



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ingeniería



Escuela de Ingeniería Química



ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEINA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE AMARANTO (*amaranthus dubius*).

Tutor (es): Dra. Susana Lobos

Presentado por : Br. Alejandro Urdaneta

Prof.^a Johliny Casanova

Br. José Zambrano

Ciudad Universitaria de Caracas, Noviembre 2010



CONTENIDO

- Fundamentos de la Investigación
 - ✓ Planteamiento del problema
 - ✓ Antecedentes
 - ✓ Objetivo (s)
 - General
 - Específicos
- Marco Teórico
 - ✓ El Cultivo de Amaranto
 - ✓ Las proteínas
 - ✓ Escalamiento
- Metodología
 - ✓ Preparación de la materia prima
 - ✓ Proceso de extracción de la proteína
 - ✓ Identificación y Cuantificación de grupos proteicos
- Análisis de Resultados
- Conclusiones
- Recomendaciones



Planteamiento del Problema







Antecedentes

**“Caracterización proteica de las semillas de once especies de Amaranto”
Juan y col, 2007**

“Valor nutritivo del Bledo (*amaranthus spp*) identificado en el municipio Morán, Estado Lara” Acevedo, 2006



Antecedentes

“Evaluación del proceso de extracción de proteínas totales del follaje de amaranto, empleando NaOH 0,2% (m/v) como solvente extrayente y harina de hojas de *Amaranthus dubius*” Bónoli, 2010.



Objetivo General

Establecer los parámetros básicos requeridos para el escalamiento del proceso de extracción de proteína total a partir de hojas de amaranto (*amaranthus dubius*)



Objetivos específicos

Realizar una revisión bibliográfica correspondiente a los procesos de extracción de proteína total de amaranto y métodos de escalamiento.

Evaluar los parámetros relacionados con la extracción de proteína total de la hoja de amaranto con experimentos de laboratorio (variables: tiempo de agitación, temperatura de extracción y número de lavados)

Analizar la influencia de los parámetros estudiados con relevancia del proceso de extracción de proteína total de amaranto

Proponer un escalamiento a nivel piloto de la fase de extracción de proteína total de amaranto usando los parámetros relevantes del proceso



Marco Teórico



El cultivo de amaranto

Alto contenido proteico (15-18%), en comparación con otros cereales similares mejorados genéticamente (10-13%)

Única proteína de origen vegetal que contiene todos los aminoácidos esenciales

Características y propiedades

Contiene dos veces más Lisina que la proteína del trigo y tres veces más que la proteína del maíz.

Contiene entre un 5 y 8% de grasas saludables. Se destaca la presencia de escualeno. Contiene un aceite de buena calidad y de bajo colesterol



El cultivo de amaranto



PRODUCTOS





Las proteínas



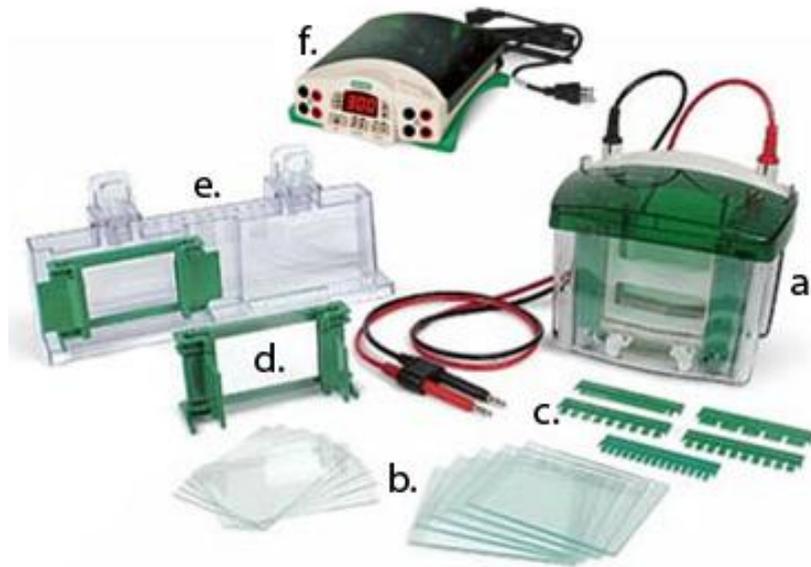


Las proteínas





Identificación de Grupos Proteicos



- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
- Espectrometría de masas
- Degradación de Edman
- Cromatografía Líquida



Cuantificación de proteínas

Método	Ventajas	Inconvenientes
<i>Métodos de Absorción</i>	No se pierden las muestras	Interfieren muchos compuestos que absorben en el UV
<i>Métodos Derivados Colorimétricos</i>		
Biuret	Bastante específico para proteínas Muestra pocas interferencias Es barato	Tiene poca sensibilidad
Lowry	Tiene bastante sensibilidad	No todas las proteínas reaccionan igual Muestra muchas interferencias como detergentes no iónicos, sulfato amónico etc.
Bradford	Muy sensible	Muestra interferencias con detergentes
BCA		Es el método más sensible Es el que muestra menos interferencias
<i>Métodos Derivados Fluorimétricos</i>		
<i>o</i> -ftalaldehido	Muy sensible	La interferencia de aminos contaminantes en la muestra No todas las muestras reaccionan igual



Cuantificación de grupos proteicos

Método de BCA

Basado en la formación de un complejo coordinado

Acido Bicinconínico

Ley de Lambert-Beer



Cambio de escala

Consideraciones
cambio
escala



eyes de
le

an de
E.T).



Escalamiento

Teoría de la Semejanza

Se ocupa únicamente de la forma de los sistemas fisicoquímicos

Nos permite relacionar un proceso a una escala de partida con la escala deseada

Semejanza geométrica, mecánica, térmica, de concentraciones, química



Semejanza Geométrica



$$W_1 = \frac{L}{D} = \frac{L'}{D'}$$

Semejanza Mecánica



$$Re = Re' = \left(\frac{\rho * V * L}{\mu} \right) = \left(\frac{\rho' * V' * L'}{\mu'} \right)$$

Semejanza Térmica



$$Br = Br' = \left(\frac{\rho * V * L}{k * \Delta T} \right) = \left(\frac{\rho' * V' * L'}{k' * \Delta T'} \right)$$

Semejanza en
Concentraciones

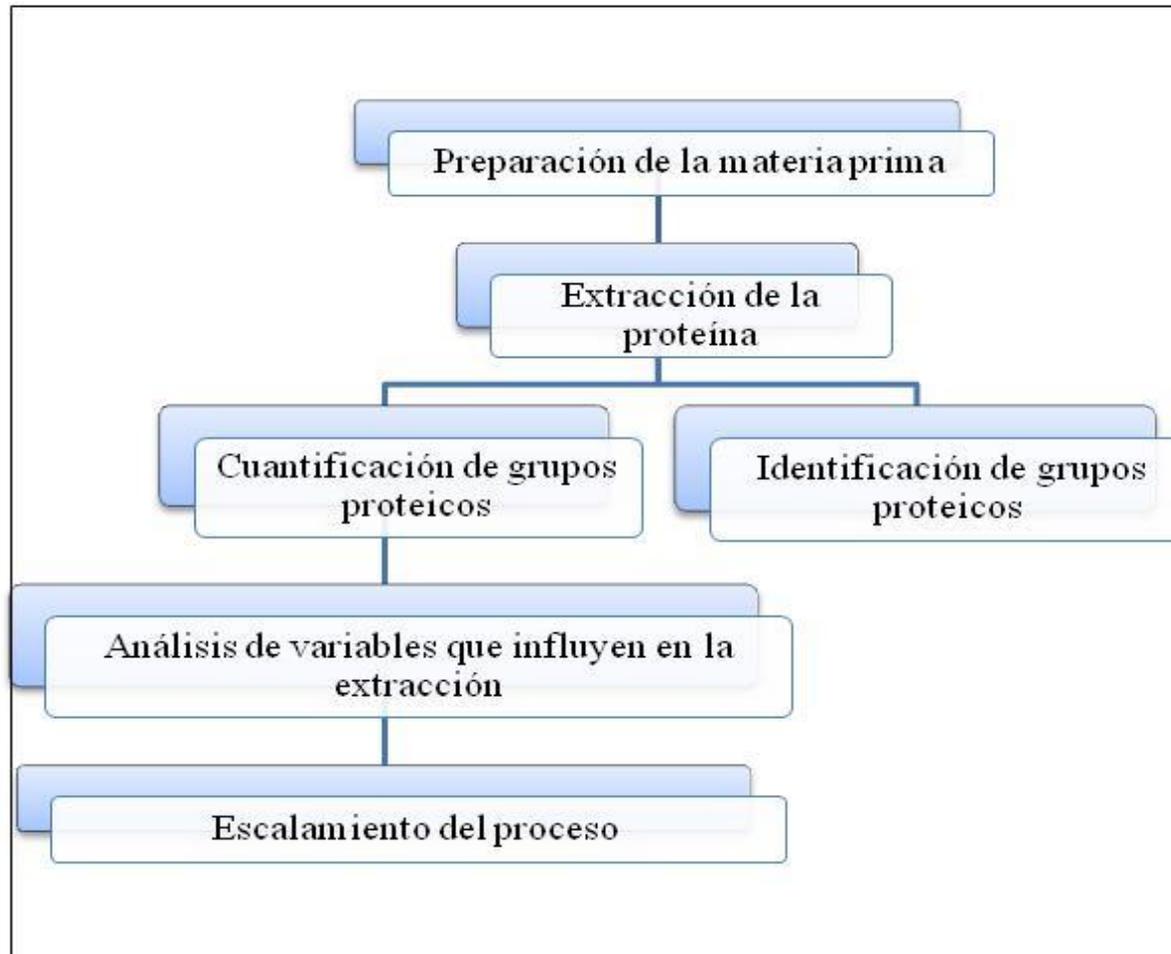
Semejanza Química



Marco Metodológico



Esquema general a seguir para el proceso de escalamiento





Preparación de la materia prima

Separación y
Limpieza



Secado



Molienda



Almacenamiento



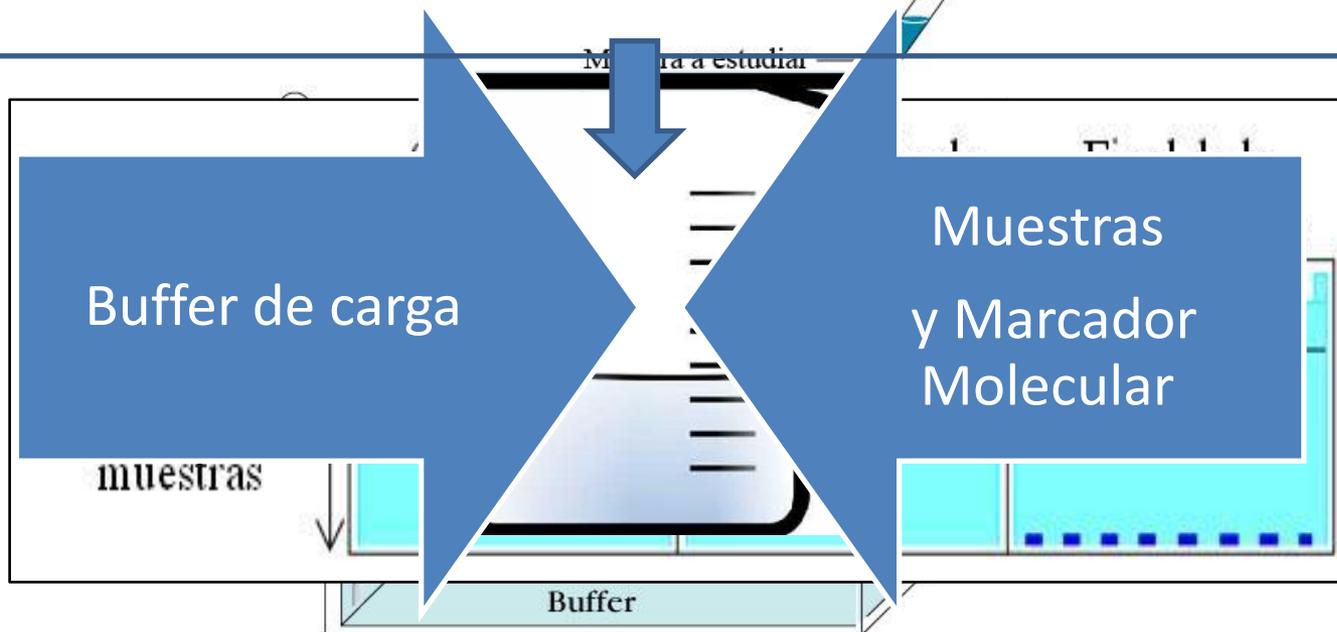
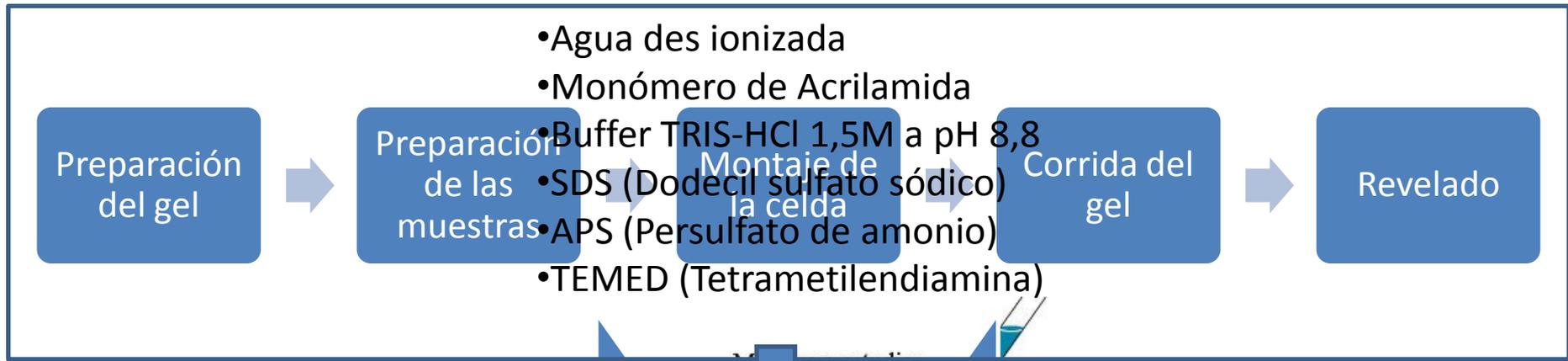


Extracción de la proteína

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
60	8,0
30	8,0
15	8,0
60	25,0
30	25,0
15	25,0
60	40,0
30	40,0
15	40,0

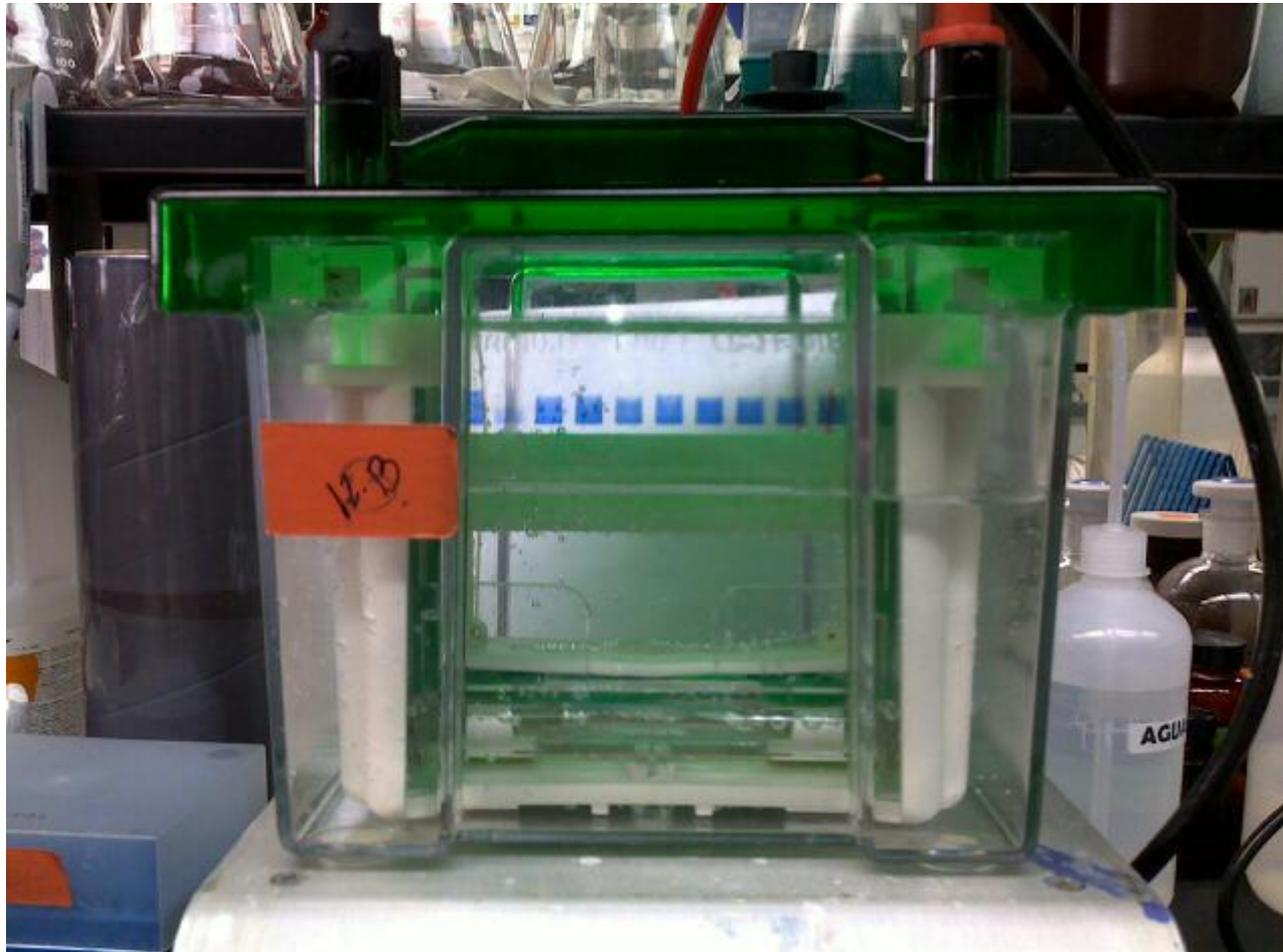


Electroforesis en gel de Acrilamida



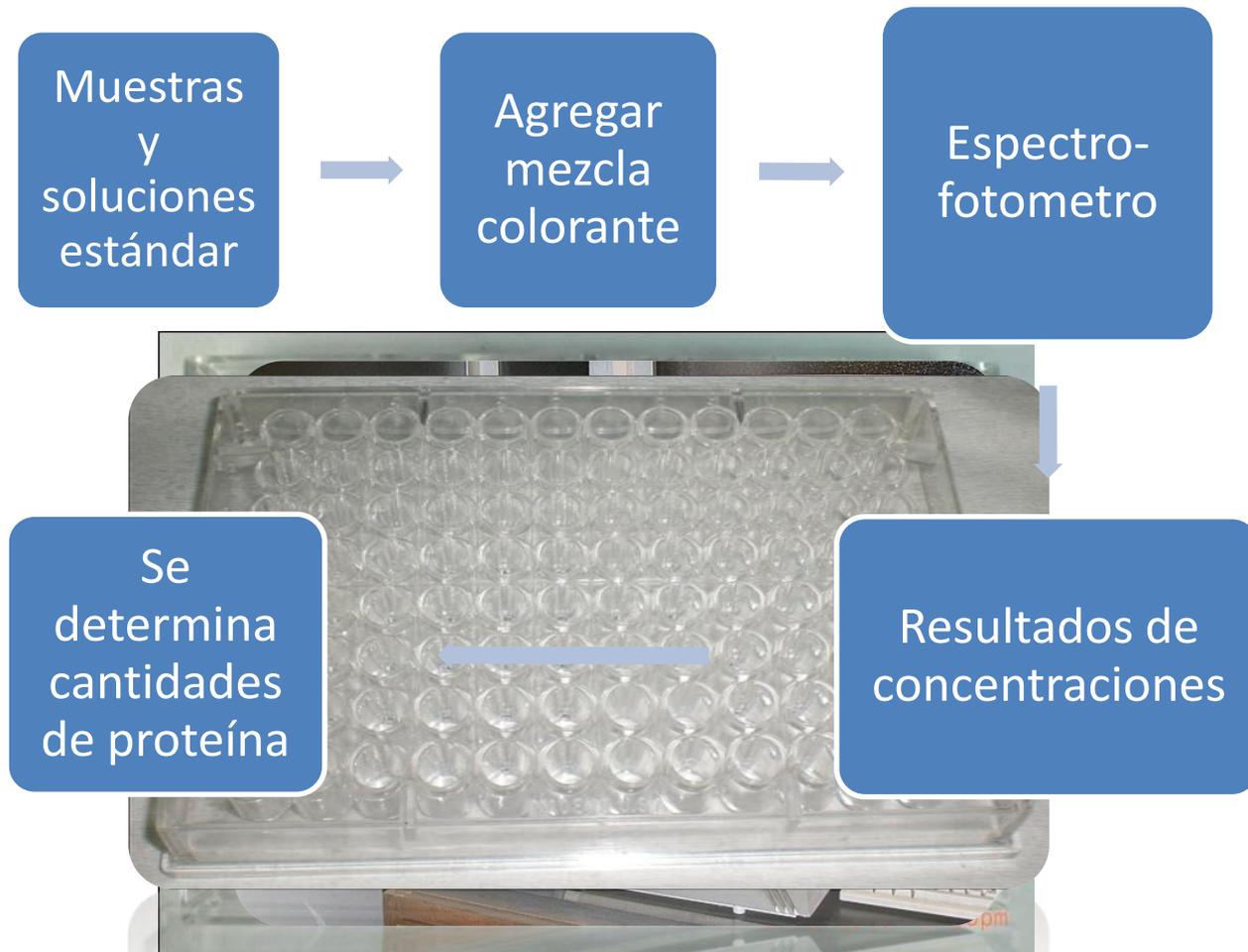


Electroforesis en gel de Acrilamida





Cuantificación de proteínas





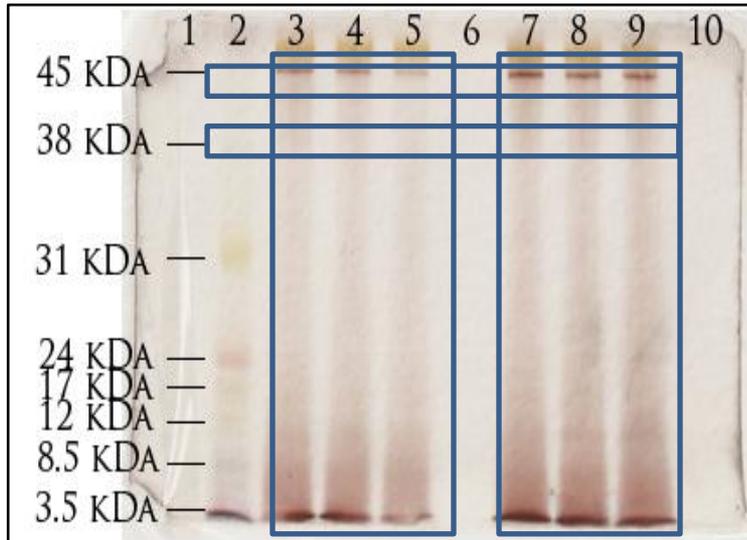
Análisis de Resultados





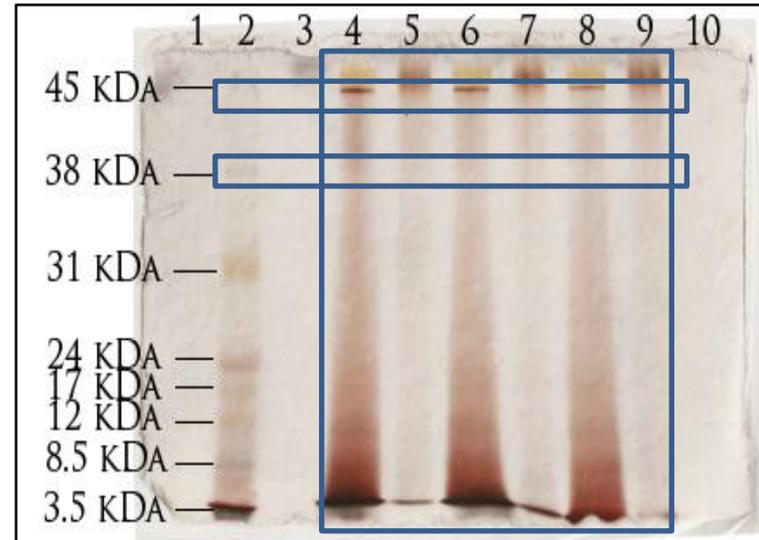
Electroforesis en Gel

A



1	Sólo Buffer Muestra
2	Marcador Molecular
3	8°C, 60 minutos, 1er Lavado
4	8°C, 30 minutos, 1er Lavado
5	8°C, 15 minutos, 1er Lavado
6	Sólo Buffer Muestra
7	25°C, 60 minutos, 1er Lavado
8	25°C, 30 minutos, 1er Lavado
9	25°C, 15 minutos, 1er Lavado
10	Sólo Buffer Muestra

B



1	Sólo Buffer Muestra
2	Marcador Molecular
3	Sólo Buffer Muestra
4	40°C, 60 minutos, 1er Lavado
5	40°C, 60 minutos, 3er Lavado
6	40°C, 30 minutos, 1er Lavado
7	40°C, 30 minutos, 3er Lavado
8	40°C, 15 minutos, 1er Lavado
9	40°C, 15 minutos, 3er Lavado
10	Sólo Buffer Muestra



Cuantificación (Método de BCA)

Temperatura (°C)	Concentración (µg/mL) ± 0,01	%
8	752,73	-2,17
25	769,45	-
40	871,79	13,30

Datos tomados a 60 minutos y primer lavado



Cuantificación (Método de BCA)

Tiempo (min)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) $\pm 0,01$	Diferencia en %
15	710,45	-5,57
30	752,38	---
60	752,73	0,04

Datos tomados a 8 grados y primer lavado



Cuantificación (Método de BCA)

Lavado	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) \pm 0,001	%
1	871,790	-
2	362,400	37,57
3	131,962	15,38



Cuantificación (Método de BCA)

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Proteína extraída (%)± 0,01
60	8,0	29,98
30	8,0	28,52
15	8,0	28,12
60	25,0	30,76
30	25,0	27,76
15	25,0	30,36
60	40,0	34,15
30	40,0	33,45
15	40,0	31,39



Escalamiento del proceso de Extracción



Análisis de Resultados

TK-101
Tanque agitador de
Hidróxido de Sodio

P-101 A/B
Bomba Centrífuga

E-101
Intercambiador de
calor

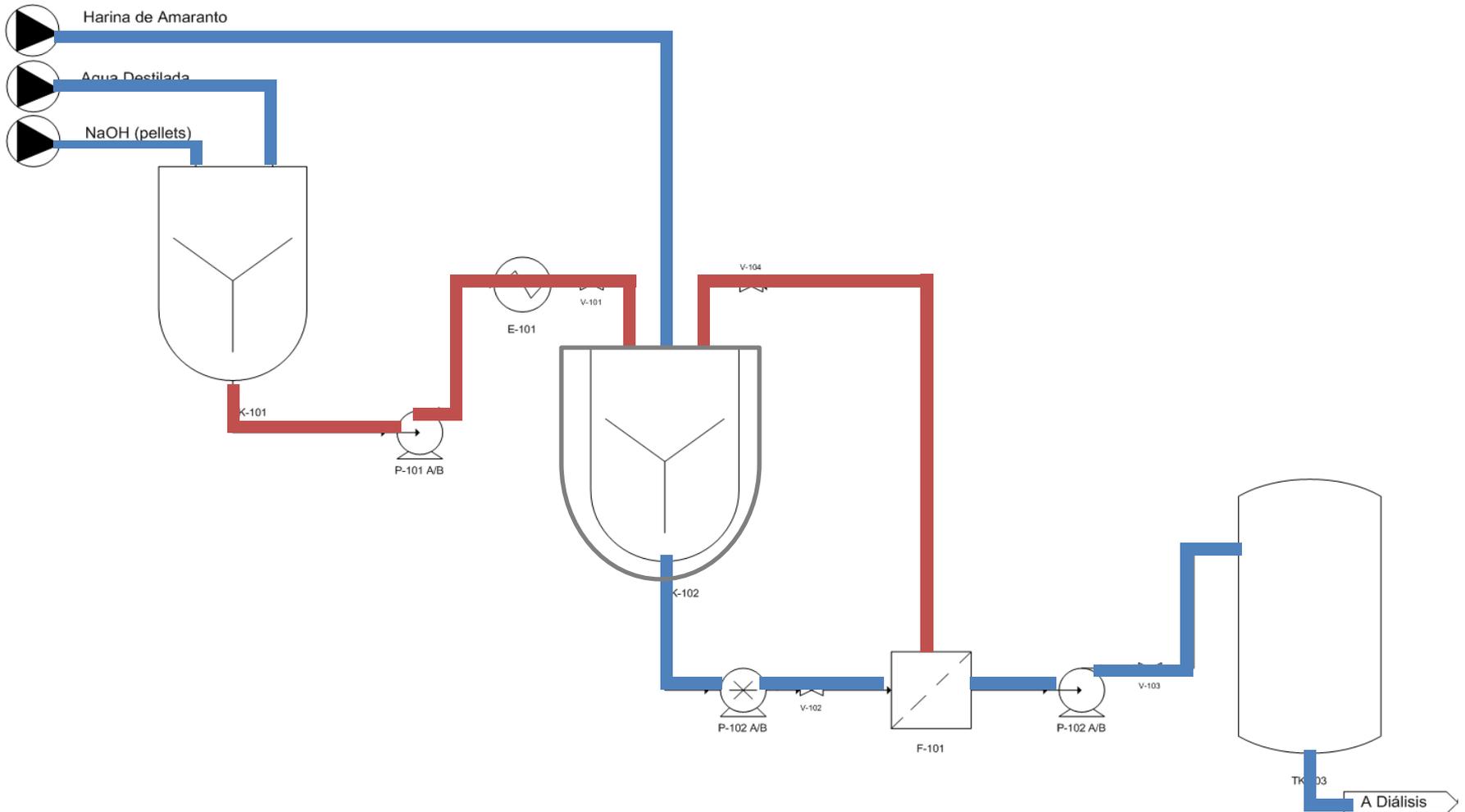
TK-102
Tanque de
Extracción

P-102 A/B
Bomba de
Desplazamiento
Positivo

F-101
Filtro tipo Nucha

P-103
Bomba Centrífuga

TK-103
Tanque de
Almacenamiento





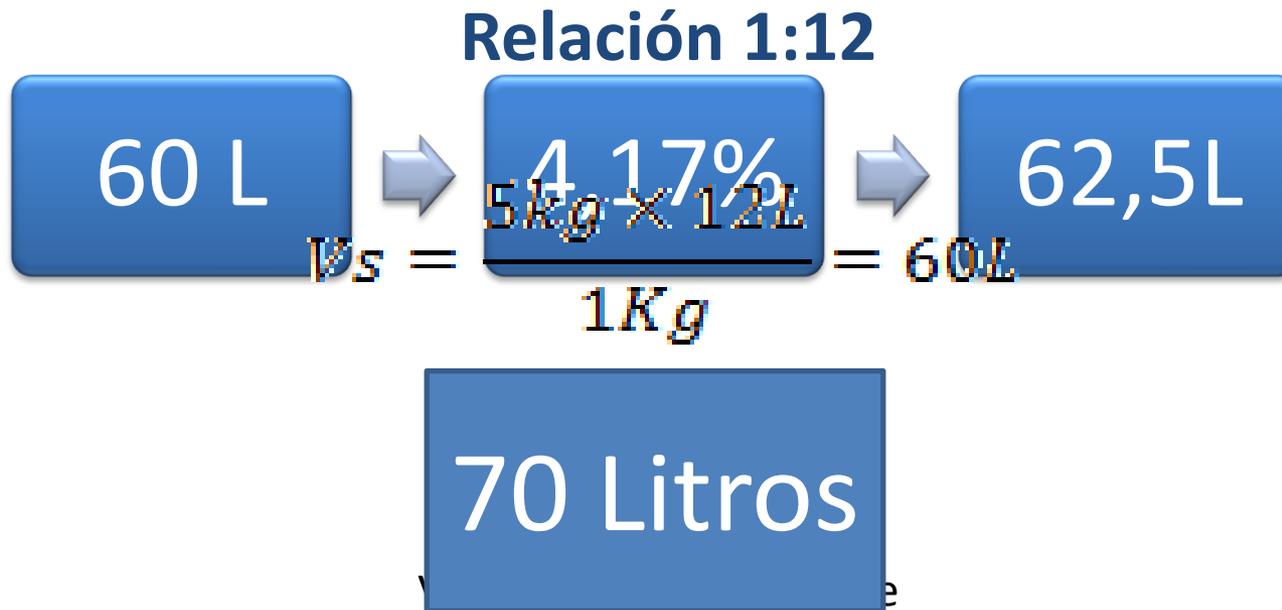
Comportamiento de la mezcla

Masa de Amaranto (g) $\pm 0,0001$	Volumen de Solvente (mL) $\pm 0,1$	Volumen de mezcla (mL) $\pm 0,1$
0,8007	9,6	10,0
1,6002	19,2	20,0
2,4008	28,8	30,0

4,17%



Cantidad de solvente por carga





Propuesta del tanque de Agitación

Semejanza Geométrica

V	Escala	Razón de Escala (adim)	Diámetro del tanque (m)	Diámetro del aspa (m)	Ancho de la paleta (m)
Piloto			0,45	0,22	0,04
Laboratorio	$\frac{H}{D} = 1$	$10,89 \frac{Da}{Dt} = 0,5$	0,04	$\frac{W}{Da} = \frac{1}{5}$	$\frac{J}{Dt} = \frac{1}{12}$

V: Volumen [m³]

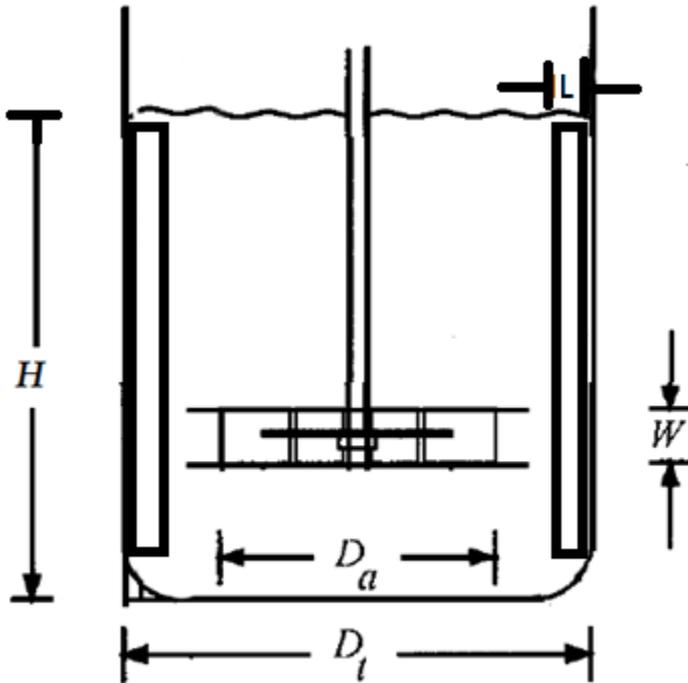
D: Diámetro [m]

H: Altura del líquido [m]

W: Ancho de la paleta del aspa [m]



Propuesta del tanque de Agitación



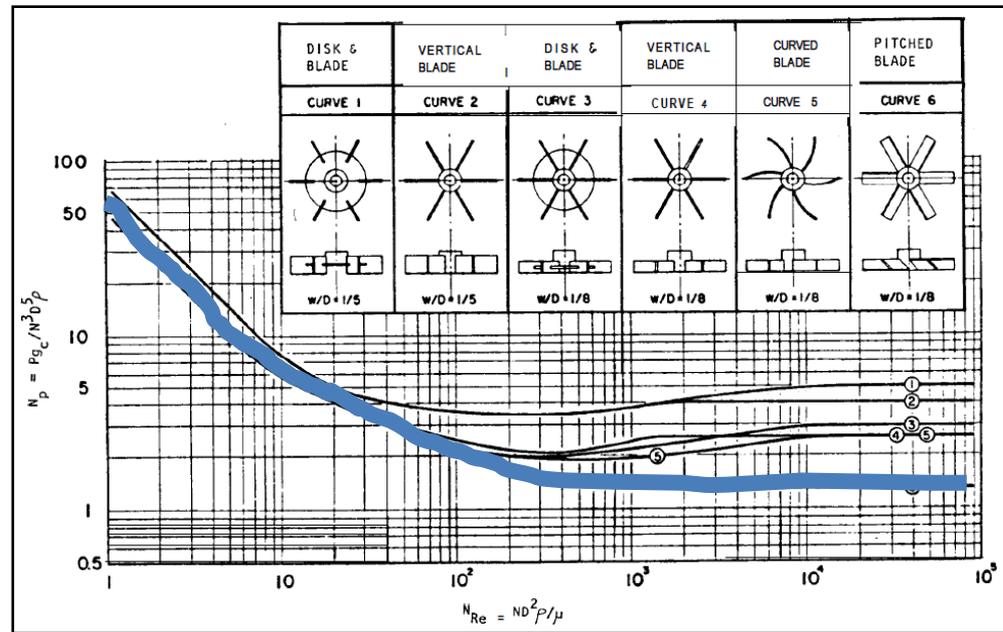
Parámetro	Medida (m)
Altura de líquido (H)	0,45
Altura del Tanque	0,52
Diámetro del Tanque (D_t)	0,45
Diámetro de la paleta (D_a)	0,22
Ancho de la paleta (W)	0,04
Ancho de los deflectores (L)	0,04



Calculo del Tanque de Agitación

Semejanza Mecánica

$$\frac{D_t \times N_t \times \rho}{\mu} = \frac{D_b \times N_b \times \rho}{\mu \mu} \quad N_p = \frac{P}{\rho \times N^3 \times D^5}$$





Calculo del Tanque de Agitación

Semejanza Mecánica

Parámetro	Valor
Número de Potencia (adim)	3
Velocidad Agitador (RPM)	90
Potencia (W)	3,3



Tanque de Hidróxido de Sodio

Número de tanques a emplear	3
Volumen del tanque (m³)	0,12
Diámetro del tanque (m)	0,53
Altura del tanque (m)	0,64
Material	Acero Inoxidable 316L



Criterios para la selección del filtro

- Filtro cerrado y estanco. Ideal para la filtración de líquidos peligrosos y/o de alto valor.
- Posibilidad de filtrar sobre tela y/o sobre papel. Ideal para la separación de sólidos con un alto valor.
- Realización íntegra del filtro en acero inoxidable. Ideal para tratar productos alimentarios.
- Ausencia de volúmenes muertos en el interior del filtro con un escurrido total de líquido en el sólido separado. Ideal para trabajar por lotes con nulas pérdidas de producto.
- Construcción simple y robusta. Notable reducción de los costes de mantenimiento.





Conclusiones

- La eficiencia del proceso de extracción de proteína total se incrementó en 5% aproximadamente al aumentar la temperatura del mismo sin producir la desnaturalización de los grupos proteicos presentes en las muestras.
- La variación del parámetro tiempo de extracción no generó cambios significativos en el rendimiento del proceso lo que lleva a considerar el tiempo original de 30 minutos como tiempo suficiente para realizar la extracción.
- Tomando en consideración los datos obtenidos a nivel experimental a través de la cuantificación de grupos proteicos, el número de lavados que se puede realizar obteniendo una cantidad de producto significativa es de tres.



Conclusiones

- Se escaló el proceso de extracción, usando para ello la información recopilada por los ensayos experimentales, dando como resultado el diseño de un tanque agitado de 70 litros con 0,43m de diámetro y 0,52 m de alto.
- Se planteó el procesamiento de 10 Kg de harina de amaranto por día considerando una jornada de labores no mayor a 8 horas.



Recomendaciones

- Realizar ensayos de laboratorio que contemplen el estudio de otras variables importantes en el proceso con el objetivo de afinar los detalles del escalamiento. Un ejemplo de variable a estudiar podría ser el tamaño de partícula de la harina de amaranto.
- Realizar estudios de diálisis con el propósito de eliminar el hidróxido de sodio de las muestras de manera de evitar la desnaturalización de las proteínas.
- Ver la posibilidad de realizar estudios de laboratorio o a escala piloto en donde se use la filtración en lugar de la centrifugación como método para separar el sobrenadante del residuo generado durante el proceso de extracción.



Recomendaciones

- Estudiar cómo afectaría el estado de desarrollo de la planta en cuanto a la cantidad máxima de proteínas que se puede obtener de sus hojas.
- Realizar estudios más minuciosos para poder identificar con exactitud todos los grupos proteicos presentes en la hoja de la planta.
- Realizar un escalamiento de la planta piloto completa a fin de estudiar todas las posibles variables que puedan influenciar el proceso de extracción.



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ingeniería



Escuela de Ingeniería Química



ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEINA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE AMARANTO (*amaranthus dubius*).

Tutor (es): Dra. Susana Lobos

Presentado por : Br. Alejandro Urdaneta

Prof.^a Johliny Casanova

Br. José Zambrano

Ciudad Universitaria de Caracas, Julio 2010



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ingeniería



Escuela de Ingeniería Química



ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEINA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE AMARANTO (*amaranthus dubius*).

Tutor (es): Dra. Susana Lobos

Presentado por : Br. Alejandro Urdaneta

Prof.^a Johliny Casanova

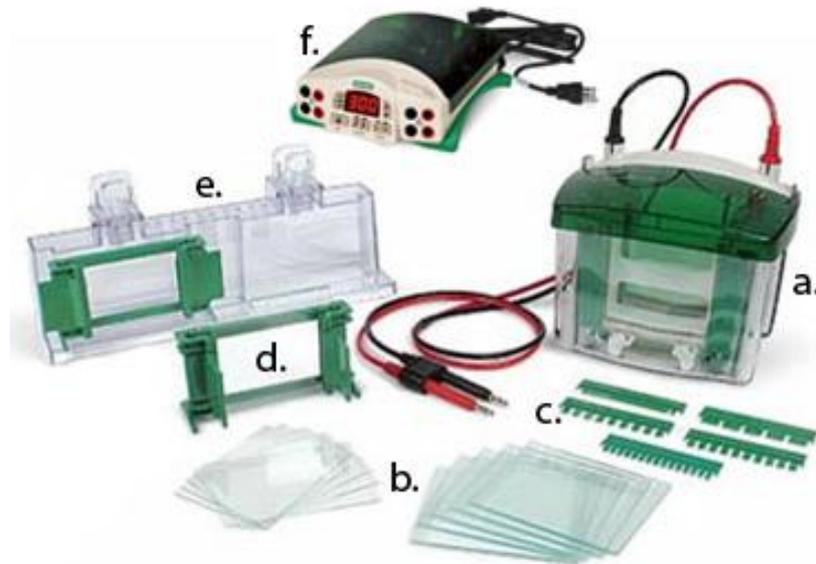
Br. José Zambrano

Ciudad Universitaria de Caracas, Julio 2010

Respaldo



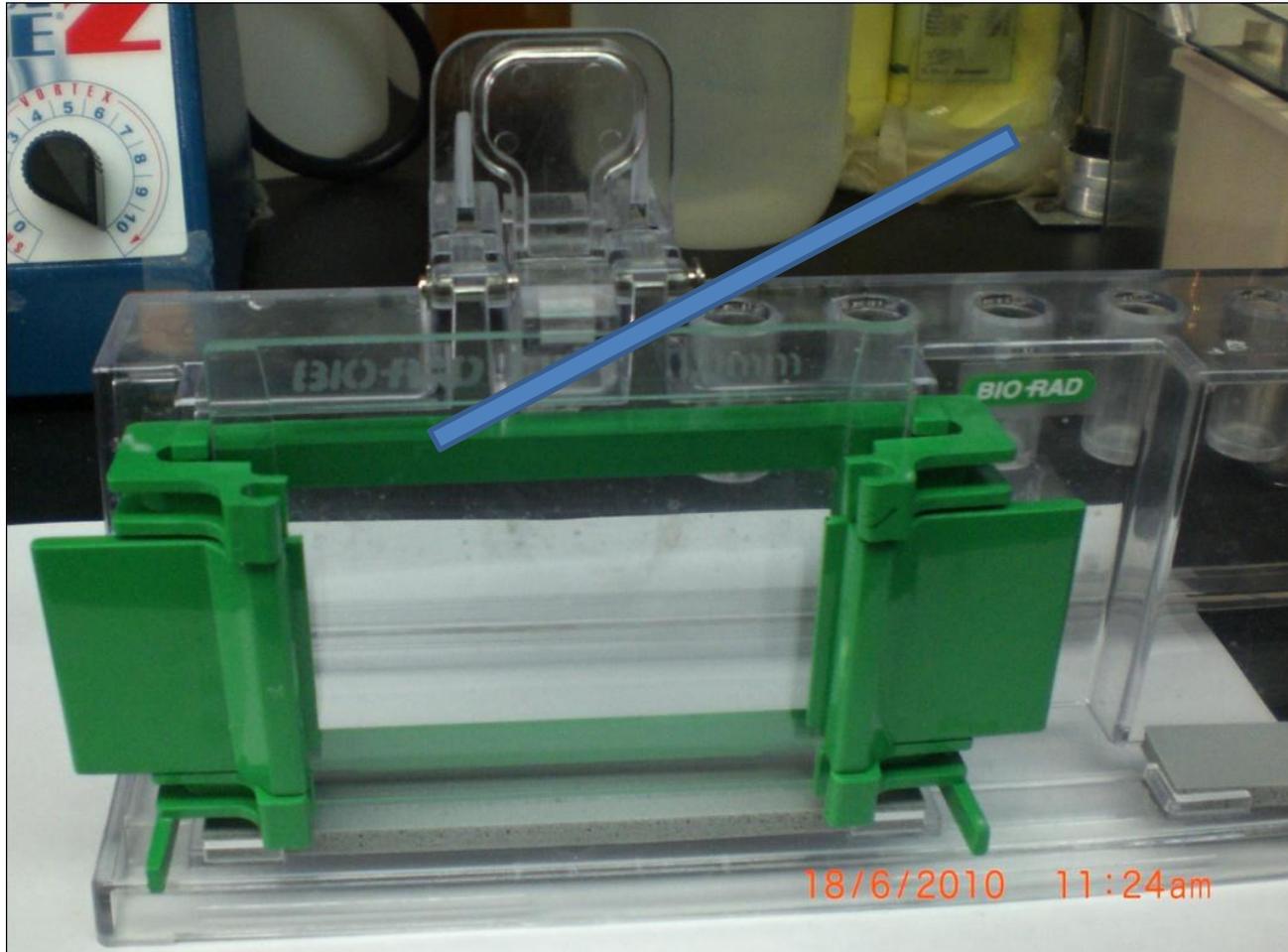
Kit de electroforesis Bio-Rad



- a) Cámara de electroforesis con dos electrodos.
- b) Dos placas de vidrios de 0,75 y 1,5 mm de espesor respectivamente.
- c) Peine de 10 espacios con 0,75 mm de espesor.
- d) Sujetador de placas de vidrio.
- e) Soporte utilizado para colocar el sujetador de placas de vidrio durante la polimerización del gel.
- f) Fuente de poder de hasta 300 voltios.



Montaje de la celda de electroforesis



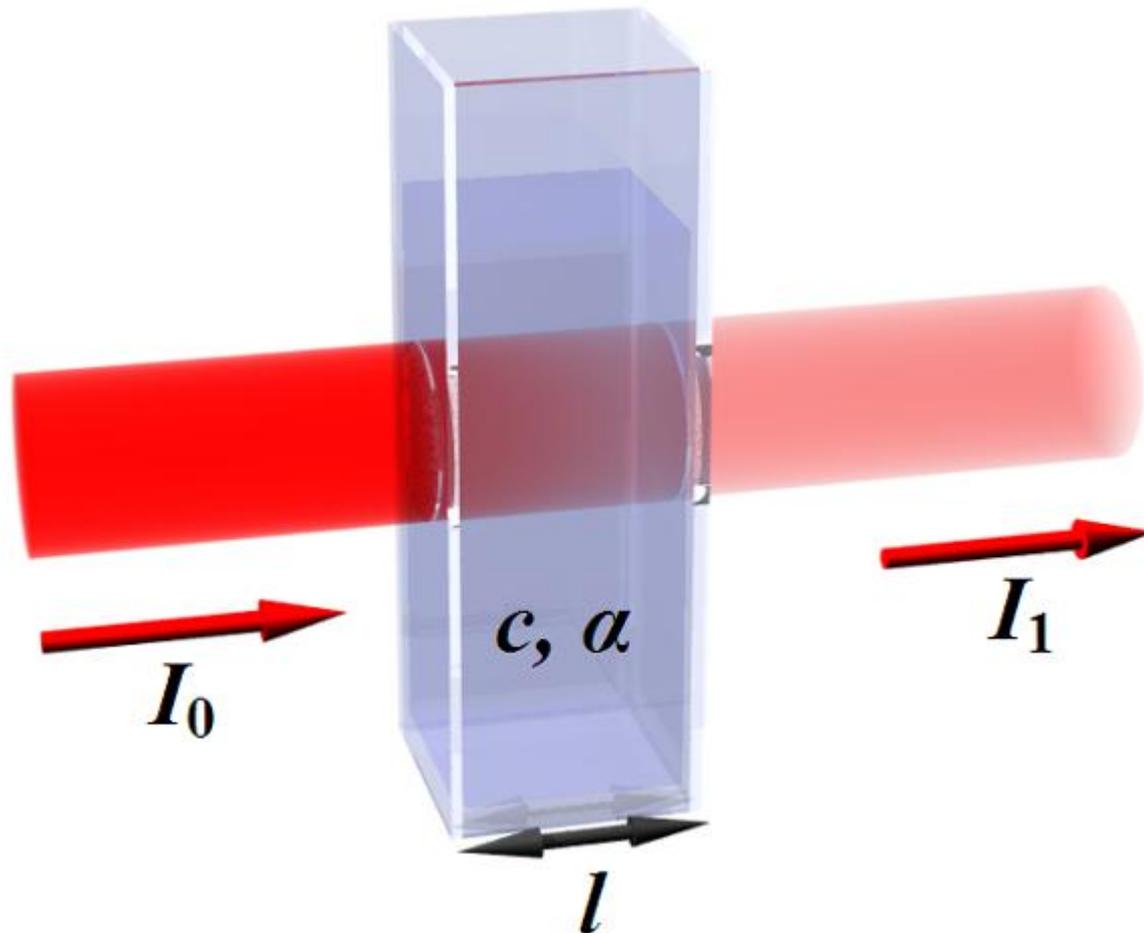


LEY DE LAMBERT BEER

La Absorbancia de una especie en solución homogénea es directamente proporcional a su actividad óptica, longitud del paso óptico y su concentración. Es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado.



LEY DE LAMBERT BEER



$$A = -\ln \frac{I_1}{I_0}$$



Lixiviación

La **lixiviación**, o extracción sólido-líquido, es un proceso en el que un disolvente líquido se pone en contacto con un sólido pulverizado para que se produzca la disolución de uno de los componentes del sólido.

Algunos ejemplos son:

- El azúcar se separa por lixiviación de la remolacha con agua caliente.
- Los aceites vegetales se recuperan a partir de semillas, como los de soya y de algodón mediante la lixiviación con disolventes orgánicos.
- La extracción de colorantes se realiza a partir de materias sólidas por lixiviación con alcohol o soda.

En cada una de las etapas de escalamiento se evalúan algunos aspectos del proceso:

1. Escala de laboratorio se llevan a cabo:

- estudios básicos de cinéticas de crecimiento
- niveles de expresión
- selección del medio, etc.

2. Planta piloto se optimizan las condiciones de operación

- forma de operación
- flujos, presiones
- Temperaturas
- velocidades de agitación, etc

3. Escala industrial se lleva a cabo la producción del producto de interés a niveles rentables.



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ingeniería



Escuela de Ingeniería Química



ESCALAMIENTO DE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEINA TOTAL DE LA HOJA DE LA PLANTA DE AMARANTO (*amaranthus dubius*).

Tutor (es): Dra. Susana Lobos

Presentado por : Br. Alejandro Urdaneta

Prof.^a Johliny Casanova

Br. José Zambrano

Ciudad Universitaria de Caracas, Julio 2010