laboratorio.

Una vez completado el proceso de hidrólisis alcalina, las membranas de cáscara de huevo solubilizadas (11) se transportan hacia un segundo reactor, en el cual ocurre la precipitación de las proteínas por acondicionamiento del pH con solución de HCl 0,5 N (12). El proceso es semi-batch y tiene lugar en un reactor enchaquetado con sistema de agitación. La alimentación de la solución diluida de ácido clorhídrico ocurre hasta alcanzar un pH de 5,6, al cual solo las proteínas presentes en el hidrolizado precipitan, de acuerdo con datos obtenidos experimentalmente.

El precipitado de proteína (14) en solución con el cloruro de sodio formado por la reacción de neutralización y el exceso de ácido clorhídrico son alimentados hacia un módulo de ultrafiltración, con membrana de tamaño de poro 0,03 μm , a través del cual se permea la solución de cloruro de sodio junto con los compuestos no proteicos (15) que se encuentran solubilizados, mientras que se recupera como retenido el precipitado de proteína (16) en solución ácida.

El retenido que contiene el precipitado de proteína hidrolizada (16), es alimentado a un tercer reactor en donde se lleva a cabo un proceso de neutralización con solución básica diluida (NaOH 0,1 N). El proceso es semi-batch y ocurre en un reactor enchaquetado con sistema de agitación. La alimentación de la solución de NaOH 0,1 N (17) se realiza hasta cuando el pH 7 es alcanzado.

El precipitado de proteína (19), esta vez en solución de cloruro de sodio a pH 7, es alimentado nuevamente al módulo de ultrafiltración, con el objetivo de concentrar el precipitado. Del proceso de ultrafiltración se obtienen dos corrientes: la primera de permeado (20) que corresponde a agua y la segunda de retenido (21A), en la que se encuentra el precipitado de proteína concentrado con un bajo contenido de cloruro de sodio.

La cantidad de agua que se encuentra en el concentrado de proteína hidrolizada (21A) es retirada a través de una liofilización, para lo cual, se somete a congelación al concentrado de proteínas a una temperatura de $-8,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La carga congelada (21B) es introducida al equipo de liofilización, del cual se obtiene el

producto final: concentrado en polvo de proteína hidrolizada (23) extraída de membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina.

3.6.3. BALANCE DE MASA

Los cambios que se producen durante el paso de los 100 kg de residuos de cáscara de huevo, a lo largo de cada una de las etapas que conlleva el proceso de su transformación en un concentrado de proteína, se observan de manera detallada en el diagrama de flujo de corrientes o “flowsheet” que se representa en la Figura 3.15.

El balance de masa realizado y representado en la Figura 3.15 muestra otros aspectos relevantes como:

- Los kg de los subproductos recuperados que corresponden a “albúmina técnica” y a las partículas de cáscara sin membranas.
- Las cantidades de solución de hidróxido de sodio (5,00 % p/p y 0,1 N) y de ácido clorhídrico (0,5 N) requeridas
- Los flujos necesarios de agua de calentamiento para el reactor de hidrólisis y de agua de enfriamiento para los reactores de acondicionamiento de pH

De acuerdo con los cálculos realizados en el balance de masa de 100 kg de residuos de cáscara de huevo de gallina, se recuperan 19,60 kg de “albúmina técnica”, 77 kg de partículas de cáscara sin membranas y 2,99 kg de partículas de membranas intersticiales que constituyen la materia prima para obtener proteína hidrolizada.

Una vez que las membranas atraviesan por las sucesivas etapas de reacción, el proceso a escala de planta piloto permite la obtención de 3,05 kg de concentrado en polvo de proteína hidrolizada, con una composición de 93,00 % de proteínas, 5,00 % de agua y 2,00 % de cenizas.

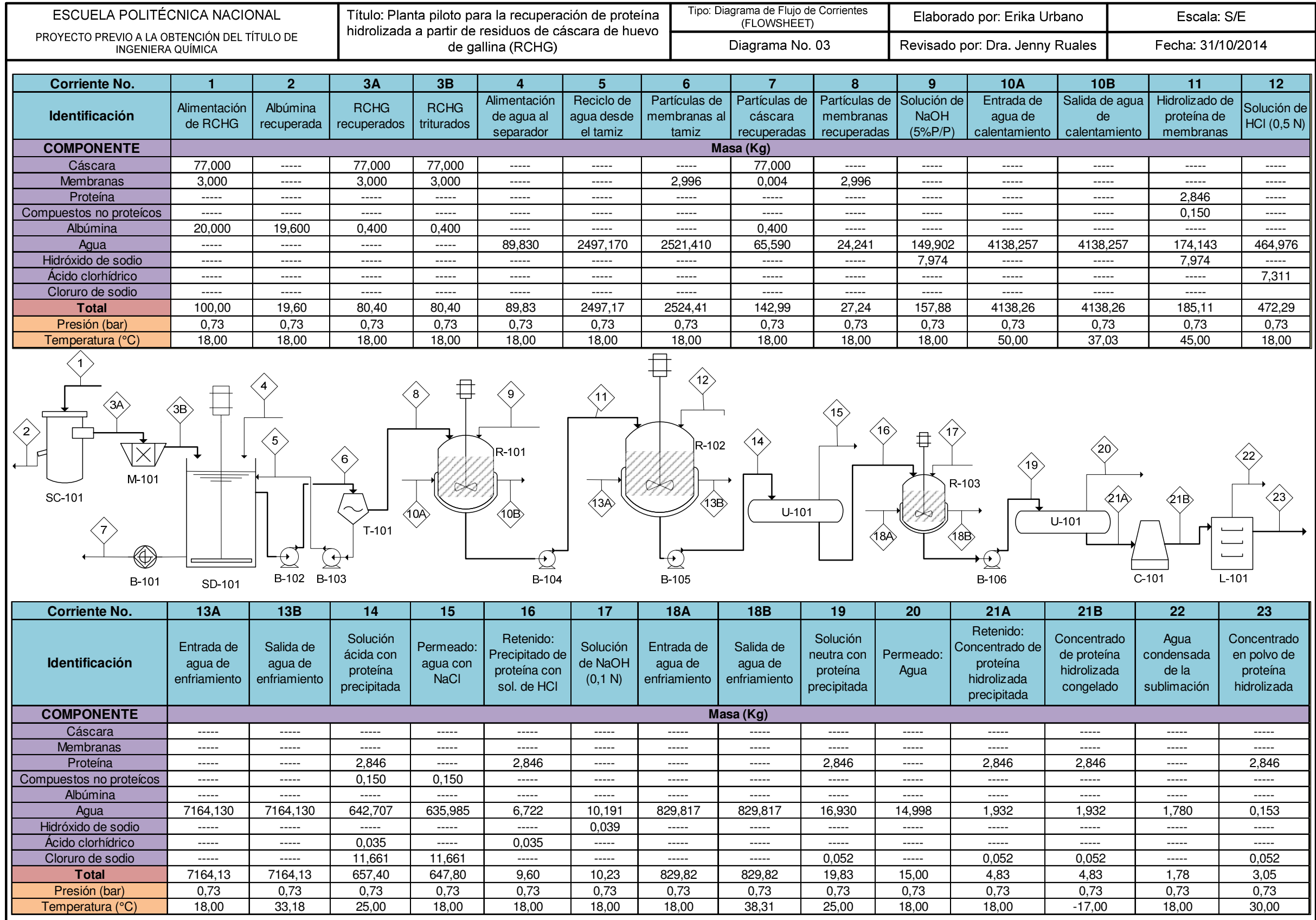


Figura 3.15. Hoja de flujos y corrientes del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (FLOWSHEET)

3.6.4. DIMENSIONAMIENTO Y SELECCIÓN DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES

Con la elección de los procesos a llevarse a cabo a nivel de planta piloto y con la determinación de los requerimientos en volumen precisados para los procesos batch y semi-batch con el balance de masa, se realizó la selección a través de catálogos de la mayoría de los equipos requeridos.

La centrífuga automática (SC-101), a través de la que se recupera albúmina y con la que se consigue la compactación de los residuos, fue seleccionada a partir de catálogos de una empresa especialista en el tratamiento de residuos de cáscara de huevo. La centrífuga opera en continuo y el detalle de sus características se encuentra en la hoja de especificaciones técnicas No. 1 del Anexo XI.

El molino de cuchillas (M-101) seleccionado corresponde a una trituradora para la industria de alimentos y consta de varios accesorios como una tolva de alimentación, juego de tamices y recipientes de recolección que se adapta al requerimiento de reducción de tamaño de partícula hasta un tamaño de 0,5 mm. La hoja de especificaciones técnicas No. 2 del Anexo XI amplía las características de este equipo.

El tanque de sedimentación (SD-101) para el proceso de separación por diferencia de densidades de los residuos triturados de cáscara de huevo de gallina fue diseñado para lograr la sedimentación exclusiva de los 77 kg de partículas de cáscara sin membranas que se alimentan al proceso. La base teórica para el diseño fue el modelo de sedimentación discreta y el parámetro de la velocidad de sedimentación crítica (V_{sc}). Los criterios teóricos empleados, al igual que las consideraciones realizadas, son desarrollados a lo largo del Anexo XII.

Con la aplicación del modelo de sedimentación discreta fue posible realizar el dimensionamiento de un sistema “tanque de sedimentación – agitador” que permite teóricamente sedimentar el 100 % de las partículas de cáscara y tener un porcentaje de retención mínimo, que corresponde al 0,13 %, lo que implica que

alrededor de 4 g de partículas de membranas intersticiales son arrastradas con las partículas de cáscara.

La configuración del sistema “tanque de sedimentación – agitador” se basa en el planteado por MacNeil (2001), por lo que se conserva el fondo plano para el tanque y un tipo de rodete de paletas planas para el agitador (p. 2). Las dimensiones del tanque de sedimentación y del agitador se puntualizan en la hoja de especificaciones No. 3 del Anexo XI.

Para la estimación de la capacidad volumétrica requerida para el reactor de hidrólisis (R-101), se consideró que la composición de las membranas intersticiales corresponde a la estimada por Fernández y Arias (2010). Estos autores determinan que las membranas intersticiales sin cenizas y en base seca puede alcanzar un valor de hasta el 95,00 % en proteínas, con alrededor del 5,00 % en elementos no proteicos (lípidos y polisacáridos) (p. 3). El equipo seleccionado para la reacción se esquematiza en la hoja de especificaciones No. 4 del Anexo XI. Las características del proceso de reacción, junto con las consideraciones asumidas, se enlistan en el Anexo XIII.

Es importante destacar que, a diferencia de lo realizado en la parte experimental del presente estudio, la etapa de filtración de los residuos de cáscara de huevo que migran junto con las membranas y que quedan como restos sólidos luego del proceso de solubilización por hidrólisis alcalina, ya no es necesaria para la planta piloto, puesto que al realizarse el diseño del equipo SD-101 se asegura que no existe migración de las partículas de cáscara hacia la corriente de membranas.

Para el reactor de precipitación (R-102) y el reactor de neutralización (R-103), se realizó la estimación del volumen requerido en función del balance de masa y con base a los datos experimentales obtenidos en el laboratorio. Las características de las reacciones que tienen lugar en estos equipos y las consideraciones asumidas se muestran en el Anexo XIV. Las dimensiones de los reactores, junto con otros datos, se detallan en las hojas de especificaciones No. 4 y No. 5 del Anexo XI.

Para la concentración del precipitado de proteína se seleccionó un módulo de ultrafiltración (U-101) con membrana de tamaño de poro $0,03 \mu\text{m}$, suficiente para retener a la proteína precipitada. Los rangos de presión, de resistencia química, el flujo de permeado y otras propiedades se muestran en la hoja de especificaciones técnicas No. 7 del Anexo XI.

La cámara de congelación (C-101) y el liofilizador (L-101), que se adaptan a los flujos de operación de la planta piloto, fueron seleccionados de catálogos y se caracterizan a través de las hojas de especificaciones técnicas No. 8 y No. 9, respectivamente, que se encuentran en el Anexo XI.

3.6.5. BALANCE DE ENERGÍA

Dentro de los procesos de reacción que se llevan a cabo en la planta piloto, existe un solo proceso endotérmico y corresponde a la hidrólisis alcalina de las membranas intersticiales de cáscara de huevo de gallina.

El requerimiento de energía que se debe aportar para que se produzca la reacción, fue estimada a través del planteamiento de ecuaciones del balance de energía, tanto para la chaqueta de calentamiento a través de la que circula agua a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, como para el reactor donde se lleva a cabo un proceso batch.

El procedimiento realizado para esta estimación energética, los criterios bibliográficos empleados, el cálculo del coeficiente global de transferencia de calor junto con otros parámetros determinados y consideraciones asumidas se encuentran a lo largo del Anexo XIII.

La Tabla 3.19 muestra la cantidad de energía con la que aporta la chaqueta de calentamiento para permitir que el proceso de reacción se dé a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. El requerimiento total de energía corresponde al calor que aporta el agua de calentamiento que atraviesa la chaqueta, durante las 3,5 h que conlleva la reacción de hidrólisis alcalina.

Tabla 3.19. Flujo de energía requerido para la reacción de hidrólisis alcalina

	Energía Requerida
kJ/h	223 544,51
kJ/día	782 405,79
Total (factor de seguridad de 1,4) kJ/día	1 095 368,1

Se realizó el balance de energía para los procesos de reacción exotérmicos que corresponden a las reacciones de precipitación de proteína por acondicionamiento de pH y de neutralización, con el fin de estimar la cantidad energía que requiere ser retirada por la chaqueta para mantener los procesos de reacción a una temperatura de 25 °C, y con ello determinar el flujo de agua de enfriamiento necesario.

El procedimiento de cálculo, las ecuaciones del balance de energía tanto en la chaqueta como en el reactor, las propiedades utilizadas y las consideraciones asumidas se indican de manera detallada en el Anexo XIV. La Tabla 3.20 señala el flujo de energía que retira la chaqueta bajo la consideración que el proceso de acondicionamiento de pH sucede en un tiempo de reacción de 0,5 h.

Tabla 3.20. Flujo de energía retirado por la chaqueta de enfriamiento en los procesos de reacción por acondicionamiento de pH.

		Energía Retirada
Reacción de precipitación de proteínas	kJ/h	455 218,44
	kJ/día	227 609,22
	Total (factor de seguridad de 1,4) kJ/día	318 652,91
Reacción de neutralización	kJ/s	70 543,06
	kJ/día	35 271,53
	Total (factor de seguridad de 1,4) kJ/día	49 380,14

3.6.6. DIAGRAMA DE TUBERÍAS E INSTRUMENTACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA FILOSOFÍA DE CONTROL

En la Figura 3.16 se presentan los equipos de instrumentación seleccionados para lograr una operación ágil y efectiva, a través del control automático de determinadas variables como son el nivel, la temperatura y el pH. Adicionalmente, se muestra las tuberías y válvulas con su identificación y caracterización correspondientes.

Para el tanque separador por diferencia de densidades (SC-101) se plantea la implementación de un controlador de nivel, a través de la regulación del agua que se alimenta al tanque.

Para el proceso batch llevado a cabo en el equipo R-101, se implementa un controlador de temperatura, para el cual el set point es 45 °C, que constituye la temperatura de reacción de hidrólisis. El controlador garantiza que la chaqueta de calentamiento proporcione el flujo adecuado de agua a 50 °C, que permite la conservación de la temperatura de reacción en el interior del reactor.

Para los equipos R-102 y R-103 se aplican dos tipos de control automático; el primero, uno de temperatura y el segundo, un control cascada. El controlador de temperatura mide la temperatura en el interior del reactor y, si esta es diferente a 25 °C, envía una señal para regular la válvula de alimentación de agua a temperatura ambiente que atraviesa la chaqueta de enfriamiento, hasta retornar a la condición de temperatura requerida. El control cascada es la elección más apropiada para la regulación del pH, puesto que la velocidad de respuesta es prácticamente instantánea. El sistema de control está conformado por un controlador máster, el cual mide el pH de la mezcla reaccionante y envía esta señal hacia el controlador esclavo, el mismo que, junto con la señal del flujo de alimentación de solución ácida o básica antes de la válvula, regula el flujo después de la válvula para que el flujo de alimentación de solución sea cada vez más pequeño, a medida que la condición de pH requerida se encuentre más cercana.

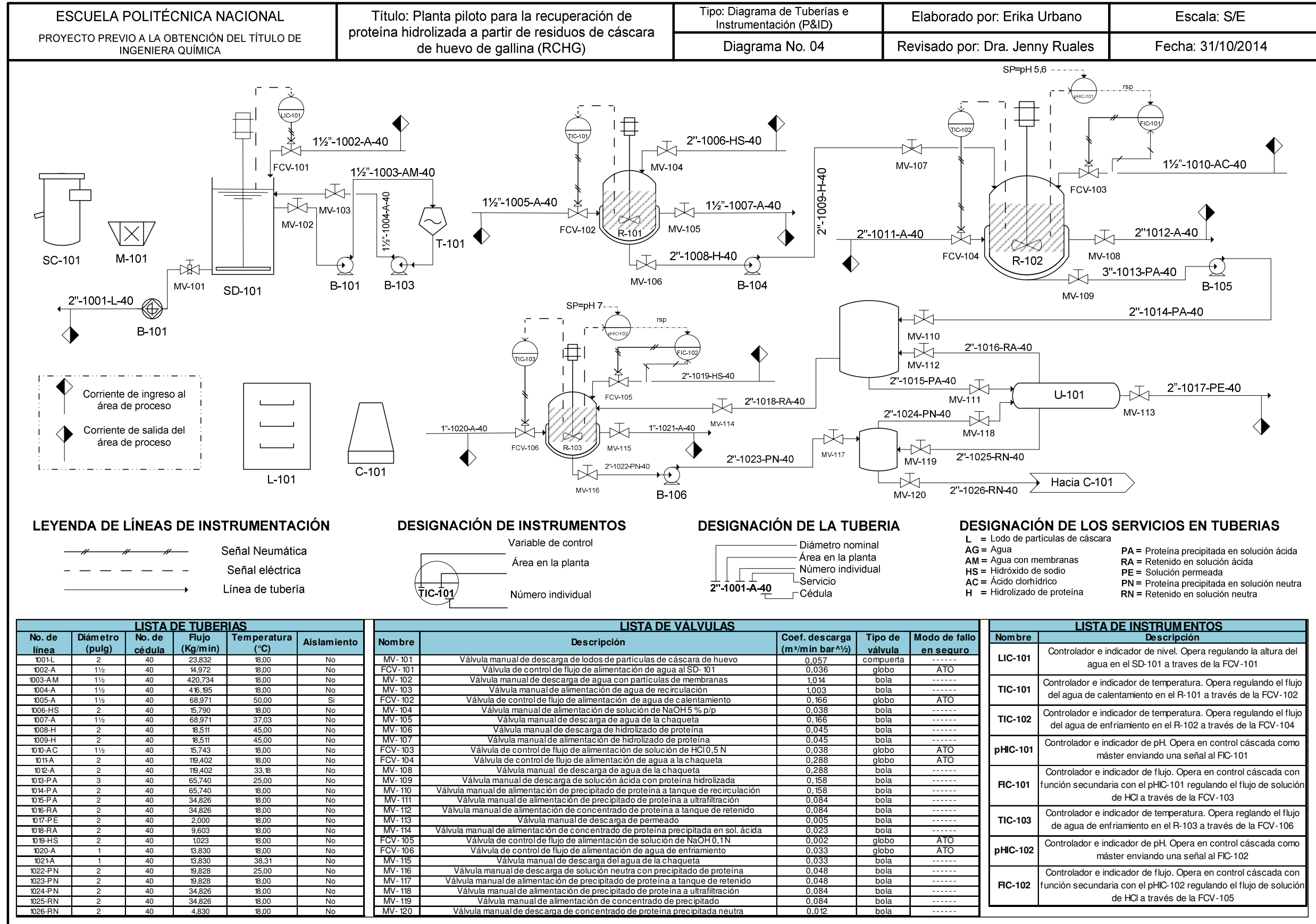


Figura 3.16. Diagrama de tuberías e instrumentación del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (P&ID)

3.6.7. DISTRIBUCIÓN DE LOS EQUIPOS EN PLANTA O “LAYOUT”

Con el diseño y la selección de los equipos requeridos para la planta piloto y junto con los datos proporcionados en las hojas de especificaciones que se muestran en el Anexo XII, donde se detallan las dimensiones de cada uno de los equipos principales, se definió una distribución básica de los equipos en la planta piloto. Una vista superior del “layout” se esquematiza a través de la Figura 3.17.

La filosofía básica para la distribución de los equipos en planta implementada fue mantener una distribución compacta y simple, que contribuya con una eficiente operación, mantenimiento y seguridad. Bajo este contexto, la configuración utilizada fue la disposición de los equipos en forma de “U”, a través de la cual se brinda el suficiente espacio para el movimiento del personal y de los materiales. Con los espaciamientos definidos entre equipo y equipo que se detallan en la Figura 3.17, se facilita el acceso hacia cada uno de los dispositivos para su mantenimiento y reparación.

Con todo lo anteriormente estipulado, se define un requerimiento de espacio de 35 m², con un área adicional de 10 m² reservada para futuras expansiones de la planta piloto. De esta manera se cumple con las consideraciones primarias de todo “layout”, que corresponde a una disposición simple y compacta que procure eficiencia en la operación y mantenimiento para las diferentes etapas del proceso.

3.7. ESTIMACIÓN DE COSTOS

La estimación de la inversión total de capital (I) o también llamado costo del capital total, fue realizada a través del método por factores de experiencia. De acuerdo con la “American Association of Cost Engineers”, el método implementado se clasifica como un cálculo para estudio y corresponde al segundo de los 5 tipos de estimaciones oficialmente reconocidas para el cálculo de la inversión total en plantas. Al tratarse de un método básico, el estimado de la inversión total tiene un error probable de hasta el 30,00 %, con respecto a métodos estimativos más detallados (Holland y Wilkinson, 1999, p. 64).

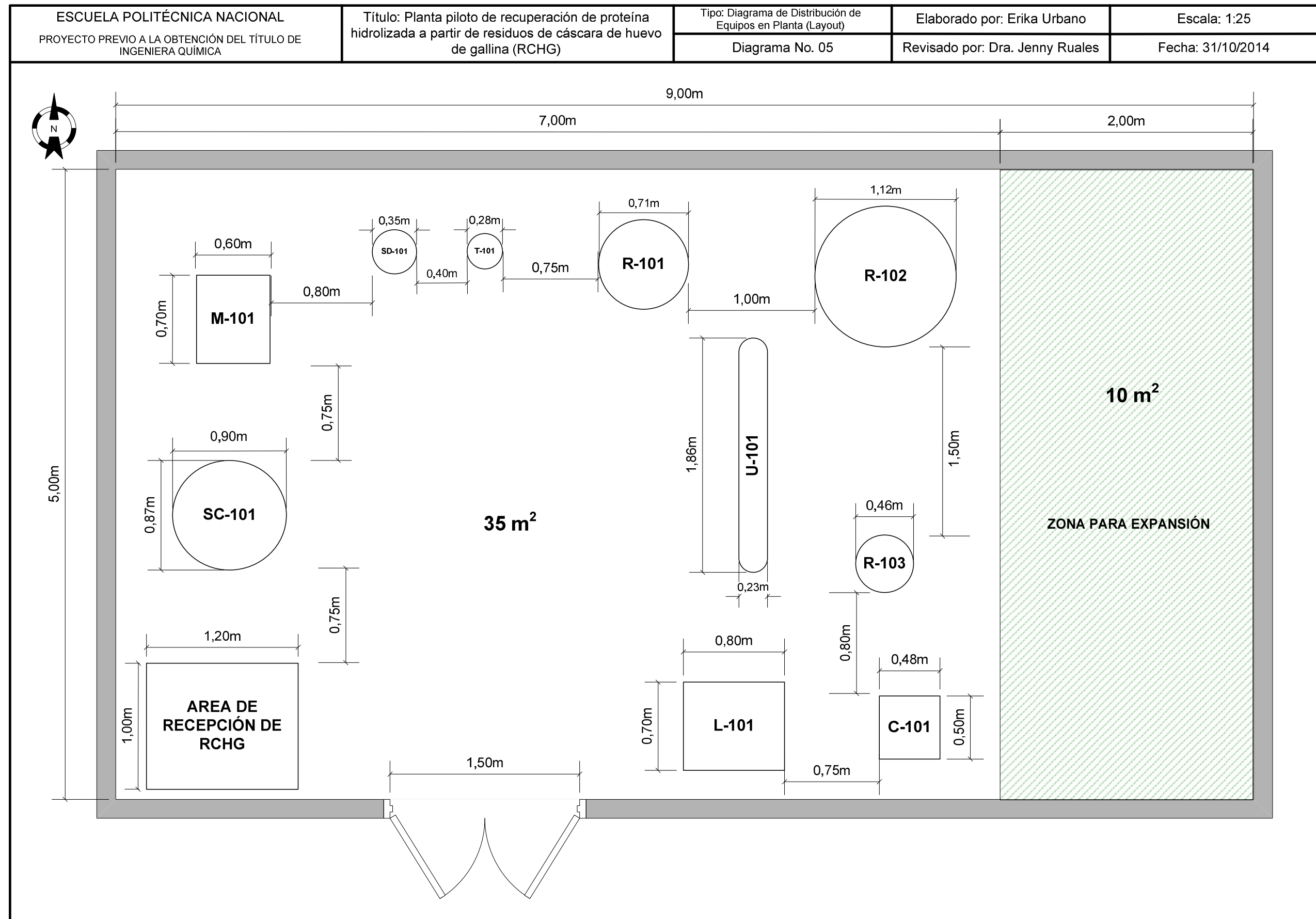


Figura 3.17. Distribución de los equipos en planta del proceso de recuperación de proteína hidrolizada a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina (LAYOUT)

La selección del método por factores para la estimación de la inversión total se ajusta con el nivel de desarrollo del diseño de la planta piloto. El presente estudio conceptualiza un diseño preliminar y básico, por lo que se hace apropiado un cálculo al mismo nivel del requerimiento en inversión.

Con la estimación realizada se ofrece una perspectiva general de la inversión requerida, siendo de utilidad para estudios de factibilidad en la comparación entre procesos alternativos

El desarrollo de la estimación por factores se muestra en el Anexo XV, a lo largo del cual se determinan tanto criterios bibliográficos como los asumidos para facilitar los cálculos, entre los que destacan:

- Las definiciones de la inversión fija y sus componentes
- Los principios en los que se basa la estimación por factores
- Las ecuaciones utilizadas para el cálculo del costo de los equipos a nivel de planta
- Los rangos para los factores de experiencia para los costos directos e indirectos
- La estimación de costos para el sistema “tanque de sedimentación – agitador”
- El precio de los equipos principales obtenidos por cotizaciones y
- La actualización del precio FOB de los equipos a través de los índices CEPCI “Chemical Engineering Plant Cost Index” (Chemical Engineering, 2014, p. 72).

Debido a que la planta piloto constituye un anexo para instalaciones ya existentes, el valor de los factores seleccionados para el cálculo de los costos directos e indirectos a partir del costo total de los equipos a nivel de planta, corresponde al límite inferior de los estipulados en Holland y Wilkinson (1999, p. 70).

Los factores de estimación, junto con el valor de la inversión fija, el desglose de los costos directos e indirectos, la magnitud del costo en la inversión de trabajo y la inversión total del capital se muestran en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Inversión total de capital para la planta piloto de tratamiento de RCHG

Detalle de costos	Factor de estimación	Costo (USD)	Porcentaje de la inversión total (%)
Costos directos			
Costo del equipo a nivel de planta	1,00	133 421,82	21,32
Instalación del equipo	0,39	52 034,51	8,32
Instalación de tuberías	0,30	40 026,55	6,40
Instrumentación y controles	0,13	17 344,84	2,77
Instalación eléctrica	0,08	10 673,75	1,71
Edificios y servicios	0,26	34 689,67	5,54
Preparación del sitio	0,08	10 673,75	1,71
Servicios auxiliares	0,48	64 042,48	10,23
Total de costos directos (I_e)		362 907,36	58,00
Costos indirectos			
Ingeniería y supervisión	0,35	46 697,64	7,46
Gastos de construcción	0,35	46 697,64	7,46
Gastos legales	0,04	5 336,87	0,85
Honorarios de contratistas	0,09	12 007,96	1,92
Contingencias	0,39	52 034,51	8,32
Total de costos indirectos (I_a)		162 774,63	26,01
Inversión de capital fijo (I_f)		525 681,99	84,01
Capital de trabajo (I_w)	0,75	100 066,37	15,99
Total de inversión del capital (I)		625 748,35	100,00

La planta piloto diseñada en el presente estudio, que procesa un flujo de 100 kg/día de residuos de cáscara de huevo de gallina, requiere de una inversión total de aproximadamente 626 000 dólares, distribuidos de la siguiente manera: 58,00 % para los costos directos, 26 % para los costos indirectos y un 16,00 % para el capital de trabajo.

A diferencia de otras plantas de tratamiento de residuos sólidos, una planta piloto para la recuperación de proteínas a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina requiere de un diseño y construcción específicos para las necesidades particulares de cada empresa generadora de este tipo de residuos, por lo que no se encuentra disponible información respecto a costos de inversión para una planta similar.

Los beneficios económicos que involucra la implementación de la planta piloto desarrollada en la presente investigación son:

- Ahorro en los costos de disposición en un vertedero
- Alternativa de producción de biogás para reducir los costos de energía en la planta y
- Producción de sub productos con valor añadido

Respecto a este último beneficio y para el caso particular de los 100 kg/día de residuos de cáscara de huevo de gallina sometidos al proceso planteado a través del presente estudio, se tienen dos subproductos y un producto final que genera el tratamiento en la planta piloto.

El primer subproducto esta constituido por los 19,60 kg de albúmina que se recupera por centrifugación. La albúmina puede ser deshidratada y luego ser vendida en polvo para aplicaciones no alimentarias a manera de albúmina técnica, cuyo valor mínimo se calculó en alrededor 10 USD/kg.

El segundo subproducto son los 77,00 kg de partículas de cáscara de huevo sin membranas que se recuperan del proceso de separación por diferencia de densidades. Las partículas de cáscara pueden ser secadas y luego pulverizadas e inclusive someterse a un proceso de purificación para concentrar su contenido de carbonato de calcio. El precio que alcanza este subproducto es de alrededor de 0,40 USD/kg.

Para el caso del producto final, se conoce que en el mercado ecuatoriano se comercializan productos de concentrado de proteína hidrolizada de origen bovino

o porcino, con un contenido de proteína superior al 90,00 % y composición en agua y cenizas muy similar a la del producto obtenido por el tratamiento en la planta piloto. El costo que alcanzan estos productos es de alrededor de 90 USD/kg. Para los 3,05 kg de concentrado en polvo de proteína hidrolizada liofilizada de membranas intersticiales, que presentan un contenido de 92,00 % de proteína, el valor comercial que pueden alcanzar es similar o superior al anteriormente establecido.

El aporte adicional del concentrado de proteína hidrolizada de membranas de cáscara de huevo de gallina es, en comparación con los concentrados de origen bovino o porcino, su alto contenido en colágeno, su baja respuesta autoinmune y de reacciones alérgicas para los humanos (Cordeiro y Hincke, 2011, p. 5).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. El proceso de separación por diferencia de densidades permitió recuperar las membranas intersticiales a partir de residuos de cáscara de huevo de gallina triturados, con un rendimiento del 61,52 %. La separación por diferencia de densidades es un método económico, sencillo y que no afecta la composición química de las membranas.
2. Los resultados del análisis de concentración de minerales para las partículas de cáscara de huevo sin membranas determinaron que son una fuente representativa de calcio, cuya concentración alcanza los 94,08 mg Ca/g material.
3. Los resultados del análisis proximal para las membranas intersticiales aisladas determinaron que constituyen una fuente representativa de proteínas, con una concentración de 71,19 % p/p.
4. Los residuos de cáscara de huevo de gallina potenciaron su valor al ser separados en sus fracciones constitutivas: cáscara y membranas. Las partículas de cáscara de huevo sin membranas, de acuerdo con el análisis de concentración de minerales, incrementaron en 30 mg/g material su contenido de Ca, una vez aisladas de los residuos de cáscara de huevo de gallina.
5. Los resultados del análisis de composición de aminoácidos para las membranas intersticiales se encuentran dentro de los rangos reportados en bibliografía. Los aminoácidos que predominan en las membranas intersticiales analizadas son la prolina y el ácido glutámico, precursores del colágeno.

6. El análisis estadístico para el diseño factorial 3^2 para el proceso de recuperación de proteínas por hidrólisis alcalina determinó, para un nivel de confianza del 95,00 %, que existe un efecto estadísticamente significativo de los factores de diseño concentración de solución de hidróxido de sodio y temperatura de reacción en los rangos 1,00 % - 5,00 % y 45,0 °C - 60,0 °C, respectivamente, sobre el factor de respuesta grado de hidrólisis.
7. El cambio en el nivel de cada uno de los factores: concentración de solución de hidróxido de sodio y temperatura de reacción da lugar a un cambio significativo del tipo lineal, en el comportamiento del grado de hidrólisis, con lo que el mayor porcentaje de grado de hidrólisis se consigue con la combinación de los niveles más altos de los factores de diseño.
8. De acuerdo con los análisis estadísticos realizados, las mejores condiciones para el proceso de hidrólisis alcalina de membranas intersticiales son 5,00 % p/p para la concentración de solución de hidróxido de sodio y 45,0 °C como temperatura de reacción de hidrólisis.
9. Los resultados del análisis proximal para el producto final: concentrado liofilizado de proteínas hidrolizadas de membranas intersticiales, indican una concentración de 49,94 % de proteínas.
10. Las pérdidas de proteína en el producto final pueden deberse a la acción mecánica provocada por la recirculación durante el proceso de concentración por ósmosis inversa, que transformó a las proteínas solubilizadas en espuma, la cual no pudo ser recuperada en su totalidad.
11. El diseño a escala de planta piloto para el procesamiento de 100 kg/día de residuos de cáscara de huevo de gallina permite la recuperación de 3,05 kg/día de concentrado liofilizado de proteínas de membranas intersticiales, con una concentración de 93,00 % p/p en proteínas.

12. El procesamiento de 100 kg/día de residuos de cáscara de huevo a nivel de planta piloto permite la recuperación de dos subproductos con valor comercial: 19,60 kg/día de albúmina técnica y 77,00 kg/día de partículas de cáscara sin membranas.
13. La inversión total de capital estimada para la planta piloto de tratamiento de residuos de cáscara de huevo de gallina es de 625 748,35 USD.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar un diseño experimental para la operación de separación por diferencia de densidades, con el fin de determinar las mejores condiciones para el tamaño de partícula y la velocidad de agitación que permita la mayor cantidad de membranas testáceas extraídas.
2. Realizar análisis de caracterización más profundos tanto para las membranas intersticiales como para el concentrado de proteína hidrolizada, que permitan cuantificar y evaluar los niveles y la calidad de proteínas y aminoazúcares específicos.
3. Introducir una etapa de diafiltración, después de la concentración por ósmosis inversa, como método para retirar las sales del concentrado de proteínas hidrolizadas de membranas intersticiales.
4. Realizar un estudio para determinar qué tipo de filtración por tecnología de membranas es la que permite mayor concentración de proteína de membranas intersticiales en sus formas: hidrolizada solubilizada e hidrolizada precipitada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2004). *Introducción a la Biología Celular*. (2a. Ed.). Madrid. España: Editorial Médica Panamericana S.A.
2. Ara, A. (2004). *El libro de la salud natural para la mujer*. (1era Ed.). Madrid. España: Editorial Edaf S.A.
3. Arias, J., Fernández, M., Dennis, J. y Caplan, A. (1991). Collagens of the chicken eggshell membranes. *Connective Tissue Research*, 26(1-2), 37-45. doi: 10.3109/03008209109152162.
4. Baker, C. (1997), *Industrial Drying of Foods*. (1era. Ed.). Londres. Inglaterra: Blackie Academic & Professional.
5. Barroeta, A. (2002). Formación del huevo. En Sastre, A., Sastre, R., Tortuero, F., Suárez, G., Vergara, G. y López, C. (1era. Ed.). *Lecciones sobre el huevo*, (pp. 45-56). Madrid, España: Instituto de Estudios del huevo.
6. Barroeta, A., Izquierdo, D. y Pérez, J. (2010). Manual de Avicultura: Breve manual de aproximación a la empresa avícola para estudiantes de veterinaria. Recuperado de http://www.uclm.es/profesorado/produccionanimal/ProduccionAnimalIII/GUIA%20AVICULTURA_castella.pdf (Junio, 2014)
7. Benítez, G., Sarno, M. y Delfino, M. (2000). Disolución de la cáscara de huevo de gallina en HCl. Recuperado de http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_053.pdf (Junio, 2013).

8. Board, R. y Fuller R. (1994). *Microbiology of the Avian Egg* [Versión Portable Document Format]. doi: 10.1007/978-1-4615-3060-2.
9. Budavari, S., O'Neil, M., Smith, A. y Heckelman, P. (1989), *The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. (11a. Ed.). Rahway, Estados Unidos: Merck & CO Inc.
10. Campos, M. (2010). *Un huevo en mi laboratorio*. (1era. Ed.). Madrid, España: Bubok Publishing.
11. Caravaca, F., Castel, J., Guzmán J., Delgado M., Mena Y., Alcalde M. y González P. (2003). Bases de la producción animal. (1era Ed.). Sevilla, España: Servicio de publicaciones Universidad de Córdoba.
12. Chemical Engineering (2014). Economic Indicators. *Chemical Engineering*, 121(3), 71-72.
13. Cheng, M., Takenaka, S., Aoki, S., Murakami S. y Aoki, K. (2009). Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(4), 373-378.
14. Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador CONAVE, (2006). *Resultados del censo nacional avícola*. Recuperado de <http://www.conave.org/informacionlistall.php?pagina=11> (Agosto, 2012).
15. Cordeiro, M. y Hincke, M. (2011). Recent Patents on Eggshell: Shell and Membranes Applications. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3(1), 1-8.
16. DeVore, D., Long, F., Osborne M., Adams, R. y Franklin, M. (2007). Anti-Inflammatory activity of eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations. (United States Patent No. 2007/0178170

- A1). Recuperado de <http://patents.com/us-20070178170.html> (Abril, 2014).
17. EPN-DECAB, (2007). Método de Análisis. *Determinación de hierro, zinc, calcio y sodio en alimentos por espectrofotometría de absorción atómica, previa digestión por microondas.*
 18. Fernández, M. y Arias, J. (2010). La cáscara de huevo: Un modelo de biomineralización. *Monografías de Medicina Veterinaria.* 20(2). Recuperado de: <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/5017/4901>. (Junio, 2014)
 19. Fernández, M., Escobar, C., Lavelin, I., Pines, M. y Arias, J. (2003). Localization of osteopontin in oviduct tissue and eggshell during different stages of the avian egg laying cycle. *Journal of Structural Biology,* 143(3), 171-180. doi: 10.1016/jsb.2003.08.007.
 20. Fernández, E. y Galván, A. (2006). *Métodos para la cuantificación de proteínas.* Recuperado de <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquímica-biol-mol/pdfs>. (Octubre, 2012).
 21. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2003). *Food Energy – Methods of analysis and conversion factors.* (1era. Ed.). Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
 22. Geankoplis, C. (1998). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias.* (3a. Ed.). México D.F., México: Compañía Editorial Continental S.A.
 23. Glatz, P. Miao, Z. y Rodda, B. (2011). Handling and Treatment of Poultry Hatchery Waste: A Review. *Sustainability.* 1(3), 216-237. doi: 10.3390/su3010216.

24. Gutiérrez, G. (2005). *Prácticas de Bioquímica*. (4a. Ed.). México D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
25. Gutiérrez, H. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (2a. Ed.). México D.F. México: Mc Graw – Hill.
26. Hassan, T., Rangari, V., Rana, R. y Jeelani, S. (2013). Sonochemical effect on size reduction of CaCO₃ nanoparticles derived from waste eggshells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1308-1315. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.01.016.
27. Hernández, M, y Sastre, A. (1999). *Tratado de Nutrición*. (1era Ed.). Madrid. España: Ediciones Díaz de Santos S.A.
28. Hicks, J. (2001). *Bioquímica*. (1era Ed.). México D.F. México: McGraw-Hill Interamericana.
29. Holland, F. y Wilkinson, J. (1999). Process Economics. En Perry, R., Green, D. y Maloney, J. (7a. Ed.). *Perry's Chemical Engineering Handbook* (pp. 63-79). New York, Estados Unidos: McGraw-Hill.
30. Horwitz, W., Latimer, G. (2007). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (18a Ed.). Estados Unidos: AOAC.
31. Hussain, A. (2009). Dielectric properties and microwave assisted separation of eggshell and membrane. (Disertación doctoral). Recuperada de la base de datos McGill Library and Collections (PID 67033).
32. Incropera, F. y DeWitt, D. (1999). *Fundamentos de transferencia de calor*. (4a Ed.). México D.F. México: Prentice Hall Hispanoamericana S.A.
33. INEN. (1995). Norma Técnica Ecuatoriana. *INEN 1233: Granos y cereales. Muestreo*.

34. INEN. (1981). Norma Técnica Ecuatoriana. *INEN 517: Harinas de Origen Vegetal. Determinación del tamaño de partículas.*
35. INIAP. (1985). *Método para análisis de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).*
36. Instrumentation System and Automation Society. (1992). *ANSI/ISA-S5.1-1984 (R1992). Instrumentation Symbols and Identification.*
37. Jiménez, A. (2003), *Diseño de procesos en la Ingeniería Química.* (1era Ed.) Guanajuato. México: Editorial REVERTÉ S.A.
38. Koolman, J. y Röhm, H. (2004). *Bioquímica: Texto y Atlas.* (3a. Ed.). Madrid. España: Editorial Médica Panamericana S.A.
39. Kuehl, R. (2001). *Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación.* (2a. Ed.). México D.F. México: Thompson Learning.
40. Lammie, D., Bain, M. y Wess, T. (2005). Microfocus X-ray scattering investigations of eggshell nanotexture. *Journal of Synchrotron Radiation*, 12(6), 721-726. doi: 10.1107/S090904505003547.
41. Larson, R. y Weber, E. (1994). *Reaction Mechanism in environmental organic chemistry.* (1era. Ed.). Boca Raton, Florida, Estados Unidos: Lewis Publishers.
42. Lee, S., Grass, G., Kim, G., Dresbach, C., Zhang, L., Gösele, U. y Knez, M. (2009). Low – temperature ZnO atomic layer deposition on biotemplates: flexible photocatalytic ZnO structures from eggshell membranes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(19), 3608-3614. doi: 10.1039/b820436e.

43. Li, N., Niu, I., Qi, y., Yiu, C., Ryou, H., Arola, D., Chen, J., Pashley D. y Tay, F. (2011). Subtleties of biomineralisation revealed by manipulation of the eggshell membrane. *Biomaterials*, 32(34), 8743-8752. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.007.
44. Liley, P., Thomson, G., Friend, D., Daubert, T. y Buck, E. (2001). Datos físicos y químicos. En Perry, R., Green, D. y Maloney, J. (4a. Ed.). *Manual del Ingeniero Químico* (pp. 1-390). Madrid, España: McGraw-Hill.
45. Lomonte, B. (2007). *Manual de métodos inmunológicos*. Recuperado de: http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9244/2007_Manual_Metodos_Inmunologicos_completo_web.pdf (Julio, 2014).
46. Long, F., Adams, R., DeVore, D. y Franklin, M. (2008). *Therapeutic, nutraceutical and cosmetic applications for eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations*. (United States Patent No. 2008/0234195 A1). Recuperado de <http://www.google.com/patents/US20080234195> (Abril, 2014).
47. MacNeil, J. (2001). *Method and apparatus for separating a protein membrane and shell material in waste egg shells*. (United States Patent No. 6 176 376 B1). Recuperado de <http://www.google.com/patents/US6176376> (Agosto, 2012).
48. MacNeil, J. (2005). *Hatchery eggshell waste processing method and device*. (United States Patent No. 6 899 294 B2). Recuperado de <http://www.google.com/patents/US6899294> (Abril, 2014).
49. Martel, M., Du, J. y Hincke, M. (2012). Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *Journal of Proteomics*, 75(9), 2697-2706. doi: 10.1016/j.jprot.2012.03.019.

50. Martínez, R. y Prada, O. (2008). *Diseño y construcción de un liofilizador piloto para el estudio de procesos de deshidratación y conservación de productos agroindustriales mediante secado al vacío*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
51. Müller, W. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. (1era. Ed.). Barcelona. España: Editorial Reverté.
52. Nakano, T., Ikawa, N. y Ozimek, L. (2003). Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*, 82(3), 510-514.
53. Nys, Y., Gautron, J., García, J. y Hincke, M. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6-7), 549-562. doi: 10.1016/j.crpv.2004.08.002.
54. Pérez, J. (1981). *Manual de Tratamiento de aguas*. Recuperado de http://www.bdigital.unal.edu.co/70/2/45_-_1_Prel_1.pdf. (Octubre, 2014).
55. Peters, M., Timmerhaus, K. y West, R. (2003). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. (5a. Ed.). New York, United States: Mc Graw – Hill.
56. Quero, H. (2007). *Comparativa de ampliación de una Estación Depuradora de Aguas Residuales mediante reactor biológico convencional*. Recuperado de <https://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/4432/2/Anejo%20A%20Membranas.pdf>. (Julio, 2014).
57. Ramalho, R. (2009). *Tratamiento de aguas residuales*. (1era. Ed.). Quebec. Canadá: Editorial Reverté.

58. Ramírez, J. (2006). Liofilización de Alimentos. *Revista Reciteia*, 6(2), 1-31.
59. Reeds, P., Burrin, D., Stoll, B. y Jahoor, F. (2000). Glutamate and Glutamine in Metabolism: Intestinal Glutamate Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 130(4), 978-982. Recuperado de: <http://jn.nutrition.org/content/130/4/978.long>, (Julio, 2014).
60. Rodríguez, A., Kalin, O., Nys, Y. y García, J. (2002). Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *British Poultry Science*, 43(3), 395-403. doi: 10.1080/00071660120103675.
61. Rose, M. y Hincke, M. (2009). Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(16), 2707-2719. doi: 10.1007/s00018-009-0046
62. See, Y., Olley, P. y Jackowski, G. (1985). The effects of high salt concentrations in the samples on molecular weight determination in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 6(8), 382-387. doi: 10.1002/elps.1150060806.
63. Solomon, S. (1999). Es un huevo. *British Poultry Science*, 40(1), 5-11.
64. Soneklar, C. (1999). Famous for egg waste. *Research Penn State*. 20(3). Recuperado de <http://www.rps.psu.edu/sep99/waste.html> (Agosto, 2012).
65. Strohbehn, R., Etzel, L. y Figgins, J. (2012). *Solubilized protein composition obtained from eggshell membrane*. (United States Patent No. 8 173 174 B2). Recuperado de <http://www.google.com/patents/US8173174> (Agosto, 2012).

66. Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. (4a. Ed.). Nueva York. Estados Unidos: W. H. Freeman and Company.
67. Tang, J., Li, J., Kang, J., Zong, L. y Zhang, Y. (2009). Preliminary studies of application of eggshell membrane as immobilization platform in sandwich immunoassay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140(1), 200-205.
68. Terrizano, M. (2002). *El secado de los sólidos en la industria química*. Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.
69. Torres, F., Troncoso, O., Piaggio, F. y Hajar, A. (2010). Structure-property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane. *Acta Biomaterialia*, 6(1), 3687-3693.
70. Turton, R., Bailie, R., Whiting, W., Shaeiwitz, J. y Bhattacharyya, D. (2012). *Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes*. (4a. Ed.) New Jersey, Estados Unidos: Prentice Hall.
71. Valdés, J. (2007). La cáscara de huevo: ¿Desecho o valor agregado para la salud humana y la producción avícola? Una experiencia cubana. *Seminario Internacional sobre nutrición del huevo*. (pp. 8-11). La Habana, Cuba: Centro de Investigaciones de Bioelementos Naturales.
72. Villegas E., Ortega E., Bauer R. (1985). *Métodos químicos usados en el CIMMYT para determinar la calidad de proteína de los cereales*. Recuperado de <http://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/3796/13389.pdf> (Abril, 2014).
73. Vlad, V. (2007). *Avian eggshell membrane polypeptide extraction via fermentation process*. (United States Patent No. 2007/0017447 A1). Recuperado de <http://www.google.com/patents/US20070017447> (Abril, 2014).

74. Wyckoff, M., Rodbard, D y Chrambach, A. (2004). Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems: Properties of the stack, valid Rf-measurement, and optimized procedure. *Analytical Biochemistry*, 78(2), 459-482. doi: 10.1016/003-2697(77)90107-5.
75. Yoo, S., Hsieh, J., Zou, P. y Kokoszka J. (2009). Utilization of calcium carbonate particles from eggshell waste as coating pigments for ink-jet printing paper. *Bioresource Technology*, 100(1), 6416-6421.
76. Yu, H., Tang, Q., Wu, J., Lin, Y., Fan, L., Huang, M., Lin, J., Li, Y. y Yu, F. (2012). Using eggshell membrane as a separator in supercapacitor. *Journal of Power Sources*, 206(1), 463-468. doi: 10.1016/j.jpowsour.2012.01.116.

ANEXOS

ANEXO I

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LAS MEMBRANAS INTERSTICIALES

A. FASE DE TRITURACIÓN Y SECADO



Figura AI.1. Proceso y equipos utilizados para la tritución de residuos de cáscara de huevo de gallina



Figura AI.2. Proceso y equipos utilizados para el secado de los residuos de cáscara de huevo de gallina triturados

B. FASE DE SEPARACIÓN POR DIFERENCIA DE DENSIDADES



Figura A1.3. Proceso y equipos utilizados para la separación por diferencia de densidades de residuos de cáscara de huevo de gallina

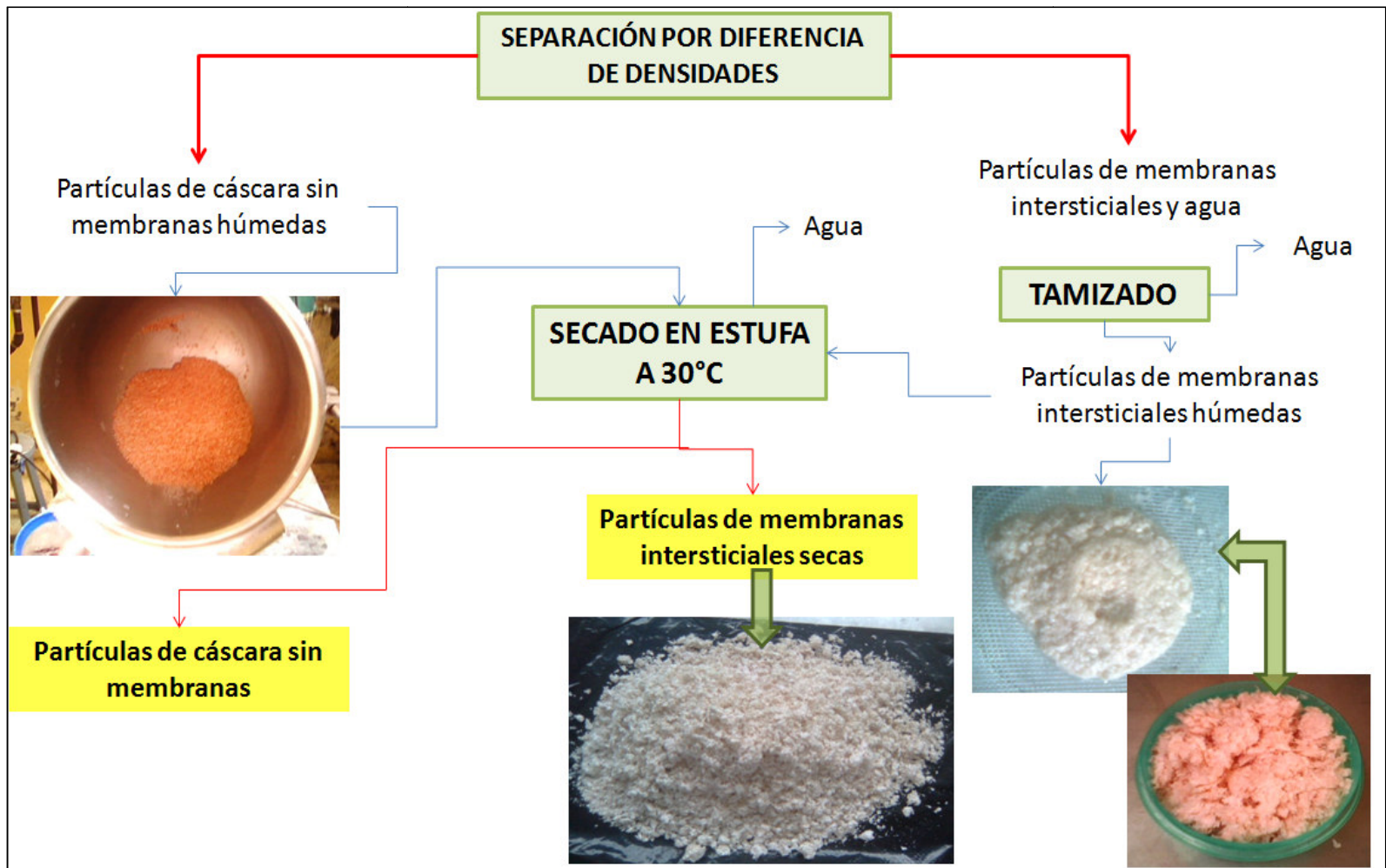


Figura AI.4. Proceso y equipos utilizados para la separación y secado de las fracciones cáscara sin membranas y membranas intersticiales

ANEXO II

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR HIDRÓLISIS ALCALINA

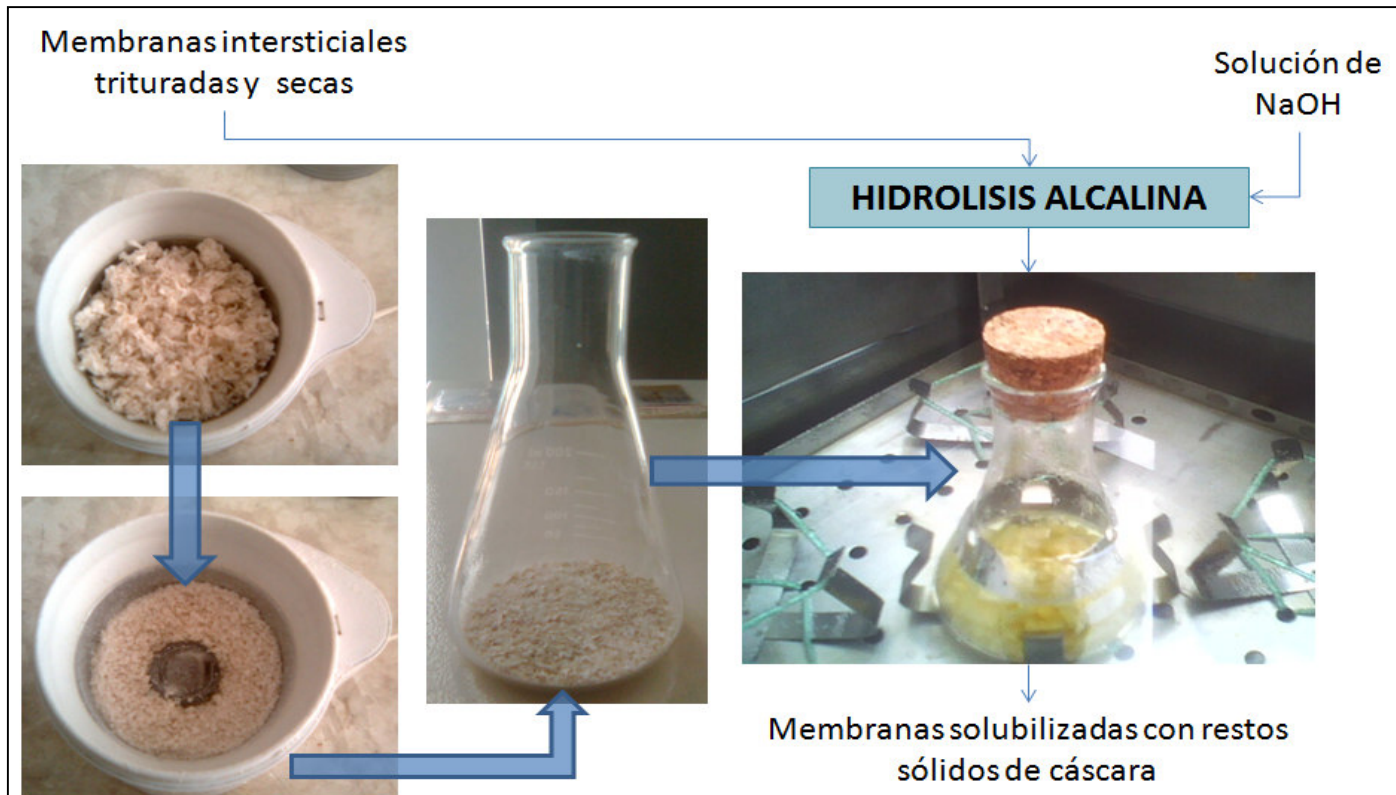


Figura AII.1. Equipos e instrumentos utilizados para la trituración de membranas para el proceso de hidrólisis

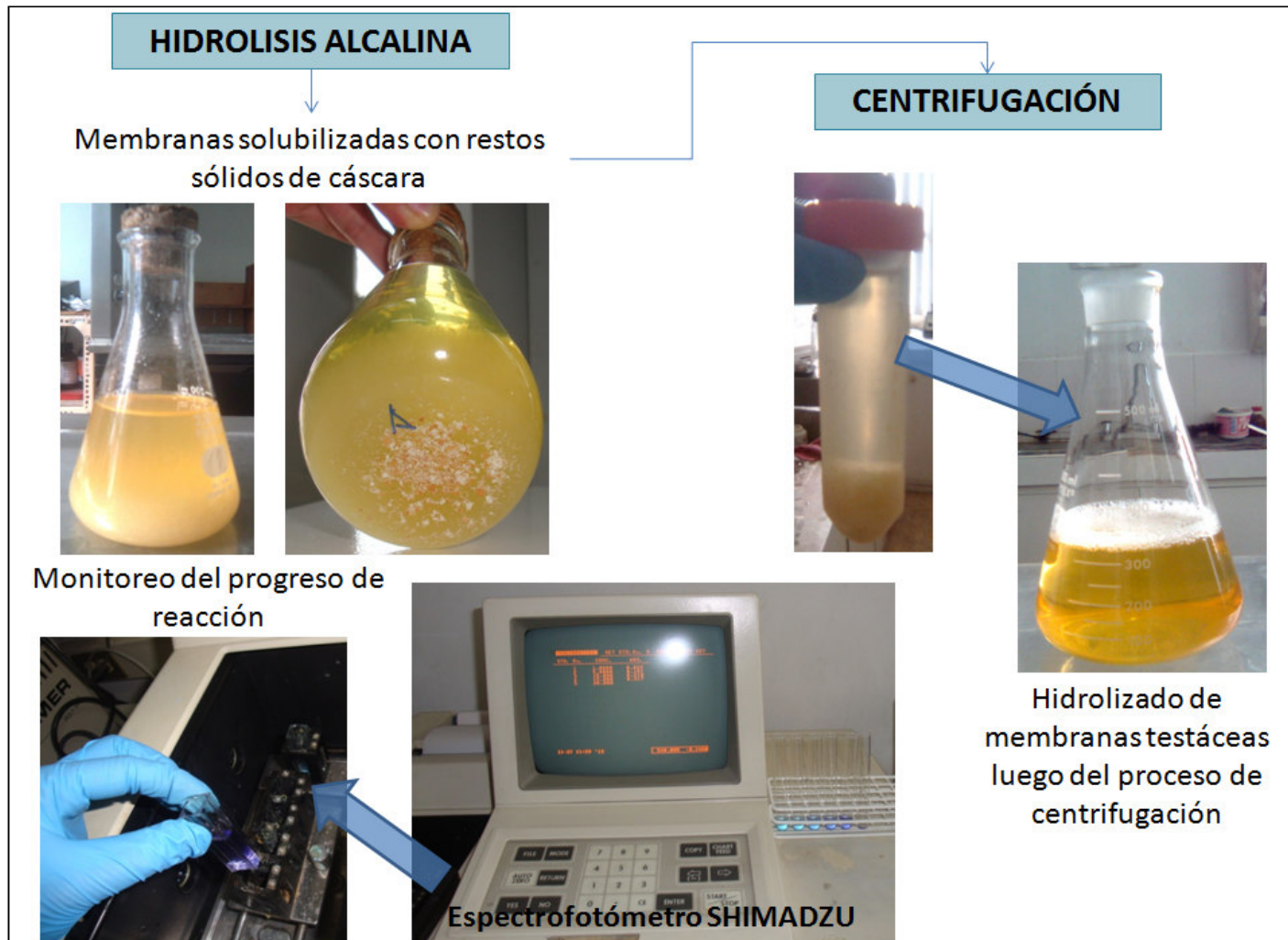


Figura AII.2. Equipos e instrumentos utilizados para el proceso de hidrólisis y centrifugación



Figura AII.3. Equipos e instrumentos utilizados durante el proceso de acondicionamiento de pH

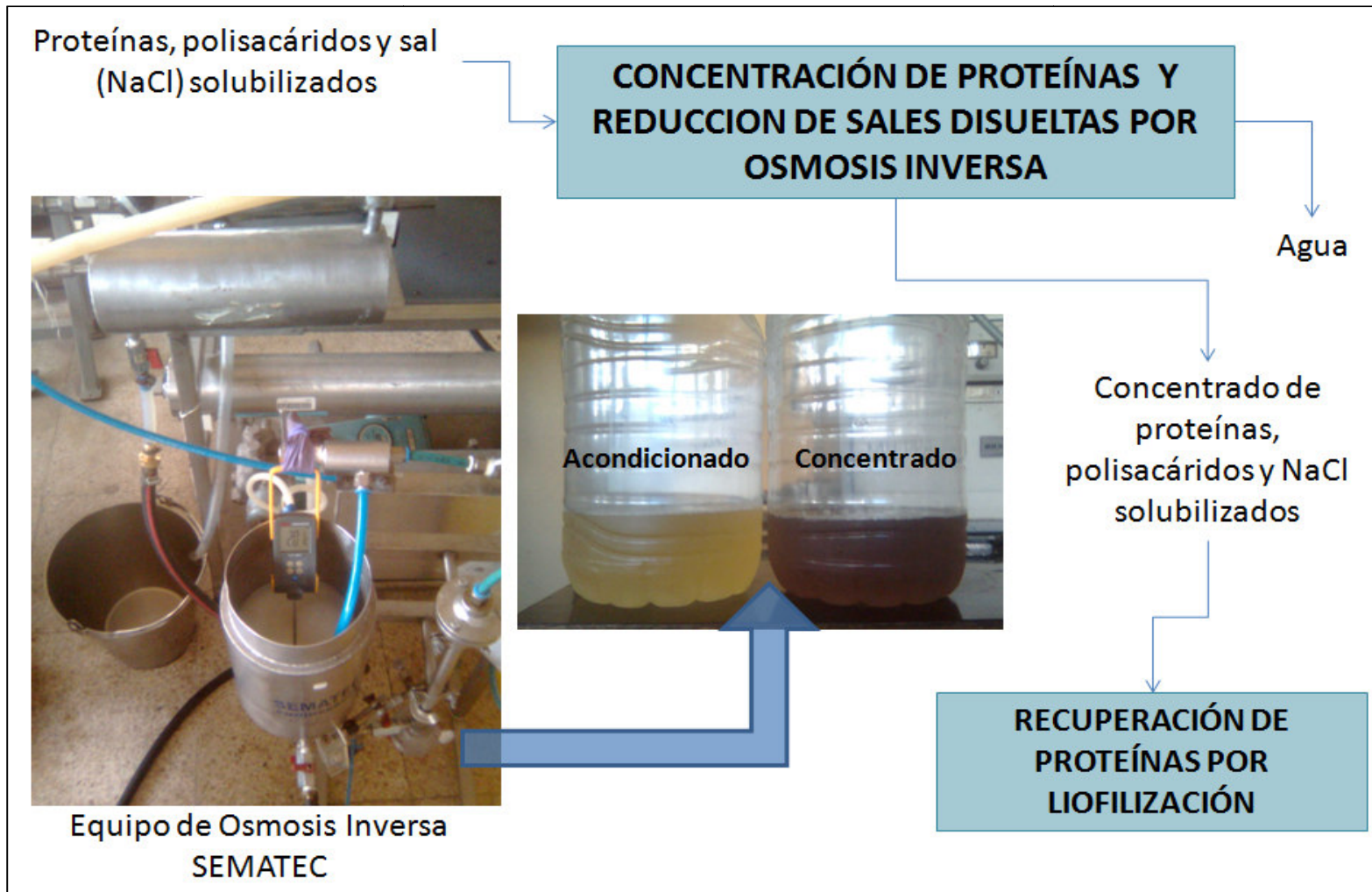


Figura AII.4. Equipo y resultados antes y después del proceso de ósmosis inversa



Figura AII.5. Fotografías de producto final obtenido después del proceso de liofilización

ANEXO III

DISEÑO FACTORIAL 3²

A. Aleatorización de los experimentos

En la Tabla AIII.1, se muestra la aleatorización de los experimentos, obtenida a través del programa STATGRAPHICS Centurion®.

Tabla AIII.1. Aleatorización de las 27 observaciones para el diseño experimental 3²

Día/Número de experimento	Concentración de NaOH (% p/p)	Temperatura de reacción de hidrólisis (°C)
1	1	45
2	5	52,5
3	5	45
4	1	52,5
5	5	60
6	3	45
7	3	60
8	3	52,5
9	1	60
10	5	45
11	3	52,5
12	1	52,5
13	5	60
14	3	45
15	1	60
16	1	45
17	3	60
18	5	52,5
19	5	60
20	1	52,5
21	5	45
22	3	52,5
23	5	52,5
24	1	60
25	1	45
26	3	45
27	3	60

B. Fundamentos del diseño factorial 3²

El modelo estadístico para el diseño factorial 3² aplicado, se define con la Ecuación AIII.1. El modelo explica el comportamiento de la variable de respuesta, a través de su media global y tomando en cuenta dos efectos: el efecto individual de cada factor de diseño y el efecto de la interacción entre ellos, además del error aleatorio (Gutiérrez, 2008, p. 240).

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_i + \delta_j + (\gamma\delta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{[AIII.1]}$$

con $i = 1, 2, 3; j = 1, 2, 3; k = 1, \dots, n$

Donde:

Y_{ijk}:	k-ésimo experimento que se hizo en el tratamiento ij. Valor del factor de respuesta que se hizo en el tratamiento ij
k:	número de tratamientos
μ:	media global de la variable de respuesta (grado de hidrólisis)
γ_i:	efecto del factor A (concentración de NaOH) en su nivel i sobre la variable de respuesta
$i = 1 = 1,00$ %:	nivel bajo del factor A
$i = 2 = 3,00$ %:	nivel medio del factor A
$i = 3 = 5,00$ %:	nivel alto del factor A
δ_j:	efecto del factor B (temperatura de reacción de hidrólisis) en su nivel j sobre la variable de respuesta
$j = 1 = 45,0$ °C:	nivel bajo del factor B
$j = 2 = 52,5$ °C:	nivel medio del factor B
$j = 3 = 60,0$ °C:	nivel alto del factor B
$(\gamma\delta)_{ij}$:	Efecto de interacción de los factores A y B en sus niveles i, j.
ε_{ijk}:	error aleatorio atribuible a la observación Y_{ijk}
n:	número de repeticiones de cada tratamiento

Los parámetros del modelo estadístico pueden definirse a través del método de Análisis de Varianza (ANOVA), que constituye la técnica central para el estudio de datos experimentales. La técnica ANOVA separa la variación total del experimento en las partes con las que contribuye cada fuente de variación, es decir la debida a los tratamientos y la debida al error, tal como se plantea en el

modelo estadístico de la Ecuación AIII.1 (Gutiérrez, 2008, p. 65). Los efectos de interés de estudio en cualquier experimento factorial son: los efectos principales y el efecto de interacción. De acuerdo a Kuehl (2001), el “efecto de un factor” es un cambio en la variable de respuesta ocasionado por un cambio en el nivel de ese factor (p. 177).

El programa STATGRAPHICS Centurion® genera la Tabla ANOVA, la misma que contiene toda la información necesaria para calcular el estadístico de prueba, denominado “razón-f”, con el cual se puede determinar el “valor-p”, el mismo que constituye la probabilidad de ocurrencia de que una hipótesis nula sea verdadera. La significancia estadística de los efectos principales y de interacción, se determina a través del procedimiento de la prueba de hipótesis y el valor p. Para el estudio de los efectos de los factores concentración de NaOH y temperatura de reacción de hidrólisis, se plantearon las hipótesis nulas y alternativas, tal como se indica en la Tabla AIII.2.

Tabla AIII.2. Planteamiento de las hipótesis nulas y alternativas a probarse a través del método ANOVA

$H_0: \gamma_i = 0$	Hipótesis Nula para el factor γ_i NO hay efecto del factor concentración de NaOH sobre la variable de respuesta grado de hidrólisis.	Prueba de Hipótesis para los Efectos Principales
$H_A: \gamma_i \neq 0$	Hipótesis Alternativa para el factor γ_i SI hay efecto del factor concentración de NaOH sobre la variable de respuesta grado de hidrólisis.	
$H_0: \delta_i = 0$	Hipótesis Nula para el factor δ_i NO hay efecto del factor temperatura de reacción sobre la variable de respuesta grado de hidrólisis.	
$H_A: \delta_i \neq 0$	Hipótesis Alternativa para el factor δ_i SI hay efecto del factor temperatura de reacción sobre la variable de respuesta grado de hidrólisis.	
$H_0: (\gamma\delta)_{ij} = 0$	Hipótesis Nula para la interacción $(\gamma\delta)_{ij}$ NO hay efecto de interacción de los factores: concentración de NaOH y temperatura de reacción sobre la variable de respuesta grado de hidrólisis.	Prueba de Hipótesis para el Efecto de Interacción
$H_A: (\gamma\delta)_{ij} \neq 0$	Hipótesis Alternativa para la interacción $(\gamma\delta)_{ij}$ SI hay efecto de interacción de los factores: concentración de NaOH y temperatura de reacción sobre la variable de respuesta grado de hidrólisis.	

ANEXO IV

PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLORÍMETRIA CON REACTIVO DE BIURET

A. Preparación del reactivo de Biuret

Para preparar 500 mL de reactivo de Biuret:

1. Preparar una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 6 mol/L, para lo cual pesar 24 g de NaOH y disolver en agua recién destilada (para minimizar CO₂), enfriar y diluir a 0,1 L. Guardar en botella de polietileno muy bien cerrada a temperatura ambiente.
2. Preparar una solución: 12 mmol/L de sulfato de cobre (CuSO₄), 32 mmol/L de tartrato de sodio y potasio (NaKC₄O₆·4H₂O), 30 mmol/L de ioduro de potasio (KI) y 0,6 mol/L de NaOH, para ello: Disolver 1,5 g de CuSO₄ e n 250 mL de agua recién destilada. Añadir 4,5 g de tartrato de sodio y potasio y 2,5 g de KI. Después de que se hayan disuelto los sólidos, añadir 50 mL de NaOH 6 mol/L y diluir a 0,5 L con agua destilada.
3. Almacenar el reactivo en una botella de polietileno y guardarlo en refrigeración.

B. Protocolo para la cuantificación de proteínas por colorimetría con reactivo de Biuret

1. Preparar una solución estándar de suero de albumina bovina de concentración 20 mg/mL.
2. Disponer 5 tubos de ensayo debidamente rotulados para preparar la curva de calibración, colocar en los tubos las cantidades de estándar de albúmina

bovina, agua destilada y reactivo de Biuret, tal como lo indica la Tabla AIV.1, a continuación:

Tabla AIV.1. Construcción de la curva de calibración para el método de Biuret

Rótulo del tubo	Reactivos			Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
	Volumen de estándar de albúmina bovina (μL)	Volumen de agua destilada (μL)	Volumen de reactivo de Biuret (mL)	
Blanco	0	200	1	0
1	5	95		1
2	25	75		5
3	50	50		10
4	75	25		15
5	100	0		20

3. Agitar los tubos de ensayo para homogenizar la mezcla.
4. Dejar a temperatura ambiente, alrededor de 18 °C - 20 °C y leer la absorbancia a 540 nm.
5. Para las muestras de concentración desconocida, tomar alícuotas de 100 μL del sobrenadante que queda luego del proceso de microcentrifugación, luego añadir 1 mL de reactivo de Biuret, homogenizar y leer en el espectrofotómetro.

ANEXO V

DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO DE ÓSMOSIS INVERSA

El equipo de osmosis inversa a escala de laboratorio MICRO 240, marca SEMATEC, consta de los componentes que se describen más adelante, y se esquematizan en la Figura AV.1.

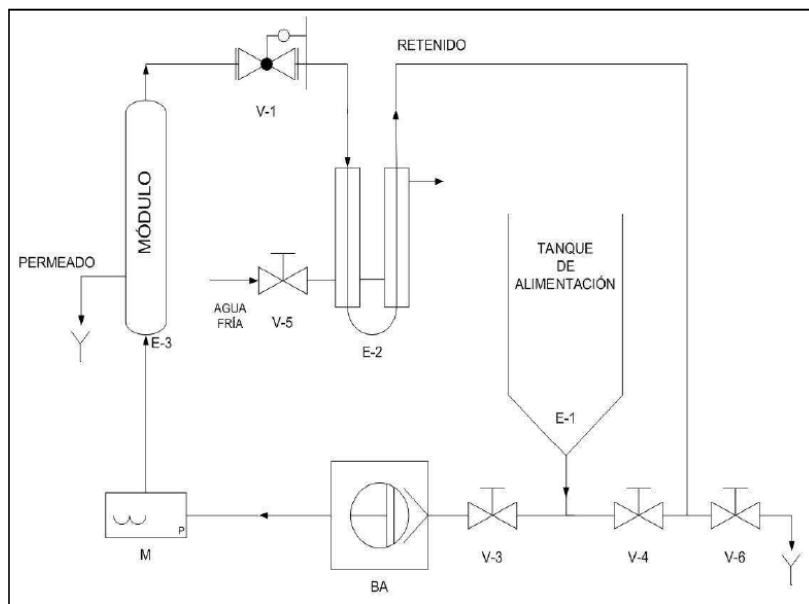


Figura AV.1. Diagrama del equipo de ósmosis inversa Micro 240 (DECAB, 2007)

- Tanque de alimentación de muestra para escala de laboratorio, que cuenta con una capacidad de 5 L y en el esquema lleva la nomenclatura E-1
- Bomba de pistones para alimentación y circulación de la muestra (BA)
- Intercambiador de calor tubular (E-2)
- Válvula para regular presión (V-1)
- Válvula para regular el flujo de alimentación (V-3)
- Válvula para vaciar el tanque de alimentación (V-4)
- Válvula para eliminar el contenido del módulo (V-6)
- Manómetro para medir la presión en la entrada del módulo (M)

- Módulo de filtración con membrana AFC99, marca Aquious – PCI Membranes (E-3), con las características que muestran la Tabla AV.1.

Tabla AV.1. Características de la membrana AFC99 del módulo de ósmosis inversa Micro 240

Material	Poliamida
Rango de resistencia de pH	1,5 – 12
Presión máxima de operación	870 psi/64 bar
Temperatura máxima de operación	80 °C
Diámetro interno	1,2 cm
Diámetro externo	1,35 cm
Longitud	32,5 cm
Área efectiva de membrana	0,024 m ²

Una fotografía del equipo se muestra, en la Figura AV.2.



Figura AV.2. Fotografía del equipo de ósmosis inversa Micro 240

ANEXO VI

DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO DE LIOFILIZACIÓN

El equipo de liofilización marca STOKES, con el que cuenta la planta piloto del Departamento de Ciencia y Biotecnología de Alimentos (DECAB) de la EPN, presenta los componentes que se describen a continuación:

- Cámara de vacío en cuyo interior se encuentra:
 - Una balanza de brazos, cuya capacidad es de 1 800 g, sobre la cual se sitúa una bandeja metálica de peso 200 g, en donde se coloca la muestra congelada y triturada
 - Una termocupla, la misma que permite el monitoreo de la temperatura del frente de sublimación del producto
 - Dos intercambiadores de calor de placas a través de los cuales fluye el aceite calefactor

- Sistema de control automático, que cuenta con un conjunto de sensores cuya función es registrar los cambios con el tiempo de: la temperatura del producto, la temperatura de refrigeración, la temperatura de aceite de calentamiento y la presión de vacío. Las gráficas del proceso a tiempo real aparecen en la interfaz hombre – máquina (HMI), creada con el programa LABVIEW. El “set point” para la temperatura de calentamiento del aceite es el único dato que se debe ingresar a la interfaz, para que los controladores automáticos se encarguen de llevar a cabo la operación bajo esta condición definida. De igual manera el peso del producto que marca el indicador de la balanza de brazos, es el segundo dato que se ingresa a la interfaz, con el fin de tener un registro de la variación de este parámetro. El monitoreo de estas condiciones se registran en cuadros con formato de hoja electrónica de Microsoft Excel®, los mismos que pueden ser recuperados una vez finalizado el proceso

- Medidor de presión de vacío.

- Sistema de refrigeración con condensador, el cual llega hasta una temperatura de $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un tiempo de 20 min aproximadamente.
- Sistema de calentamiento para el aceite que circula por los intercambiadores de placas
- Bombas de vacío y de recirculación de aire.
- Tablero de control que contiene los switches para el encendido y apagado de los sistemas de refrigeración y calentamiento y para el accionamiento de las bombas.

Fotografías del equipo de liofilización, y de algunos de sus accesorios y componentes se presentan a partir de la Figura AVI.1 hasta la Figura AVI.3 .

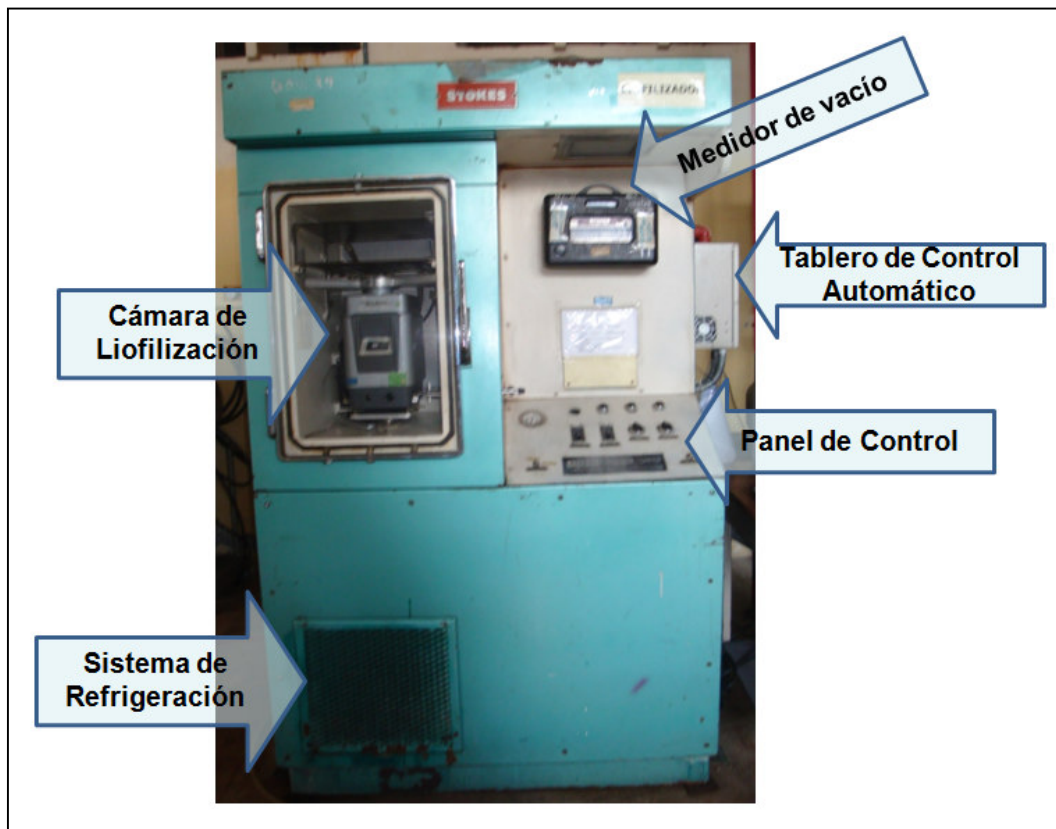


Figura AVI.1. Liofilizador STOKES con detalle de sus principales componentes

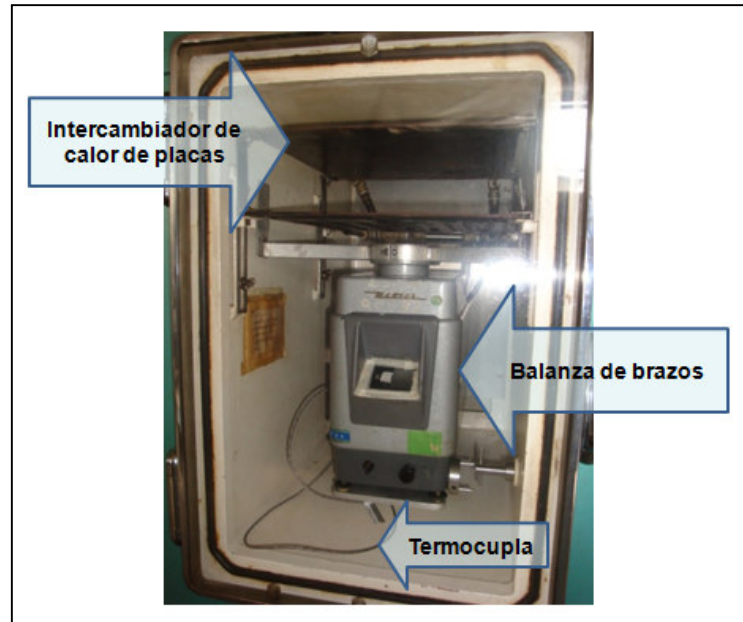


Figura AVI.2. Componentes del interior de la cámara de liofilización

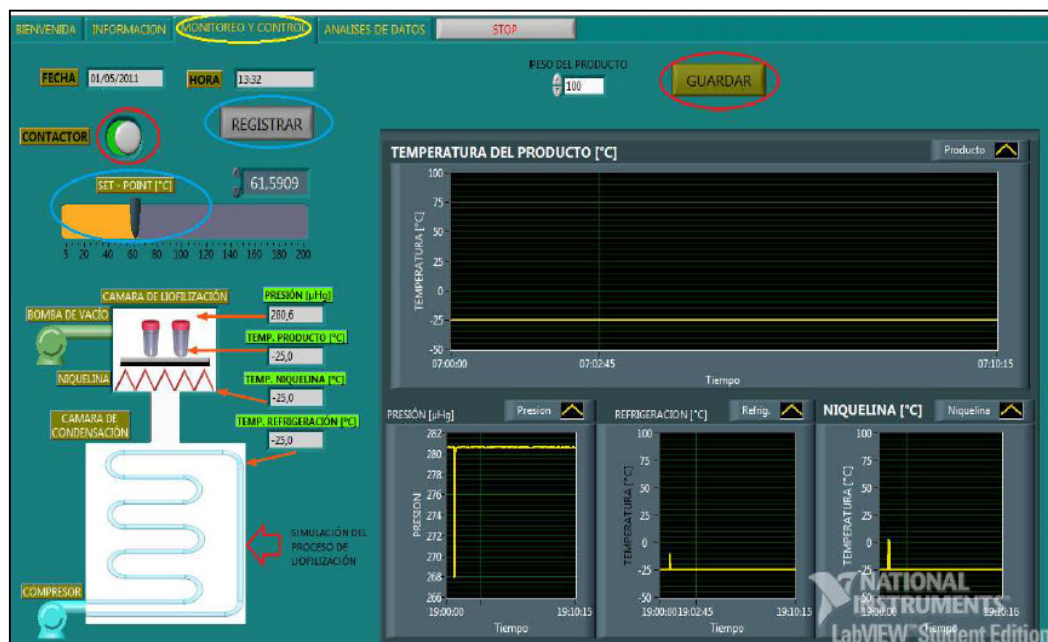


Figura AVI.3. Interfaz Hombre – Máquina (HMI) para monitoreo de los parámetros del proceso de liofilización

ANEXO VII**EQUIPO PHAST SYSTEM® PARA ELECTROFORESIS**

Figura AVII.1. Equipo PhastSystem para electroforesis

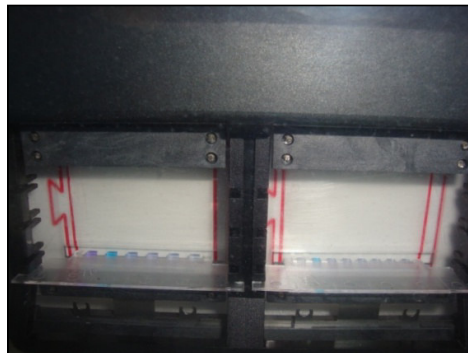


Figura AVII.2. Unidad de separación y control

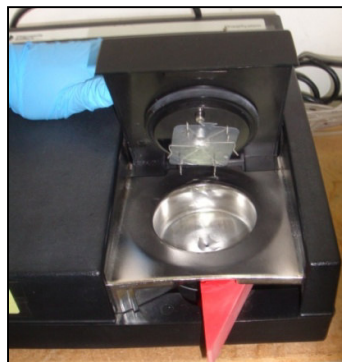


Figura AVII.3. Unidad de revelado

ANEXO VIII

PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES POR SDS-PAGE

A continuación se encuentra el protocolo implementado para la determinación de los pesos moleculares de proteínas y polipéptidos por electroforesis en geles de poliacrilamida sododecil sulfato (SDS-PAGE) ¹ usando el equipo Phast System[®].

Materiales

- Membranas de teflón de tamaño de poro 0,45 µm
- Micropipetas automáticas de 10, 100 y 1 000 µL
- Puntas de plástico para micropipetas
- Pinzas metálicas
- Portamuestra 6/4 (6 muestras de 4 µL cada una) para celdas de electroforesis
- Aplicador de muestra para celdas de electroforesis
- Película de plástico de parafina
- Tubos de vidrio con tapa de 2 mL
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
- Portafiltro de vidrio de 250 mL para filtración al vacío

Reactivos

- Sodium Dodecil Sulfato (SDS), Center of Surface Biotechnology Uppsala Universitet
- Hidroximetil amino metano, 99,90 %, Promega
- Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), 100 %, J.T. Baker Chemical
- Ácido acético glacial, grado ACS de pureza, Merck
- Ácido Clorhídrico, 36,50 - 38,00 %, reactivo ACS, J.T. Baker
- Azul de bromofenol, grado ACS de pureza, Mallinckrodt

¹ SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

- 2-Mercaptoetanol, $\geq 98,00\%$, Sigma Chemical C.O.
- Dithiothreitol (DTT), $\geq 99,00\%$, Sigma-Aldrich
- Glicerol, grado ACS de pureza, Mallinckrodt
- Metanol, grado ACS de pureza, Panreac
- Phast Gel Blue R Coomassie R350 stain, Pharmacia Biotech
- SDS - Buffer strips, PhastGel, Amersham Biosciences
- Geles de acrilamida ($< 0,20\%$), gradiente 8-25, PhastGel, Amersham Biosciences
- Estándar de proteínas de bajo peso molecular, 14,4-97,0 kDa, Amersham Biosciences
- Estándar de proteínas de alto peso molecular, 53-212 kDa, Amersham Biosciences
- Estándar de proteínas de alto y bajo pesos moleculares (rango amplio), 6,5-200,0 kDa, Sigma Aldrich

Equipos

- Phast System[®], consistente en la unidad de separación y control y en la unidad de desarrollo o revelado
- Baño termostático Precision Scientific, 99,9 °C, 0,1 °C
- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415 D

A. Preparación de la muestra

Soluciones requeridas:

- Buffer para la muestra: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
- Solución SDS: SDS 2,50 % + β -mercaptoetanol 5,00 % + Azul de bromofenol 0,01 %

Procedimiento:

- Añadir 3 partes de muestra (900 μ L) + 1 parte de la solución de SDS (300 μ L) y luego hervirlas a 100 °C por 5 min

- Centrifugar las muestras por 3 min
- Las muestras deben tener una concentración de 5-10 mg de proteína por mililitro de agua destilada o el buffer adecuado si se tiñe con Azul Coomasie.

B. Preparación de los estándares o marcadores de proteínas

Marcador de proteínas de pesos moleculares altos (HMW)

- Reconstituir el contenido de 1 vial con 100 μ L de agua deionizada.
- Almacenarlo en congelación máximo 3 meses.

Marcador de proteínas de rango amplio de pesos moleculares (LMW-HMW)

- Reconstituir el contenido de 1 vial con 100 μ L de agua deionizada.
- Almacenarlo en congelación máximo 3 meses.

Marcador de proteínas de pesos moleculares bajos (LMW)

- Reconstituir el contenido de 1 vial con 200 μ L de la siguiente solución buffer: 10 mM Tris/HCl, 2,00 % SDS, 0,1 M DTT, 0,01 % azul de bromofenol, 1 mM EDTA.
- Ajustar el pH a 8.0 con HCl
- Almacenarlo en congelación máximo 3 meses.

C. Procedimiento de operación de la unidad de separación del equipo de electroforesis PhastSystem®

Aplicación del gel de acrilamida de gradiente 8 - 25:

- Limpiar el sitio donde se coloca el gel con unas gotas de agua deionizada y un papel absorbente.
- Colocar dos gotas de agua en el sitio del gel
- Cortar el empaque del gel con tijeras por la línea punteada y sacar el gel del empaque con la ayuda de pinzas

- Colocar el gel en la posición y sitio correcto, evitando la formación de burbujas debajo del gel
- Secar con papel adsorbente el sitio donde se colocó el gel
- Remover la lámina de plástico que cubre el gel
- Colocar el portador del buffer sobre el gel
- Sacar dos buffer strips² y colocarlos cuidadosamente en el portador del buffer
- Poner en contacto los electrodos con los buffer strips

Aplicación de la muestra

- Cubrir con parafilm el porta muestra
- Añadir 4 μL de la muestra exactamente en las celdas marcadas del portamuestra.
- Tomar la muestra con el aplicador 6/4 como indica la Figura AVIII.1.

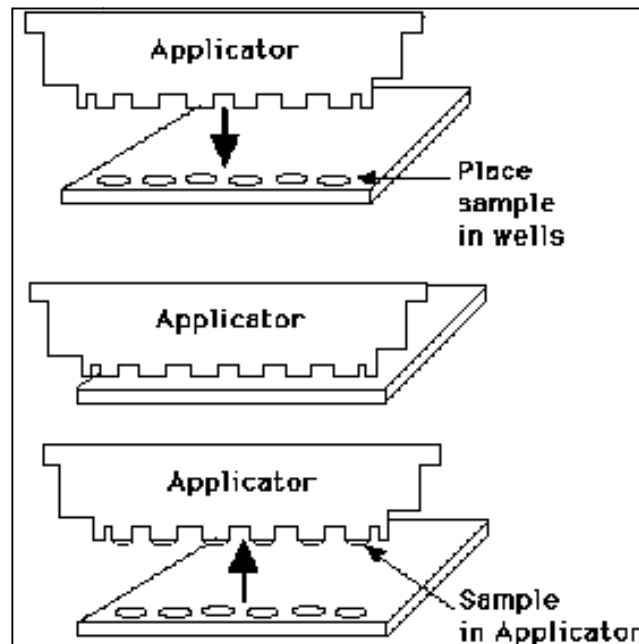


Figura AVIII.1. Uso del aplicador de muestras del equipo PhastSystem

² Buffer strips: geles de buffer específicamente para SDS

- Poner el aplicador con la muestra en la primera hendidura del compartimiento de separación del Phast System y bajar la tapa
- Presionar la tecla “Sep start”, y luego el número de geles que se va a correr y la tecla “do”
- Seleccionar el número de método según el programa y presionar “do”
- Presionar “Sep stop” y luego “do” cuando la alarma del equipo haya sonado (prestar atención a la alarma del equipo porque las proteínas pueden correr fuera del gel).

D. Revelado de los geles

Preparación de la solución stock (0,20 %) de Phast Gel Blue R

- Disolver 1 tableta de Phast Gel Blue R en 80 ml de agua destilada y agitar por 5 a 10 min.
- Añadir 120 mL de metanol y agitar hasta que toda la tableta se haya disuelto.
- Filtrar la solución utilizando membranas de tamaño de poro 0,45 µm.
- Guardar la solución máximo 3 semanas.

Preparación de la solución al 0,1 % de Phast Gel Blue R para Phast Gel Media

- Mezclar 1 parte de la solución stock con 1 parte de ácido acético al 20,00 % en agua destilada.

Nota: Preparar por lo menos 80 mL de la solución para el revelado

Preparación de la solución de lavado (Wash/Destain solution)

- 30,00 % methanol, 10,00 % ácido acético, 60,00 % agua destilada (3:1:6)
- Se necesitan al menos 80 mL de solución

Preparación de la solución para preservación del gel (Preserving solution)

- 13,00 % glicerol y 10,00 % ácido acético en agua destilada
- Se necesitan al menos 80 mL de solución

E. Procedimiento de operación de la unidad de revelado del equipo de electroforesis PhastSystem®

- Abrir la tapa del compartimiento de separación y retirar el aplicador de la muestra. Lavarlo bien con agua destilada y guardarlo para volver a usarlo.
- Retirar el gel cuidadosamente con una pinza y ponerlo en la cámara de revelado del Phast System. Si se corren dos geles colocar la parte del gel una frente a la otra (tipo sánduche).
- Revisar que todas las mangueras estén en las soluciones correctas de acuerdo a la técnica de revelado que se va a usar.
- Presionar “Dev start” y seleccionar el número del método que se va usar, y luego presionar “do”
- Realizar el revelado inmediatamente después de la electroforesis o el proceso de separación para prevenir la difusión de las bandas.
- El revelado de los geles tomará cerca de 1 h, después de escuchar la alarma del equipo retirar los geles, colocarlos en cajas petri.
- Para guardarlos como documentos se recomienda tomar fotos de los geles o escanearlos.

ANEXO IX

MONITOREO DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ALCALINA

A. Tabla de datos

Tabla AIX.1. Datos de la concentración medida por espectrofotometría

Día	NaOH (% p/p)	T (°C)	Tiempo de hidrólisis (h)										
			0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5
			µg/µL de proteína										
1	1	45	-0,20	0,27	0,51	0,55	0,65	0,65	0,74	0,74	0,74	0,88	0,88
2	5	52,5	2,92	4,51	7,00	8,48	8,85	9,49	9,65	9,70	10,02	10,12	10,23
3	5	45	2,83	4,36	4,80	6,38	7,86	9,88	10,97	11,46	11,46	12,01	12,12
4	1	52,5	1,16	1,16	1,16	1,67	1,71	1,81	1,81	1,99	2,09	2,13	2,32
5	5	60	5,37	11,43	11,62	11,62	12,07	12,56	12,71	12,71	12,81	13,30	13,84
6	3	45	2,01	2,53	3,16	3,53	3,85	4,01	4,32	4,48	4,85	5,42	5,85
7	3	60	1,33	5,44	7,56	11,49	11,67	11,81	11,86	11,86	12,18	13,38	13,84
8	3	52,5	1,89	2,62	3,54	4,26	5,18	5,76	7,16	8,85	11,27	11,75	13,64
9	1	60	1,45	1,65	1,70	1,85	2,16	2,41	2,56	2,56	2,66	2,81	3,67
10	5	45	4,27	7,11	7,32	8,43	11,48	13,49	13,64	14,96	14,96	15,17	15,44
11	3	52,5	1,87	3,52	3,98	4,81	5,95	6,82	8,27	8,58	8,99	11,83	12,51
12	1	52,5	0,71	1,06	1,06	1,06	1,11	1,42	1,46	1,46	1,64	1,73	2,17
13	5	60	7,34	11,60	12,46	12,51	12,62	13,09	13,15	13,63	13,73	14,00	14,21
14	3	45	2,00	2,23	2,56	3,12	3,28	3,84	4,17	4,23	4,28	5,01	5,17
15	1	60	2,26	2,37	2,47	2,47	2,58	3,01	3,44	4,03	4,08	4,19	4,56
16	1	45	0,39	0,48	0,81	0,85	0,95	0,95	0,99	0,99	1,09	1,09	1,13
17	3	60	1,29	7,20	9,56	11,20	11,65	13,17	13,34	13,34	13,73	14,01	14,18
18	5	52,5	5,14	7,19	9,55	12,86	13,36	13,51	13,56	13,91	14,31	14,46	14,91
19	5	60	1,25	12,37	12,57	12,57	12,86	12,91	13,29	13,34	13,53	13,58	14,16
20	1	52,5	1,14	1,14	1,27	1,36	1,45	1,59	1,59	1,63	1,63	1,81	2,53
21	5	45	3,26	4,29	7,22	8,58	9,93	12,97	13,19	13,62	13,62	14,11	14,33
22	3	52,5	3,68	3,89	4,64	5,50	5,82	7,27	8,55	9,35	10,69	11,55	12,73
23	5	52,5	1,99	3,46	4,65	12,02	12,06	12,25	12,25	12,52	12,70	13,21	13,62
24	1	60	0,71	2,07	2,29	2,34	2,40	2,78	2,94	2,94	3,16	3,65	4,25
25	1	45	0,10	0,28	0,87	0,92	0,97	1,15	1,15	1,47	1,47	1,83	1,92
26	3	45	1,15	2,29	3,00	3,24	3,95	4,28	4,52	4,57	4,76	5,09	5,71
27	3	60	1,88	3,21	4,65	7,24	11,42	11,78	12,34	13,26	13,26	13,52	13,92

B. Curva de calibración

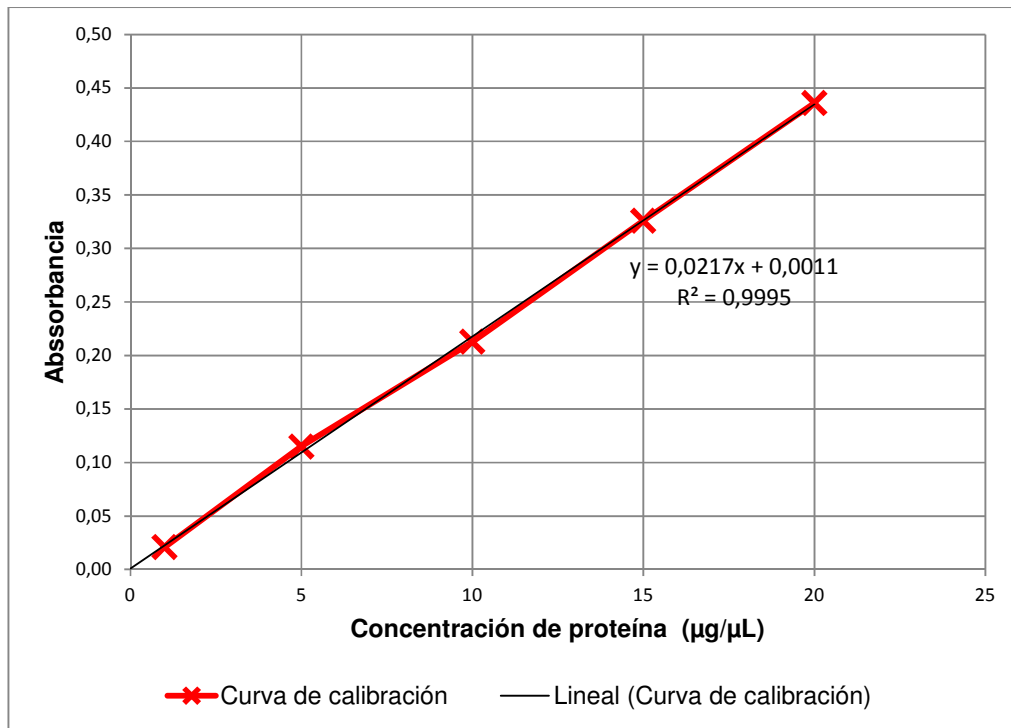


Figura AIX.1. Curva de calibración elaborada con suero de albúmina bovina

C. Ejemplo de cálculo de la concentración de proteína máxima en las muestras:

Como se estableció una proporción 20:1 (mg de membranas intersticiales: mL de solución de hidróxido de sodio) para cada experimentación, en cada muestra, se tiene como concentración máxima de proteína:

$$\frac{1500 \text{ mg membranas}}{75 \text{ mL sol NaOH}} \times \frac{71,19 \text{ mg de proteína}}{100 \text{ mg membranas}} = 14,24 \frac{\text{mg de proteína}}{\text{mL sol NaOH}} = 14,24 \frac{\mu\text{g de proteína}}{\mu\text{L sol NaOH}}$$

Con la proporción 20:1 la concentración máxima de proteína que se puede detectar por espectrofotometría, se encuentra dentro del rango lineal de la curva de calibración, con lo que se evita realizar diluciones para conocer la concentración de muestras, ya que siempre se encontrarán en el rango lineal.

D. Ejemplo de cálculo para el grado de hidrólisis

Para el experimento realizado el día 10 y monitoreado en un tiempo de hidrólisis de 3,5 h, se lee una concentración de 13,64 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, por tanto el grado de hidrólisis es el siguiente:

$$\frac{13,64 \mu\text{g proteína hidrolizada}}{\mu\text{L sol NaOH}} = \frac{13,64 \text{ mg proteína hidrolizada}}{\text{mL sol NaOH}}$$

$$\frac{13,64 \text{ mg proteína hidrolizada}}{\text{mL sol NaOH}} \times \frac{75 \text{ mL sol NaOH}}{1504,5 \text{ mg membranas}} = \frac{0,68 \text{ mg proteína hidrolizada}}{\text{mg membranas}}$$

$$\frac{0,68 \text{ mg proteína hidrolizada}}{\text{mg membranas}} \times \frac{100 \text{ mg membranas}}{71,19 \text{ mg proteína total}} = \frac{0,95 \text{ mg proteína hidrolizada}}{\text{mg proteína total}}$$

$$\frac{0,95 \text{ mg proteína hidrolizada}}{\text{mg proteína total}} \times 100 \% = 95,55 \%$$

ANEXO X

**CURVA DE VALORACIÓN PARA EL HIDROLIZADO DE
PROTEINA DE MEMBRANAS INTERSTICIALES**

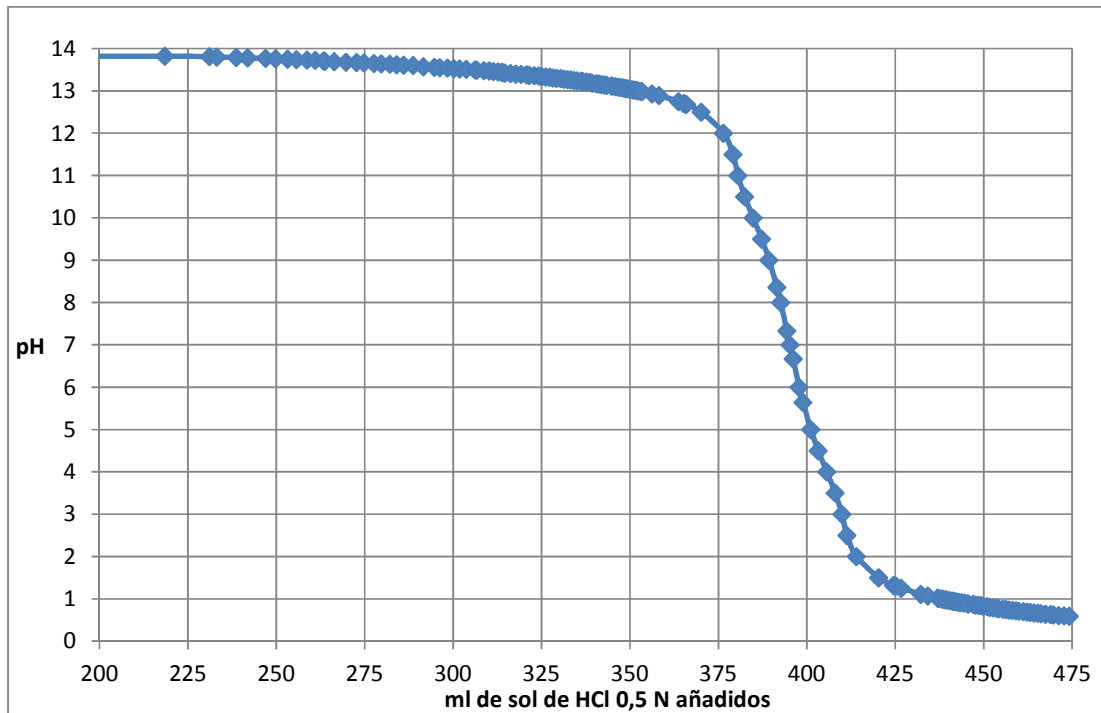


Figura AX.1. Curva de valoración para el hidrolizado de proteína de membranas intersticiales de RCHG

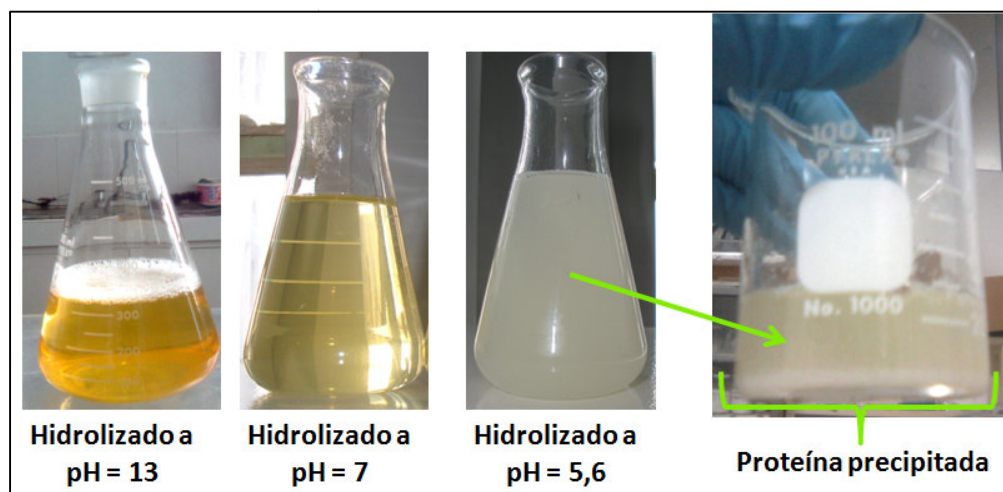


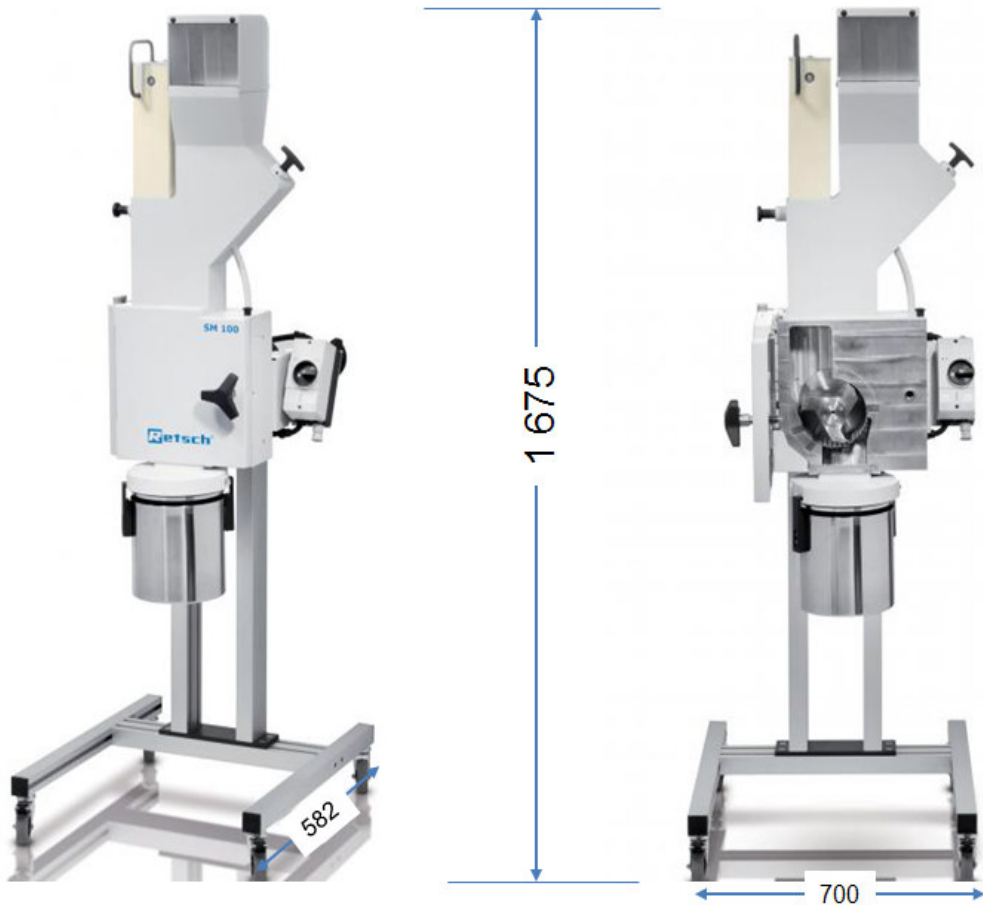
Figura AX.2. Fotografías de los cambios en el hidrolizado por cambios en el pH

ANEXO XI

HOJAS DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS EQUIPOS

PRINCIPALES

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 01
Identificación:		Tipo de operación: Semi-Batch
Nombre del equipo:	Separador centrífugo	Tipo: Centrífuga automática
Código del equipo:	SC-101	Material de construcción: Acero inoxidable
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
Marca: COENRAADTS Modelo: C-430 Capacidad máxima: 65 000 cascarones de huevos por hora Peso: 260 kg		Características del motor Tipo: Trifásico Conexión voltaje: 220 - 240 Electricidad: 4 kW Revoluciones: 1 430 rpm
Esquema del equipo*:		
<p style="text-align: right;">*Dimensiones dadas en mm</p>		

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 02
Identificación:		Tipo de operación: Semi-Batch
Nombre del equipo:	Molino de corte	Tipo: Molino de cuchillas
Código del equipo:	M-101	Material de construcción: Acero inoxidable
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
<p>Marca: RETSCH Modelo: SM-100 Capacidad: 0,5 kg de RCHG para un tiempo de molienda de 30 s Rotor: de corte paralelo con 3 cuchillas grandes con motor trifásico de 1,5 kW Peso del equipo: 73 kg</p>		<p>Accesorios: Tolva de alimentación de 80 x 80 mm Tamiz de fondo en acero inoxidable de abertura trapezoidal de 0,5 mm Recipiente colector de 30 L con filtro de manga Soporte con ruedas</p>
Esquema del equipo*:		
 <p>The image shows a technical drawing of the Retsch SM-100 mill. It consists of two views: a front view on the left and a side view on the right. A vertical dimension line between the two views indicates a height of 1675 mm. A horizontal dimension line at the bottom indicates a width of 700 mm. A diagonal dimension line at the bottom left indicates a depth of 582 mm. The mill is a white, vertical machine with a stainless steel collection container at the bottom and a hopper at the top. The Retsch logo and model number 'SM 100' are visible on the front panel.</p>		
*Dimensiones dadas en mm		


HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 03
Identificación:		Tipo de operación: Continua
Nombre del equipo:	Separador por diferencia de densidades	Tipo: Tanque de sedimentación cilíndrico de fondo plano
Código del equipo:	SD-101	Material de construcción: Acero inoxidable 316
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas para el Diseño		
Volumen del tanque de sedimentación: 68,3 L aproximadamente 18 gal		Sistema de agitación: Tipo de rodete: De paletas de 2 aspas planos Potencia mínima requerida para el motor: 27 W
Esquema del equipo*:		
<p style="text-align: right;">*Dimensiones dadas en mm</p>		

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 04
Identificación:		Tipo de operación: Batch
Nombre del equipo:	Reactor de hidrólisis	Tipo: Reactor enchaquetado de fondo elíptico con piernas de soporte
Código del equipo:	R-101	Material de construcción: Acero al carbón de grano fino
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
Marca: PFAUDLER Modelo: RT-24-50 Dimensiones principales: Altura del reactor(A): 730 mm Altura total (B): 2 540 mm Diámetro del reactor: 610 mm Diámetro con chaqueta: 711 mm		Capacidad volumétrica de trabajo: 50 gal Chaqueta de calentamiento: Volumen: 18,4 gal Área de calentamiento: 13,1 ft ² =1,22 m ² Sistema de agitación: Tipo de rodete: De hélice de 4 aspas curvas
Esquema del equipo*:		
*Dimensiones dadas en pulgadas		

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 05
Identificación:		Tipo de operación: Semi-Batch
Nombre del equipo:	Reactor de precipitación por acondicionamiento de pH	Tipo: Reactor enchaquetado de fondo elíptico con piernas de soporte
Código del equipo:	R-102	Material de construcción: Acero al carbón de grano fino
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
Marca: PFAUDLER Modelo: RT-40-200 Dimensiones principales: Altura del reactor(A): 1 155,7 mm Altura total (B): 3 127,375 mm Diámetro del reactor: 1 016 mm Diámetro con chaqueta: 1 117,6 mm		Capacidad volumétrica de trabajo: 200 gal Chaqueta de calentamiento: Volumen: 45,4 gal Área de calentamiento: 37,8 ft ² =3,51 m ² Sistema de agitación: Tipo de rodete: De hélice de 4 aspas curvas
Esquema del equipo*:		
*Dimensiones dadas en pulgadas		

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 06
Identificación:		Tipo de operación: Semi-Batch
Nombre del equipo:	Reactor de neutralización	Tipo: Reactor enchaquetado de fondo elíptico con piernas de soporte
Código del equipo:	R-103	Material de construcción: Acero al carbón de grano fino
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
Marca: PFAUDLER Modelo: RT-14-10 Dimensiones principales: Altura del reactor(A): 419,1 mm Altura total (B): 1 869,948 mm Diámetro del reactor: 355,6 mm Diámetro con chaqueta: 457,2 mm		Capacidad volumétrica de trabajo: 10 gal Chaqueta de calentamiento: Volumen: 5,8 gal Área de calentamiento: 3,6 ft ² =0,33 m ² Sistema de agitación: Tipo de rodete: De hélice de 2 aspas curvas
Esquema del equipo*:		
*Dimensiones dadas en pulgadas		

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 07
Identificación:		Tipo de operación: Continuo
Nombre del equipo:	Módulo de Ultrafiltración	Tipo: Módulo con carcasa de plástico
Código del equipo:	U-101	Material de construcción: Carcasa de PVC y membrana de PVDF
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
Marca: DOW Modelo: SFP-2 860 Flujo de alimentación: 9,2 – 26,7 gal/min Volumen del módulo: 9,3 gal = 35 L Dimensiones principales: Diámetro del modulo: 225 mm Longitud total (L): 1 860 mm L3: 1 820 mm L2: 1 630 mm L1: 1 500 mm W1: 180 mm W2: 342 mm		Flujo de filtrado: 40 – 120 L/h Características membrana: Rango de resistencia de pH: 2 – 11 Temperatura máxima: 40 °C Diámetro de poro nominal: 0,03 µm Material de la membrana: Fibras de polifluoruro de vinilideno PVDF Área de la membrana: 51 m ² Máxima presión de operación: 30 psi Máxima presión carcasa: 87 psi
Esquema del equipo*:		
<p>The technical drawing includes a side view of the ultrafiltration module with the following dimensions and labels: <ul style="list-style-type: none"> DN 50 Product 2" (top left inlet) DN 50 Inlet 2" (top right inlet) Concentrate 2" DN 50 (left outlet) Air (Rp 3/8") (right inlet) Dimensions: L (total length), L3, L2, L1 (segment lengths), 180 (height), 135 (width of end section), 225 (diameter), W2 (total width), and W1 (width of end section). Below the side view is a top-down view of the circular module with dimensions W1 and W2. To the right is a photograph of the physical unit. </p>		
*Dimensiones dadas en mm		

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 08
Identificación:		Tipo de operación: Batch
Nombre del equipo:	Cámara de congelación	Tipo: Mini-congelador vertical con patas ajustables
Código del equipo:	C-101	Material de construcción: Poliuretano como material aislante
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
Marca: IBERNA Modelo: ITUP-130 Capacidad de congelación: 4,5 kg/24h Capacidad bruta: 90 L Capacidad neta: 64 L Número de compartimientos: 3 Peso: 24 Kg Puerta de bisagra reversible Consumo diario de energía: 0,47 kWh		Consumo de energía: 171 kWh Autonomía sin electricidad: 11 h Nivel de ruido: 43 dB Sistema de congelación no frost Tipo de líquido refrigerante: R600 Dimensiones de los compartimientos: Alto: 270 mm Ancho: 490 mm Profundidad: 490 mm
Esquema del equipo*:		
		
*Dimensiones dadas en mm		

HOJA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS		No. 09
Identificación:		Tipo de operación: Batch
Nombre del equipo:	Liofilizador	Tipo: De sistema de bandejas
Código del equipo:	L-101	Material de construcción: Acero Inoxidable 430 calibre 22
No. requerido en planta:	1	
Especificaciones Técnicas de Catálogo		
Temperatura de operación: < - 40°C Presión de operación: < 0,0061 bar Carga máxima de producto: 10 kg Superficie útil de carga por placa: 2394 cm ² Número de bandejas: 3 Temperatura de las placas: - 40 °C a 60 °C		Capacidad del evaporador: 9 000 BTU Temperatura de diseño de la cámara: 30 °C Temperatura de condensación: 40 °C Presión de vacío por la bomba: 0,089 psi Temperatura máxima de las resistencias eléctricas: 60 °C
Esquema del equipo* (Dimensiones en mm):		
<p>The technical drawing consists of three views: <ul style="list-style-type: none"> Front View (Left): Shows the overall dimensions of the unit. Total width is 600 mm, total height is 1220 mm, and total depth is 556,51 mm. The main chamber width is 800 mm and height is 800 mm. There are two trays, each 460 mm wide and 600 mm long. The distance between trays is 425 mm. The top panel is 70 mm high. There are two doors on the front, each 125 mm wide. The bottom panel is 182,58 mm high. There are two small circular features on the top panel, each with a diameter of 110 mm. Side View (Right): Shows the side profile of the unit. Total height is 1690 mm. The main chamber height is 700 mm. The distance between trays is 610 mm. The bottom panel is 500 mm high. The bottom panel has a width of 370 mm and a depth of 490 mm. There are two small circular features on the side panel, each with a diameter of 10 mm. Tray View (Bottom): Shows the dimensions of the trays. The tray is 570 mm long and 380 mm wide. The tray has rounded corners with a radius of R 80 mm. The tray has a thickness of 80 mm and rounded ends with a radius of R 40 mm. </p>		
*(Martínez y Prada (2008), pp. 137-140)		

ANEXO XII

CRITERIOS DE DISEÑO PARA EL SEPARADOR DE RCHG POR DIFERENCIA DE DENSIDADES

Antecedentes teóricos

- El mecanismo a través del cual se realiza la separación por diferencia de densidades de las partículas de membranas intersticiales y las partículas de cáscara de huevo, corresponde al modelo de “sedimentación discreta”. Las partículas mantienen su individualidad, no existe coalescencia entre ellas y sus propiedades físicas como tamaño, forma y peso específico no cambian durante el proceso (Ramalho, 2009, p. 93).
- El fundamento para la sedimentación de partículas discretas es la ley de Newton, con base a la cual las fuerzas que provocan la sedimentación de una partícula se equilibran con las resistencias o fuerzas de fricción ofrecidas por el líquido. Cuando este equilibrio se alcanza la partícula alcanza una velocidad de sedimentación constante, descrita por la Ecuación AXII.1 (Geankoplis, 1998, pp. 900-902).

$$v_s = \left[\frac{4(\rho_p - \rho_l)gD_p}{3C_D\rho_l} \right]^{1/2} \quad [AXII.1]$$

Donde

v_s	Velocidad de sedimentación de partícula (m/s)
ρ_p	Densidad de la partícula (kg/m ³)
ρ_l	Densidad del líquido o medio de sedimentación (kg/m ³)
g	Gravedad (m/s ²)
D_p	Diámetro de la partícula (m)
C_D	Coefficiente de fricción

- Para partículas esféricas el coeficiente de fricción C_D está relacionado con el número de Re y toma un valor constante e igual a 0,44, para la región turbulenta o zona de Newton, en la que el Re alcanza valores mayores de 500.

Las correlaciones para las regiones laminar y de transición se muestran en la Figura AXII.1 (Ramalho, 2009, p. 95).

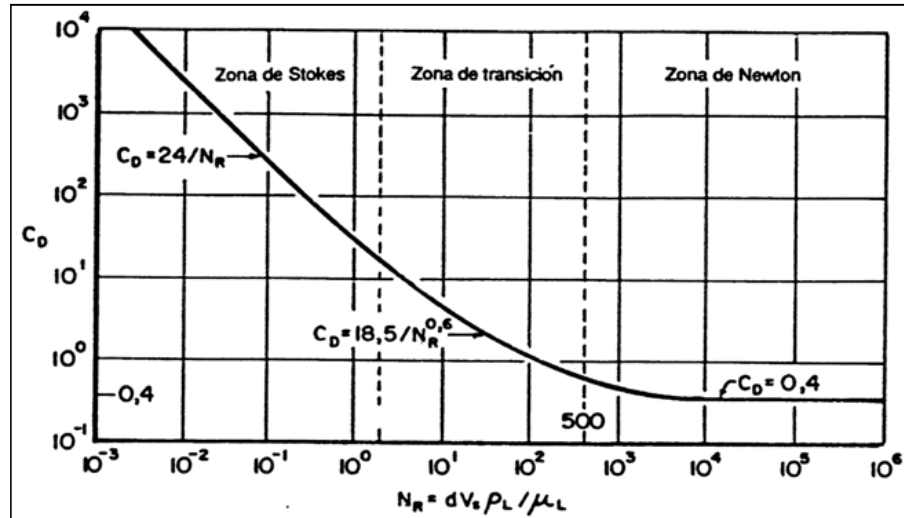


Figura AXII.1. Correlaciones entre el C_D para partículas esféricas y el Re (Ramalho, 2009, p. 95)

- El diseño de un sedimentador es tal, que permite remover el tamaño de partícula mínimo esperado. La velocidad de sedimentación del diámetro de partícula más pequeño, corresponde a la “velocidad de sedimentación crítica (V_{sc})” (Pérez, 1981, p. 100).
- Todas las partículas con velocidad de sedimentación igual o mayor a la V_{sc} son 100 % removidas ya que sedimentan y llegan a la zona de lodos que para el presente estudio, corresponde al fondo del tanque donde quedan retenidas las partículas de cáscara sin membranas, mientras que para las partículas de velocidad de sedimentación menor a V_{sc} , su porcentaje de remoción se da acuerdo a la proporción establecida en la Ecuación AXII.2 (Pérez, 1981, p. 103).

$$\% \text{ remoción} = \frac{V_{si}}{V_{sc}} \quad [\text{AXII.2}]$$

Donde

V_{sc} Velocidad de sedimentación crítica (m/s)
 V_{si} Velocidad de sedimentación de partícula (m/s)

- El cálculo del área de sección horizontal del tanque de sedimentación se realiza a través de la Ecuación AXII.3 (Pérez, 1981, p. 103).

$$V_{sc} = \frac{Q}{A} \quad [AXII.3]$$

Donde

V_{sc}	Velocidad de sedimentación crítica (m/s)
Q	Caudal de diseño (m ³ /s)
A	Área horizontal del sedimentador (m ²)

- El periodo de retención, residencia o también denominado como tiempo de detención nominal, que constituye el tiempo que se demora la “partícula crítica” en llegar a la zona de lodos y por tanto sedimentarse, se calcula a través de la Ecuación AXII.4 (Pérez, 1981, p. 103).

$$td = \frac{V}{Q} \quad [AXII.4]$$

Donde

td	Tiempo de detención (s)
Q	Caudal de diseño (m ³ /s)
V	Volumen de la zona de sedimentación (m ³)

- La distancia máxima que alcanza a recorrer la “partícula crítica” en el td es decir la altura requerida en la zona de sedimentación se expresa a través de la Ecuación AXIII.5 (Pérez, 1981, p. 103).

$$V_{sc} = \frac{H}{td} \quad [AXIII.5]$$

Donde

V_{sc}	Velocidad de sedimentación crítica (m/s)
H	Altura de la zona de sedimentación (m)
td	Tiempo de detención (s)

- Un sistema de agitación de paletas provee al tanque de buen flujo radial y poco flujo axial. Provoca velocidades de agitación entre 20 a 200 rpm. La longitud del propulsor mide del 60,00 al 80,00 % del diámetro del tanque y la anchura de la paleta es de 1/6 a 1/10 de su longitud (Geankoplis, 1998, p. 162).

- Las proporciones geométricas para el sistema de agitación propuesto para el tanque sedimentador de RCHG se basa en los criterios de Geankoplis (1998) y se presentan en la Figura AXII.2 (p. 165).

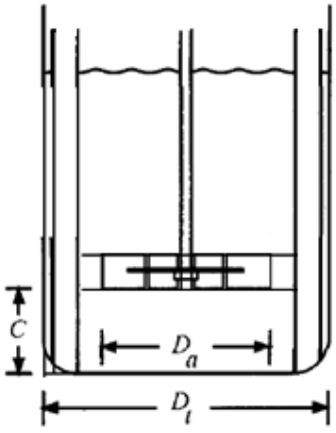
	Relación geométrica	Magnitud
	$\frac{D_a}{D_t}$	0,8
	$\frac{W}{D_a}$	$\frac{1}{6}$
	$\frac{C}{D_t}$	$\frac{1}{3}$
W: ancho de las aspa	C: altura del agitador sobre el fondo	

Figura AXII.2. Proporciones geométricas para el sistema de agitación
(Geankoplis, 1998, pp. 162, 165)

- El flujo en el tanque es laminar cuando el Re_a es menor a 10 y turbulento cuando es mayor a 10 000 (Geankoplis, 1998, p. 164).
- La potencia necesaria para mover el agitador se estima a través de correlaciones empíricas con el número de Reynolds del agitador (Re_a), dado por la Ecuación AXII.6.

$$Re_a = \frac{D_a^2 n \rho_l}{\mu} \quad [AXII.6]$$

Donde

Re_a	Número de Reynolds del agitador
D_a	Diámetro del agitador (m)
n	Velocidad de rotación (rps)
ρ_l	Densidad del fluido (kg/m^3)
μ	Viscosidad del fluido (kg/ms)

- La Figura AXII.3, constituye un tipo de gráfica a través del cual se hace posible la estimación de la potencia requerida para mover el agitador. En la Ecuación AXII.7 se muestra el cálculo de la potencia a través del número de potencia N_p (Geankoplis, 1998, p. 165).

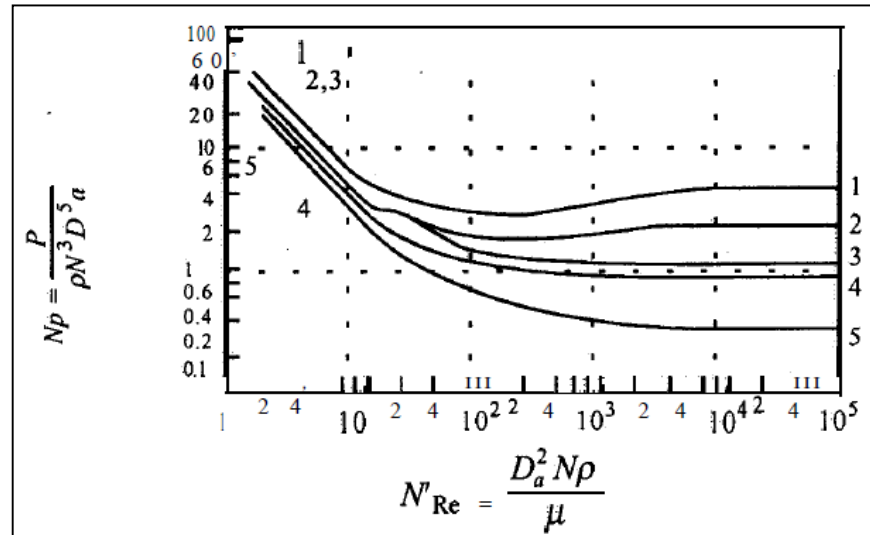


Figura AXII.3. Correlaciones empíricas de Re_a vs N_p para agitadores de uso común (Geankoplis, 1998, p. 165)

$$N_p = \frac{P}{\rho_1 n D a^5} \quad [AXII.7]$$

Donde

N_p	Número de agitación
P	Potencia del agitador (J/s)
n	Velocidad de rotación (rps)
ρ_1	Densidad del fluido (kg/m^3)
Da	Diámetro del agitador (kg/ms)

Consideraciones asumidas

- Las propiedades físicas del fluido con RCHG como son la densidad y la viscosidad son las del agua a 18 °C.

- La concentración de las partículas de residuos de cáscara de huevo de gallina (C_{RCHG}) a la entrada de la zona de sedimentación es homogénea. La composición de las corrientes que ingresan y salen del separador por sedimentación se basan en datos experimentales y se detallan en la Figura AXII. 4. El contenido de albúmina que ingresa con los RCHG se considera que sale y se desecha con las partículas de cáscara.

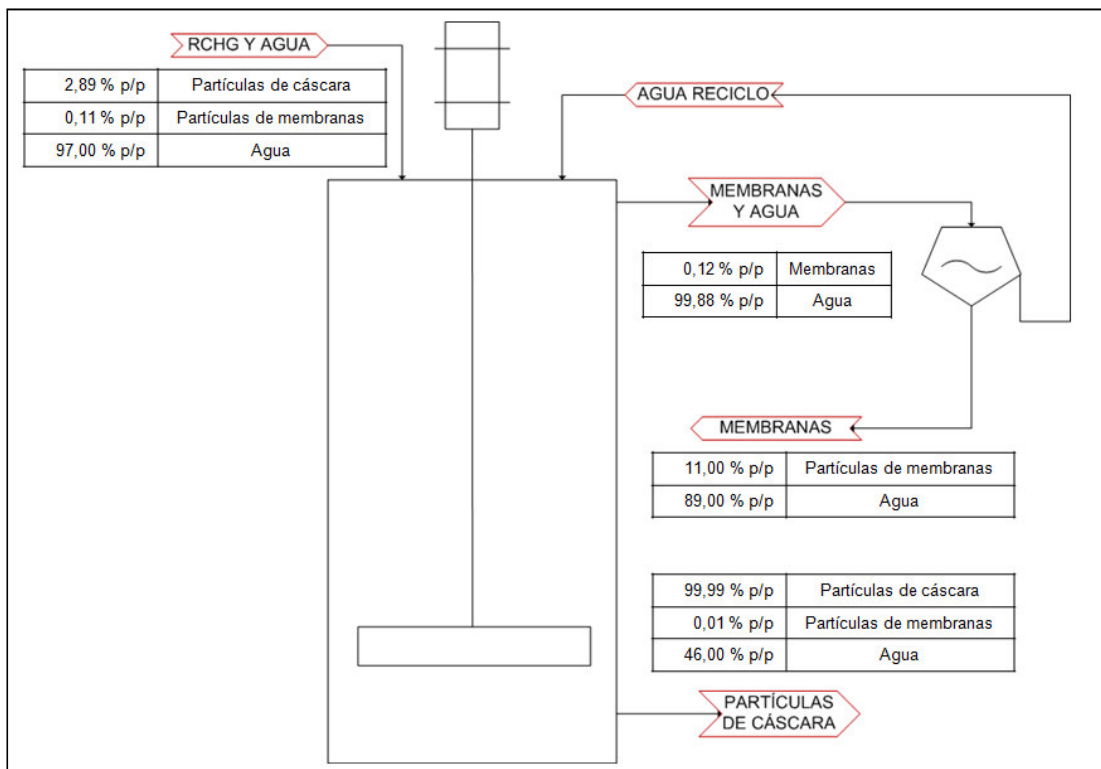


Figura AXII. 4. Composición de las corrientes para el tanque de separación de RCHG

- Las partículas de residuos de cáscara de huevo son esféricas con diámetros homogéneos y densidad uniforme.
- El proceso de trituración da lugar exclusivamente a fragmentos de tamaño de partícula de 0,5 mm, que corresponde al diámetro de partícula mínimo esperado. El diámetro de partícula es el mismo tanto para los fragmentos de membranas intersticiales como para los fragmentos de cáscara sin membranas.

- La sedimentación de las partículas de residuos de cáscara de huevo de gallina ocurre en régimen turbulento, puesto que existen fuerzas provocadas por el agitador de dos paletas
- La zona de entrada corresponde el 5,00 % del volumen de la zona de sedimentación, mientras que el volumen de la zona de lodos corresponde al 15,00 % del volumen de la zona de sedimentación de manera que exista un espacio en el que se retengan los lodos o fragmentos de cáscara de huevo sin membrana para luego ser recolectados por un tornillo sin fin.
- El tanque donde ocurre el proceso de sedimentación de las partículas de cáscara sin membrana es del tipo cilíndrico con fondo plano.
- El tanque esta inicialmente lleno de agua hasta un 95,00 % de su volumen, es decir hasta una altura de 0,67 m.
- El agitador que se selecciona para el diseño del equipo de separación de RCHG y que permite a las partículas de membranas intersticiales permanecer flotando sin sedimentarse es del tipo de paletas, conformado por 2 aspas planas.
- El flujo en el interior del tanque debido a la agitación provocada se encuentra en régimen turbulento.
- Las pérdidas de masa durante el proceso de separación por diferencia de densidades son mínimas y por tanto se desprecian.
- El tamiz que retiene las partículas de membranas intersticiales tiene un tamaño de poro de 0,425 mm que corresponde a la malla ASTM No. 40, con lo que se asegura la retención del tamaño de partícula mínimo esperado.

Valores obtenidos para el diseño del tanque de sedimentación de residuos de cáscara de huevo de gallina

La magnitud de los parámetros necesarios para el diseño del tanque de sedimentación al igual que los valores obtenidos, se muestra en la Tabla AXII.1.

Tabla AXII.1. Valores de los parámetros para el diseño del tanque de sedimentación de RCHG

TANQUE DE SEDIMENTACIÓN			AGITADOR		
Parámetro	Unidades	Magnitud	Parámetro	Unidades	Magnitud
C_{RCHG}	% p/p	3,00	Da	m	0,28
V_{sc} Para partículas de cáscara sin membranas	m/s	0,09	W	m	0,05
V_{si} Para partículas de membranas intersticiales	m/s	12×10^5	C	m	0,12
% remoción	% p/p	0,13	n	rpm	115,00
Q	L/min	150	P	J/s	27
A	m ²	0,10	PROPIEDADES FÍSICAS (a 18 °C)		
Dt	m	0,35	ρ_l Densidad del fluido con RCHG	kg/m ³	999,09
td	s	6	ρ_{PC} Densidad de las partículas de cáscara	kg/m ³	2740
V	L	15	ρ_{PM} Densidad de las partículas de membranas	kg/m ³	999,1
H	m	0,58	Dp	mm	0,5
Ht	m	0,71	μ	Kg/ms	$1,005 \times 10^{-3}$

ANEXO XIII

BALANCE DE ENERGÍA EN EL REACTOR DE HIDRÓLISIS ALCALINA

Características del proceso de hidrólisis alcalina y del tanque de reacción

- La reacción de hidrólisis alcalina de proteínas de membranas intersticiales de residuos de cáscara de huevo de gallina (RCHG), es un proceso endotérmico y batch que requiere de 3,5 h para una proporción 20:1 (g membranas intersticiales: L solución de NaOH al 5,00 % p/p), de acuerdo a los datos obtenidos durante el desarrollo experimental en el laboratorio.
- Bajo el criterio de conservación de la proporción 20:1 para el procesamiento de 3 kg de membranas intersticiales presentes en 100 kg de residuos de cáscara de huevo de gallina (flujo de diseño de la planta piloto), se requiere alrededor de 150 L de solución de hidróxido de sodio al 5,00 % p/p.
- De acuerdo a los procesos estipulados para una planta piloto de recuperación de RCHG, las membranas intersticiales se alimentan inmediatamente después del proceso de separación por diferencia de densidades por tanto tienen un contenido alto de humedad, tal como lo muestra la composición de la Figura AXII. 4, en base a esta condición el volumen requerido para albergar tanto membranas húmedas como solución de hidróxido de sodio en un reactor con un sobredimensionamiento del 20,00 % es de alrededor de 189 L (50 gal).
- El reactor de hidrólisis se seleccionó de un catálogo, es del tipo encaquetado y su sistema de agitación consiste en un rodete tipo turbina con 4 aspas curvas. Mayor detalle de sus características se muestra en la hoja de especificaciones técnicas No. 4 del Anexo XI.
- Las membranas intersticiales que ingresan al reactor de hidrólisis tienen una composición en base seca de 95,00 % de proteínas y 5,00 % de material no proteico (Fernández y Arias, 2010, p. 3), de manera que en la corriente de membranas intersticiales que van hacia el reactor de hidrólisis existen 2,846 kg de proteína y alrededor de 150 g de materia no proteico.

Ecuación del balance de energía en la chaqueta de calentamiento

El balance de energía en la chaqueta de calentamiento del reactor de hidrólisis a estado estacionario se describe con la Ecuación AXIII.1.

$$\left[\begin{array}{l} \text{Energía que} \\ \text{entra a la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Energía que} \\ \text{sale de la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Energía que} \\ \text{se genera en} \\ \text{la chaqueta} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Energía que} \\ \text{se consume en} \\ \text{la chaqueta} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Energía que} \\ \text{se acumula en} \\ \text{la chaqueta} \end{array} \right] \quad [\text{AXIII.1}]$$

La generación y consumo de energía en la chaqueta es igual a cero al igual que el término de acumulación puesto que el análisis se hace en estado estacionario, por tanto la anterior expresión se simplifica en la Ecuación AXIII.2.

$$\left[\begin{array}{l} \text{Energía que} \\ \text{entra a la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Energía que} \\ \text{sale de la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] = 0 \quad [\text{AXIII.2}]$$

La energía que ingresa a la chaqueta de calentamiento viene dada por el flujo de agua caliente que la atraviesa, mientras que las salidas de energía se deben al flujo de agua que sale de chaqueta y a la cantidad de calor que la chaqueta otorga al reactor para el proceso de hidrólisis, situación que se describe a través de la Ecuación AXIII.3.

$$F_{AC} \rho_{AC} C_{pAC} (T_{EAC} - T_{SAC}) - U A_{CH} (T_R - T_{SAC}) = 0 \quad [\text{AXIII.3}]$$

Donde

F_{AC}	Flujo de agua de calentamiento (m ³ /s)
ρ_{AC}	Densidad del agua de calentamiento (kg/m ³)
C_{pAC}	Capacidad calórica del agua de calentamiento (J/kg °C)
T_{EAC}	Temperatura de entrada a la chaqueta del agua de calentamiento (°C)
T_{SAC}	Temperatura de salida de la chaqueta del agua de calentamiento (°C)
U	Coefficiente global de transferencia de calor (W/m ² °C)
A_{CH}	Área de transferencia de calor de la chaqueta (m ²)
T_R	Temperatura de reacción (°C)

Las correlaciones para el coeficiente de transferencia de calor entre líquidos agitados en el interior de un recipiente y las paredes de la chaqueta de

calentamiento presenta la forma que se muestra en la Ecuación AXIII.4 (Geankoplis, 1998, p. 337).

$$\frac{hiDt}{k_{FR}} = 0,54 \left(\frac{Da^2 n \rho_{FR}}{\mu_{FR}} \right)^{2/3} \left(\frac{Cp_{FR} \mu_{FR}}{k_{FR}} \right)^{1/3} \left(\frac{\mu_{FR}}{\mu_{AC}} \right)^{0,14} \quad [AXIII.4]$$

Donde

hi	Coefficiente de transferencia de calor del liquido agitado a la pared interior (W/m ² °C)
Dt	Diámetro interior del tanque (m)
k_{FR}	Conductividad térmica en (W/m °C)
Da	Diámetro del agitador (m)
n	Velocidad de rotación del agitador (rps)
ρ_{FR}	Densidad del fluido en el reactor (kg/m ³)
μ_{FR}	Viscosidad del fluido en el reactor (kg/m s)
Cp_{FR}	Capacidad calórica del fluido en el reactor (J/kg °C)
μ_{AC}	Viscosidad del fluido a la temperatura de pared (agua de calentamiento) (kg/m s)

El coeficiente global de transferencia de calor U se calcula a través de la expresión AXIII.5 (Incropera, 1999, p. 585).

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{hi} + \frac{1}{he} \quad [AXIII.5]$$

Para el presente caso se considera que el coeficiente de transferencia de calor externo es demasiado alto, de manera que su efecto sobre el coeficiente global es despreciable.

La estimación de la temperatura alcanzada por el agua de calentamiento a la salida de la chaqueta, se obtiene con el uso de las ecuaciones anteriormente planteadas, de igual manera se puede determinar la cantidad de energía que aporta el sistema de calentamiento.

Ecuación del balance de energía en el reactor de hidrólisis alcalina

Para la determinación de la cantidad de energía requerida por el reactor, se realiza el respectivo balance de energía en estado estacionario, el mismo que se expresa a través de la Ecuación AXIII.6.

$$\left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{entra al} \\ \text{reactor} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{sale del} \\ \text{reactor} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se genera en} \\ \text{el reactor} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se consume en} \\ \text{el reactor} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se acumula en} \\ \text{el reactor} \end{array} \right] \quad [\text{AXIII.6}]$$

El proceso de reacción de hidrólisis es batch por tanto no existen aportes de energía debidos a flujos de entrada o de salida, no se genera calor pero si se consume, de esta manera la cantidad de energía que suministra la chaqueta para mantener al fluido en el reactor a 45 °C es igual a la cantidad de energía que requiere la reacción endotérmica, situación que se muestra en la Ecuación AXIII.7

$$UA_{CH}(T_R - T_{SAC}) = -H_{RX}kC_A C_B V \quad [\text{AXIII.7}]$$

Donde

H_{RX}	Entalpía de reacción de hidrólisis alcalina de proteínas (J/kgmol)
k	Constante de velocidad de reacción ($m^3/kgmol \ s$)
C_A	Concentración del reactivo A (proteínas) ($kgmol/m^3$)
C_B	Concentración del reactivo B (NaOH) ($kgmol/m^3$)
V	Volumen del fluido reactante (m^3)

Las consideraciones tomadas en cuenta para facilitar la estimación teórica de la cantidad de energía requerida por el reactor se desglosan a continuación:

- El fluido en el reactor se encuentra perfectamente agitado, por tanto la temperatura es homogénea en toda su masa e igual a 45 °C, por lo que para el fluido de reacción se asumen las propiedades del agua a esta temperatura.

- El agua de calentamiento ingresa a la chaqueta a 50 °C por lo que se usan las propiedades del agua a esta temperatura para la estimación del coeficiente de transferencia de calor.
- La temperatura de pared es la misma que la temperatura de entrada del agua de calentamiento.

Determinación de los parámetros

La Tabla AXIII.1, muestra los valores de los parámetros para la estimación de la energía requerida para el proceso de reacción de hidrólisis alcalina

Tabla AXIII.1. Valores obtenidos para la estimación calórica de la reacción de hidrólisis

Parámetro	Unidades	Magnitud	Parámetro	Unidades	Magnitud
F_{AC}	m ³ /s	11,61x10 ⁻⁴	Dt	m	0,61
ρ_{AC}	kg/m ³	987,74	k_{FR}	W/m °C	0,64
Cp_{AC}	J/kg °C	4175,26	Da	m	0,28
T_{EAC}	°C	50,00	n	rps	4,65
T_{SAC}	°C	37,02	ρ_{FR}	kg/m ³	989,64
U	kW/m ² °C	6,40	μ_{FR}	kg/m s	6,05x10 ⁻⁴
A_{CH}	m ²	1,22	Cp_{FR}	J/kg °C	4174,00
T_R	°C	45,00	μ_{AC}	kg/m s	5,55x10 ⁻⁴

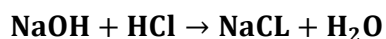
ANEXO XIV

REACTORES DE ACONDICIONAMIENTO DE PH PARA EL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE MEMBRANAS INTERSTICIALES

A. Reactor para la precipitación de proteína solubilizada e hidrolizada

Características del proceso y consideraciones

- El pH de precipitación de las proteínas de membranas intersticiales de cáscara de huevo es de 5,6, de acuerdo con los datos obtenidos en laboratorio y que se muestran a través de la curva de valoración del Anexo X. A través de este proceso experimental se define que el volumen de solución ácida requerida para la precipitación cumple con la proporción 8:3 (L sol de HCl 0,5 N: L hidrolizado de proteínas de membranas).
- Bajo el criterio de conservación de la proporción 8:3 para la etapa de precipitación de los 2,996 kg de proteína que se encuentran solubilizados en aproximadamente 150 L de hidrolizado (flujo de diseño de la planta piloto), se requiere alrededor de 400 L de solución de ácido clorhídrico 0,5 N. Con base en un factor de seguridad de 1,2 y a las necesidades anteriormente expuestas, el volumen necesario para este proceso corresponde al de un reactor de aproximadamente 700 L, (185 galones).
- El reactor para la precipitación de proteínas por acondicionamiento de pH se seleccionó de un catálogo, es del tipo enchaquetado y su sistema de agitación consiste en un rodete tipo turbina con 4 aspas curvas. Mayor detalle de sus características se muestra en la hoja de especificaciones técnicas No. 5 del Anexo XI.
- El proceso de acondicionamiento del pH es semi-batch y exotérmico y en éste se da la generación de sal (hidróxido de sodio) y agua de acuerdo a la reacción que se indica con la Ecuación AXIV.1. Las cantidades generadas por la reacción se indican en la Tabla AXIV.1.



[AXIV.1]

Tabla AXIV.1. Cantidad de productos generados debido a la reacción de neutralización

Productos	kg
NaCl	11,66
H ₂ O	3,59

- La solución de HCl 0,5 N ingresa al reactor a una temperatura de 18 °C y la reacción se da a 25 °C, temperatura que se mantiene constante y es homogénea en toda la masa de reacción. El incremento de temperatura a valores superiores de 25 °C se evita gracias a la chaqueta con agua de enfriamiento, la misma que ingresa a temperatura ambiente e igual a 18 °C.
- La entalpía de reacción a 25 °C se obtuvo a partir de los calores de formación de los productos menos los calores de formación de los reactivos (Liley et al., 2001, pp. 194-196).

Ecuaciones para el balance de energía

Para la determinación de la cantidad de calor que se genera en el reactor y que requiere ser retirada para mantener una temperatura baja e igual a 25 °C, para el proceso de reacción, se realizó el respectivo balance de energía en estado estacionario, el mismo que se expresa a través de la Ecuación AXIV.2.

$$\left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{entra al} \\ \text{reactor} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{sale del} \\ \text{reactor} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se genera en} \\ \text{el reactor} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se consume en} \\ \text{el reactor} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se acumula en} \\ \text{el reactor} \end{array} \right] \quad [\text{AXIV.2}]$$

El proceso de precipitación por acondicionamiento de pH es semi-batch puesto que existe una corriente de entrada pero ninguna de salida. Por tanto existe un aporte de energía debido al flujo de solución de HCl que se alimenta.

Las salidas de energía se deben al calor generado por la reacción exotérmica, y a la retirada por la chaqueta de enfriamiento, situación que se muestra en la Ecuación AXIV.3.

$$F_{SA}\rho_{SA}Cp_{SA}Te_{SA} - H_{RX}kC_A C_B V - UA_{CH}(T_{SAE} - T_R) = 0 \quad [AXIV.3]$$

Donde

F_{SA}	Flujo de la solución ácida de HCl 0,5 N (m ³ /s)
ρ_{SA}	Densidad de la solución ácida (kg/m ³)
Cp_{SA}	Capacidad calórica de la solución ácida (J/kg°C)
Te_{SA}	Temperatura de alimentación de la solución ácida (°C)
H_{RX}	Entalpía de reacción para la neutralización (J/kgmol)
k	Constante de velocidad de reacción (m ³ /kgmol s)
C_A	Concentración del reactivo A (NaOH) (kgmol/m ³)
C_B	Concentración del reactivo B (HCl) (kgmol/m ³)
V	Volumen del fluido reactante (m ³)
T_{SAE}	Temperatura de salida de la chaqueta del agua de enfriamiento (°C)
U	Coficiente global de transferencia de calor (W/m ² °C)
A_{CH}	Área de transferencia de calor de la chaqueta (m ²)
T_R	Temperatura de reacción (°C)

El balance de energía en la chaqueta de enfriamiento para el reactor a estado estacionario se describe con la Ecuación AXIV.4.

$$\left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{entra a la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{sale de la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se genera en} \\ \text{la chaqueta} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se consume en} \\ \text{la chaqueta} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{se acumula en} \\ \text{la chaqueta} \end{array} \right] \quad [AXIV.4]$$

La generación y consumo de energía en la chaqueta es igual a cero al igual que el término de acumulación puesto que el análisis se hace en estado estacionario, por tanto la anterior expresión se simplifica en la Ecuación AXIV.5.

$$\left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{entra a la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Energía que} \\ \text{sale de la} \\ \text{chaqueta} \end{array} \right] = 0 \quad [AXIV.5]$$

La energía que ingresa a la chaqueta de enfriamiento viene dada por el flujo de agua fría que la atraviesa y por la cantidad de energía que retira la chaqueta debido al proceso de reacción exotérmico, mientras que la salida de energía solo se deben al flujo de agua que sale de chaqueta, situación que se describe a través de la Ecuación AXIV.6.

$$F_{AE}\rho_{AE}C_{pAE}(T_{SAE} - T_{EAE}) + UA_{CH}(T_{SAE} - T_R) = 0 \quad [AXIV.6]$$

Donde

F_{AE}	Flujo de agua de enfriamiento (m ³ /s)
ρ_{AE}	Densidad del agua de enfriamiento (kg/m ³)
C_{pAE}	Capacidad calórica del agua de enfriamiento (J/kg °C)
T_{EAE}	Temperatura de entrada a la chaqueta del agua de enfriamiento (°C)

La estimación de la temperatura alcanzada por el agua de enfriamiento a la salida de la chaqueta, además del flujo de agua de enfriamiento requerido se obtiene con el uso de las ecuaciones anteriormente planteadas, de igual manera se puede determinar la cantidad de energía que retira el sistema de enfriamiento.

Determinación de los parámetros

La Tabla AXIV. 2, muestra los valores de los parámetros para la estimación de la energía requerida para el proceso de precipitación de proteínas por acondicionamiento de pH.

Tabla AXIV. 2. Valores utilizados y obtenidos para la estimación calórica de la reacción de precipitación de proteínas

Parámetro	Unidades	Magnitud	Parámetro	Unidades	Magnitud
F_{SA}	m ³ /s	2,23x10 ⁻⁴	T_R	°C	25,00
ρ_{SA}	kg/m ³	1008,20	H_{RX}	kJ/gmol	57,28
C_{pSA}	J/kgmol °C	73684,00	F_{AE}	m ³ /s	19,93x10 ⁻⁴
T_{ESA}	°C	18,00	ρ_{AE}	kg/m ³	998,77
T_{SAE}	°C	33,18	C_{pAE}	J/kg °C	4184,85
U	kW/m ² °C	4,4	T_{EAE}	°C	18,00
A_{CH}	m ²	3,51			

B. Reactor para la neutralización de la proteína precipitada

Características del proceso y consideraciones

- Al proceso de neutralización llega un volumen aproximado de 10 L que contiene el precipitado de proteínas de membranas intersticiales en solución ácida. La reacción debe neutralizar 35,43 g de ácido clorhídrico y se lo realiza con solución diluida de hidróxido de sodio de concentración 0,1 N. Se calculó un consumo de alrededor de 9,7 L de solución básica diluida para la reacción de neutralización. Con base en los volúmenes anteriormente planteados, se establece el requerimiento de un reactor de volumen de 25 L (7 gal) para un factor de seguridad de 1,2.
- El reactor para la neutralización del precipitado de proteínas de membranas intersticiales por acondicionamiento de pH se seleccionó de un catálogo, es del tipo encaquetado y su sistema de agitación consiste en un rodete tipo turbina con 2 aspas curvas. Mayor detalle de sus características se muestra en la hoja de especificaciones técnicas No. 6 del Anexo XI.
- El proceso de neutralización es semi-batch y exotérmico y en este se da la generación de sal (hidróxido de sodio) y agua de acuerdo a la reacción que se indica con la Ecuación AXIV.1. Las cantidades generadas por la reacción se indican en la Tabla AXIV.3.

Tabla AXIV.3. Cantidad de productos generados debido a la reacción de neutralización

Productos	g
NaCl	51,93
H ₂ O	17,47

- La solución de NaOH 0,1 N ingresa al reactor a una temperatura de 18 °C y la reacción se da a 25 °C, temperatura que se mantiene constante y es homogénea en toda la masa de reacción. El incremento de temperatura a

valores superiores de 25 °C se evita gracias a la chaqueta con agua de enfriamiento, la misma que ingresa a temperatura ambiente e igual a 18 °C.

- La entalpía de reacción a 25 °C se obtuvo a partir de los calores de formación de los productos menos los calores de formación de los reactivos (Liley et al., 2001, pp. 194-196).
- La determinación de la cantidad de calor que se genera en el reactor y que requiere ser retirada para mantener una temperatura igual a 25 °C y la estimación de la temperatura alcanzada por el agua de enfriamiento a la salida de la chaqueta, además del flujo de agua de enfriamiento requerido se obtuvo con el planteamiento del balance de energía en estado estacionario, de manera similar a lo elaborado en la sección A. El valor de los parámetros utilizados al igual que los obtenidos a través del desarrollo del balance de energía se muestran en la Tabla AXIV.4.

Tabla AXIV.4. Valores obtenidos para la estimación calórica de la reacción de neutralización

Parámetro	Unidades	Magnitud	Parámetro	Unidades	Magnitud
F_{SB}	m ³ /s	1,62x10 ⁻⁵	H_{RX}	kJ/gmol	57,28
ρ_{SB}	kg/m ³	998,77	F_{AE}	m ³ /s	2,31x10 ⁻⁴
Cp_{SB}	J/kgmol °C	4184,85	ρ_{AE}	kg/m ³	998,77
T_{ESB}	°C	18,00	Cp_{AE}	J/kg °C	4184,85
U	kW/m ² °C	4,4	T_{EAE}	°C	18,00
A_{CH}	m ²	0,34	T_{SAE}	°C	38,31
T_R	°C	25,00	El subíndice $_{SB}$ se refiere a parámetros de la solución básica (NaOH 0,1 N)		

ANEXO XV

ESTIMACIÓN DEL CAPITAL DE INVERSIÓN FIJA

Antecedentes teóricos:

- El capital de inversión es la cantidad de dinero requerida para la construcción de una nueva planta o la modificación de una existente y es producto de la suma del capital fijo de inversión y capital de trabajo, tal como la muestra la Ecuación AXV.1. El primero se refiere al costo asociado con la construcción de la planta con todos los componentes necesarios para su operación; el segundo involucra los costos requeridos para iniciar la operación de la planta (Jiménez, 2003, p. 8).

$$I = I_f + I_w \quad [AXV.1]$$

Donde:

- I** Inversión total del capital de inversión (USD)
- I_w** Inversión del capital de trabajo (USD)
- I_f** Inversión del capital fijo (USD)

- El capital fijo de inversión a su vez se subdivide en costo directo e indirecto tal como lo muestra la Ecuación AXV.2. El costo directo incluye todos los gastos que están relacionados con la instalación de la planta. El costo indirecto se refiere a gastos que no están directamente relacionados con la instalación de la planta (Jiménez, 2003, p. 9).

$$I_f = I_e + I_a \quad [AXV.2]$$

Donde:

- I_e** Inversión en costos directos (USD)
- I_a** Inversión en costos indirectos (USD)

- La estimación de la inversión total del capital se puede realizar a través de métodos clásicos como el “cálculo por factores”. Este método implica el sumar primero el costo base de los principales equipos del proceso y en seguida multiplicarlo por una serie de factores (Jiménez, 2003, p. 39).
- La Tabla AXV.1 indica los rangos utilizados para los factores que se usan en la estimación de la inversión total de capital, para el caso de una planta procesadora de sólidos y fluidos.

Tabla AXV.1. Rango de factores para convertir los costos del equipo a nivel de planta a inversión en capital fijo
(Holland y Wilkinson, 1999, p. 70)

	DETALLE DE COSTOS	NOMENCLATURA	RANGO DEL “FACTOR POR EXPERIENCIA”
INVERSIÓN DE CAPITAL FIJO (I_f)	COSTOS DIRECTOS	(I_e)	
	Costo del equipo a nivel de planta		1,00
	Instalación del equipo		0,39 – 0,43
	Instalación de tuberías		0,30 – 0,39
	Instrumentación y controles		0,13
	Instalación eléctrica		0,08 – 0,17
	Edificios y servicios		0,26 – 0,35
	Preparación del sitio		0,08 – 0,22
	Servicios auxiliares		0,48 – 0,55
	COSTOS INDIRECTOS	(I_a)	
	Ingeniería y supervisión		0,35 – 0,43
	Gastos de construcción		0,35 – 0,43
	Gastos legales		0,04
	Honorarios de contratistas		0,09 – 0,17
	Contingencias		0,39
INVERSIÓN DEL CAPITAL DE TRABAJO	(I_w)		0,75

- El método de estimación por “factores de experiencia”, se desprende del análisis de varios procesos existentes y solo requiere del conocimiento del diagrama de flujo que muestre los principales componentes de equipos y sus dimensiones (Jiménez, 2003, p.38).

Estimación del costo del sistema tanque de sedimentación-agitador

El costo del sistema de tanque de sedimentación-agitador que se diseñó para el requerimiento de separación por diferencia de densidades, de los residuos triturados de cáscara de huevo de gallina, se obtuvo a través de curvas de estimación de costos que se muestran en la Figura AXV.1 y la Figura AXV.2 (Peters, Timmerhaus y West, 2003, pp. 545, 557).

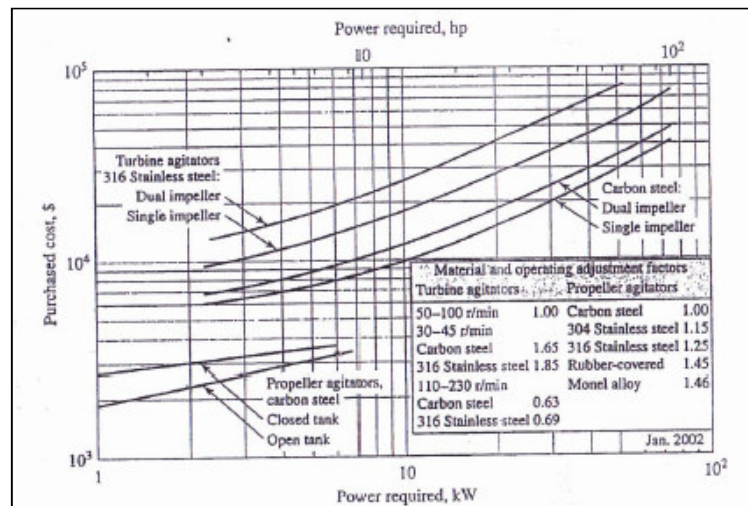


Figura AXV.1. Costo FOB para el 2002 de sistemas de agitación (Peters et al., 2003, p. 545)

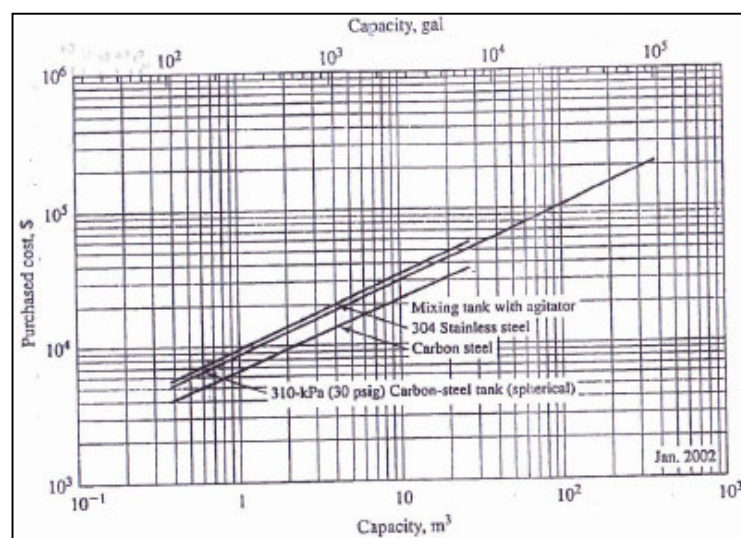


Figura AXV.2. Costo FOB para el 2002 de recipientes de almacenamiento y de mezcla (Peters et al., 2003, p. 557)

Con las curvas anteriormente expuestas y junto con la aplicación de la actualización del precio FOB, a través de la Ecuación AXV.3 (Peters et al., 2003, p. 236), se obtuvo el precio FOB del sistema “tanque de sedimentación - agitación”, este cálculo y los datos utilizados, se muestran en la Tabla AXV.2.

$$C_p = C_o \left(\frac{I_p}{I_o} \right) \quad [AXV.3]$$

Donde

- C_p Costo FOB al tiempo presente
- C_o Costo FOB original
- I_p Índice del año actual o tiempo presente
- I_o Índice del año en el que se obtuvo el costo original

Tabla AXV.2. Estimación del costo FOB del sistema de sedimentación para RCHG

Costo del sistema de agitación (2002)	1 185,17
Costos del sistema de agitación (2014)	1 697,47
Índice CEPCI ^[1] para el año 2002	395,60 ^[38]
Índice CEPCI para el año 2014	566,60 ^[38]
Costo del tanque de sedimentación (2002)	1 200,00
Costos del tanque de sedimentación (2014)	1 718,71
Costo del sistema “tanque de sedimentación-agitador” (2014)	3 416,17

^[1] Chemical Engineering Plant Cost Index

^[38] Chemical Engineering, 2014, p. 72

Estimación del precio del equipo a nivel de planta a partir del equipo a nivel de fábrica o FOB

La estimación del costo base de los equipos principales o precio del equipo a nivel de planta, se compone del precio FOB (Free on board) o precio del equipo en la fábrica, al que se le suma el costo del envío que comprende gastos de descarga, aduana, bodegaje, gravámenes de importación y transporte hacia la planta, lo que aproximadamente corresponde de un 40,00 % a un 60,00 % del precio FOB (Holland y Wilkinson, 1999, p.68).

Con la Tabla AXV.3, se presentan los datos proporcionados por diferentes empresas, a las que se solicitó cotizaciones de los equipos principales requeridos para el proceso en planta piloto.

Tabla AXV.3. Precios de los equipos principales obtenidos por cotizaciones

Empresa a través de la cual se obtuvo la cotización	País	Nombre/Modelo del equipo	Marca	Precio (USD)	Tipo de precio	Precio base calculado
MOBA-OVOBEL	EEUU	Centrifugadora para cáscaras/C430	COENRAADTS	23 342,80	CIF	23 342,80
INCOLOR	Ecuador	Molino de corte/SM 100	RETSCH	14 035,59	CIF	14 035,59
PFAUDLER EQUIPAMENTOS	Brasil	“Glasteel Reactor” de 10 gal/ RT 14-10	PFAUDLER	9 000,00	FOB	14 400,00
PFAUDLER EQUIPAMENTOS	Brasil	“Glasteel Reactor” de 50 gal/ RT 24-50	PFAUDLER	14 500,00	FOB	23 200,00
PFAUDLER EQUIPAMENTOS	Brasil	“Glasteel Reactor” de 200 gal/ RT 40-200	PFAUDLER	23 900,00	FOB	38 240,00
DOW BRASIL IND E COM PRODUTOS QUIMICO LTDA	Brasil	Membrana de Ultrafiltración/SFP 2860	DOW- OMEXELL	2 310,00	FOB	3 696,00
TRONY	Italia	Minicongeladora/ ITUP 130	IBERNA	214,36	CIF	214,36
TOPTION GROUP CO. LIMITED	China	Liofilizador/TPV-10F	TOPTION	6 767,00	FOB	10 827,20
		Tanque de sedimentación-agitador		3 416,17	FOB	5 465,87
INVERSIÓN EN EQUIPOS PRINCIPALES						133 421,82