



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES
Grado en Ingeniería Química
RECUPERACIÓN DE LA FRACCIÓN
PROTEICA DE RESIDUOS
AGROALIMENTARIOS

Autor:

Martínez Velaz, Óscar

Tutores:

Lucas Yagüe, Susana

García Cubero, M^a Teresa

Dpto. Ingeniería Química Y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, junio de 2021

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE **(ABSTRACT & KEYWORDS)**

En este trabajo se ha realizado un estudio experimental sobre la extracción, asistida por microondas, de la proteína presente en el grano de café agotado (GCA) y en el residuo de kale.

En el caso del GCA, las condiciones de extracción óptimas fueron 113°C, 3,33 minutos (tiempo de extracción) y 1,3 M de NaOH con un rendimiento de extracción de proteína del 61,2%. Para el residuo de kale, el rendimiento óptimo es superior, 96,6%, con condiciones de extracción similares (109°C, 15 minutos y 1,3 M, de NaOH).

La viabilidad técnica está garantizada ya que la tecnología microondas permite obtener extractos líquidos, potencialmente comercializables, con concentraciones de proteína de 10,5 g/L para el GCA y 21,5 g/L para el kale. Sin embargo, para garantizar la viabilidad económica de la planta sería necesaria una valorización integral de ambos residuos para obtener, además de proteína, biocombustibles u otros bioproductos de alto valor añadido.

PALABRAS CLAVE: Kale; grano de café agotado; proteínas; extracción; microondas.

In this work, an experimental study has been carried out on the microwave-assisted extraction of the protein present in spent coffee bean (GCA) and kale residue.

In the case of GCA, the optimal extraction conditions were 113°C, 3.33 minutes (extraction time) and 1.3 M NaOH with a protein extraction yield of 61.2%. For the kale residue, the optimal yield is higher, 96.6%, with similar extraction conditions (109°C, 15 minutes and 1.3 M, NaOH).

Technical feasibility is guaranteed as microwave technology allows obtaining liquid extracts, potentially marketable, with protein concentrations of 10.5 g/L for GCA and 21.5 g/L for kale.

However, to guarantee the economic viability of the plant, it would be necessary to recover both wastes in order to obtain, in addition to protein, biofuels or other bioproducts with high added value.

KEY WORDS: Kale; spent coffee grounds; protein; extraction; microwave.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Proteína de origen vegetal	12
1.2 Residuos agroalimentarios ricos en proteína	14
1.2.1 Residuos de frutas y verduras.....	15
1.2.2 Residuos agroindustriales	17
1.3 Kale.....	18
1.3.1 Composición	18
1.3.2 Aplicaciones	23
1.4 Grano de café agotado.....	24
1.4.1 Composición.....	25
1.4.2 Aplicaciones	27
1.5 Tecnologías para la extracción de proteínas.	31
1.5.1 Extracción química.....	31
1.5.2 Tratamientos físicos y fisicoquímicos	32
1.5.3 Extracción bioquímica.....	37
1.5.4 Tratamientos combinados.....	37
1.6 Tecnologías para la recuperación de proteínas.....	37
1.6.1 Métodos de precipitación:	38
1.6.2 Separación por membranas.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
3. SELECCIÓN DE ALTERNATIVAS.....	45
3.1 Selección de residuos agroalimentarios utilizados.....	45
3.2 Selección del método de extracción.....	48
3.3 Selección de las condiciones de extracción	48
3.3.1 Solventes.....	53
3.3.2 Concentración, temperatura y tiempo.....	53
4. TRABAJO EXPERIMENTAL: EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS.....	55
4.1 Materiales y métodos.....	55
4.1.1 Materia prima y reactivos	55
4.1.2 Extracción de la proteína mediante microondas.....	57
4.1.3 Diseño de experimentos (DOE)	61
4.1.4 Determinación de la proteína mediante NKT.....	63
4.2 Resultados y discusión.....	66

4.2.1 Resultados preliminares.....	66
4.2.2 Resultados DOE	68
4.2.3 Óptimo y confirmación del óptimo	73
5. ESTUDIO DE PREVIABILIDAD TÉCNICA Y ECONÓMICA.....	78
5.1 Balance de masa y diagrama de flujo	78
5.1.1 Base de cálculo	78
5.1.2 Condiciones de operación: Extracción y separación.....	78
5.1.3 Diagrama de flujo y tablas de corriente.....	79
5.2 Dimensionado de los equipos y selección.....	81
5.3 Estudio de viabilidad económica.....	83
5.3.1 Coste de materia prima	83
5.3.2 Coste total de inversión	83
5.3.3 Costes de producción	86
5.3.4 VAN/TIR (tiempo retorno)	88
5.3.5 Análisis de sensibilidad	90
6 CONCLUSIONES.....	95
7 BIBLIOGRAFÍA.....	98
8 ANEXOS.....	105
ANEXO I: Hoja de especificaciones del equipo de microondas empleado en el laboratorio:.....	105
ANEXO II: Hoja de especificaciones de la centrífuga empleada en el laboratorio:.....	115
ANEXO III: Balances económicos de los Escenarios 1 y 2.....	127
ANEXO IV: Gráfica Viscosidad vs Volumen	131
ANEXO V: Gráfica Número de potencia vs Reynolds	132

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Diagrama de bloques de extracción de proteínas.
- Figura 1.2: Fotografía donde se muestra el residuo de alcachofa.
- Figura 1.3: Fotografía donde se muestra el residuo de champiñón: compost.
- Figura 1.4: Fotografía donde se muestra el bagazo de cerveza.
- Figura 1.5: Fotografía donde se muestra Pulpa de remolacha.
- Figura 1.6: Imagen de la hoja del kale.
- Figura 1.7: Imagen del residuo de café.
- Figura 1.8: Estructura del fitoesterol.
- Figura 1.9: Alimentos con fitoesterol.
- Figura 1.10: Equipos de ultrasonidos a escala de laboratorio.
- Figura 1.11: Gráfica Temperatura-Presión.
- Figura 1.12: Sistema de extracción mediante fluidos supercríticos a escala de laboratorio.
- Figura 1.13: Sistema de extracción mediante microondas a escala de laboratorio.
- Figura 1.14: Extracción por extrusión.
- Figura 4.1: Imagen del grano de café agotado seco realizada en el laboratorio
- Figura 4.2: Imagen del grano de café molido realizada en el laboratorio
- Figura 4.3: Imagen del residuo de kale fresco realizada en el laboratorio
- Figura 4.4: Imagen del residuo de kale recién molido realizada en el laboratorio
- Figura 4.5: Equipo de extracción por microondas.
- Figura 4.6: Extracto tras centrifugación del grano de café agotado.
- Figura 4.7: Extracto tras centrifugación del kale.
- Figura 4.8: Extracto del kale antes de ser introducido en la estufa.
- Figura 4.9: Extracto del kale al sacarle de la estufa.
- Figura 4.10: Equipo de digestión utilizado en el laboratorio.

Figura 4.11: Equipo de destilación utilizado en el laboratorio.

Figura 4.12: Valorización color inicial: Verde.

Figura 4.13: Valorización color final: Morado.

Figura 4.14: Superficie de respuesta Temperatura vs tiempo del escenario 1.

Figura 4.15: Superficie de respuesta Temperatura vs tiempo del escenario 2.

Figura 5.1: Diagrama de flujo del proceso de extracción de la proteína tanto del escenario 1 como del escenario 2.

Figura 5.2: Flujos de caja acumulados del escenario 1 (grano de café agotado).

Figura 5.3: Flujos de caja acumulados del escenario 2 (kale).

Figura 5.4: Análisis de sensibilidad escenario 1 (grano de café agotado).

Figura 5.5: Análisis de sensibilidad escenario 2 (kale).

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1: Principales fuentes de proteína de origen vegetal con la cantidad de proteína que contienen.

Tabla 1.2: Porcentaje de proteína en los principales residuos agroalimentarios.

Tabla 1.3: Composición del kale según distintos autores.

Tabla 1.4: Composición de aminoácidos en el kale.

Tabla 1.5: Carbohidratos y alcoholes de azúcar contenidos en el kale.

Tabla 1.6: Vitaminas contenidas en el kale.

Tabla 1.7: Minerales contenidos en el kale.

Tabla 1.8: Resumen de las aplicaciones del kale.

Tabla 1.9: Composición química del grano de café agotado.

Tabla 1.10: Aminoácidos contenidos en el grano de café agotado.

Tabla 1.11: Composición de minerales del grano de café agotado.

Tabla 1.12: Resumen de las aplicaciones del grano de café agotado.

Tabla 3.1: Composición del kale utilizado.

Tabla 3.2: Composición del grano de café agotado utilizado.

Tabla 3.3: Ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de extracción de proteínas.

Tabla 3.4: Ejemplos de extracción de proteínas con sus condiciones de operación.

Tabla 4.1: Composición del grano de café agotado utilizado

Tabla 4.2: Composición del kale utilizado

Tabla 4.3: Diseño de experimentos del grano de café agotado.

Tabla 4.4: Diseño de experimentos del kale.

Tabla 4.5: Pruebas de kale con NaOH donde se conoce el RTG y el pH.

Tabla 4.6: Pruebas de kale con NaOH donde se conoce el rendimiento de extracción.

Tabla 4.7: DOE del grano de café agotado con NaOH donde se conoce el RTG y el pH.

Tabla 4.8: DOE del grano del café agotado con NaOH donde se conoce el RTG y el pH.

Tabla 4.9: DOE del kale con NaOH donde se conoce el RTG y el pH.

Tabla 4.10: DOE del kale con NaOH donde se conoce el RTG y el pH.

Tabla 4.11: Escenario 1: Condiciones de operación óptimas para el grano de café agotado.

Tabla 4.12: Condiciones de operación y rendimiento de las experiencias 17, 18 y 19 del escenario 1 (grano de café agotado).

Tabla 4.13: Escenario 2: Condiciones de operación óptimas para el kale.

Tabla 4.14: Escenario 2: Condiciones de operación y rendimientos de las experiencias 17, 18 y 19 del escenario 2 (kale).

Tabla 5.1: Tabla de corrientes del Escenario 1: grano de café agotado.

Tabla 5.2: Tabla de corrientes del Escenario 2: kale.

Tabla 5.3: Dimensionado tanque de preparación de NaOH.

Tabla 5.4: Dimensionado reactor de microondas.

Tabla 5.5: Dimensionado centrífuga.

Tabla 5.6: Coste de la materia prima en el escenario 1 (grano de café agotado).

Tabla 5.7: Coste de la materia prima en el escenario 2 (kale).

Tabla 5.8: Valores de factores de Lang para CFTP, CF y CTI.

Tabla 5.9: Coste de los equipos en los escenarios 1 y 2.

Tabla 5.10: Costes físicos de la planta del Escenario 1 y 2.

Tabla 5.11: Coste físico total de la planta, el capital fijo, el capital de trabajo y el coste total de inversión en ambos escenarios (grano de café agotado y kale).

Tabla 5.12: Costes anuales de producción en el escenario 1 y 2.

1. INTRODUCCIÓN

En este apartado se va a explicar qué es la proteína de una forma general y posteriormente se analizarán los distintos residuos agroalimentarios que pueden ser fuente natural de obtención de proteínas, así como las aplicaciones potenciales de cada uno de ellos. Se pondrá más atención a dos residuos que se desarrollarán durante este proyecto, el kale y el grano de café agotado. Tras esto, también se mostrarán los distintos métodos utilizados para la extracción y recuperación de proteínas.

En la figura 1.1 se presenta el diagrama de bloques que resume de forma esquemática todo lo que se va a desarrollar en este capítulo.



Figura 1.1: Diagrama de bloques de extracción de proteínas.

1.1 Proteína de origen vegetal

Las proteínas son macronutrientes adquiridos, generalmente, a través de los alimentos, con funciones importantes para el organismo y, aunque su aporte calórico es de 4 calorías por gramo, su principal función no es energética.

Tienen funciones variadas, son importantes para la formación o reparación de los tejidos, como huesos o músculos. Algunas funcionan como enzimas que facilitan las reacciones químicas del cuerpo, otras funcionan como transportadoras y otras participan en mejorar los niveles de azúcar en sangre. Por otro lado, algunas tienen funciones reguladoras y otras funciones defensivas que sirven para impedir enfermedades.

Las proteínas están formadas por unidades básicas llamadas aminoácidos. Existen 20 aminoácidos, doce de los cuales se denominan aminoácidos no esenciales y pueden ser fabricados por nuestro organismo. Los ocho restantes se denominan esenciales y se deben adquirir de los alimentos. Se pueden conseguir en diferentes proporciones en distintos alimentos, tanto de origen animal como vegetal.

En el caso de los alimentos de origen vegetal no contienen todos los aminoácidos y son deficitarios, pero es posible llevar una dieta equilibrada si se combinan todos ellos. En el caso de la quinoa y la soja si se consideran alimentos completos [1].

Las principales fuentes de proteínas de origen vegetal se pueden ver en la Tabla 1.1:

Tabla 1.1: Principales fuentes de proteína de origen vegetal con la cantidad de proteína que contienen [2].

Alimentos	Proteína que contiene por media taza
Soja:	
Tofu	10 g
Frijoles edamame	8,5 g
Tempeh	15 g
Lentejas:	8,84 g
Garbanzos:	7,25 g
Cacahuetes:	20,5 g
Almendras:	16,5 g
Espirulina (tipo de alga):	8 g por dos cucharadas
Quinoa:	4 g
Microproteína (proteína a base de hongos):	13 g
Semillas de chía:	2 g por cucharada
Semillas de cáñamo:	5 g por cucharada
Frijoles con arroz:	3,5 g
Patatas:	8 g por porción
Verduras:	
Tallo de brócoli	2 g
Kale	1 g
Champiñones	1,5 g en 5 champiñones
Seitán (trigo con especias):	21 g por un tercio de taza
Pan Ezequiel (tipo de pan):	4 g por rebanada

De la Tabla 1 podemos observar que alimentos como la soja, las legumbres (lentejas, garbanzos), frutos secos (cacahuetes, almendras), quinoa, patatas o verduras, los cuales son de origen vegetal, son ricos en proteínas. [2]

1.2 Residuos agroalimentarios ricos en proteína

Los residuos de los alimentos son la parte de los alimentos utilizados para el consumo humano que son descargados, perdidos, degradados o contaminados. Involucra a todos los sectores de gestión de residuos desde la recogida hasta la eliminación. Estos residuos tienen muchas aplicaciones relacionadas con la recuperación de nutrientes, en procesos industriales para biocombustibles o polímeros, recuperación de energía, etc.

Dentro de los residuos agroalimentarios, se encuentran los residuos procedentes de la industria láctea (36%), residuos de cereales y alimentos con almidón (31%) y los residuos de frutas y verduras (15%). [3]

La producción mundial de residuos agroalimentarios es de 1,3 billones de toneladas al año, en la Unión Europea la producción de estos residuos es de 88 millones anuales. [4]

De forma general podemos observar la gran variedad de residuos agroalimentarios ricos en proteínas que se utilizan y el porcentaje de dichas proteínas en cada caso en la Tabla 1.2:

Tabla 1.2: Porcentaje de proteína en los principales residuos agroalimentarios. Fuente: Adaptación [5].

Residuos Agroalimentarios	Contenido de proteína (%)
Trigo	Grano desgrasado 27,6
	Salvado 13,2-18,4
	Paja 3,57
Cebada	Paja 2,34-2,42
	Grano gastado 23,1-26,93
Maíz	Grano 32
	Rastrojo 8
	Hoja 9,40
Arroz	Residuo 62,32
	Salvado 15
Colza	Parte comestible 34,4-40,6
Girasol	Parte comestible 26,62
	Tallo 5,2
Palma	Parte comestible 14,86
Oliva	Fruto 1,1-3,2
	Hoja 7

Las naranjas tuvieron una producción mundial en 2016 de 67 millones de toneladas de las cuales 18,5 millones de toneladas se utilizaron como residuo y el porcentaje de proteína es del 8%. [8]

Los plátanos tuvieron una producción mundial de 114,08 millones de toneladas y sus residuos corresponden al 35%. El volumen de los desechos aumentó hasta los 353 millones de toneladas en los últimos 10 años. [9]

La alcachofa, es una planta de origen mediterráneo en la que la parte comestible es el corazón y una pequeña parte del tallo. Las cantidades de residuos son del 80%-85% de la materia prima de partida. La producción mundial de alcachofas es de 1678 kilo toneladas al año, donde Italia es la mayor productora con 390 kilo toneladas y España tienen una producción de 208 kilo toneladas al año en el año 2010. [10]

El champiñón, es un hongo comestible, siendo el residuo del champiñón, como se observa en la Figura 1.3. En España, en el año 2010, se generaron 500.000 toneladas anuales, en Castilla-La Mancha se concentra el 45% de la producción nacional.

El conjunto de la Unión europea produce más de 3.500.000 toneladas al año [11]. En las figuras 1.2 y 1.3 se muestran el residuo de la



Figura 1.2: Fotografía donde se muestra el residuo de alcachofa [12]



Figura 1.3: Fotografía donde se muestra el residuo de champiñón: Compost [13]

1.2.2 Residuos agroindustriales

Por otro lado, existen numerosos residuos de origen agroindustrial, entre los que pueden destacarse los DDG (dried distilled grain), bagazo de cerveza y la pulpa de remolacha o el grano de café agotado.

Los DDG son un el subproducto de las plantas de bioetanol y destilería y al tener un gran valor proteico funcionan como piensos para el ganado. En 2009, en la Unión Europea se han producido 1,1 millones de toneladas de DDG, de los cuales en España 700.000 toneladas. [14]

El bagazo de cerveza es un subproducto industrial del proceso de producción de la cerveza. Está compuesto por 15-25% de proteínas y 70% de fibras. En la Unión Europea se producen 3,4 millones de toneladas al año. En 2018, en España se produjeron alrededor de 23 millones de hectolitros de cerveza que equivale a 475.179 toneladas de bagazo de cerveza. [15]

Por otro lado, cabe destacar la pulpa de remolacha la cual es un subproducto de la industria azucarera. El contenido de proteínas se encuentra en torno a un 10%. [16]. En las figuras 1.4 y 1.5 se muestran el bagazo de cerveza y la pulpa de remolacha.



Figura 1.4: Fotografía donde se muestra el bagazo de cerveza [17]



Figura 1.5: Fotografía donde se muestra la pulpa de remolacha [18]

1.3 Kale

Como residuo alimentario dentro de las frutas y verduras nos vamos a centrar en el kale, que será uno de los residuos agroalimentarios que vamos a desarrollar en este proyecto.

El kale o col rizada es un alimento saludable, con un alto contenido en antioxidantes, calcio, carotenoides y otros fitonutrientes. [19] La col rizada proviene de las regiones del este del mediterráneo y Asia Menor. Fue utilizada desde el año 2000 a.c. y extendida a lo largo de los siglos a través de viajeros y comerciantes.

Existen diferentes variedades de col rizada como pueden ser col rizada enana, rizada verde, escocesa, rizada de hoja... Las hojas de col rizada son consumidas frescas como alimento, mientras que el tallo es el residuo con un elevado contenido en proteína, lo que hace atractivo su valorización mediante el desarrollo de procesos que permitan la extracción de la proteína presente. [20]



Figura 1.6: Imagen de la hoja del kale [21]

1.3.1 Composición

En relación a su composición, es rica en antioxidantes, fibra, calcio, vitaminas C, K y A, minerales como hierro, potasio, calcio y manganeso entre otros. Por todo esto, se le considera un superalimento. [19]

En la Tabla 1.3 podemos ver la composición de kale, conociendo los porcentajes de proteína, energía, ceniza, carbohidratos, grasas, humedad y fibra, todo ello según distintos autores. [20]

Tabla 1.3: Composición del kale según distintos autores. Fuente: Adaptación [20]

Nutriente	Talwinder .etal., (2008) (MS)	Acikgoz (2011) (MS)	Thavarajah et.al (2010) (MH)	Emebu and Anyika (2011) (MH)	Sikora and Bodziarczyk (2012) (MH)	Mancha li etal (2012) (MH)
Proteína (%)	36,8	30,83	4,2	11,67	4,17	3,28
Energía (kcal/100g)	ND	ND	66	58,46	ND	ND
Cenizas (%)	15,8	ND	ND	1,33	2,11	ND
Grasa (%)	11,8	ND	ND	0,26	0,67	0,74
Carbohidratos (%)	38,6	ND	ND	2,36	10,14	10
Fibra (%)	36,8	ND	ND	3	8,39	1,94
Humedad (%)	ND	ND	85	81,38	82,92	ND

MH= Materia húmeda; MS= Materia seca; ND=No disponible

Según los autores de la tabla se observa que el porcentaje de proteína en el kale se encuentra entre el 3,28% y el 11,67% en peso en la materia prima original y entre el 30% y 36,8% en base seca, el porcentaje de energía se encuentra entre un 59% un 66%. El porcentaje en ceniza es de un 15,8% en seco y alrededor del 1-2% con humedad. El contenido en grasa es del 11,8% en seco y sin llegar al 1% con humedad.

El porcentaje en carbohidratos es del 38,6% en seco y entre el 2,36%-10,14% con humedad. En el caso de la fibra tiene un 36,8% en seco y entre el 1,94%-8,39% con humedad. Por último, se debe tener en cuenta que el porcentaje de humedad es de alrededor del 85%. [20]

Los aminoácidos dominantes son el ácido glutámico, prolina y ácido aspártico con un 12%, 12% y 10% respectivamente, mientras que la proporción de aminoácidos como leucina, lisina o valina es de un 8%. En la Tabla 1.4 se recogen los principales aminoácidos presentes en las hojas del kale sin cocer. [22]

Se puede observar en la Tabla 1.4 que la composición total de proteínas, en mg por cada 100 g de producto es de 3621, el ácido glutámico tiene 450 mg por cada 100 g de producto, le siguen la prolina (434) y el ácido aspártico (349). Aunque existen otros como la leucina (299), la arginina (229) o la alanina (215). [22]

Tabla 1.4: Composición de aminoácidos en el kale. Fuente: Adaptación [22]

Aminoácido	Composición (mg/100g de producto)
Isoleucina	156
Leucina	299
Lisina	221
Cisteína	58
Metionina	72
Total aminoácidos de azufre	130
Tirosina	122
Fenilalanina	186
Total de aminoácidos aromáticos	308
Treonina	164
Valina	207
Histidina	106
Total aminoácidos esenciales	1591
Arginina	229
Ácido Aspártico	349
Ácido glutámico	450
Serina	163
Prolina	434
Glicina	190
Alanina	215
Total aminoácidos no esenciales	2030
Total aminoácidos	3621
Materia seca g/100 g de producto	18,08

Se pueden ver los carbohidratos que se encuentran en el kale en la tabla 1.5, las vitaminas en la tabla 1.6 y las sales minerales en la tabla 1.7.

Tabla 1.5 Carbohidratos y alcoholes de azúcar contenidos en el kale. Fuente: Adaptación [21]

Componentes (mg/100g)	Ayaz et al. (2006)	Thavarajah et.al (2010)	Wang (1998)	Hagen et al. (2009)
Alcohol de azúcar	ND	24,5	ND	ND
Sorbitol	ND	17,9	ND	ND
Glucosa	1056	993	3040	5800
Fructosa	2011	545	5950	7200
Sacarosa	894	39,3	300	3400
Arabinosa	ND	73,5	ND	ND
Manosa	ND	241	ND	ND
Xilosa	ND	59,9	ND	ND
Total carbohidratos	ND	1900	ND	ND
Otros carbohidratos	ND	5500	ND	ND
Ácido cítrico	2231	ND	386	ND
Ácido málico	151	ND	124	ND

De la Tabla 1.5, se puede destacar el valor de la glucosa que tiene una composición en mg/100g de producto de entre 993 y 5800 dependiendo del autor, por otro lado, la fructosa tiene un valor entre 545 y 7200 así como también hay carbohidratos como la sacarosa, manosa o arabinosa entre otros. Por otro lado, se observa que existen ácidos como el cítrico que tiene un valor entre 386 y 2231 y el málico entre 124 y 151. [21]

De la Tabla 1.6 podemos saber que la vitamina mas usual es la C con valores entre 62 y 969 mg/100g de producto.

Existen otras vitaminas en el kale como son el caroteno o luteína entre otras. [21]

Tabla 1.6: Vitaminas contenidas en el kale. Fuente: Adaptación [21]

Componentes (mg/100g)	Acikgoz (2011)	Hagen et al. (2009)	M.G. Lefsrud et al. (2005)	De azevedo and Rodríguez- Amaya (2005)	M.Lefsrud et al. (2007)	Sikora and Bodziarczyk (2012)	Murtaza et al. (2006)
Vitamina C	104,31	969	ND	ND	ND	62,27	151
Caroteno	ND	ND	10,97	3,887	8,92	6,40	44
Luteína	ND	ND	14,175	5,061	38,16	ND	ND
Violaxantina	ND	ND	ND	3,316	ND	ND	ND
Leoxantina	ND	ND	ND	1,694	ND	ND	ND

De la Tabla 1.7 podemos ver los minerales que destacan en el kale, entre los que se encuentran el potasio (4-1350), el calcio (2,6-1970) o el magnesio (0,36-240) entre otros muchos, como el zinc, el manganeso o el selenio. [21]

Tabla 1.7: Minerales contenidos en el kale. Fuente: Adaptación [21]

Mineral (mg/100g)	Manchalim et al. (2012) (MS)	Ayaz et al. (2006) (MS)	Thavarajah et.al (2016) (MH)	Acikgoz (2011) (MS)	Emebu and Anyka (2011) (MH)	Sikora and Bodziarczyk (2012) (MH)
Potasio	446	1350	488	4,16	7,03	440,2
Calcio	13,5	1970	106	2,61	4,05	384,8
Magnesio	34	240	44	0,36	6,69	34,9
Hierro	16	7,26	1,1	12,19	8,94	ND
Zinc	0,045	3,94	0,7	2,08	2,16	0,83
Manganeso	0,75	5,35	0,8	14,77	ND	0,86
Cobre	0,3	0,51	0,055	0,18	ND	0,05
Selenio	0,0009	ND	0,0023	ND	ND	ND
Fósforo	56	573	ND	0,52	ND	ND
Sodio	43	170	ND	ND	4,69	38,5

MH = Material húmedo; MS= Peso seco; ND= No disponible

1.3.2 Aplicaciones

Entre las propiedades funcionales que se le atribuyen, están las de mejorar el estado de ánimo, reducir el colesterol, prevenir el cáncer, mejorar la inmunología y reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Una función importante del kale es ser un vegetal anticancerígeno al inhibir el desarrollo del cáncer ya que tiene distintos compuestos que protegen las células como glucosinolatos y nitrilos. [23]

La fibra en el kale ofrece protección contra la diabetes y también contribuye a la salud de la piel, se atribuye a la pérdida de peso al tener pocas calorías y reduce el colesterol alto.

El kale también sirve como aplicación, para aumentar la actividad del citocromo e influye en el metabolismo de la bilirrubina. La cantidad de bilirrubina se reduce utilizando kale. [23]

Por otro lado, existe un uso alimentario al ser un superalimento, ya que como hemos visto en su composición tienen numerosas vitaminas, carbohidratos, proteínas... Se suele consumir el kale fresco, en ensaladas, acompañarlo de distintos alimentos o en batidos. [24]

En las hojas verdes hay grandes cantidades de clorofila, complejos proteicos que cosechan y convierten la energía solar en energía química. [25]

En la Tabla 1.8 podemos ver una tabla resumen con las aplicaciones del kale.

Tabla 1.8: Resumen de las aplicaciones del kale.

APLICACIONES	PROPIEDADES	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Propiedades Funcionales	<p>Una función importante del kale es ser un vegetal anticancerígeno al inhibir el desarrollo del cáncer al tener distintos compuestos que protegen las células como glucosinolatos y nitrilos.</p> <p>La fibra en el kale ofrece protección contra la diabetes y también contribuye a la salud de la piel, se atribuye a la pérdida de peso al tener pocas calorías y reduce el colesterol alto.</p> <p>El kale también sirve como aplicación, para aumentar la actividad del citocromo e influye en el metabolismo de la bilirrubina.</p> <p>La cantidad de bilirrubina se reduce utilizando kale.</p>	[23]
Alimentación	<p>Es un superalimento.</p> <p>Se suele consumir el kale fresco, en ensaladas, acompañarlo de distintos alimentos o en batidos.</p>	[24]
Biológicas	<p>En las hojas verdes hay grandes cantidades de clorofila, complejos proteicos que cosechan y convierten la energía solar en energía química.</p>	[25]

1.4 Grano de café agotado.

Dentro de los residuos de origen agroindustrial, se va a explicar el grano de café agotado ya que es el residuo que se va a desarrollar durante este proyecto. El grano de café agotado es un residuo en la producción del café, que contienen una gran cantidad de compuestos orgánicos. Es un producto secundario de la cáscara y la pulpa del café el cual es utilizado en la industria alimentaria, además de ser una fuente importante de polisacáridos [26]. En la figura 1.7 se muestra una fotografía del residuo de café.



Figura 1.7: Imagen del residuo de café [27]

1.4.1 Composición

Se puede observar de forma rigurosa la composición química del grano de café agotado en base seca en la Tabla 1.9: [28]

Tabla 1.9 Composición química del grano de café agotado. Fuente: Adaptación [28]

Composición química	Composición (g/100g de producto seco)
Celulosa (glucosa)	12,4
Hemicelulosa	39,1
Arabinosa	3,6
Manosa	19,07
Galactosa	16,43
Xilosa	nd
Lignina	23,90
Insoluble	17,59
Soluble	6,31
Grasa	2,29
Cenizas	1,3
Proteína	17,44

Podemos ver en la tabla 1.9 que la mayor composición es de hemicelulosa donde el mayor porcentaje es de manosa, también tiene un valor alto de lignina. Es rico en azúcares que corresponden al 45,3% del material.

Como los principales polisacáridos destacan, con 19,07 g por cada 100 g de producto, la manosa, con 16,43 g la galactosa, con 12,4 de glucosa y 3,6 g de arabinosa. También contiene fibra lo que le hace tener productos antioxidantes apropiados, similar al contenido en el vino tinto y los melocotones. [28] El grano de café agotado contiene una cantidad de proteínas del 13,6%. En la Tabla 1.10 se puede observar que existen una gran cantidad de aminoácidos dentro del grano de café agotado donde destacan la leucina, ácido glutámico o valina entre otros. [27]

Tabla 1.10: Aminoácidos contenidos en el grano de café agotado. Fuente: Adaptación [27].

Aminoácidos	Mínimo (%)	Máximo (%)	Media (%)
Alanina	4,8	5,4	4
Arginina	0,1	0,2	0,5
Ácido aspártico	0,2	1,9	3
Cisteína	ND	5,1	0,3
Ácido glutámico	11,5	13,8	12,9
Glicina	2,4	7,9	4,7
Histidina	0,1	5,3	1,6
Isoleucina	5,1	5,3	4,2
Leucina	10,6	10,9	8,5
Lisina	1,9	2,3	1,4
Metionina	1	1,9	1,2
Fenilalanina	0,5	6,7	5,2
Prolina	3,1	4,7	5,6
Serina	0,9	1,2	1,6
Treonina	0,3	2,2	2,6
Tirosina	2,9	4	3,1
Valina	6	6,8	5,7

En la Tabla 1.11 se puede observar la composición de minerales más importantes que se encuentran en el café agotado, podemos ver que el hierro es el mineral que más proporción tiene dentro del café de grano agotado, le siguen el potasio el aluminio, el sodio y el manganeso entre otros. [28]

Tabla 1.11: Composición de minerales del grano de café agotado. Fuente: Adaptación [28]

Mineral	Composición grano de café agotado (mg/kg de materia seca)
Potasio	11,69-11,71
Calcio	1,20
Magnesio	1,90
Azufre	1,60
Fósforo	1,80
Hierro	51,5-52,5
Aluminio	18,8-25,8
Estroncio	5,90
Bario	3,41-3,51
Cobre	17,72-19,6
Sodio	24,95-42,45
Manganeso	28,1-29,5
Boro	7,30-9,50
Zinc	8,20-8,60
Cobalto	15,13-15,23

1.4.2 Aplicaciones

Dentro de las numerosas aplicaciones del grano de café agotado se pueden destacar:

Aplicaciones industriales: El grano de café agotado puede funcionar como materia prima para el desarrollo de biorrefinerías para generar productos de alto valor añadido. Se utiliza en el tratamiento de aguas residuales, eliminación de metales pesados y colorantes catiónicos.

También se utiliza para la producción de biocatalizadores, los cuales son una alternativa adecuada a los catalizadores químicos al ser renovables y económicos, destaca el carbón activo y es mejor que otros catalizadores por una estructura de poros muy desarrollada. [29] Se producen biopolímeros que son utilizados para envasar materiales en forma de botellas de champú, cartones de leche, bolsas... [29]

El grano de café agotado, junto con compuestos de ácido poliláctico, puede ser utilizado para impresión tridimensional. Los rellenos funcionales en filamentos formados por impresión tridimensional son una forma de reutilizar el café agotado, pero el color marrón inherente a este café hace que el color tenga un límite y con ello un problema en la impresión. [30]

Aplicaciones sanitarias: Las proteínas con alta cadena ramificada de aminoácidos y bajo contenido de aminoácidos aromáticos sirven para producir alimentos funcionales y es utilizado para pacientes con quemaduras, cánceres, traumatismos y apoyo nutricional a niños con diarrea. [27]

Otra aplicación de gran importancia es la producción, con interés comercial, de fitoesteroles. Los fitoesteroles o esteroides vegetales son moléculas que se encuentran de forma natural en casi todos los vegetales, en los frutos, semillas, tallos y hojas.

Estos compuestos, a diferencia del colesterol, son absorbidos de forma escasa por el intestino y no pueden ser producidos por el organismo. Por ello el consumo de los fitoesteroles ayuda a reducir el nivel de colesterol, previniendo enfermedades cardiovasculares. También se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas. [31] [32]

Se muestra la estructura del fitoesterol y los alimentos que lo contienen en las Figuras 1.8 y 1.9.

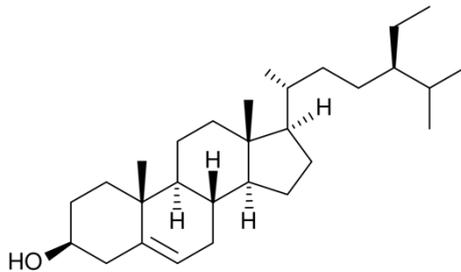


Figura 1.8: Estructura del fitoesterol [33]



Figura 1.9: Alimentos con fitoesterol [34]

Aplicaciones energéticas: El café agotado puede ser utilizado para extraer lípidos tras la hidrólisis dentro de la producción de biodiesel con hexano como disolvente. Para valorizar los lípidos en el café, se somete a hidrólisis ácida diluida para la producción de hidrolizado rico en azúcar y residuo posthidrólisis rico en lípidos. Después de esta hidrólisis se observa que contiene un 26% en peso, aproximadamente, de lípidos. [35]

Otra aplicación de importancia es la obtención de biocarbón por carbonización del café agotado, el cual puede ser utilizado para la creación de un dispositivo de almacenamiento de energía. El biochar se utiliza para fabricar electrodos supercondensadores combinado con una celda de combustible como fuente de energía eléctrica. Esto sirve para la conversión de energía solar, degradación fotocatalítica de una sustancia orgánica y almacenamiento de energía eléctrica en un condensador. [36]

En la Tabla 1.12 se puede ver una tabla a modo de resumen de las aplicaciones del grano de café agotado.

Tabla 1.12: Resumen de las aplicaciones del grano de café agotado.

Aplicaciones	Propiedades	Referencia
Industriales	El grano de café agotado, junto con compuestos de ácido poliláctico, puede ser utilizado para impresión tridimensional.	[32]
	En general, se producen biopolímeros que son utilizados para envasar materiales en forma de botellas de champú, cartones de leche, bolsas...	[31]
	Se utiliza en el tratamiento de aguas residuales, eliminación de metales pesados y colorantes catiónicos. Producción de biocatalizadores.	[31]
Sanitarias	Otra aplicación de gran importancia es la producción, con interés comercial, de fitoesteroles. Por ello el consumo de los fitoesteroles ayuda a reducir el nivel de colesterol. También se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas.	[33] [34]
	Las proteínas con alta cadena ramificada de aminoácidos y bajo contenido de aminoácidos aromáticos sirven para producir alimentos funcionales y es utilizado para pacientes con quemaduras, cánceres, traumatismos y apoyo nutricional a niños con diarrea.	[29]
Energéticas	El café agotado puede ser utilizado para extraer lípidos tras la hidrólisis dentro de la producción de biodiesel como hexano como disolvente.	[35]
	Otra aplicación de importancia es la obtención de biochar por carbonización del café agotado, el cual puede ser utilizado para la creación de un dispositivo de almacenamiento de energía.	[36]

1.5 Tecnologías para la extracción de proteínas.

Existen numerosas formas de clasificar los procesos de extracción de proteínas. Una de las más admitidas es la división de los procesos de extracción en aquellos que no utilizan solventes (condiciones secas) o los que hacen uso de ellos (condiciones no secas).

En este apartado se van a desarrollar las diferentes tecnologías de extracción que existen en condiciones no secas, ya que en el trabajo que se va a desarrollar la extracción se realiza en estas condiciones.

1.5.1 Extracción química

Dentro de la extracción química se van a desarrollar las extracciones con agua (extracción hidrotérmica), con solventes orgánicos y con solventes alcalinos.

Extracción con agua desionizada (tratamiento hidrotérmico):

Un tipo de extracción es mediante el tratamiento hidrotérmico, el cual es un tratamiento limpio y comprometido con el medio ambiente, consiste en una extracción, utilizando agua como disolvente.

Como ejemplo se ha desarrollado un pretratamiento de agua para extraer la proteína del bagazo de cerveza.

A temperatura ambiente solo es capaz de extraer el 43% de proteína. Al aumentar la temperatura a 60°C, el tiempo de reacción aumentó a 24 horas y la extracción de proteína ascendió al 66%. [37]

Extracción alcalina:

Es un tipo de extracción convencional que utiliza una sustancia alcalina como disolvente para solubilizar proteínas de residuos agroalimentarios.

La extracción alcalina es un método común, se utiliza para mejorar la capacidad de extracción de proteínas, es una forma más respetuosa con el medio ambiente que el uso de disolventes orgánicos.

Se suele usar el hidróxido de sodio como disolvente con concentraciones de hasta 0,4 M. [30] Se realiza a una temperatura entre 30 y 95°C y el tiempo de extracción es de entre 30 minutos y 4 horas. A mayor temperatura el rendimiento de proteína es mayor, sin embargo, a 140°C la proteína podría desnaturalizarse. [38]

El rendimiento de la proteína puede estar entre un 20% y un 90% dependiendo del residuo agroalimentario. A 90°C el rendimiento de extracción es de un 95%, en el caso del té verde. [39]

Extracción con disolventes orgánicos:

Es una extracción convencional, que se realiza con disolventes como pueden ser metanol, etanol y acetona entre otros y la mezcla de estos con agua. Es una técnica efectiva y sencilla de utilizar cuyo problema es que el tiempo de extracción es elevado. [38]

Por ejemplo, se ha utilizado etanol e isopropanol para solubilizar proteínas de diferentes residuos agroalimentarios, y para proteínas de lípidos de biomasa con gran contenido en aceite se ha utilizado cloroformo. En el caso de extracción de proteínas y aceite de un arroz utilizando etanol e isopropanol, el rendimiento del aceite es del 80% y la extracción de proteína varía de entre del 8,9% y el 20,4%, realizándose a una temperatura de entre 50-80°C. [38]

En general, la extracción de proteína con solventes orgánicos conduce a una baja recuperación de proteína [38]. La mejor recuperación de compuestos fenólicos ocurría utilizando una mezcla de acetona/agua con un 60% de acetona, a una temperatura de 60°C y con un tiempo de extracción de 30 minutos. [40]

1.5.2 Tratamientos físicos y fisicoquímicos

Extracción mediante ultrasonidos:

Una técnica alternativa de extracción es la de ultrasonidos. Es un método de extracción muy eficiente, permite ahorrar tiempo y dinero y se obtienen extractos de gran calidad.

Se basa en el principio de funcionamiento de la cavitación acústica o ultrasónica, se acoplan ondas de ultrasonido con una mezcla de material botánico en un disolvente. Las ondas ultrasónicas viajan por el líquido creando ciclos de alta y baja presión provocando la cavitación acústica. Este método es compatible con cualquier disolvente, fácil y seguro de operar y respetuoso con el medio ambiente. [41]

Los ultrasonidos se pueden dividir en ultrasonidos de baja frecuencia y alta intensidad o de baja intensidad y alta frecuencia, estos últimos son utilizados como una técnica no destructiva. [38]

En la Figura 1.10 se pueden observar equipos de ultrasonidos utilizados a nivel de laboratorio.



Figura 1.10: Equipos de ultrasonidos a escala de laboratorio. [42]

De forma general, como disolvente se puede usar el etanol (14:100). La extracción se realiza generalmente a 60°C durante un tiempo de extracción de 10 minutos, la recuperación suele ser alta alrededor del 97%. [40]

Como ejemplo, se pueden utilizar para extracción de proteínas de cereales, semillas oleaginosas y coliflor. [38]

En estos casos, la recuperación fue alrededor del 88,44% dependiendo de las condiciones aplicadas, concretamente en el caso de la extracción de proteína en la coliflor el tiempo fue de entre 10 y 30 minutos, con una potencia de 175 W y su pH es de 11, con lo que tiene carácter básico. [38]

Extracción con fluidos supercríticos:

Otra forma de extracción se puede realizar por medio de fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico es aquel que se difunde en sólidos como un gas y disuelve sustancias como un líquido en condiciones de temperatura y presión por encima de su punto crítico, presenta grandes cambios en su densidad y por ello se puede utilizar como sustituto de solventes orgánicos.

Se observa, en la Figura 1.11 la gráfica presión-temperatura para conocer la región de fluido supercrítico. [43]

En la figura 1.11 se puede observar la zona de la gráfica P-T donde se encuentran los fluidos supercríticos.

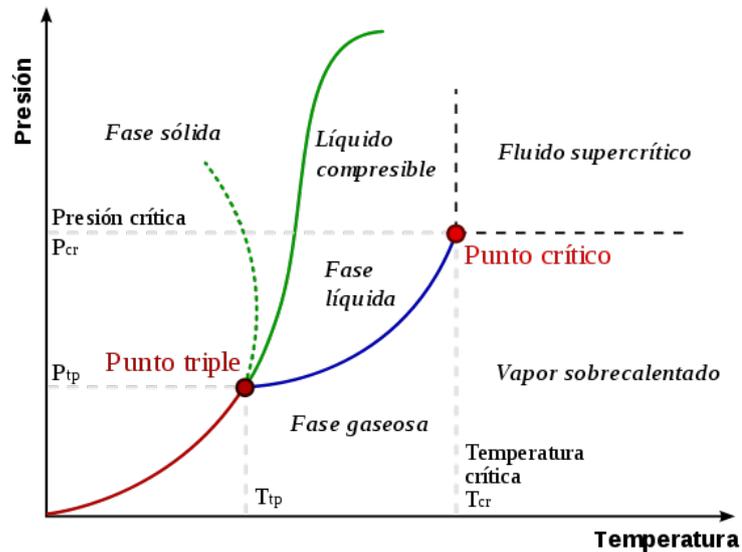


Figura 1.11: Gráfica Temperatura-Presión. [44]

Este proceso se da a una temperatura crítica moderada de 32°C y como disolvente se utiliza CO₂ ya que es moderadamente inflamable, no tóxico, no explosivo y que tiene el triple de difusividad que otros fluidos.

Los extractos se separan por un fluido gaseoso con presión baja y recogido en un colector. [43]

En la figura 1.12 podemos observar el equipo de extracción por fluidos supercríticos.



Figura 1.12: Sistema de extracción mediante fluidos supercríticos a escala de laboratorio [45]

Dentro de este tipo de extracción se puede incluir la extracción asistida por alta presión, la cual puede favorecer la extracción de compuestos naturales de plantas acortando el tiempo de extracción, disminuye el uso de solventes y aumenta los rendimientos de extracción. [43] Se ha utilizado para trigo, rastrojo y hojas de maíz, orujo de aceituna y uva.

Este método ha provocado altos valores de recuperación para arroz o harina de soja con un porcentaje de extracción de un 50% a un 100% a realizada a 200°C para 30 minutos y con presiones que van de 1 a 39,7 bar. [38]

Extracción con microondas:

Otra técnica de extracción de proteínas se consigue utilizando un microondas. La extracción por microondas es una tecnología de alta eficacia. Son utilizadas ya que el tiempo en la que se realiza el proceso es menor que con otras técnicas y esto hace que la energía que se consume sea mucho menor que en otras técnicas convencionales, disminuye hasta en un 90%, y conduce a beneficios de cambio de clima y emisiones de gases de efecto invernadero.

Son tecnologías de gran eficiencia. El microondas es una tecnología “verde” de bajo coste que proporciona un aumento en el rendimiento del producto, así como de pureza, con una reducción en recursos de materiales y energía y menos desechos. Sus aplicaciones contribuyen a la salud mediante la reducción de desechos tóxicos. [15]

En la figura 1.13 se muestra el equipo de microondas.



Figura 1.13: Sistema de extracción mediante microondas a escala de laboratorio [46]

Un ejemplo de utilización de esta técnica es la extracción de la proteína del bagazo de cerveza. Como disolvente se utiliza hidróxido de sodio, con una relación del 10%, las temperaturas se encontraban entre 170 °C y 270 °C. y los tiempos son alrededor de 2,5 minutos. [15]

Otro ejemplo a destacar es la extracción es el caso de salvado de arroz obteniendo una recuperación del 22%, utilizando una potencia de hasta 1000 W, con 90 segundos de tiempo de extracción. [38]

Extracción eléctrica:

Las extracciones eléctricas son un grupo de nuevas tecnologías menos agresivas con el producto y que permiten reducir los costes de producción. Una de las técnicas con mayor proyección son los pulsos eléctricos de alto voltaje.

Este método no térmico de conservación de alimentos utiliza pulsos cortos e intermitentes de electricidad para la inactivación microbiana. Estos campos producen la electroporación de las células que se fundamenta en el aumento de permeabilidad de las membranas celulares. [47] Este tipo de extracción tienen ventajas en la valorización de la biomasa al mejorar la extracción. Incluye electroactivación, campo y descarga eléctrica de alto voltaje.

La extracción de proteínas es de 34,32% en el caso de la pasta de canola, la cual es mayor que en extracciones convencionales donde el porcentaje fue del 31% con un pH de 7 a 10.

Otro ejemplo se realizó con semillas de papaya donde el pH es de entre 2,5 y 11 y las temperaturas van de 20 a 60°C. [38]

Extracción por extrusión (con tornillo o doble tornillo):

Este tipo de extracción se puede utilizar para transformar los residuos de la biomasa en fracciones más pequeñas y también puede ser utilizado para extraer proteínas como puede ser el caso que la alfalfa.

El tiempo de realización suele ser de al menos 20 minutos, y la recuperación de proteína es más o menos del 50,8%. El problema es que en ocasiones se forman extractos complejos con lo que hay que realizar distintos pasos en la purificación. [38]

Se muestra en la figura 1,.14 un sistema de extracción por extrusión.

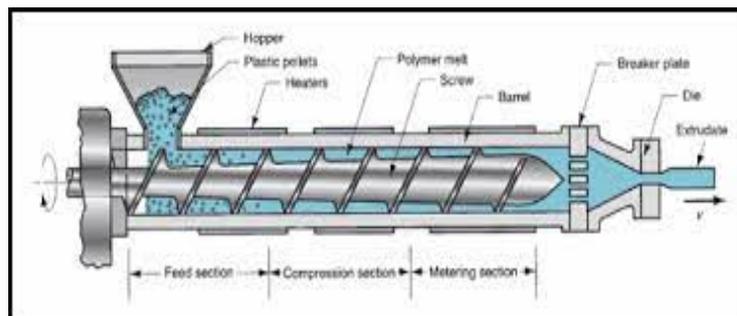


Figura 1.14: Extracción por extrusión [48].

1.5.3 Extracción bioquímica

Otro tipo de extracción es la bioquímica la cual esta asistida por enzimas.

Cada vez están siendo más utilizados para tratar fracciones lignocelulósica y material proteico. La enzima utilizada y las condiciones aplicadas se pueden estudiar para maximizar la recuperación de proteínas. El problema que se debe tener en cuenta es el coste de la enzima y si el coste es bajo el proceso se deberá realizar a gran escala.

Existen distintos tipos de enzimas a utilizar como son las carbohidrolasas, peptidasas o fosfolipasas entre otras. [38]

1.5.4 Tratamientos combinados

Por último, se debe hacer mención a otras técnicas de extracción como pueden ser tratamientos combinados.

Esto consiste en combinar enzimas con tratamientos físicos o físicoquímicos en los que destaca la utilización de ultrasonidos y peptidasas. El uso de enzimas puede favorecer los valores de recuperación dependiendo de las condiciones de operación y el tipo de enzima. Como ejemplo se evaluó el uso de serina para extraer aceite y proteína de copos de altramuz y soja donde el rendimiento es superior al 77%. [38]

1.6 Tecnologías para la recuperación de proteínas.

Por último, se van a desarrollar los distintos tipos de recuperación de proteína que se pueden utilizar. Se pueden organizar en cuatro grupos, separación por precipitación, por membranas, cromatografía y electroforesis.

1.6.1 Métodos de precipitación:

Los métodos utilizados para la precipitación de proteínas tienen como objetivo modificar las propiedades de la proteína o disolvente cambiando la fuerza iónica y el pH, utilizando disolventes o polímeros.

Precipitación isoelectrica:

Esta precipitación es utilizada para separar proteínas en el punto isoelectrico el cual tiene la solubilidad más baja. [49]

Se suele utilizar para proteínas con baja constante de hidratación o proteínas hidrófobas y su desventaja es que se necesita utilizar ácidos que pueden dañar las proteínas de forma irreversible. Es un método eficaz y proporciona la máxima recuperación de proteínas funcionales desprovistas de lípidos. El 50% de la precipitación de proteínas se obtiene con precipitación isoelectrica. [50]

Como ejemplos se utiliza para el aislamiento de una proteína sin toxinas, con bajo contenido de fibra, cenizas y lípidos y con gran contenido de proteína y energía, también se puede utilizar para proteínas extraídas de la langosta, ya que este alimento es un nutriente abundante y sostenible. [49]

Precipitación usando solventes orgánicos:

Los disolventes orgánicos como el etanol y la acetona se han utilizado para precipitar proteínas a partir de soluciones de baja fuerza iónica.

Se deben tener en cuenta parámetros como la concentración de disolvente, pH, temperatura o concentración de proteína.

En comparación con otros métodos, este proporciona una mayor separación, un mayor poder de selección, funcionamiento continuo y sencillo, bajo consumo de energía y gran capacidad de producción. Se utiliza a pequeña escala, y no se usa para aguas industriales debido a que sería económicamente inviable. [50]

Precipitación de sales neutras:

Este tipo de precipitación consiste en introducir una sal, cuando aumenta la concentración la solubilidad de la proteína en agua disminuye.

Una sal muy utilizada es el sulfato de amonio el cual es barato, fácilmente disponible, soluble en agua y con bajo riesgo de desnaturizar la proteína.

Es una tecnología poco selectiva ya que pueden precipitarse contaminantes y en ocasiones se puede necesitar eliminar sales lo que aumentaría el coste de recuperación. [50]

Polielectrolitos cargados:

Este método se ha utilizado para la precipitación de proteínas vegetales.

Inicialmente, los polielectrolitos son grupos con cargas aisladas que se van uniendo unos con otros juntando sus cargas y formando flóculos. Estos flóculos depende del pH, de la fuerza iónica y del peso molecular.

Se utilizan polisacáridos ácidos como carboximetilcelulosa, ácido poliacrílico entre otros. Las polietilaminas se utilizan como floculante en aguas residuales para la purificación de proteínas y también se utiliza hidroxietilcelulosa y lignosulfato para precipitar proteínas y grasas de las aguas residuales de las industrias de alimentos. [50]

Polímeros no iónicos:

Como polímeros usados en la precipitación de proteínas destacan los polietilenglicoles. Eliminan las proteínas de la solución y reducen la cantidad de agua disponible. La separación acuosa en dos fases en polietilenglicol y fosfatos de potasio se utiliza de forma común para la recuperación de extractos biológicos y extractos fermentados. [50]

En un ejemplo de este tipo de precipitación se ha observado que la recuperación es del 95,85% de proteína en aguas residuales, con lo que el sistema fue superior a otros métodos. [50]

Iones metálicos polivalentes:

Los iones metálicos polivalentes que pueden ser utilizados para precipitación de proteínas se dividen en tres grupos.

1. Los iones que se unen fuertemente a ácidos carboxílicos y a compuestos nitrogenados.
2. Los que se unen fuertemente solo a ácidos carboxílicos
3. Los que lo hacen fuertemente solo a compuestos nitrogenados.

Los iones metálicos empleados a bajas concentraciones se pueden eliminar mediante agentes quelantes o resinas de intercambio iónico. Para efluentes lácteos se utiliza CaCl_2 y FeCl_3 . El 80% de proteína se recuperó de las aguas residuales lácteas utilizando FeCl_3 con un pH de 10, y cuando este se reduce a 4 el porcentaje se redujo a 54%. [50]

1.6.2 Separación por membranas

Este tipo de filtración se ha utilizado para procesamiento de productos lácteos, bebidas, aceite, carne, fruta y verdura. La separación por membranas puede separar las proteínas de otras impurezas. [50]

Consiste en el uso de filtros de membrana semipermeable para concentrar un flujo de alimentación líquida dando dos flujos de productos de diferente composición. La membrana selecciona ciertos compuestos mientras restringe otros a través de ella, los componentes que atraviesan la membrana junto con el líquido son los “permeados” y el líquido retenido es el “retenido”. [50]

Diálisis:

Es un método de purificación que se basa en el gradiente de concentración como fuerza motriz debido a que las proteínas no pueden atravesar la membrana semipermeable. Generalmente este método se combina con otros métodos de separación.

Como ejemplo, se puede utilizar en una película de sílice. En este caso, la membrana se convierte en un nanofiltro lo que hace que se puedan separar y purificar proteínas de distintos tamaños. El tamaño de los poros de la membrana en este caso es menor de 50 nm. [49]

Ultrafiltración:

Dentro de la separación por membranas, la ultrafiltración es la técnica más utilizada para la recuperación de proteínas, concretamente sirve para la desalinización, desalcoholización y el enriquecimiento de proteínas. También se puede utilizar para aislar proteínas con un peso molecular cercano. [36] La presión hidrostática fuerza a un líquido contra una membrana semipermeable que conduce a la retención de sólidos en suspensión y solutos con altos pesos moleculares. La ultrafiltración es el método industrial más utilizado para la separación de proteínas de suero, este proceso se realiza a temperaturas menores de 55°C y una presión de 300 kPa con tamaño de poro de 200 a 250 nm y se utiliza para aumentar el contenido de proteína a un 85%. [51]

Se han realizado distintas modificaciones para aumentar los rendimientos de recuperación y estas modificaciones son las siguientes.

- Ultrafiltración en cascada: En este sistema el retenido o permeado de una etapa de la membrana se transfiere a la etapa siguiente o anterior como alimento y algunas corrientes también se pueden reciclar para mejorar el rendimiento. Tal disposición permite un enriquecimiento de la proteína del suero.
- Bio-catálisis: El objetivo de este sistema es aumentar el tamaño de las proteínas, utilizan membranas catalíticas para catalizar las proteínas durante la separación. La enzima más útil es la transglutaminasa dando lugar a la formación de un polímero de alto peso molecular que puede retenerse en la superficie exterior.
- Ultrafiltración de flujo tangencial de alto rendimiento: Utiliza la diferencia de tamaño de las partículas, así como la carga de la molécula y esto hace que se pueda utilizar eficazmente para obtener mayor eficiencia de separación. Una gran ventaja es que pueden separar biomoléculas con el mismo peso molecular en función de las diferencias en la carga. [51]

2. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es realizar un **estudio experimental** a escala de laboratorio del proceso de **extracción de proteína de dos residuos**, de origen agroalimentario, **el grano de café agotado y el kale**, utilizando la tecnología de **microondas** con solvente básico (NaOH).

Los objetivos parciales de este trabajo son los siguientes:

1. Realizar una **revisión bibliográfica** para establecer que residuos de origen agroalimentario tienen interés para recuperar su fracción proteica, así como revisar el estado del arte de las tecnologías de extracción y recuperación de proteínas existentes.
2. Seleccionar los **residuos agroalimentarios** objeto de estudio, la **técnica de extracción y las condiciones de operación** más adecuadas (tipo de solvente y concentración, temperatura y tiempo).
3. Realizar el **estudio experimental** a escala de laboratorio para la extracción de la fracción proteica de los residuos seleccionados utilizando la tecnología de extracción asistida por microondas con NaOH como solvente. Se empleará una **metodología de diseño de experimentos** para optimizar el rendimiento de extracción de proteína.
 - 3.1 Llevar a cabo unas experiencias preliminares, en el caso del kale, que serán necesarias para determinar las condiciones de operación del diseño experimental (en el caso del grano de café agotado ya se tenía información previa).
 - 3.2 Realizar el diseño experimental para la etapa de extracción utilizando el software Statgraphics Centurion XVIII.
 - 3.3 Obtener las condiciones óptimas de extracción que permitan obtener el máximo rendimiento de extracción de proteína de los residuos.
- 4 **Comprobar la viabilidad técnica y económica del proceso realizado a escala de laboratorio.** Para ello se realizarán los correspondientes balances de materia, selección de equipos, estimación del coste total de la planta y análisis de sensibilidad.

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha realizado en el marco del Proyecto “VALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS PRODUCIDOS EN CASTILLA Y LEÓN PARA LA RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS MEDIANTE TECNOLOGÍAS ECO-EFICIENTES”. Financiado por la Junta de Castilla y León – Consejería de Educación (VA028G19). Apoyo a GIR (JCYL). “10/07/2010 – 30/09/2021”, concedido al GIR de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos de la Uva.

3. SELECCIÓN DE ALTERNATIVAS

En este capítulo se van a seleccionar las alternativas más adecuadas para desarrollar el proyecto experimental de extracción de proteína a partir de residuos agroalimentarios. Para ello, se va a seleccionar el tipo de residuo agroalimentario a utilizar, el proceso de extracción y recuperación más adecuado, así como los parámetros de operación y proceso como son el tipo de solvente, su concentración, los intervalos de temperatura y el tiempo de extracción.

3.1 Selección de residuos agroalimentarios utilizados

Como elección de los residuos agroalimentarios de los cuales se van a extraer las proteínas se han tomado dos, un residuo representativo de la categoría de frutas o verduras y un residuo agroindustrial con la finalidad de observar las diferencias entre ellos.

En la categoría de fruta y verduras se ha elegido el residuo de **kale**, básicamente su tallo. El kale es una verdura poco conocida de la que se puede determinar su importancia proteica. Se trata de un superalimento el cual tiene un contenido en proteína elevado. El residuo de kale es especialmente novedoso y con un elevado potencial en el mercado actual por presentar buenas propiedades nutricionales y tener interesantes aplicaciones médicas. Además, no existen referencias bibliográficas previas de extracción de compuestos funcionales a partir de este tipo de residuo.

En la Tabla 3.1 podemos ver la composición de kale utilizado:

Tabla 3.1: Composición del kale utilizado

% w/w	M. Prima Extraída con agua + etanol
Celulosa	15,04 ± 0,03
Hemicelulosa	13,02 ± 0,08
LAI	2,08 ± 0,34
LAS	1,75 ± 0,03
Lignina total	3,83 ± 0,34
Cenizas totales	19,33 ± 0,06
Extractos	46,89 ± 0,73
En agua	43,75 ± 1,68
En etanol	3,14 ± 1,35
Grasa	
Proteína	15,71 ± 0,17
Humedad	4,61

De la Tabla 1 se puede destacar que el porcentaje de proteína es muy grande (15,71%) lo que lo hace un buen residuo a analizar, el porcentaje de celulosa es del (15,04%), el de hemicelulosa (13,02%) y el porcentaje de grasas no ha sido valorado.

El valor de la lignina ácida insoluble (LAI) es de 2,08%, el valor de la lignina ácida soluble es de 1,75%. Por último, cabe destacar que el porcentaje de cenizas es de 19,33% y el de humedad es de 4,61%.

Por otro lado, como residuo agroindustrial se ha elegido el **grano de café agotado** al ser un residuo muy conocido y utilizado, ya que la producción mundial es bastante alta. Además, el grano de café agotado contiene gran cantidad de aminoácidos diferentes con lo que es una forma de conocer el carácter proteico de un producto muy comercializado y consumido por la población como es el café. [26]

Se estima que la producción mundial anual de grano de café agotado es de 6 Mt [52]. Se producen alrededor de 650 Kg de café molido a partir de una tonelada de los granos de café verde. Además, durante la preparación de una tonelada de café soluble se generan alrededor de 2 kg de café húmedo molido. Con estos datos se puede estimar que actualmente en España se generan alrededor de 0,6 Mt/año de residuo de grano de café agotado. [53]

En la Tabla 3.2 se muestra la composición del grano de café agotado utilizado:

Tabla 3.2: Composición del grano de café agotado utilizado.

%	M. Prima Extraída con agua + etanol
Celulosa	16,27 ± 0,08
Hemicelulosa	27,68 ± 0,70
LAI	38,46 ± 0,71
LAS	0,71 ± 0,06
Lignina total	39,17 ± 0,71
Cenizas totales	0,13 ± 0,04
Extractos	12,43 ± 0,39
En agua	0,94 ± 0,09
En etanol	11,48 ± 0,33
Grasa	9,85 ± 0,16
Proteína	12,07 ± 0,40
Humedad	0,51

De la Tabla 3.2 se puede observar que el porcentaje de proteína del grano de café agotado es del 12,07%, el porcentaje de celulosa es de 16,27%, el de hemicelulosa es del 27,68% y el de grasa del 9,85%.

El valor de la lignina ácida insoluble (LAI) es de 38,46%, el valor de la lignina ácida soluble es de 0,71%. Por último, cabe destacar que el porcentaje de cenizas es de 0,13%. Y el de humedad del 0,51%.

Comparando las Tablas 1 y 2 de caracterización de residuos se puede observar que el porcentaje de celulosa y hemicelulosa en el grano de café agotado es más alto que en el caso del kale. Por otro lado, el valor de lignina ácida insoluble es mucho mayor en el caso del grano de café agotado, y el de lignina ácida soluble es algo más bajo al igual que el porcentaje de cenizas. Los extractos totales (tanto de agua como etanol) son mucho mayores en el caso del kale al igual que el porcentaje de humedad.

Por último, se observa que el porcentaje de proteína en ambos residuos es alto (12-15%), aunque en el caso del kale es mayor, por ello son adecuados para ser utilizados en este proyecto de extracción de proteína a partir de residuos agroalimentarios.

En resumen, el origen de la categoría a la que pertenece el kale (frutas y verduras) es diferente a la que pertenece el grano de café agotado (residuo agroindustrial), por lo que el análisis de estos dos residuos va a servir para establecer las diferencias entre estas dos clases de residuos.

En el caso del grano de café agotado, existen referencias bibliográficas para la extracción de la proteína de este residuo, pero en el caso del kale, no se encuentran apenas trabajos bibliográficos. La valorización de estos residuos es de interés ya que del grano de café agotado se han realizado estudios previos y se pueden comparar y validar los residuos obtenidos mientras que el residuo de kale es novedoso y los resultados pueden ser de interés para la obtención de extractos concentrados de proteína, de alto valor añadido, y con potenciales aplicaciones alimentarias, propiedades funcionales para la salud, etc.

3.2 Selección del método de extracción

Como método de extracción utilizado se ha elegido la extracción asistida por microondas ya que presenta ventajas potenciales frente a otras tecnologías de extracción. Se trata de una técnica de alta eficacia y es muy utilizada principalmente porque el tiempo de extracción requerido es menor que en otras técnicas y esto supone que se consuma menor energía con el consecuente ahorro energético. Además de esto es una técnica “verde” de bajo coste con un gran rendimiento de extracción del compuesto deseado. [15]

En la Tabla 3.3 se muestra una comparativa de la extracción por microondas con otras técnicas de extracción descritas con detalle en el capítulo de introducción mostrando las ventajas e inconvenientes que presentan cada una de ellas.

3.3 Selección de las condiciones de extracción

Para realizar la selección de los distintos parámetros de extracción, se ha realizado una revisión bibliográfica con la finalidad de recopilar los ejemplos de extracción de proteínas existentes para los residuos utilizados u otros de similares características.

En la Tabla 3.4 se recogen las principales variables de operación y proceso de extracción de proteína a partir de los residuos seleccionados.

Tabla 3.3: Ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de extracción de proteínas. [40]
[54]

	Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Extracciones convencionales	Extracción con disolventes	<p>Facilidad de uso.</p> <p>Buena eficacia.</p> <p>Muchas aplicaciones.</p> <p>Buenos rendimientos de extracción de proteína.</p>	<p>Elevado tiempo de extracción.</p> <p>Selección limitada de disolventes.</p> <p>Operaciones de purificación posteriores.</p> <p>Necesidad de gran cantidad de disolventes.</p> <p>Posibilidad de desnaturalización de las proteínas por modificación del pH.</p>
Técnicas de extracción avanzadas	Microondas	<p>Técnica rápida y sencilla.</p> <p>Bajo coste.</p> <p>Proceso simple.</p> <p>Tiempo de extracción corto.</p> <p>Gran rendimiento del producto.</p> <p>Reducción de desechos tóxicos.</p> <p>Tecnología verde.</p>	<p>Necesitan filtración posterior.</p> <p>Temperaturas muy elevadas que podrían desnaturalizar las proteínas.</p>
		<p>Disolventes más seguros.</p> <p>Extracción selectiva.</p>	<p>Disminución de la potencia con el tiempo.</p>

	Técnica	Ventajas	Inconvenientes
Técnicas de extracción avanzadas	Ultrasonidos	<p>Reducción del tamaño de los equipos.</p> <p>Respuesta rápida y aumento de la producción.</p> <p>Reducción del tiempo de extracción.</p>	Falta de uniformidad en la distribución energética.
	Fluidos supercríticos	<p>Limpia.</p> <p>Respetuosa con el medio ambiente.</p> <p>Rendimiento mejorado.</p> <p>Mejores propiedades de los productos.</p> <p>Más selectivo.</p>	<p>Elevado coste económico.</p> <p>Requiere elevadas presiones.</p>

Tabla 3.4: Ejemplos de extracción de proteínas con sus condiciones de operación.

Materia Prima	Tecnología de extracción	Disolvente y ratio (sólido/disolvente)	Temperatura	Tiempo	Tecnología de separación y purificación	Referencia
Salvado de arroz	Extracción asistida por microondas	Agua 0,89g/10 ml	1000 W de potencia	90 s		[55]
Salvado de arroz	Extracción asistida por ultrasonidos	0,99g/10 ml		18 min		[55]
Salvado de arroz	Extracción con disolventes subcríticos	Agua Etanol (0,227g/g) Acetona (0,512g/g)	100-220°C 207°C 230°C	30 min 5 min 5 min		[55]
Bagazo de cerveza	Extracción alcalina	0,1 M de NaOH	60°	1 hora	Precipitación ácida	[5]
Bagazo de cerveza	Extracción asistida por enzimas	3,33% con agua Se utilizan carbohidrolasas y peptidasas	60°C	4 horas		[5]

Materia Prima	Tecnología de extracción	Disolvente y ratio (sólido/disolvente)	Temperatura	Tiempo	Tecnología de separación y purificación	Referencia
Bagazo de cerveza	Extracción hidrotérmica	2,5 % al 4% con agua	60°C	24 horas		[5]
Kale	Tratamiento con agua caliente	Agua	20°C 47°C 50°C 53°C	3 min 5 min 3 y 5 min 3 y 5 min		[56] [57]
Grano de café agotado	Fluidos supercríticos	CO ₂ (dióxido de carbono)	De 313 k a 333 K	Se conoce la presión (150,200 y 250 bar)		[58]
Grano de café agotado	Extracción ácida	HCl 0,1 M NaCl 0,1 M	4 °C	12 horas	Precipitación ácida	[59]

3.3.1 Solventes

Como posibles solventes que se podrían elegir son el cloruro de sodio o el etanol, el hidróxido de sodio (NaOH) y el agua.

Por un lado, el agua destilada es siempre un buen solvente debido a sobre todo ser el líquido más común que existe y ser un solvente limpio, no contaminante y nada seguro. La extracción de proteína con agua se puede realizar obteniendo unos resultados adecuados, pero no es el mejor solvente para la extracción.

Por otro lado, la mejor secuencia de disolvente para extraer proteína es la del NaOH ya que con este solvente se obtienen los rendimientos más altos de extracción. El problema de este solvente es que tiene la desventaja de extraer toda la proteína haciendo imposible realizar un fraccionamiento posterior.

Si se toma como criterio la máxima recuperación de proteína existente en el residuo el NaOH es la mejor opción en este caso. [60]

Como solvente, teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes, ha sido elegido **el hidróxido de sodio (NaOH)**.

3.3.2 Concentración, temperatura y tiempo

En la extracción por microondas, que es la utilizada en este proyecto, tanto para el grano de café agotado como para el residuo de kale, se seleccionaron condiciones de operación similares de temperatura y tiempo, ya que son residuos de composición no muy diferente. Así, se seleccionaron:

Temperatura: 70°C-110°C, este rango de temperatura se debe a que a menos de 70°C de temperatura es difícil obtener un rendimiento de extracción de proteína adecuado, y no es recomendable que se superen los 110°C de temperatura porque se podría desnaturalizar la proteína. Las concentraciones de NaOH usadas han sido **0,1M, 1M y 1,5M**. **El tiempo de extracción está comprendido entre 5, 10 o 15 minutos**, debido a que el microondas necesita tiempos de extracción cortos.

En lo referido a la concentración, en el caso del grano de café agotado se seleccionó el intervalo de concentraciones de NaOH de **0,1 M a 1 M**. Como los rendimientos alcanzados no eran muy elevados (inferiores a un 50%) se decidió emplear concentraciones ligeramente superiores con el **residuo de kale**, empleando en este caso un intervalo de **0,5M a 1,5M**, a fin de aumentar el rendimiento de extracción.

4. TRABAJO EXPERIMENTAL: EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS

En este apartado se va a explicar el proceso experimental que se ha realizado en este proyecto, mostrando los resultados de rendimiento de la proteína en el caso tanto del grano de café agotado como del kale, analizando estos resultados y comparándolos entre sí y con algunos trabajos bibliográficos.

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Materia prima y reactivos

Como materias primas se han utilizado:

Grano de café agotado: El café agotado ha sido proporcionado por la empresa Productos Solubles S.A. (Palencia), se secó en un horno a 50°C, se molió con un molinillo de café (Moulinex, A505, Francia) hasta obtener una partícula de tamaño inferior a 1 mm. El contenido en humedad fue inferior al 1%. Los SCG se almacenaron a 4°C hasta su uso. La composición del grano de café agotado expresada en porcentaje en masa en base seca se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Composición del grano de café agotado utilizado.

% w/w	
Celulosa	16,27 ± 0,08
Hemicelulosa	27,68 ± 0,70
LAI	38,46 ± 0,71
LAS	0,71 ± 0,06
Lignina total	39,17 ± 0,71
Cenizas totales	0,13 ± 0,04
Extractos	12,43 ± 0,39
En agua	0,94 ± 0,09
En etanol	11,48 ± 0,33
Grasa	9,85 ± 0,16
Proteína	12,07 ± 0,40

Kale: El kale ha sido proporcionado por la empresa Natursnacks, localizado en Pedrajas de San Esteban (Valladolid), se cortó, se secó en un horno a 50°C, se

molió con un molinillo de café (Moulinex, A505, Francia) hasta obtener una partícula de tamaño inferior a 1 mm. El contenido en humedad es del 4,6%.

La composición del kale expresada en porcentaje en masa en base seca se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Composición del kale utilizado.

% w/w	M. Prima Extraída con agua + etanol
Celulosa	15,04 ± 0,03
Hemicelulosa	13,02 ± 0,08
LAI	2,08 ± 0,34
LAS	1,75 ± 0,03
Lignina total	3,83 ± 0,34
Cenizas totales	19,33 ± 0,06
Extractos	46,89 ± 0,73
En agua	43,75 ± 1,68
En etanol	3,14 ± 1,35
Grasa	No determinada
Proteína	15,71 ± 0,17

Los reactivos utilizados en el trabajo experimental han sido los siguientes:

- Hidróxido de sodio (NaOH) de la casa Panreac, que tiene una pureza del 98%, el cual será utilizado para el tratamiento de la materia prima utilizando el microondas.
- Ácido sulfúrico con una pureza del 98%, (H₂SO₄) introducido antes de realizar la digestión, este ácido con una concentración de 0,05 M también se utiliza para la valoración de la proteína contenida en la materia prima, tras la realización del NKT (Proceso nitrógeno Kjeldahl).
- Agua destilada tipo II.

El procedimiento experimental llevado a cabo para la extracción de proteína es similar con el grano de café agotado y con el residuo de kale.

4.1.2 Extracción de la proteína mediante microondas.

Acondicionamiento/pretratamiento: Tal y como se ha indicado previamente, el grano de café agotado proporcionado se saca de la cámara frigorífica y se deja secar en la estufa durante tres días, los granos son grandes por lo que primero se debe introducir la materia prima en un molinillo de café, donde se muele hasta obtener el tamaño deseado para el tratamiento posterior (inferior a 1 mm). En las Figuras 4.1 y 4.2 se muestra el grano de café agotado seco y tras ser molido.



Figura 4.1: Grano de café agotado seco

Figura 4.2: Grano de café molido

Tal como se ha indicado anteriormente, el kale se saca de la cámara frigorífica en la que se encuentra almacenado, se corta y se introduce en una estufa donde se deja secar unos 3 días.

Tras esto, se introduce en el molinillo, donde se muele hasta obtener un tamaño adecuado (inferior 1mm) para su tratamiento posterior. En las Figuras 4.3 y 4.4 se muestran el kale fresco antes de ser secado y el kale recién molido.



Figura 4.3: Residuo de kale fresco

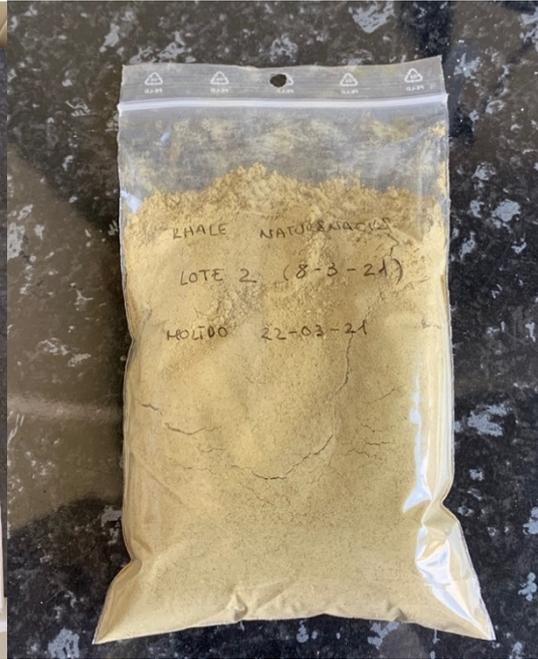


Figura 4.4: Residuo de kale recién molido

Extracción alcalina asistida con microondas: La proteína tanto del café como del kale se va a extraer con un tratamiento con microondas utilizando NaOH como solvente.

El equipo de microondas empleado es el modelo multiwave PRO SOLV reactor 50 Hz con rotor tipo 16HF100 (Anton Para GmbH, Austria, Europa). El microondas está compuesto por dos magnetrones de 1000W. Se utilizan tubos de presión, que se introducen en tubos cerámicos. Estos tubos pueden tener unos 100 ml de capacidad y deben introducirse, junto con la disolución que se desea extraer, unos imanes agitadores.

En este caso, se utilizan cuatro tubos y en uno de ellos se coloca una sonda que mide la presión y la temperatura dentro del tubo. La finalidad de este sensor es controlar la energía que el microondas aplica al reactor.

En la Figura 4.5, se puede observar el equipo de microondas utilizado.



Figura 4.5: Equipo de extracción por microondas

En primer lugar, se mezcla la materia prima acondicionada (kale o grano de café agotado) con NaOH utilizando distintas concentraciones de este reactivo dependiendo del experimento a realizar, también se han realizado experimentos con agua como solvente.

Se pesan 5 g de grano de café agotado y se disuelven en 50 mL de la disolución de NaOH con agua destilada tipo II a distintas concentraciones, con la finalidad de trabajar con una relación sólido-líquido 1/10 (%p/v). Este proceso se realiza de forma similar en cada uno de los cuatro tubos que serán introducidos al microondas.

En el caso del kale, el procedimiento es el mismo, con la diferencia de que en este caso se pesan 5,2 g de kale.

Tras esto, se introducen los tubos en el microondas y se pone a funcionar, fijando unas condiciones de temperatura y unos tiempos distintos para cada experimento. Tras la finalización del proceso de extracción, el extracto líquido y el sólido agotado se separan por centrifugación.

Separación de las dos fases por centrifugación: Tras la extracción por microondas, el slurry resultante se introduce en dos tubos de centrífuga cargados con volúmenes similares y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos empleando una centrífuga modelo.

Tras la primera centrifugación, el líquido se recoge en una probeta para conocer el volumen de líquido que se ha conseguido, y el sólido se lava con agua destilada y tras igualar los volúmenes en ambos botes se introduce de nuevo en la centrífuga.

Tras este primer lavado, el líquido se desecha y el sólido se vuelve a mezclar con agua destilada y se procede al segundo lavado en la centrifugadora.

Finalmente, el líquido se desecha y el sólido se coloca en una bandeja de papel de aluminio y se introduce en la estufa, donde se dejará secar unos dos días.

En las figuras 4.6 y 4.7 podemos ver el extracto obtenido tras una centrifugación tanto del grano de café agotado como el kale.



Figura 4.6: Extracto tras centrifugación del grano de café agotado



Figura 4.7: Extracto tras centrifugación del kale

Pasados estos días, se retira de la estufa, se pesa para conocer la masa de sólido obtenido, y se introduce en una bolsa. Este sólido será utilizado posteriormente para determinar la proteína extraída. En las Figuras 4.8 y 4.9 se puede ver dos extractos de kale uno antes de ser introducido en la estufa y otro tras dos días en la estufa.



Figura 4.8: Extracto del kale antes de ser introducido en la estufa



Figura 4.9: Extracto del kale al sacarle de la estufa

4.1.3 Diseño de experimentos (DOE)

Para seleccionar las condiciones de operación adecuadas en la extracción, asistida por microondas, de proteína a partir del grano de café agotado se propuso un diseño de experimentos empleando el software comercial estadístico Statgraphics Centurion XVII.

Los factores o variables independientes escogidos fueron la temperatura (70/90/110°C), el tiempo (5/10/15 min) y la concentración de NaOH (0,1/0,5/1 M). La variable respuesta seleccionada fue el rendimiento de extracción de proteína.

El diseño se compuso de 16 experiencias en las que se incluyeron un punto y dos réplicas en el centro del dominio seleccionado para cada factor en estudio y seis puntos estrella, dos para cada factor

Los experimentos realizados se indican en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Diseño de experimentos del grano de café agotado.

Run	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Conc NaOH (M)
1	90	10	1,30681
2	70	15	1
3	90	18,409	0,55
4	110	15	0,1
5	123,636	10	0,55
6	90	10	-0,206807
7	110	15	1
8	70	15	0,1
9	90	10	0,55
10	70	5	0,1
11	110	5	0,1
12	70	5	1
13	110	5	1
14	56,3641	10	0,55
15	90	10	0,55
16	90	1,59104	0,55

Para seleccionar las condiciones de operación adecuadas en la extracción, asistida por microondas, de proteína a partir del kale se propuso un diseño de experimentos empleando el software comercial estadístico Statgraphics Centurion XVII.

Los factores o variables independientes escogidos fueron la temperatura (70/90/110°C), el tiempo (5/10/15 min) y la concentración de NaOH (0,5/1/1,5 M). La variable respuesta seleccionada fue el rendimiento de extracción de proteína.

El diseño se compuso de 16 experiencias en las que se incluyeron un punto y dos réplicas en el centro del dominio seleccionado para cada factor en estudio y seis puntos estrella, dos para cada factor.

Los experimentos realizados se indican en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Diseño de experimentos del kale.

Run	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Conc NaOH (M)
RUN	°C	min	M
1	90	10	1
2	90	10	1
3	123,636	10	1
4	56,3641	10	1
5	110	5	0,5
6	70	5	1,5
7	90	10	1,8409
8	90	18,409	1
9	110	15	1,5
10	70	5	0,5
11	90	1,59104	1
12	70	15	0,5
13	110	15	0,5
14	70	15	1,5
15	110	5	1,5
16	90	10	0,159104

4.1.4 Determinación de la proteína mediante NKT

Una vez que se saca el sólido de la estufa se va a realizar con él la determinación de la proteína por el método del NKT.

Pesamos unos 0,20 gramos aproximadamente del sólido molido y los introducimos en un tubo de digestión al que se le añade un plato poroso, 6 mililitros de ácido sulfúrico concentrado al 98%, y una pastilla de catalizador. Realizamos el proceso dos veces para cada experiencia.

Tras esto, se colocan los tubos en el bloque de digestión, el colector de humos y se conecta la trompa de vacío abriendo el agua de refrigeración, se produce una digestión de esos tubos durante tres horas programando una rampa de temperaturas y en el último paso se programa a 370°C durante 60 minutos. Se deja enfriar y se pasa a la destilación mediante NKT. Se siguen las instrucciones del equipo de destilación. En las figuras 4.10 y 4.11 se muestra el equipo de digestión y destilación.



Figura 4.10: Equipo de digestión utilizado en el laboratorio



Figura 4.11: Equipo de destilación.

Tras seguir este procedimiento, con el líquido introducido en un Erlenmeyer se procede a la valoración.

Se van echando pequeñas proporciones de ácido sulfúrico a 0,05 M, el líquido que en un principio está de un color verde se convertirá, tras pasar por distintas gamas de colores, al color morado brillante deseado y se tienen en cuenta el volumen de ácido sulfúrico introducido para el tratamiento posterior de los datos.

En las Figuras 4.12 y 4.13 se muestran los colores inicial y final de la valoración.



Figura 4.12: Valorización color inicial: Verde



Figura 4.13: Valorización color final: Morado

Determinación del rendimiento de extracción: Tras la realización del proceso, se va a calcular la concentración de nitrógeno Kjeldhal expresada en miligramos, para ello se utiliza la fórmula:

[Ecuación 4.1]
$$mgN/L = \frac{(N*V)14000}{V_m}$$

N: normalidad de sulfúrico utilizado en la valoración.

V: volumen en ml de sulfúrico consumido en la valoración.

V_m : volumen en ml de muestra que se ha digerido.

El resultado se puede expresar en miligramos de nitrógeno por gramos de muestra y %N.

[Ecuación 4.2]
$$mgN/Kg = \frac{(N*V)14000}{g}$$

[Ecuación 4.3]
$$\%N = \frac{(N*V)14}{10g}$$

Se determinará el contenido de proteína del residuo original y del sólido agotado tras el proceso de extracción. De esta forma el rendimiento de extracción se podrá calcular como:

$$\text{[Ecuación 4.4] } \textit{Rendimiento} = \frac{\% \textit{proteína materia prima} - \% \textit{proteína experimento}}{\% \textit{proteína materia prima}} * 100$$

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Resultados preliminares

Inicialmente, antes de realizar el diseño de experimentos, y con el fin de establecer el intervalo de las variables de operación a incluir en el DOE, se han realizado unas pruebas preliminares (8 concretamente) de extracción de la proteína del kale utilizando como solvente el hidróxido de sodio.

Estas experiencias se realizaron únicamente para el residuo de kale, ya que para el residuo de café el equipo de investigación ya contaba con esta información preliminar. Se realizaron un total de 8 experiencias trabajando con dos temperaturas (70 y 110°C), tiempos de 5 y 15 min, y concentraciones de NaOH de 0,5 y 1,5 M. En la siguiente tabla, se pueden observar las condiciones de operación seleccionadas junto con el porcentaje de recuperación gravimétrica y el pH obtenidos.

Tabla 4.5: Pruebas de kale con NaOH donde se conoce el RTG y el pH

Pruebas	Condiciones de pretratamiento			RTG (%)	pH
	T ^a (°C)	T (min)	NaOH (M)		
1	70	5	0,5	40,2	13,1
2	70	15	0,5	52,1	13,5
3	70	5	1,5	49,0	14,1
4	70	15	1,5	49,5	14,2
5	110	5	0,5	31,4	13,1
6	110	15	0,5	22,0	13,0
7	110	5	1,5	29,4	14,2
8	110	15	1,5	19,5	14,1

De estas pruebas previas se puede concluir que la recuperación total gravimétrica es mayor cuando se emplean condiciones de pretratamiento más suaves de temperatura y concentración, siendo el máximo de RTG el correspondiente a la experiencia 2 (70°C, 15 min y 0,5 M).

En lo que respecta al pH, todas las experiencias presentan valores comprendidos entre 13 y 14, lo que corresponde a extractos de carácter muy básico debido al intervalo de concentraciones de solvente seleccionadas.

Tabla 4.6: Pruebas de kale con NaOH donde se conoce el rendimiento de extracción

PRUEBA	mg N/Kg pret	mg N/Kg mat prim	% N	Proteína (%)	Rendimiento extracción (%)
1	13,6	5,5	0,55	341	80,4
2	13,2	6,9	0,69	4,30	75,3
3	6,8	3,3	0,33	2,09	88,0
4	8,0	4,0	0,40	2,49	85,7
5	7,4	2,3	0,23	1,45	91,7
6	6,6	1,5	0,15	0,91	94,8
7	5,0	1,5	0,15	0,92	94,7
8	4,9	0,9	0,09	0,59	96,6
Khale Lote1 (materia prima sin pretratar)	-	27871,22	2,79	17,42	-

En la Tabla 4.6 se presentan los valores de concentración de proteína (medida con nitrógeno) en la materia prima original y en los diferentes extractos, así como el valor del rendimiento de extracción. A la vista de estos resultados se comprueba que los mayores rendimientos de extracción de proteína se dan a mayores temperaturas. Por otro lado, tiempos más largos y una mayor concentración de NaOH también hace que el rendimiento de extracción sea mayor, pero en menor medida. La temperatura es el factor más influyente, seguido de la concentración de NaOH, mientras que el tiempo parece tener poco efecto en el rendimiento de extracción.

La prueba con mayor rendimiento es la prueba 8, correspondiente a los valores más altos en todas las variables (110°C, 15 min, 1,5 M de NaOH), con un rendimiento del 96,6%. Estos resultados son lógicos ya que cuanto más drásticas son las condiciones de extracción más se favorece la solubilidad de la proteína en el solvente debido a la modificación de la estructura del sólido a extraer (acceso más sencillo del solvente al soluto al extraer) a la mejora de la transferencia de materia al aumentar la temperatura.

4.2.2 Resultados DOE

En este trabajo se han realizado en el laboratorio dos diseños de experimentos de extracción de proteína, uno del grano de café agotado y otro del kale utilizando como solvente, en ambos casos, el hidróxido de sodio.

Escenario 1: Extracción de proteína del grano de café agotado

En primer lugar, se realizó el DOE del grano de café agotado con 18 experiencias. En la siguiente tabla se pueden observar las condiciones a las que se realizó cada experiencia, y el RTG (recuperación total gravimétrica) y el pH obtenidos.

Tabla 4.7: DOE del grano de café agotado con NaOH donde se conoce el RTG y el pH

RUN	Tª (°C)	t (min)	NaOH (M)	RTG (%)	pH preH
1	90	10	1,31	80,3	13,5
2	70	15	1	89,3	13,4
3	90	18.41	0,55	74,5	13,4
4	110	15	0,1	77,7	10,4
5	124	10	0,55	58,2	13,0
6	90	10	0	92,9	4,7
7	110	15	1	64,4	13,5
8	70	15	0,1	85,3	12,5
9	90	10	0,55	75,0	13,4
10	70	5	0,1	80,4	12,8
11	110	5	0,1	79,0	10,9
12	70	5	1	83,6	13,5
13	110	5	1	66,4	13,5
14	56	10	0,55	85,4	13,5
15	90	10	0,55	78,1	13,5
16	90	1.59	0,55	83,0	13,5

Podemos ver que el mayor porcentaje de RTG corresponde a la experiencia 6 donde la temperatura es de 90°C, el tiempo de mantenimiento es de 10 minutos y la concentración de NaOH es de cero. De estos experimentos se puede observar que cuando la temperatura es menor el valor de RTG es mayor, generalmente a menor concentración de NaOH el valor de RTG es mayor. Esta tendencia corrobora el hecho de que se consiguen RTG mayores (80-90%) cuando las condiciones de pretratamiento son más suaves (con solvente agua y temperaturas 70-90°C, siendo las RTG más bajass cuando se emplean los valores más altos de concentración y temperatura.

El pH de los experimentos suele estar entre 12 y 13 (carácter básico), salvo en los casos en los que la concentración de NaOH es muy baja, a 0,1M el pH es alrededor de 10 y cuando se trabaja con agua el pH es de 4 (carácter ácido).

Tabla 4.8: DOE del grano del café agotado con NaOH donde se conoce el RTG y el pH

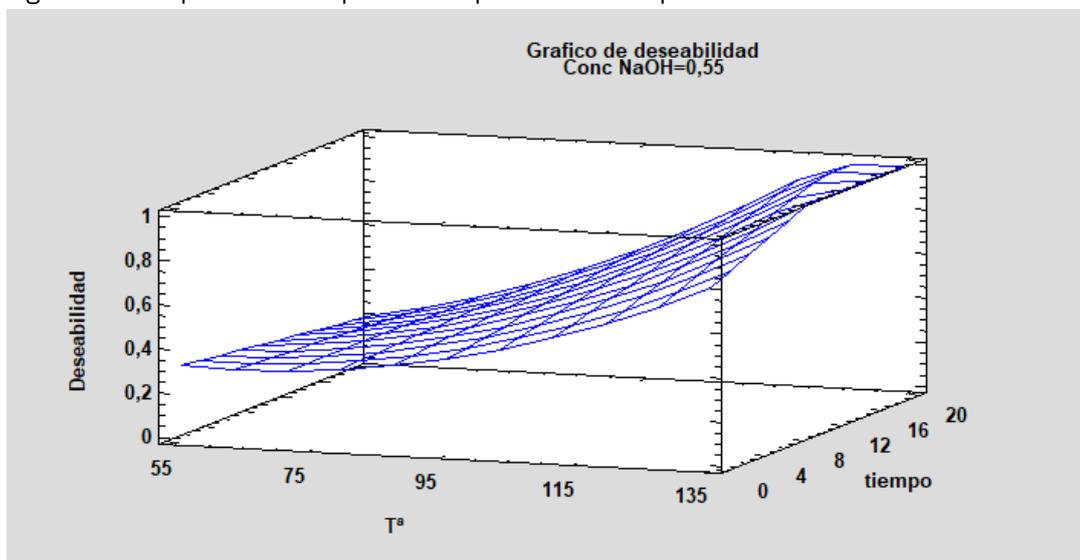
RUN	g N/Kg pret	g N/Kg mat prim	% N	Proteína (%)	Rendimiento extracción (%)
1	12,3	9,9	0,99	6,17	48,86
2	15,3	13,7	1,37	8,53	29,30
3	16,4	12,2	1,22	7,63	36,83
4	17,7	13,8	1,38	8,60	28,77
5	16,1	9,4	0,94	5,86	51,45
6	18,8	17,5	1,75	10,91	9,63
7	11,9	7,7	0,77	4,79	60,28
8	18,8	16,0	1,60	10,02	16,96
9	16,5	12,3	1,23	7,72	36,08
10	19,2	15,4	1,54	9,65	20,09
11	18,1	14,3	1,43	8,92	26,14
12	16,2	13,6	1,36	8,49	29,67
13	13,8	9,1	0,91	5,72	52,65
14	17,1	14,6	1,46	9,14	24,28
15	17,7	13,8	1,38	8,62	28,59
16	16,7	13,8	1,38	8,65	28,32
Res café (materia prima sin tratar)	-	15,5	1,93	12,07	-

De la Tabla 4.8 podemos ver que el mayor rendimiento (60,28%) ocurre en la experiencia 7 con una temperatura de 110°C, tiempo de mantenimiento de 15 minutos y una concentración de NaOH de 1M y el menor rendimiento (9,63%) ocurre en la experiencia 6 donde la temperatura es de 90°C, el tiempo de mantenimiento es de 10 minutos y se emplea agua como solvente.

De forma general, se puede ver que el rendimiento de extracción mejora de forma significativa con el aumento de la temperatura y la concentración de NaOH empleada, si bien el tiempo no parece ser un factor muy influyente.

En la figura 4.14 se puede ver la gráfica de superficie de respuesta (temperatura vs tiempo).

Figura 4.14: Superficie de respuesta Temperatura vs tiempo del escenario 1.



En la Tabla 4.14 se observa que la superficie de respuesta se ajusta a una ecuación polinómica de segundo orden y se observa que la respuesta mejora según va aumentando la temperatura y el tiempo, siendo la temperatura el factor más influyente.

La ecuación de ajuste es: $\text{Rendimiento} = 32,36 + 17,21 \cdot T + 3,09 \cdot t + 21,37 \cdot c + 3,77 \cdot T^2 + 3,44 \cdot T \cdot t + 9,03 \cdot T \cdot c + 0,03 \cdot t^2 + 1,94 \cdot t \cdot c - 2,33 \cdot c^2$.

Escenario 2: Extracción de proteína del residuo de kale

Por último, se realizó un DOE del kale con NaOH como disolvente con 18 experiencias. En la siguiente tabla se pueden observar las condiciones a las que se realizó cada experiencia, y el RTG (recuperación total gravimétrica) y el pH obtenidos.

Tabla 4.9: DOE del kale con NaOH donde se conoce el RTG y el pH.

RUN	T^a (°C)	t (min)	NaOH (M)	RTG (%)	pH preH
1	90	10	1	40,7	13,9
2	90	10	1	48,4	13,8
3	124	10	1	29,6	13,7
4	56	10	1	54,3	14,1
5	110	5	0.5	42,2	13,4
6	70	5	1.5	54,0	14,1
7	90	10	1.84	45,0	14,1
8	90	18.41	1	41,9	13,8
9	110	15	1.5	31,77	14,1
10	70	5	0.5	51,96	13,7
11	90	1.59	1	42,75	13,8
12	70	15	0.5	56,54	13,6
13	110	15	0.5	36,74	13,3
14	70	15	1.5	45,90	14,1
15	110	5	1.5	26,00	14,0
16	90	10	0.16	53,86	11,3

El mayor porcentaje de RTG (56,54%) ocurre en el experimento 12 donde la temperatura es de 70°C, el tiempo de mantenimiento es de 15 minutos y la concentración de NaOH es de 0,5 M. De estos experimentos se puede observar que cuando la temperatura es menor el valor de RTG es mayor, generalmente a menor concentración de NaOH el valor de RTG es mayor. Esta tendencia corrobora el hecho de que se consiguen unos valores de RTG mayores (50-55%) cuando las condiciones de pretratamiento son más suaves (concentración de 0,16 M de NaOH y temperaturas (70-90°C), siendo las RTG más bajas cuando se emplean los valores más altos de concentración y temperatura.

El pH se encuentra entre 11 y 14 (carácter básico) salvo en los casos en los que la concentración de NaOH es muy baja, a 0,16 M el pH es alrededor de 11.

Tabla 4.10: DOE del kale con NaOH donde se conoce el RTG y el pH

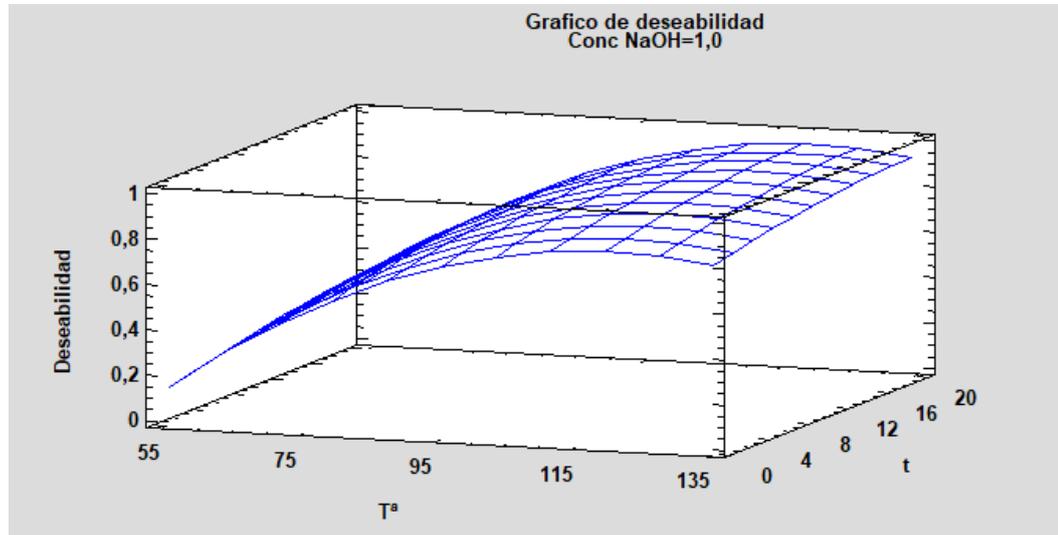
RUN	g N/Kg pret	g N/Kg mat prim	% N	Proteína (%)	Rendimiento extracción (%)
1	4,7	1,9	0,19	1,19	92,40
2	6,0	2,9	0,29	1,80	88,51
3	5,0	1,5	0,15	0,93	94,07
4	10,3	5,6	0,56	3,49	77,76
5	9,6	4,1	0,41	2,53	83,87
6	7,9	4,3	0,43	2,68	82,95
7	4,6	2,1	0,21	1,29	91,78
8	4,5	1,9	0,19	1,18	92,46
9	4,7	1,5	0,15	0,94	94,02
10	12,8	6,6	0,66	4,14	73,62
11	6,9	2,9	0,29	1,83	88,34
12	13,1	7,4	0,74	4,62	70,61
13	8,2	3,0	0,30	1,89	87,94
14	6,3	2,9	0,29	1,80	88,52
15	4,4	1,1	0,11	0,72	95,44
16	14,3	7,7	0,77	4,80	69,44
Khale (materia prima sin pretratar, lote 2)	-	25130,84	2,51	15,71	-

En la Tabla 8 se puede observar que el mayor rendimiento (95,44%) se da en la experiencia 15 donde la temperatura es de 110°C, el tiempo de mantenimiento es de 5 minutos y la concentración de NaOH es de 1,5M. El menor rendimiento (70,61%) se da en la experiencia 12 donde la temperatura es de 70°C, el tiempo de mantenimiento es de 15 minutos y la concentración de NaOH es de 0,5 M.

Cuando la temperatura es mayor el rendimiento es más alto, y por otro lado, cuando la concentración de NaOH es mayor el rendimiento es mayor, con lo cual se corrobora la tendencia obtenida en las experiencias preliminares, en condiciones de operación más severas de temperatura y concentración de solvente, el rendimiento de extracción de proteína del kale es mayor.

En la figura 4.15 se muestra la gráfica de superficie de respuesta (temperatura vs tiempo).

Figura 4.15: Superficie de respuesta Temperatura vs tiempo del escenario 2.



En la Tabla 4.15 se observa que la superficie de respuesta se ajusta a una ecuación polinómica de segundo orden y se observa que la respuesta mejora según va aumentando la temperatura y el tiempo, siendo la temperatura el factor más influyente. En este caso se observa que la deseabilidad de respuesta es mayor que en el caso del kale, con lo que el estudio se encuentra mejor realizado. (el rendimiento de proteína es mayor).

La ecuación de ajuste es: $\text{Rendimiento} = 90,53 + 10,70 \cdot T + 1,78 \cdot t + 12,08 \cdot c - 3,55 \cdot T^2 + 0,023 \cdot T \cdot t - 2,40 \cdot T \cdot c - 0,38 \cdot t^2 + 0,77 \cdot t \cdot c - 7,30 \cdot c^2$.

Comparando los resultados obtenidos del grano de café agotado y del kale, se puede observar que el rendimiento de proteína en el kale (el mayor es del 98%), es siempre mayor que el rendimiento del grano de café agotado (el mayor es del 69%), y esto tiene sentido, ya que como se ha explicado anteriormente hay mucho mayor contenido de proteína en el kale que en el grano de café agotado. Los pH son más o menos los mismo en los dos casos.

En ambos casos, también ocurre que a mayor temperatura y concentración de NaOH el rendimiento es mayor.

4.2.3 Óptimo y confirmación del óptimo

En este apartado, se muestra el experimento óptimo de extracción de proteína, primero del grano de café agotado (escenario 1) y luego del kale (escenario 2), viendo el rendimiento, también se repitió el óptimo en el laboratorio (experimento confirmado) y se calculó su rendimiento.

Escenario 1: Óptimo del residuo de grano de café agotado

En la Tabla 4.11 se pueden ver las condiciones del óptimo y del óptimo confirmado del grano de café agotado junto con su rendimiento de extracción.

Tabla 4.11: Escenario 1: Condiciones de operación óptimas para el grano de café agotado

RUN	T ^a (°C)	t (min)	NaOH (M)	Rendimiento Extracción (%)
17 OPT	113	3.33	1.30	61,2
17 OPT CONFIRMADO	113	3,33	1,30	61,0

Como hemos visto en la Tabla 4.11, el óptimo se realiza a **113°C, 3,33 minutos de tiempo de mantenimiento y concentración de NaOH de 1,30M**, el porcentaje de RTG (recuperación total gravimétrica) es de un 58,4% y el pH es de 13,4, con lo cual tiene un carácter básico.

El rendimiento del óptimo según el programa con el que se ha realizado el DOE es de 61,2%, al realizar el óptimo en el laboratorio, el rendimiento calculado es de 61%, con lo cual el error es de un 0,33% por lo que se puede determinar que el óptimo está bien realizado ya que el error es muy bajo.

Tras la realización del óptimo se realizaron las experiencias 18 y 19 que se muestran en la Tabla 4.12, con la finalidad de analizar el efecto de un aumento de la concentración de NaOH en las condiciones óptimas.

Tabla 4.12: Condiciones de operación y rendimiento de las experiencias 17, 18 y 19 del escenario 1 (grano de café agotado).

RUN	T ^a (°C)	t (min)	NaOH (M)	Rendimiento extracción (%)
17	113	3,33	1,30	61,2
18	113	3,33	1,60	55,5
19	113	3,33	2	69,8

En la Tabla 4.12 se muestra que tanto la temperatura (113°C) y el tiempo de extracción (3,33 min) utilizados son los del óptimo y se ha aumentado la concentración de NaOH. Se observa que el rendimiento de extracción de la proteína aumenta cuando la concentración es mayor, y las experiencias 18 y 19 son las que mayor rendimiento tienen, debido, tanto a las altas concentraciones como a las altas temperaturas de ambas experiencias. La experiencia 19 tiene un rendimiento mayor que la del óptimo ya que su concentración de NaOH es bastante más alto (2 M).

Escenario 2: Óptimo del residuo de kale

En la Tabla 4.13 se pueden ver las condiciones del óptimo y del óptimo confirmado del kale junto con su rendimiento de extracción.

Tabla 4.13: Escenario 2: Condiciones de operación óptimas para el kale.

RUN	T ^a (°C)	t (min)	NaOH (M)	Rendimiento extracción (%)
17 OPT	109	14,93	1,29	96,55
17 OPT CONFIRMADO	109	14,93	1,29	95,97

Como hemos visto en la Tabla 4.13, el óptimo se realiza a **109°C, 14,93 minutos de tiempo de mantenimiento y concentración de NaOH de 1,29M**, el porcentaje de RTG (recuperación total gravimétrica) es de un 22,81% y el pH es de 13,48, con lo cual tiene un carácter básico.

El rendimiento del óptimo según el programa con el que se ha realizado el DOE es de 96,6%, al realizar el óptimo en el laboratorio, el rendimiento calculado es de 96,0%, con lo cual el error es de un 0,62%, por lo que se puede determinar que el óptimo está bien realizado ya que el error es muy bajo.

Tras la realización del óptimo se realizaron las experiencias 18 y 19 que se muestran en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14: Escenario 2: Condiciones de operación y rendimientos de las experiencias 17, 18 y 19 del escenario 2 (kale).

RUN	T ^a (°C)	t (min)	NaOH (M)	Rendimiento extracción (%)
17	109	14,93	1,29	96,55
18	109	14,93	1,6	98,1
19	109	14,93	2	96,9

En la Tabla 4.14 se muestra que tanto la temperatura (109°C) y el tiempo de mantenimiento (14,93 min) utilizados son los del óptimo y se ha aumentado la concentración de NaOH. Se observa que el rendimiento de extracción de la proteína aumenta cuando la concentración es menor, y estas dos experiencias son las que mayor rendimiento tienen, debido, tanto a las altas concentraciones como a las altas temperaturas de ambas experiencias. Los rendimientos en ambas son mayores que en el óptimo al tener mayor concentración y en este caso el mayor rendimiento mayor lo tiene la experiencia 18 con lo que la concentración de NaOH más adecuada es la de 1,6 M.

Comparación escenarios 1 y 2

Por último, comparando los óptimos del grano de café agotado (113°C, 3,3 minutos, 1,3 M) y del kale (109°C, 15 minutos, 1,3 M) podemos observar que las temperaturas son muy cercanas y las concentraciones prácticamente iguales mientras que el tiempo de mantenimiento es mayor en el caso del kale. Los valores de pH son similares y el porcentaje de RTG es algo mayor en el caso del grano del café agotado.

El rendimiento es mucho más alto en el caso del kale, lo que es lógico al ser el kale un residuo con mayor contenido proteico que el grano de café agotado (mayor gradiente de concentración o fuerza impulsora en el proceso de extracción).

Por otro lado, el kale tiene un contenido más bajo de lignina, lo que facilita el acceso de solvente al soluto de interés (en este caso la proteína).

Comparación con algunos trabajos bibliográficos

En el caso del grano de café agotado, al tener cierta información previa de él se han comparado los resultados realizados con algunos trabajos bibliográficos.

Un ejemplo es una extracción ácida para extraer la proteína del grano de café agotado, como solventes se utilizan el HCl a 0,1 M y el NaCl a 0,1 M, la temperatura de operación es a 4°C y el proceso se realiza en 12 horas, en este caso el rendimiento de proteína fue de entre el 51% y el 63,8%, con lo que los resultados concuerdan con los de este trabajo, ya que el rendimiento de proteína del óptimo en el caso del grano de café agotado es del 60%. [48]

Por último, se ha encontrado un ejemplo de extracción por microondas de la proteína contenida en el salvado de arroz en el que el contenido de proteína es del 44% aproximadamente, se puede observar que es un buen método de extracción, pero que el contenido proteico del salvado de arroz es menor que el del grano de café agotado y, por supuesto, que el del kale. [42]

5. ESTUDIO DE PREVIABILIDAD TÉCNICA Y ECONÓMICA

En este capítulo se va a determinar la viabilidad técnica y económica de el proceso experimental de extracción de proteína del grano de café agotado (escenario 1) y del kale (escenario 2) realizado en el laboratorio.

Primero se estudiará el diagrama del proceso y el dimensionado de los equipos y por último, se realizará un estudio económico básico junto con un análisis de sensibilidad para conocer la viabilidad económica del proceso a escala de laboratorio.

5.1 Balance de masa y diagrama de flujo

5.1.1 Base de cálculo

Escenario 1: Grano de café agotado

Como base de cálculo para el balance de materia se ha tomado la capacidad de tratamiento del microondas en la operación en discontinuo (5 g de café seco por tubo y carga). Sabiendo que en cada carga se emplean 16 tubos y estableciendo un tiempo de operación diario de la planta de 16 h/d se puede estimar el número de cargas diarias (10 cargas/d). De este modo es posible determinar la capacidad de tratamiento de la planta laboratorio, estableciendo en 50 g de grano de café seco/h. La humedad del grano de café determinada experimentalmente es 0,51% y el contenido en proteína (base seca) 12,1%.

Escenario 2: Kale

De igual forma, para el residuo de kale, la capacidad de tratamiento de la planta laboratorio es de 50 g kale seco/h. La humedad de residuo de kale es del 4,6% y el contenido en proteína (base seca) 15,5%.

5.1.2 Condiciones de operación: Extracción y separación

Escenario 1: Grano de café agotado

Las condiciones de operación óptimas para la extracción de proteína a partir del grano de café agotado obtenidas a partir del diseño de experimentos fueron:

Las condiciones de operación de la extracción, en este caso, son:

Temperatura: 113°C

Tiempo de extracción: 3,33 minutos

Concentración de NaOH: 1,30 M

Relación S/L=10% masa/volumen

Rendimiento de extracción de proteína: 61%

Para la separación de la mezcla S/L se emplea una centrífuga con un rendimiento de separación del sólido del 80% y del líquido recuperado del 70% (datos bibliográficos).

Escenario 2: Kale

Las condiciones de operación óptimas para la extracción, obtenidas de igual forma a partir del diseño de experimentos fueron:

Temperatura: 109°C

Tiempo de extracción: 14,93 minutos

Concentración de NaOH: 1,29 M

Relación S/L= 10% masa/volumen

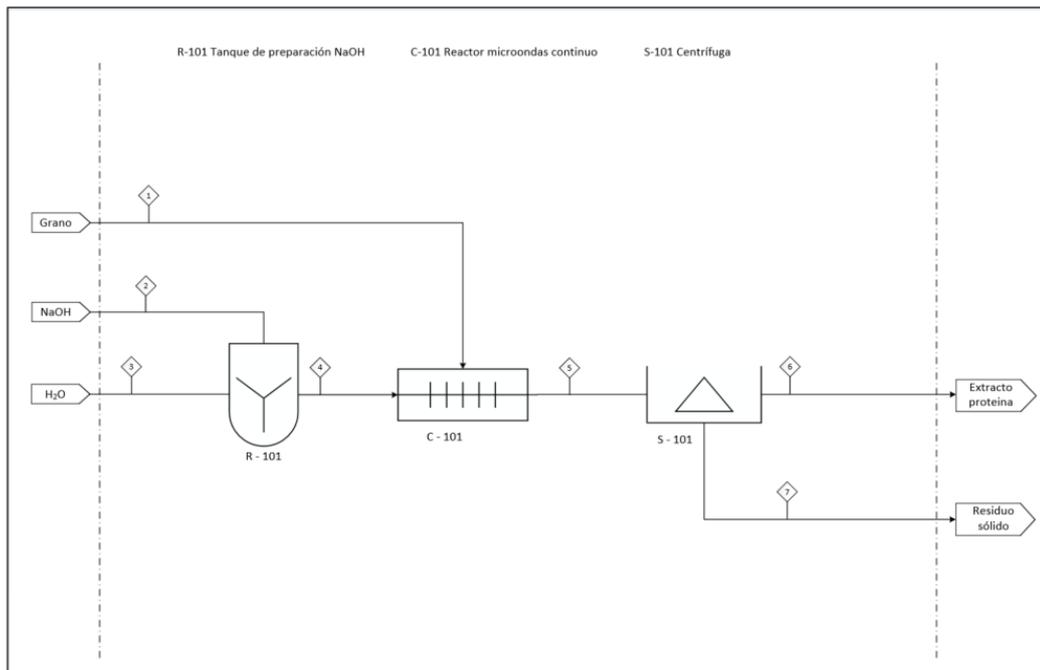
Rendimiento de extracción proteína 96%

Las condiciones establecidas para la etapa de separación por centrifugación fueron las mismas que para el residuo de grano de café agotado.

5.1.3 Diagrama de flujo y tablas de corriente

En la Figura 5.1 podemos ver el diagrama de flujo del proceso que es idéntico tanto en el caso del grano de café agotado (escenario 1) como en el caso del kale (escenario 2).

Figura 5.1 Diagrama de flujo del proceso de extracción de la proteína tanto del escenario 1 como del escenario 2.



Como podemos ver en la Figura 5.1, el diagrama de flujo está compuesto por un tanque de preparación de NaOH en el que entran las corrientes de agua y NaOH (corrientes 2 y 3), en la proporción adecuada para garantizar la extracción de solvente necesaria, un reactor de microondas para la extracción de la proteína presente en la materia prima (grano de café o residuo de kale (corriente 1) y una centrífuga para la separación del extracto líquido enriquecido en proteína (corriente 6) del residuo sólido agotado (corriente 7) procedentes de la etapa de extracción.

Escenario 1: Grano de café agotado

La Tabla 5.1 muestra la tabla de corrientes del Escenario 1 (grano de café agotado).

Tabla 5.1: Tabla de corrientes del Escenario 1: grano de café agotado

Nº Corriente	1	2	3	4	5	6	7
Grano húmedo (g/h)	50,26	0	0	0	0	0	0
Grano seco (g/h)	50	0	0	0	0	0	0
Sólido agotado (g/h)	0	0	0	0	50	10	40
NaOH sól (g/h)	0	26	0	0	0	0	0
Agua (g/h)	0,26	0	499,7	0	0	0	0
NaOH 1,3 M (g/h)	0	0	0	499,7	0	0	0
Líquido rico en proteína (g/h)	0	0	0	0	500	350	150
Proteína (g/h)	6,04	0	0	0	3,68	3,68	2,35
Total (g/h)	50,26	26	499,7	499,7	550	360	190

Escenario 2: Kale

La Tabla 5.2 muestra la tabla de corrientes del Escenario 2 (kale)

Tabla 5.2: Tabla de corrientes del Escenario 2: kale

Nº Corriente	1	2	3	4	5	6	7
Grano húmedo (g/h)	52,42	0	0	0	0	0	0
Grano seco (g/h)	50	0	0	0	0	0	0
Sólido agotado (g/h)	0	0	0	0	50	10	40
NaOH sól (g/h)	0	26	0	0	0	0	0
Agua (g/h)	2,42	0	497,6	497,6	497,6	0	0
NaOH 1,3 M (g/h)	0	0	0	497,6	0	0	0
Líquido rico en proteína	0	0	0	0	500	350	150
Proteína (g/h)	7,85	0	0	0	7,54	7,54	0,31
Total (g/h)	52,42	26	497,6	497,6	550	360	190

5.2 Dimensionado de los equipos y selección

Este apartado de dimensionado y selección de equipos es similar para ambos escenarios, tanto para el grano de café agotado (escenario 1) como para el kale (escenario 2). En la Tabla 5.3 podemos ver el dimensionado del tanque de preparación de NaOH.

Tabla 5.3: Dimensionado tanque de preparación de NaOH

Tanque preparación NaOH	
Tipo de equipo	Dimensionado
Tiempo de residencia (min)	15
Volumen (cm ³)	150
D (cm)	4,7
H (cm)	8,5
Potencia agitación (W)	180

Se ha seleccionado el tiempo de residencia (15 minutos) y con ello se ha calculado el volumen. Se ha supuesto un sobredimensionado del 20%, se ha establecido una relación $H/D=1,8$. Para conocer la potencia de agitación, primero se elige el tipo de agitador con la gráfica viscosidad vs volumen. (ver anexos)

Se establece la densidad y la viscosidad y junto con el diámetro interno se calcula el Reynolds, con este y utilizando la gráfica número de potencia vs Reynolds, (ver anexos) se calcula la potencia total.

Se divide la potencia total entre el número de agitadores y se obtiene la potencia individual, esta se divide entre el volumen del reactor y se obtiene la Pe , al conocer que este número tiene q ser de más o menos 0,2, debido a tener una viscosidad cercana al agua y tener sólidos suspendidos, se calcula la potencia total necesaria (180 W).

En la Tabla 5.4 se puede ver el dimensionado del reactor de microondas para la extracción. Se ha necesitado la ayuda de fuentes bibliográficas. (ver anexos)

Tabla 5.4: Dimensionado reactor de microondas

Reactor Microondas	
Tipo de equipo	Comercial (labotron XEN)
Tiempo de residencia (min)	7
Volumen reactor (cm^3)	68
Volumen equipo (cm^3)	110
Potencia (W)	2000

Por último, en la Tabla 5.5 se puede ver el dimensionado de la centrífuga para la separación.

Tabla 5.5: Dimensionado centrífuga

Centrifuga	
Tipo de equipo	Sorvall cc40nx centrifuge
Volumen equipo (L)	3,2
Diámetro interno (mm)	66
Longitud (mm)	761
w máxima (rpm)	40000

Como se observa en la Tabla 5.5 se ha fijado el flujo a tratar y la separación, que en este caso es sólido/líquido y en base a ello se ha elegido una centrífuga comercial (Sorvall cc40nx centrifuge) (ver anexos).

5.3 Estudio de viabilidad económica

5.3.1 Coste de materia prima

Escenario 1: Grano de café agotado

En la tabla 5.6 se muestra el coste de la materia prima en el escenario 1.

Tabla 5.6: Coste de la materia prima en el escenario 1 (grano de café agotado)

Materia Prima	Precio (€)	Flujo	Precio total (€/año)
Grano de café	0,10 €/kg	0,050 kg/h	40,2
NaOH puro	0,50 €/kg	0,026 kg/h	104,0
Agua	1,35 €/m ³	0,500 L/h	5,4
Coste total			149,6

Para el cálculo del coste total se han supuesto 8000 h/año (2 turnos de horas con 2 trabajadores).

Escenario 2: Kale

En la tabla 5.7 se muestra el coste de la materia prima en el escenario 2.

Tabla 5.7: Coste de la materia prima en el escenario 2 (kale)

Materia Prima	Precio (€)	Flujo	Precio total (€/año)
Grano de café	0,10 €/kg	0,052 kg/h	41,9
NaOH puro	0,50 €/kg	0,026 kg/h	104,0
Agua	1,35 €/m ³	0,498 L/h	5,4
Coste total			151,3

Para el cálculo del coste total se han supuesto 8000 h/año (2 turnos de horas con 2 trabajadores).

5.3.2 Coste total de inversión

El Coste Total de Inversión se va a calcular a través del método de los factores de Lang. Es un método factorial que permite calcular el coste total de inversión en plantas químicas a partir del coste de los equipos del proceso. Mediante el software Capcost se estiman los precios de los equipos C_E .

El cálculo del Coste Fijo (CF) es el producto del C_E multiplicado por un factor de Lang f_L cuyo valor es de 3,1.

Para obtener los parámetros de coste más importantes como son el Capital Fijo (CF), el Coste Físico Total de la Planta (CFTP) y el Coste Total de Inversión (CTI) se necesita conocer el Coste Total de Equipos. Este es el sumatorio de los precios de los equipos.

Los valores de los CFTP, CF y CTI dependen de los factores de Lang f ya mencionados y estos varían en función del tipo de materia prima y se calculan de la siguiente manera:

[Ecuación 5.1] $CFTP = CTE \cdot (1 + \sum_1^0 f) = CTE \cdot 2,80$

[Ecuación 5.2] $CF = CFTP \cdot (1 + \sum_{10}^{12} f) = CFTP \cdot 1,35$

[Ecuación 5.3] $CTI = CF \cdot (1 + f_{13}) = CF \cdot 1,05$

Los factores de Lang para materias sólidas se muestran en la Tabla 5.8

5.8: Valores de factores de Lang para CFTP, CF y CTI.

Coste total de los equipos	CTE	1
Montaje de equipos	f_1	0,50
Tubería	f_2	0,20
Instrumentación	f_3	0,10
Electricidad	f_4	0,10
Edificio y procesos	f_5	0,05
Servicios auxiliares	f_6	0,25
Almacenamiento	f_7	0,25
Desarrollo del sitio	f_8	0,05
Edificios auxiliares	f_9	0,30
Coste físico total de la planta	CFTP	2,80
Diseño e ingeniería	f_{10}	0,20
Cuota de contratista	f_{11}	0,05
Contingencias	f_{12}	0,10
Capital fijo	CF	1,35
Capital de trabajo	f_{13}	0,05
Coste total de inversión	CTI	1,05

En primer lugar, se necesita conocer el coste total de los equipos, lo cual se puede ver en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9: Coste de los equipos en los escenarios 1 y 2.

	Escenario 1 (grano de café agotado)	Escenario 2 (kale)
Instalaciones	Precio total (€)	Precio total (€)
R-101	13,5	13,4
Agitador tanque R-101	1406,1	1401,0
MW 101	35000,0	35000,0
Tanque pulmón	93,5	93,7
Centrífuga	7190,9	7190,9
Total	43704,0	43699,0

En la Tabla 5.9 se observa que el coste total es muy parecido en ambos casos, aunque con un precio algo mayor en el caso del grano de café agotado.

Es necesario conocer el coste total físico de la planta que se muestran en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10: Costes físicos de la planta del Escenario 1 y 2.

	Escenario 1 (grano de café agotado)	Escenario 2 (kale)
Costes	Precio total (€)	Precio total (€)
Montaje de equipos	19666,8	19664,5
Tubería	19666,8	19664,5
Instrumentación	6555,6	6554,8
Electricidad	4370,4	4369,9
Edificios y procesos	4370,4	4369,9
Servicios auxiliares	19666,8	19664,5
Almacenamiento	8740,8	8739,8
Desarrollo del sitio	2185,2	2184,9
Edificios auxiliares	8740,8	8739,8

Tras esto se obtienen el coste físico total de la planta, el capital fijo, el capital de trabajo y el coste total de inversión mostrados en la Tabla 11.

Tabla 5.11: Coste físico total de la planta, el capital fijo, el capital de trabajo y el coste total de inversión en ambos escenarios (grano de café agotado y kale).

	Escenario 1 (grano de café agotado)	Escenario 2 (kale)
Costes	Precio total (€)	Precio total (€)
Coste físico total de la planta	137667,5	137651,8
Capital fijo	192734,5	192712,5
Capital de trabajo	9636,7	9635,6
Coste total de inversión	202371,2	202348,2

En la Tabla 5.11 se observa que el coste total de inversión de ambos escenarios es similar, aunque algo mayor en el caso del grano de café agotado.

5.3.3 Costes de producción

Para conocer los costes de producción, es necesario conocer el coste de producción anual ya que;

[Ecuación 5.4]
$$\text{coste producción} = \frac{\text{coste anual producción } \text{€}}{\text{Coste producción } (\text{€/kg})}$$

Los costes anuales de producción de los escenarios 1 y 2 se pueden ver en la Tabla 5.12.

Tabla 5.12: Costes anuales de producción en el escenario 1 y 2.

	Escenario 1 (grano de café agotado)	Escenario 2 (kale)
Tipo de coste	€	€
Materias primas	149,6	151,3
Materiales	1927,3	1927,1
Utensilios	19666,8	19664,5
Costes variables	21743,7	21743,0
Mantenimiento	19273,5	19271,3
Mano de obra operativa	20000,0	20000,0
Costes de laboratorio	4000,0	4000,0
Supervisión	4000,0	4000,0
Planificación gastos generales	10000,0	10000,0
Gastos de capital	19273,5	19271,3
Seguro	1927,3	1927,1
Impuestos locales	3854,7	3854,3
Royalties	1927,3	1927,1
Costes fijos	84256,3	84251,0
Gastos de ventas	21200,0	21198,8
Gastos generales	21200,0	21198,8
Investigación y desarrollo	21200,0	21198,8
Costes indirectos	63600,0	63596,4

Escenario 1: Grano de café agotado

De la suma de los costes indirectos, los costes fijos y los costes variables se obtiene el coste de producción anual que es de 169600,0€, con ello y conociendo el coste de producción en €/kg (2880,0 €/kg), se obtiene el coste de producción que tiene un valor de 58,9 €/L.

Escenario 2: Kale

De la suma de los costes indirectos, los costes fijos y los costes variables se obtiene el coste de producción anual que es de 169590,4€, con ello y conociendo el coste de producción en €/kg (2880,0 €/kg), se obtiene el coste de producción que tiene un valor de 58,9 €/L.

5.3.4 VAN/TIR (tiempo retorno)

Escenario 1: Grano de café agotado

Se ha realizado un balance económico (Ver anexos) en el que se incluye un balance de costes, ingresos y flujos de caja que se utilizará para el cálculo del Van y del TIR y para realizar un análisis de sensibilidad.

Tras realizar el cálculo de flujos de caja, se calculan los indicadores de viabilidad del producto, estos son el Valor Actual Neto (VAN) y la Tasa Interna de Retorno (TIR). Con el VAN se analizan los flujos de caja y la rentabilidad que da el proyecto se mide en euros (€), con el TIR se asegura que la inversión sea rentable desde el punto de vista económico. Estos valores son:

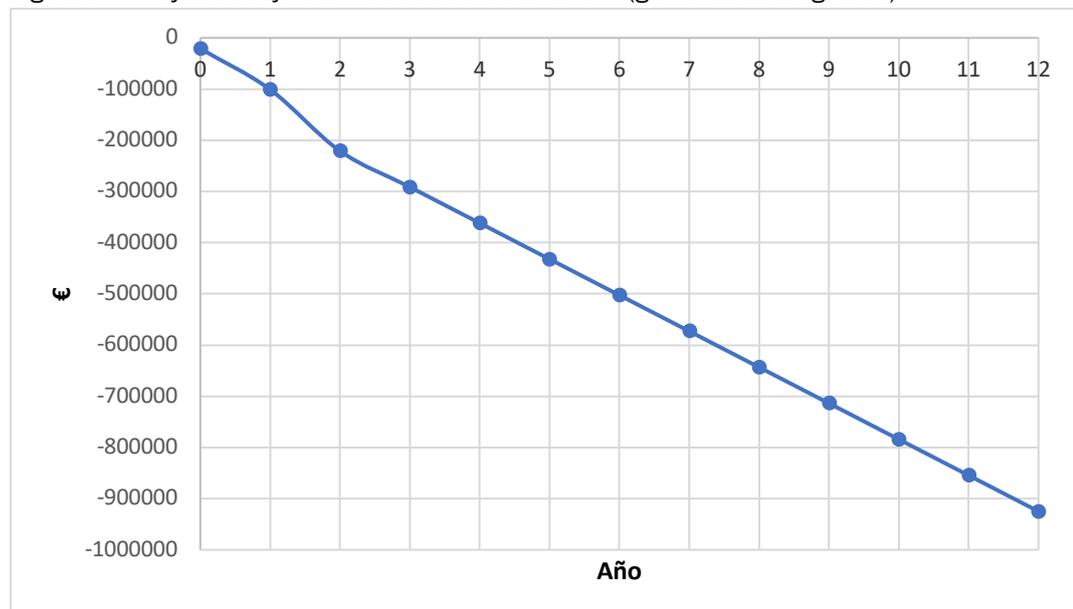
VAN: -457,54 €
TIR: No es posible calcularlo
Precio de venta: 5€/100 mL

Debido a que el VAN tiene un valor negativo, realizar el proceso no es una buena inversión, además el valor del TIR no es posible calcularlo con lo que se puede asegurar que el proyecto no es rentable.

El precio mínimo de venta debería ser de 9,95€/100 mL (VAN=0€; TIR=0%)

Se han representado los flujos de caja acumulados en la Figura 5.2:

Figura 5.2: Flujos de caja acumulados del escenario 1 (grano de café agotado)



Como se observa en la Figura 5.2, la representación de los flujos de caja acumulados indica que la inversión inicial no se recupera, esto se debe a que el precio del producto (5€/100 mL) es menor que el precio mínimo al que se debería vender el producto (9,95€/100 mL). Desde el punto de vista económico, el proceso de recuperación de proteína a partir de grano de café agotado no es viable desde el punto de vista económico, no hay suficientes beneficios como para que sea rentable.

Escenario 2: Kale

Se ha realizado un balance económico (Tabla 5.15) en el que se incluye un balance de costes, ingresos y flujos de caja que se utilizará para el cálculo del Van y del TIR y para realizar un análisis de sensibilidad.

Tras realizar el cálculo de flujos de caja, se calculan los indicadores de viabilidad del producto, estos son el Valor Actual Neto (VAN) y la Tasa Interna de Retorno (TIR). Con el VAN se analizan los flujos de caja y la rentabilidad que da el proyecto se mide en euros (€), con el TIR se asegura que la inversión sea rentable desde el punto de vista económico. Estos valores son:

VAN: -275,21 €

TIR: No es posible calcularlo

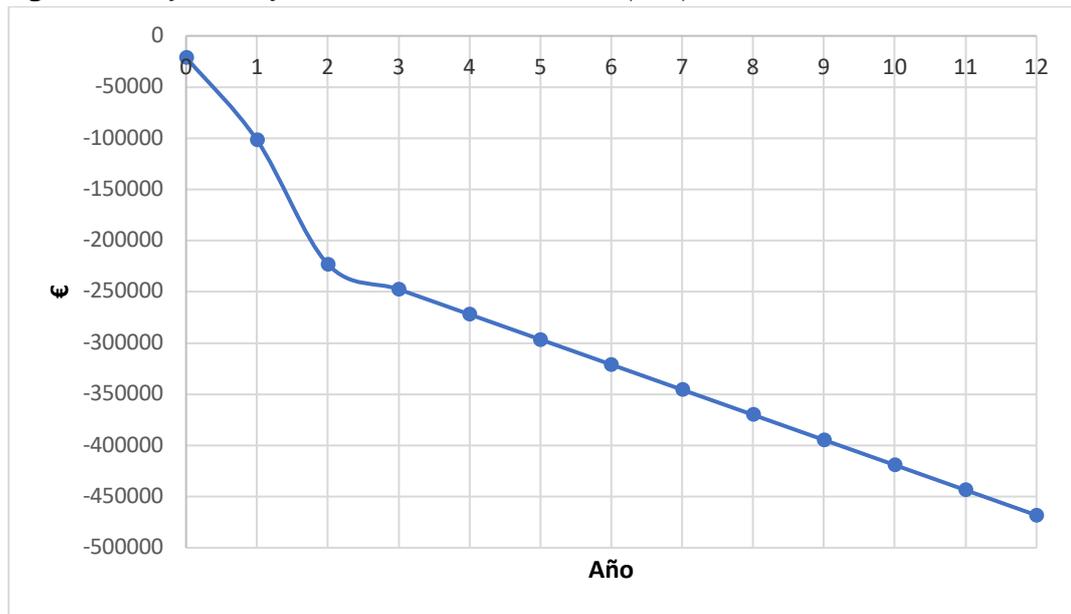
Precio de venta: 7€/100 mL

Debido a que el VAN tiene un valor negativo, realizar el proceso no es una buena inversión, además el valor del TIR no es posible calcularlo con lo que se puede asegurar que el proyecto no es rentable.

El precio mínimo de venta debería ser de 9,98€/100 mL (VAN=0€; TIR=0%)

Se han representado los flujos de caja acumulados en la Figura 5.3:

Figura 5.3: Flujos de caja acumulados del escenario 2 (kale)



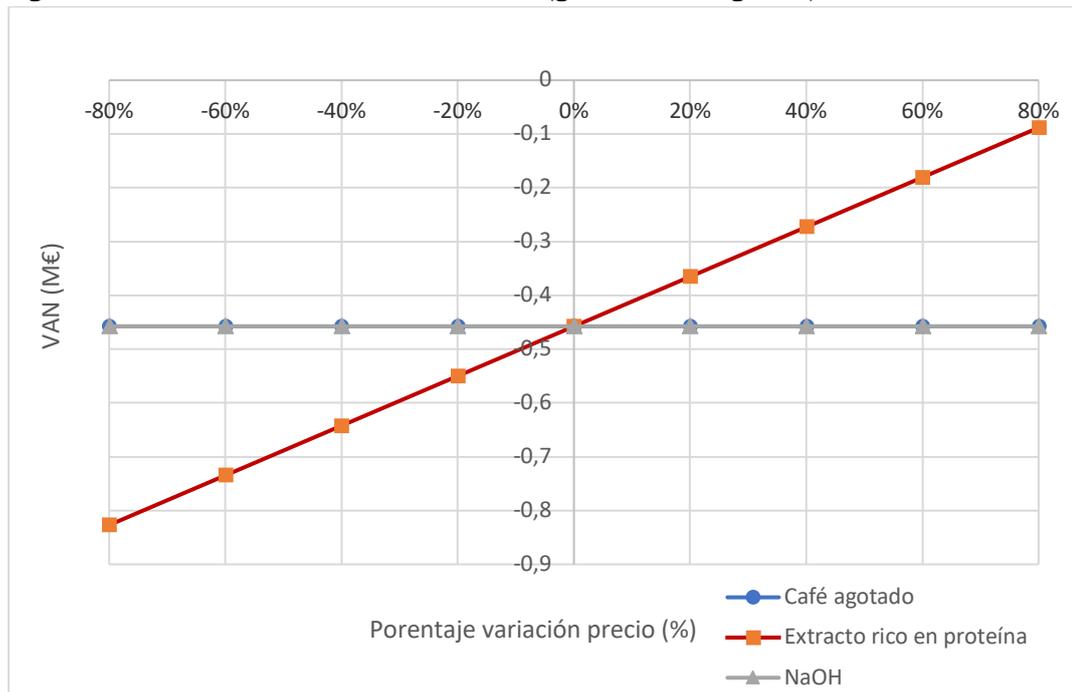
Como se observa en la Figura 5.3, la representación de los flujos de caja acumulados indica que la inversión inicial no se recupera, esto se debe a que el precio del producto (7€/100 mL) es menor que el precio mínimo al que se debería vender el producto (10€/100 mL). Desde el punto de vista económico, la recuperación de proteína a partir del residuo de kale no es viable, no hay suficientes beneficios como para que sea rentable.

5.3.5 Análisis de sensibilidad

Escenario 1: Grano de café agotado

En la Figura 5.4 se muestra el análisis de sensibilidad realizado, en el que se observa como afectaría una variación del precio de venta del extracto rico en proteína, y los precios de compra del grano de café agotado y del solvente (NaOH). La variación se estima desde un 80% menos del precio actual hasta un 80% superior al precio actual.

Figura 5.4: Análisis de sensibilidad escenario 1 (grano de café agotado)

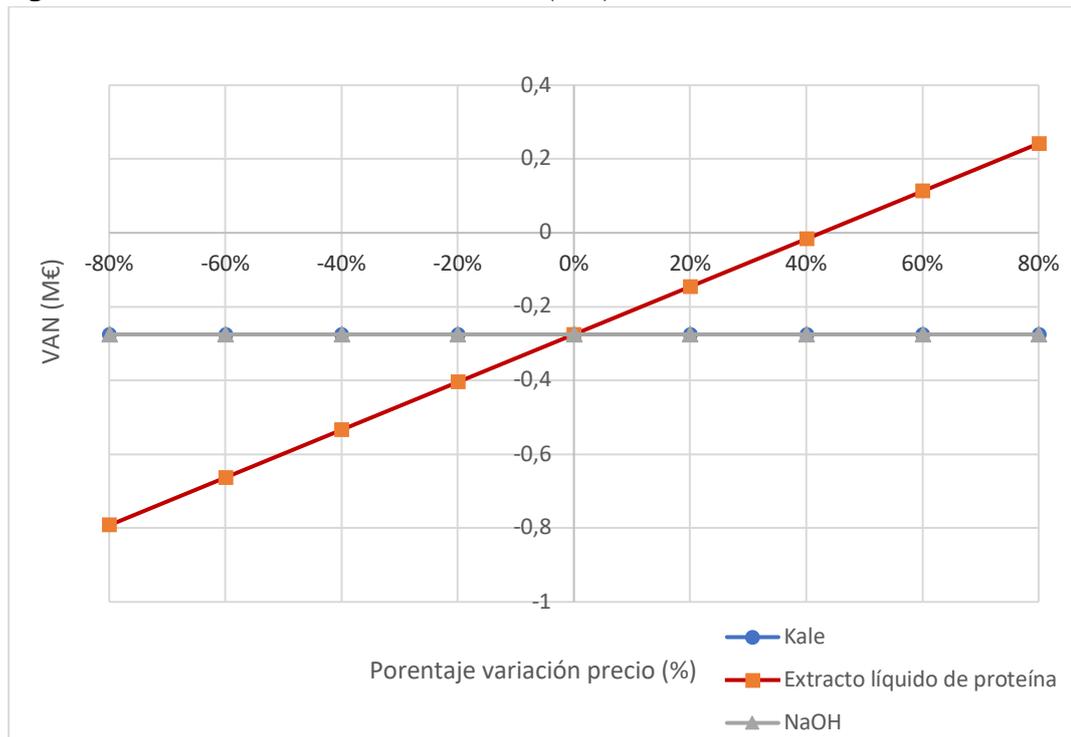


Analizando la gráfica se determina que el precio del extracto de proteína es el factor más influyente, ya que hay grandes variaciones aumentando o disminuyendo el precio, pese a ello en ningún caso el proyecto es económicamente viable ya que el valor del VAN en todos los casos es negativo. En cambio, la variación del precio del NaOH, al igual que el precio del grano de café agotado, no influyen de forma significativa en el VAN.

Escenario 2: Kale

En la Figura 5.5 se muestra el análisis de sensibilidad realizado, en el que se observa cómo afectaría una variación del precio de venta del extracto rico en proteína y del precio de compra del residuo de kale y del solvente (NaOH). La variación se estima desde un 80% menos del precio actual hasta un 80% superior al precio actual.

Figura 5.5: Análisis de sensibilidad escenario 2 (kale)



Analizando la gráfica se determina que el precio del extracto de proteína es el factor más influyente, ya que hay grandes variaciones aumentando o disminuyendo el precio, en el caso del aumento del precio del extracto de proteína el VAN va a tener un valor positivo, por ejemplo, aumentando el precio del extracto líquido de 60% o superior se incrementaría el VAN a 0,1-0,2 M€, lo que garantizaría la viabilidad del proyecto, en el caso de la bajada de precio el VAN va a tener un valor negativo.

En cambio, la variación del precio del NaOH no influye de forma significativa en el VAN.

Finalmente, tras este estudio de la viabilidad económica de los dos escenarios de extracción de proteína propuestos, se ha concluido que la extracción de kale podría llegar a ser rentable si el precio de venta del extracto líquido obtenido se incrementase de forma significativa (60-80% sobre el precio de venta actual establecido en 7 euros). Sin embargo, el proceso de extracción de proteína del grano de café agotado no es viable económicamente. Para mejorar la rentabilidad de la planta sería necesaria una valorización integral de ambos residuos para obtener biocombustibles (butanol o etanol) u otros compuestos de alto valor añadido.

En lo referido a la viabilidad técnica del proceso, ha quedado demostrado que está garantizada, ya que se basa en la aplicación de procesos de extracción sencillos y conocidos, implementados a escala industrial, con buenos rendimientos de extracción y tiempos de operación cortos. En este trabajo,

empleando la tecnología de extracción asistida por microondas, empleando NaOH como solvente, se han logrado rendimientos de extracción de proteínas elevados (61% para el grano de café agotado y 97% para el residuo de kale), con concentraciones de proteína en los extractos líquidos de 10,5 g/L para el residuo de café 21,5 g/L para el residuo de kale.

6 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado un estudio experimental a escala de laboratorio del proceso de extracción de proteína del grano de café agotado y del residuo de kale. El estudio se basa en la optimización de la etapa de extracción de estas dos materias primas empleando la tecnología microondas y utilizando el NaOH como solvente.

De acuerdo con los objetivos explicados anteriormente, se muestran a continuación las conclusiones del trabajo:

- La selección de alternativas ha permitido establecer como residuo objeto de estudio un **residuo alimentario (kale)** y un **residuo agroindustrial (grano de café agotado)**, dos residuos con un contenido en proteína importante (**12% en el caso del GCA y 15,7% para el kale**). Como método de extracción se ha seleccionado la tecnología microondas por los buenos rendimientos de extracción y los tiempos cortos de operación. Como solvente se ha utilizado el NaOH, ya que la bibliografía indica que las extracciones en medio básico proporcionan mejores rendimientos de extracción.
- El trabajo experimental se ha centrado en la optimización del rendimiento de extracción de proteína utilizando una metodología de diseño de experimentos con el software Statgraphics Centurion XVIII. Se han seleccionado 3 variables (T, tiempo y concentración de NaOH) y 3 niveles (= 70/90/110°C; 5/10/15 minutos) y concentraciones de 0,1/0,55/1 M para el GCA y 0,5/1/1,5 M para el kale. Las **condiciones óptimas de extracción de proteína** son similares para ambos residuos (**113°C, 3,3 minutos y 1,30 M para el GCA y 109°C, 15 minutos y 1,3 M de NaOH para el kale**). Sin embargo, el rendimiento de extracción de proteína óptimo es significativamente mayor para el kale (96,6 %) que para el GCA (61,2%). El kale es un residuo con un mayor contenido inicial de proteína y con un menor contenido en lignina lo que facilita la extracción de proteína.
- La **viabilidad técnica** del proceso de extracción de proteína propuesto, basado en la tecnología de extracción asistida por microondas empleando NaOH como solvente, está **garantizada**. Se han conseguido rendimientos de extracción elevados operando con tiempos cortos y condiciones suaves de operación. Los **extractos líquidos** obtenidos en condiciones óptimas presentan **concentraciones de proteína** adecuadas

desde el punto de vista comercial (**10,5 g/L para el residuo de café** **21,5 g/L para el residuo de kale**).

- El estudio de **viabilidad económica** muestra que el proyecto a escala de laboratorio **no es viable económicamente**, sin embargo, una **valorización integral de ambos residuos**, mediante la obtención simultánea de biocombustibles y otros bioproductos de interés, podría llegar a rentabilizar la inversión.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ainara Ortiz., “¿Qué son las proteínas y para qué sirven?”, 2019, https://www.alimente.elconfidencial.com/nutricion/2019-06-01/proteinas-aminoacidos-para-que-sirven_1522540/, consultado el 8 de abril de 2021.
- [2] Zawn Villines., “Top 15 sources of plant-based protein”, Abril 2018, <https://www.medicalnewstoday.com/articles/321474>, consultado el 8 de abril de 2021.
- [3] Francesca Girotto, Luca Alibardi, Raffaello Cossu., “Food waste generation and industrial uses: A review”, 2015, Waste Management. 45, 32-41.
- [4] Irene Esparza, Nerea Jiménez-Moreno, Fernando Bimbela, Carmen Ancín-Azpilicueta, Luis M.Gandía., “Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches ”, 2020, Journal of Environmental Management. 265, 110510.
- [5] María del Mar Contreras, Antonio Lama-Muñoz, José Manuel Gutiérrez-Pérez, Francisco Espínola, Manuel Moya, Eulogio Castro, “Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status”, 2019, Bioresource Technology. 280, 459-477.
- [6] Marta Ramos-Andrés, Beatriz Aguilera-Torre, Juan García-Serna, “Hydrothermal production of high-molecular weight hemicellulose-pectin, free sugars and residual cellulose pulp from discarded carrots”, 2021, Journal of Cleaner Production.290, 125179.
- [7] Adriana Kovalcik, Iva Pernicova, Stanislav Obruca, Martin Szotkowski, Vojtech Enev, Michal Kalina, Ivana Marova, “Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products”, 2020, Food and Bioproducts Processing. 124, 1-10.
- [8] Erminta Tsouko, Sofia Maina, Dimitrios Ladakis, Ioannis K. Kookos, Apostolis Koutinas, “Integrated biorefinery development for the extraction of value-added components and bacterial cellulose production from orange peel waste streams”, 2020, Renewable Energy. 160, 944-954.
- [9] Raissa Cristina da Silva Mazareli, Alejandra Carolina Villa Montoya, Tiago Palladino Delforno, Victor Borin Centurion, Valeria Maia de Oliveira, Edson Luiz Silva, Maria Bernadete Amancio Varesche, “Enzymatic routes to hydrogen and organic acids production from banana waste fermentation by autochthonous bacteria: Optimization of pH and temperature”, 2020, International journal of Hydrogen Energy. 46, 8454-8468.

- [10] Matteo Francavilla, Mauro Marone, Paolo Marasco, Francesco Contillo, Massimo Monteleone., “Artichoke Biorefinery: From Food to Advanced Technological Applications”, 2021, Foods. 10, 112.
- [11] Arturo Pardo-Giménez, Diego Cunha Zied, José Emilio Pardo-González., “Utilización de compost agotado de champiñón como capa de coberturas en nuevos ciclos de producción”, 2010, Pesq.agropec.bras. 45,10.
- [12] “Extracción de antioxidantes de subproductos de alcachofa”., <https://alimentosindesperdicio.blog/2017/05/16/extraccion-de-antioxidantes-de-subproductos-de-alcachofa/>, consultado el 11 de abril de 2021
- [13] “Agaricus bisporus champiñón micelio coloniza el sustrato de crecimiento (compost)”., <https://www.alamy.es/foto-agaricus-bisporus-champinon-micelio-coloniza-el-sustrato-de-crecimiento-compost>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [14] “Co-productos de la producción de etanol: DDGS”, 2007, https://www.3tres3.com/articulos/co-productos-de-la-produccion-de-etanol-ddgs_1850/, consultado el 6 de mayo de 2021.
- [15] Raquel Pérez de la Calle., “Producción de compuestos de interés nutricional a partir de bagazo de cerveza mediante tecnología de microondas”, 2019. Trabajo fin de grado. Repositorio Institucional UVaDOC de la Universidad de Valladolid, .
- [16] “Pulpa de remolacha”, 2012, http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/pulpa-de-remolacha-actualizado-nov-2012, consultado el 13 de abril de 2021.
- [17] “Bagazo de Cerveza” Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Presidencia de la Nación., <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/documentos/TendenciaBagazo.pdf>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [18] “Poballe,S.A”., <https://www.poballe.com/alimentacionanimal/home/21-pulpa-de-remolacha.html>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [19] “¿Qué es el kale y para qué sirve?”, 2020, <https://www.superalimentos.es/kale/>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [20] Fatih Yildiz., “Kale: Review on nutritional composition, bio-active compounds, anti-nutritional factors, health beneficial properties and value-added products”, 2020, Cofen Food & Agriculture, 6, 1811048.
- [21] “La kale, la verdura que está pasando de moda”., <http://territoriogastronomico.com/ingredientes/verduras-hongos->

[hortalizas/la-kale-la-verdura-que-esta-pasando-de](#), consultado el 5 de abril de 2021.

[22] Zofia Lisiewska, Waldemar Kmiecik, Anna Korus., “The amino acid composition of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), fresh and after culinary and technological processing”, 2007, *Food Chemistry*. 108, 642-648.

[23] Magdalena Michalak, Dominik Sz wajgier, Roman Paduch, Wirginia Kukula-Koch, Adam Waśko, Magdalena Polak-Berecka., “Fermented curly kale as a new source of gentisic and salicylic acids with antitumor potential”, 2020, *Journal of Functional Foods*. 67, 103866.

[24] Gabriela Gottau, “Todo sobre el kale: propiedades, beneficios y su uso en la cocina”, 2016, <https://www.vitonica.com/alimentos/todo-sobre-el-kale-propiedades-beneficios-y-su-uso-en-la-cocina>, consultado 5 de abril de 2021.

[25] Daisuke Horigome, Hiroyuki Satoh and Akira Uchida., “Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a water-soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea* L. var. *acephala* (kale)”, 2003, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 59, 2283-2285.

[26] Rocío Campos-Vega, Guadalupe Loarca-Piña, Haydé A. Vergara-Castañeda, B. Dave Oomah., “Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects”, 2020, *Trends in Food Science & Technology*. 45, 24-36.

[27] “El residuo de café” <https://delvolcancito.wixsite.com/delvolcancito/single-post/2016/09/14/el-residuo-del-café>, consultado el 13 de abril de 2021.

[28] Lina F. Ballesteros & José A. Teixeira & Solange I. Mussatto., “Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin”, 2014, *Food and Bioprocess Technology*. 7, 3493-3503.

[29] Ganesh Dattatraya Saratale, Rahul Bhosale, Sutha Shobana, J. Rajesh Banu, Arivalagan Pugazhendhi, Eyas Mahmoud, Ranjna Sirohi, Shashi Kant Bhatia, A.E. Atabani, Vincenzo Mulone, Jeong-Jun Yoon, Han Seung Shin, Gopalakrishnan Kuma., “A review on valorization of spent coffee grounds (SCG) towards biopolymers and biocatalysts production”, 2020, *Bioresource Technology*. 314, 123800.

[30] Sheng Li, Congcan Shi, Shenghong Sun, Huifang Chan, Huimin Lu, Azadeh Nilghaz, Junfei Tian, Rong Cao., “From brown to colored: Polylactic acid composite with micro/ nano-structured white spent coffee grounds for three-dimensional printing”, 2021, *Internacional Journal of Biological Macromolecules*. 174, 300-308.

- [31] “Fitoesteroles” <https://www.sabervivirtv.com/guia-nutricion/fitoesteroles>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [32] Franks kamgang Nzekoue, Gulzhan Khamitova, Simone Angeloni, Alba Nácher Sempere, Jing Tao, Filippo Maggi, Jianbo Xiao, Gianni Sagratini, Sauro Vittori, Giovanni Caprioli., “Spent coffee grounds: A potential commercial source of phytosterols”, 2020, Food Chemistry. 325, 126836.
- [33] “Fitoesterol” <https://es.wikipedia.org/wiki/Fitoesterol>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [34] “Fitoesteroles: aliados naturales de los alimentos para bajar el colesterol”, 2017, <https://misionesonline.net/2017/05/07/fitoesteroles-aliados-naturales-los-alimentos-bajar-colesterol/>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [35] Alchris Woo Go, Thi Yen Nhu Pham, Yi-Hsu Ju, Ramelito C. Agapay, Artik Elisa Angkawijaya , Kristelle L. Quijote., “ Extraction of lipids from post-hydrolysis spent coffee grounds for biodiesel production with hexane as solvent: Kinetic and equilibrium data”,2020, Biomass and Bioenergy. 140, 105704.
- [36] Tatiana Santos Andrade, John Vakros, Dionissios Mantzavinou, Panagiotis Lianos., “ Biochar obtained by carbonization of spent coffee grounds and its application in the construction of an energy storage device”, 2020, Chemical Engineering Journal Advances. 4, 100061.
- [37] Fren Qin, Astrid Z. Johansen, Solange I. Mussatto., “Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer’s spent grains”, 2018, Industrial Crops and Products. 125, 443-453.
- [38] María del Mar Contreras, Antonio Lama-Muñoz, José Manuel Gutiérrez-Pérez, Francisco Espínola, Manuel Moya, Eulogio Castro., “Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status”, 2019, Bioresource Technology. 280, 459-477.
- [39] Yessie W. Sari, Wilhelmus J. Mulder, Johan P. M. Sanders, Marieke E. Bruins., “Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance”,2015, Biotechnology Journal. 10, 1138-1157.
- [40] Nieto Sanz, Leire., “OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE BAGAZO DE CERVEZA”, 2019, Trabajo fin de grado. Repositorio Institucional UVaDOC de la Universidad de Valladolid, <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/38445>.

- [41] “La extracción ultrasónica y su principio de funcionamiento”, 2020, <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [42] “Equipos de ultrasonidos para el procesamiento de líquidos”, <https://www.hielscher.com/es/products.htm>, consultado el 6 de mayo de 2021.
- [43] Mohammad Yousefi, Mehdi Rahimi-Nasrabadi, Seied Mahdi Pourmortazavi, Marcin Wysokowski, Teofil Jesionowski, Hermann Ehrlich, Somayeh Mirsadeghi., “Supercritical fluid extraction of essential oils”, 2019, TrAC Trends in Analytical Chemistry. 118, 182-193.
- [44] “Fluido supercrítico” https://es.wikipedia.org/wiki/Fluido_supercr%C3%ADtico, consultado el 5 de abril de 2021.
- [45] “SISTEMA DE EXTRACCION DE FLUIDOS SUPERCRITICOS MV-10”, <https://www.mercantil.com.pe/producto/sistema-de-extraccion-de-fluidos-supercriticos-mv-10/>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [46] “Multiwave GO Plus” <https://www.anton-paar.com/mx-es/productos/detalles/sistema-de-digestion-por-microondas-multiwave-go/>, consultado el 5 de abril de 2021.
- [47] Maged E.A.Mohamed, Ayman H.Amer Eissa., “Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology”, 2012, Structure and Function of Food Engineering.
- [48] “Polymer Screw Extrusion” <https://ptfe-machinery.com/polymer-screw-extrusion/>, consultado el 29 de abril de 2021.
- [49] Shixiang Liu, Zhihua Li, Bing Yu, Song Wang, Youqing Shen, Hailin Cong., “Recent advances on protein separation and purification methods”, 2020, Advances in Colloid and Interface Science. 284, 102254.
- [50] Bhoomika Yadav, Shraddha Chavan, Anusha Atmakuri, R.D. Tyagi*, Patrick Drogui., “A review on recovery of proteins from industrial wastewaters with special emphasis on PHA production process: Sustainable circular bioeconomy process development”, 2020, Bioresource Technology. 317, 124006.
- [51] Sparsh Ganju, Parag R. Gogate., “A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents”, 2017, Journal of Food Engineering. 215, 84-96.
- [52] Mussatto et al., 2011a. Food Bioprocess Technol 4, 661–672.

- [53] Murthy and Naidu 2012. Food and Bioprocess Technology, 5, 897-903.
- [54] Lucas Cantao Freitas, Jhonatas Rodrigues Barbosa, Ana Laura Caldas da Costa, Fernanda Wariss Figueiredo Bezerra, Rafael Henrique Holanda Pinto, Raul Nunes de Carvalho Junior., “From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products?”, 2020, Resources, Conservation and Recycling, 169.
- [55] René R. Balandrán-Quintana., “Recovery of proteins from cereal processing by products”, 2018, Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products, 125-157.
- [56] Mauro A. Perini, Ignacio N. Sin, Andrea M. Reyes Jara, María E. Gómez Lobato, Pedro M. Civello, Gustavo A. Martínez., “Hot water treatments performed in the base of the broccoli stem reduce postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var *italic*) heads stored at 20°C”, 2016, LWT - Food Science and Technology, 77, 314-322.
- [57] Victoria Casajús, Mauro Perini, Romina Ramos, Antonella Barriga Lourenco, Corel Salinas, Emiliana Sánchez, Diego Fanello, Pedro Civello, Diana Frezza, Gustavo Martínez., “Harvesting at the end of the day extends postharvest life of kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*)”, 2021, Scientia Horticulturae, 276, 109757.
- [58] Ercília M. S. Machado, José A Teixeira, Gabriela Bernardo-Gil, Solange I Mussatto., “Extraction of Value-added Compounds from Spent Coffee Grounds using Supercritical Fluid”, 2014, Sustainability and Environment, 15, 67-69.
- [59] Everton Ribeiro, Thais de Souza Rocha, Sandra Helena Prudencio., “Potential of green and roasted coffee beans and spent coffee grounds to provide bioactive peptides”, 2021, Food Chemistry, 348, 129061.
- [60] R A Gómez-Brenes, E I Núñez, R Bressani, J E Braham., “[Effect of various solvents on the extraction of protein fractions of beans (*Phaseolus vulgaris*)]”, 1983, Arch Latinoam Nutr, 33, 503-518.

8 ANEXOS

ANEXO I: Hoja de especificaciones del equipo de microondas empleado en el laboratorio:

Sistema de digestión de muestras por microondas Anton Paar

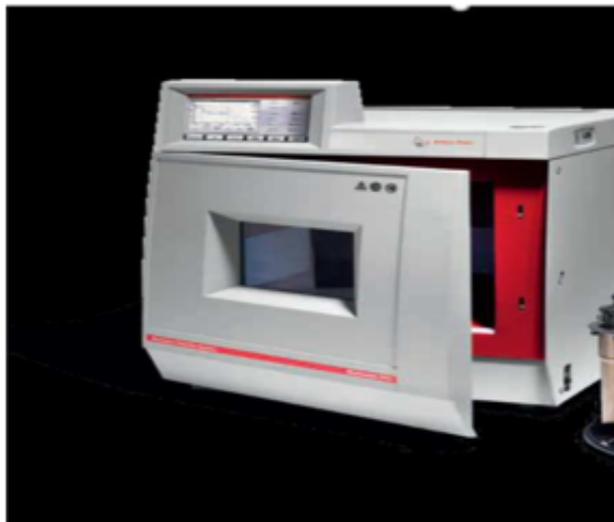
Multiwave PRO



El **Multiwave PRO**, (digestor por microondas para digestiones ácidas), está diseñado para poder realizar diferentes aplicaciones en vaso cerrado, para análisis por FAAS, ICP-OES, CVGAAS, ETAAS, etc..

El es el "master" de todos los Métodos de la Preparación de Muestras y puede soportar:

- Digestión ácida
- Lixiviado ácido
- Extracción de solventes
- Combustión con Oxígeno asistido por microondas
- Digestión UV asistido por Microondas
- Hidrólisis de Proteínas
- Evaporación ácida
- Secado de muestras



La síntesis, Extracción y la preparación de la muestra se pueden realizar con el mismo dispositivo variando simplemente accesorios. Esto hace que **Multiwave PRO SOLV** sea un reactor muy flexible, que puede usarse en muchas Aplicaciones.

Para Síntesis y Extracciones se requiere de un sistema de agitación para una distribución homogénea, incluso de mezclas bifásicas. Esta agitación produce una reducción de Tiempos del proceso

El equipo a suministrar es el **Multiwave PRO SOLV 16HF100**

Esta Formador por:

- Horno Básico con módulo SOLV y agitador magnético para disolventes orgánicos ,con sensor de IR de medida de temperatura y todos los accesorios necesarios para la instalación inicial y el funcionamiento del sistema.
- Rotor 16 posiciones con **16 vasos HF100 SOLV** de alta presión (100ml,310°C, 115bares)
- Cabezal con sensor de control p/T-sensor



- **El Rotor de 16 posiciones tiene Control simultáneo de la temperatura de IR en todos los vasos**
- Los vasos son de **PTFE-TFM** y tienen una **camisa cerámica**.
- Puede trabajar a una temperatura máxima de **310°C** y presión máxima de hasta **115bares**, puede trabajar simultáneamente a 20°C y 40 bares simultáneamente hasta 9 horas



- Son del tipo herméticamente sellados con cierres autosellantes tipo "labio" para su máxima presión de operación. Antes de la apertura de los vasos, los vasos son despresurizados con una válvula de venteo y se libera los gases residuales, a través de un puerto de escape de una forma segura
 - Sin evaporación de ácidos, sin pérdida de analitos
 - Cierre manual, sin llaves de cierre por torque u otras pesadas herramientas para un cierre adecuadoDiscos de ruptura metálicos durables, no se necesita cambiarlos después de cada test.

- **Control de la energía de microondas con potencia regulable en TODO el rango de 2000W**

Sistema **SIN PULSOS** en todo el rango de energía, Única forma de controlar con precisión una reacción. Una sofisticada electrónica hace cualquier proceso químico fácil y seguro.
Con dos magnetrones para un mejor control y distribución de la energía a lo largo de todo el rango de trabajo.

 - Rápido y homogéneo calentamiento
 - Condiciones extremas de reacción fácilmente alcanzables
 - Reduce las reacciones espontáneas
 - Incrementa la vida de servicio de los componentes de las microondas
 - Real y exacto control de la Potencia según la IEC 705 estándar

- **Sistema de enfriamiento integrado**

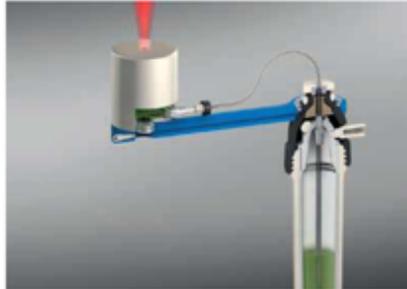
El sistema dirige el aire de refrigeración a través del espacio entre los vasos de reacción y su soporte, proporcionando el mejor y más rápido sistema de enfriamiento. Sin gruesas paredes plásticas que obstruyan

- la transferencia de calor. Sistema patentado que permite enfriar los vasos dentro del horno sin necesidad de manejar vasos calientes o moverlos a sistemas externos de enfriamiento.
- Bajo ruido
 - Un rápido enfriamiento mejora la eficiencia económica de todos los procesos.
 - Manejo seguro, con vasos fríos para sacarlos del horno.
 - Reducción de la fatiga de los materiales de las camisas de presión
 - No se requieren baños de agua o refrigeradores enfriadores externos
 - Con Sistema "exhaust" para la evacuación de humos y vapores con flujo de 220 m³ /h
-
- **Cavidad de espacio de horno en acero inoxidable, de acceso frontal.** Con un volumen de 66 litros. Cavidad iluminada, recubierta con multicapas de fluoropolímeros para alta resistencia a la corrosión y fácil limpieza.
 - Dimensiones (WxDxH): 600x720x760mm
 - Dimensiones de la cavidad (WxDxH): 450x420x350mm
 - Puerta de seguridad con cierre resellado automático magnético.

 - **Comprobación e identificación automática del tipo de Rotor-** Tiene un sensor "inteligente" que evita errores de programación chequeando el tipo de rotor que ha sido insertado dentro de la cavidad. El sistema no puede arrancar sin los datos correctos del tipo de rotor
 - Fija automáticamente los límites correspondientes de Presión y Temperatura al tipo de vasos usados
 - Sin riesgo de errores en el manejo

 - Tiene una **p/T-sensor** para medir la Presión y temperatura interna en el vaso de referencia para llevar el control durante el proceso y los **datos son transferidos por wireless.** (sin cables)





- Para el correcto control de las operaciones de digestión el equipo cuenta con un **software**:
 - Que **Controla digitalmente la temperatura y la presión, para el enfriamiento de la cámara de reacción**
 - Contiene una Biblioteca de métodos probados incluyendo método UNE, U.S, EPA, ISO y ASTM.
 - **Modifica en tiempo real los parámetros de operación durante el test desde el PC o directamente desde el equipo.**
 - **Fácil chequeo y calibrado de potencia, temperatura IR mediante protocolos incluidos en el software**
 - **Calibración guiada por el software.**

Los métodos standard requieren sensores de temperatura precisos y control de resultados. **Multiwave PRO** ofrece un automatizado, controlado por el software, accesorio de calibración para re calibraciones de rutina de los sensores de temperatura del usuario.

- Hasta 20 diferentes sensores (datos de calibración) pueden ser manejados automáticamente dentro de un instrumento
- Los Datos de calibración de un sensor pueden transferirse a otros instrumentos

- **No se requieren instalaciones de los sensores**
Sin instalación de mangueras, cables, válvulas, férulas o tornillos.
Insertando los vasos dentro del rotor e introduciéndolo en el horno, la presión y la temperatura estarán "conectados" con el sistemas.
Wireless(tienen un número de identificación individual, que se comprueba automáticamente)
 - Ahorro de tiempo en el manejo
 - Sin instalación, limpieza o mantenimiento de los sensores
 - **Sin tendencia a la corrosión** de los conectores eléctricos en la cavidad del horno
- **El Software genera informes de análisis con los datos obtenidos y transmite fácilmente los datos como archivos pdf, xls, txt, pgn a cualquier dispositivo USB o directamente al PC**
- Otras características importantes del equipo:

ASPECTOS DE SEGURIDAD:

Para Anton Paar la seguridad del operador es una de las más importantes cuestiones.

Para evitar riesgos y hacer nuestro instrumento lo más seguro posible el Sistema **Multiwave PRO** está equipado con un set de características especialmente diseñadas y muchas de ellas únicas:

- **Instrumento individualmente comprobado y testado:** todas las funciones relevantes y prestaciones son rigurosamente comprobadas antes de su despacho.
- **Procedimientos de manejo intrínsecamente seguros-** La construcción de los rotores y vasos no requieren manejo de los mismos ni calientes, ni presurizados después del proceso.
- **Con 10 sistemas de seguridad de sobrepresión**



- **Módulo de seguridad-SOLV PRO.** Obligatorio para aplicaciones de síntesis y extracción de microondas. Sólo puede utilizarse si se presenta alguna posibilidad de acumulación de mezclas de disolvente / aire explosivas. (Disolventes orgánicos)
- Tapa de protección para todos los Rotores. Esto reduce la posibilidad de que una rotura de la embarcación pueda dañar a los usuarios. Incluso reducen el daño a los otros vasos y la cavidad del horno.
- La cavidad no sólo es resistente a la corrosión, sino también fortificada para soportar explosiones en el Interior con poca deformación
- **Exacta Tecnología de los sensores:** Control real y fiable de microondas basado en datos exactos de los sensores de temperatura y presión.
- **4 conmutadores de enclavamiento a prueba de fallos, bloquea la puerta de una forma activa:** apaga la fuente de microondas directamente sin ninguna intervención del firmware o software. La puerta se abrirá en breve para reducir la presión interna acumulada, pero inmediatamente se volverá a sellar por fuerza magnética. Durante el funcionamiento de la puerta el mecanismo de apertura está activamente bloqueado hasta que se pueda esperar que la apertura sea segura de nuevo
- Todos los recipientes a presión tienen una determinada presión de trabajo permitida definida. Los Máxima tolerancia de los vasos es mucho mayor que la de Durante la operación. De esta manera se asegura que existe una Minimizar el riesgo de explosión del vaso. Los suministros están protegidos doblemente. Pruebas de presión con Presión de prueba de 140 bares
- **Protecciones múltiples contra sobrecalentamientos:** no solo los vasos están protegidos contra sobrecalentamientos por un sensor de temperatura IR o un adicional sensor interno de temperatura, sino también los magnetrones

- **CE certificado de conformidad:** muchos más detalles electrónicos y mecánicos, que hacen seguro al **Multiwave PRO** y que pueda ser manejado con mínimo riesgo para el usuario.

Documentación suministrada con el Equipo:

- Manual del equipo y del software en castellano
- Procedimientos de trabajo en castellano
- Certificado de validación del software
- Listado de repuestos en castellano

- Las **pautas de mantenimiento** de los componentes que puede realizar el cliente vienen en el propio manual. El mantenimiento preventivo del equipo, tiene que realizarlo el propio personal autorizado por Anton Paar

- La **puesta en marcha del equipo**, la realizarán personas autorizadas y preparadas por Anton Paar, en la ubicación indicada en el Laboratorio de Bailín, situado carretera de N-330 Km 623,4.
- Una vez instalado, se realizará la formación al personal del laboratorio que vaya a utilizar el equipo, durante el tiempo necesario, llevándose a cabo pruebas con muestras del cliente, verificando su perfecto funcionamiento, así como la consecución de los objetivos pretendidos por el proceso de digestión programado.
- Se entregará Documentación IQ-OQ básica de instalación, puesta en marcha, en la que se detallará el procedimiento y test realizados en dicha puesta en marcha.

En la formación se darán los fundamentos necesarios para un perfecto conocimiento de:

- Funcionamiento del equipo y sus componentes



- Sistema de digestión
 - Desarrollo de métodos específicos para el tratamiento de las muestras del cliente
 - Parámetros de las condiciones de ensayo
 - Puesta en marcha y parada
 - Correcciones y ajustes
 - Actividades de mantenimiento preventivo y correctivo
 - Calibraciones y verificaciones
 - Montaje e instalación de componentes y accesorios
 - Buen manejo del equipo en relación a la prevención de riesgos laborales
-
- Curso de formación del personal para el manejo del equipo, con sus rotores y vasos y limpieza y mantenimiento de todos ellos para mayor aprovechamiento del equipo y durabilidad de los materiales y de los vasos.
 - Se le suministra una lista de aplicaciones como guía orientativa para desarrollo de Nuevos métodos
 - El cliente puede contar con asesoramiento telefónico para solución de dudas surgidas en el uso posterior del equipo.
-
- **Garantía-** Massó Analítica, como distribuidora oficial en España, da una garantía para los equipos de Anton Paar de **2 años**, frente a cualquier defecto de fabricación.

ANEXO II: Hoja de especificaciones de la centrífuga empleada en el laboratorio:



Sorvall CC40NX and CC40SNX Ultracentrifuge Series

Large-scale, continuous-flow ultracentrifuge for development to commercial purification or concentration of viruses and nanosize particles

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Sorvall CC40NX Ultracentrifuge Series

While protecting the sample and maximizing the yield, the Thermo Scientific™ Sorvall™ CC40NX Ultracentrifuge Series offers an easy, cost-effective, reliable, and proven solution for large-scale isolation and purification of viral particles or nanosize particles for the development and manufacture of vaccines and other bioproducts with sample protection and maximized yield.

Features	Advantages
Separation of nanoparticles	Maximum speed of 40,000 rpm and an RCF up to 118,000 x g to support a wide variety of separation and density gradient centrifugation applications.
High-throughput continuous and batch processing	Up to 7.7 L maximum capacity with continuous-flow operation, and 8.0 L maximum with batch operation.
Scalability	Scale-up and scale-down model. Change the core piece only for linear scalability down to 0.2 L of your large-scale process. Develop process in small scale, and then scale up using the same process parameters.
Sample integrity and GMP ready	Reduced risk of cross-overs with the product line being at the highest pressure and supports GMP application with set of FAT, SAT, IQ, OQ and TurnOver Package document.
Data integrity	Control software supports U.S. FDA 21 CFR Part 11. With connectivity and Active Directory™ user management.
Safety	Complies with international standards and/or requirements, such as EN60204-1, EM12100, E61000-6-4, EN6100-6-2.
Sanitizable in place	The product line is designed with no dead zone and full drainability enabling the ability to clean and steam in place.
Electrical power supply	Utility limited to 1ph 30A power supply only. No need for a separate air turbine compressor and air exhaust filtration system, or an external cooling water loop, which provides location and workflow flexibility.
Reliability	Electrical drive system of the Sorvall CC40NX Ultracentrifuge Series is a highly reliable high-frequency induction motor. It operates in a very dry and low-pressure condition.
Quiet operation	68 dBA at 40,000 rpm. No need for operator-specific protection.



Figure 1. Highly reliable electrical drive system

Models and key features

The Sorvall CC40NX Ultracentrifuge Series is designed expressly to purify large-scale samples such as viral particles and nanosize particles. Depending on the rotors-cores selection, the Sorvall CC40NX Ultracentrifuge Series can be used to purify the sample by density gradient centrifugation, or by differential pelleting methods, either in continuous-flow or batch centrifugation.

In addition, the sample-contacting parts are made of corrosion-resistant stainless steel and titanium alloy, and USP Class VI compliant elastomers. The lift section of the main unit is made of stainless steel that has superior corrosion-resistance, to meet the needs of pharmaceutical manufacturers.



Figure 2. Sorvall CC40NX with optional add-ons



Figure 3. Sorvall CC40SNX with optional add-ons

Sorvall CC40NX Pilot -> Production Scale

The performance of this model is defined by its 8.0 L maximum capacity with batch centrifugation, and its 7.7 L maximum capacity with continuous-flow centrifugation, at speeds up to 40,000 rpm and a maximum RCF of 118,000 x g with titanium alloy and Noryl™ cores

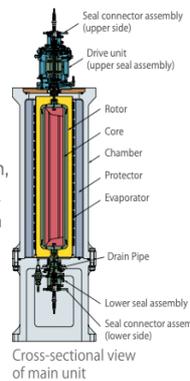


Figure 4. Model CC40NX cut view

Sorvall CC40SNX R&D -> Pilot Scale

With approximately one-half the capacity of the CC40NX, the CC40SNX is ideal for research, development, pilot production, and small-volume production of pharmaceuticals and nano-sized materials. This model has maximum capacity of 1.6 L, at speeds up to 40,000 rpm and a maximum RCF of 118,000 x g with titanium alloy and Noryl™ cores

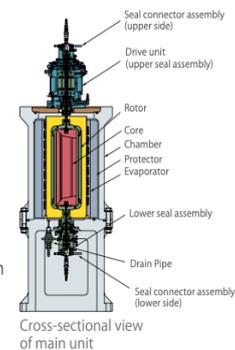


Figure 5. Model CC40SNX cut view

Touch-sensitive LCD panel

A Windows™ system-based PC controller offers simplified operation with a touch-sensitive LCD panel. Our touch screen design* with a graphical user interface (GUI) and high contrast, against a black screen, enables users to identify the operating status at a glance, and operate the system easily. The control software supports US FDA 21 CFR Part 11, such that the operating data are handled with high security and protected from corruption or falsification.

* Screen design is subject to change due to upgrades of software without advanced notice



Figure 6. GUI

Microcomputer control

CC40NX Ultracentrifuge Series has a self-diagnosis function that generates an alarm and error code to indicate the area of the abnormality in case of operational error, allowing the operator to easily find and correct the error.

Connectivity

Log data can be output in CSV or PDF format via a USB port or to a network share folder for data management and analysis by commercially available data base or spreadsheet software. Ethernet OPC-DA or Profibus-DP communication is also available for monitoring real time data and remote control operation.

User management can be local or remote via the Active Directory server allowing four different access levels.

Designed with safety in mind

The Sorvall CC40NX Ultracentrifuge Series complies with directions 2006/42/EC, 2014/30/EU, 2011/65/EU and with international standards and requirements, such as EN60204-1, EN12100, EN6100-6-4 and EN61000-6-2, as well as carrying the CE mark.

Usage counter

Lifetime management of consumable parts and rotor-core. Elapsed time and replacement time of the parts are managed and indicated on the display. Timers and warning displays are selectable.

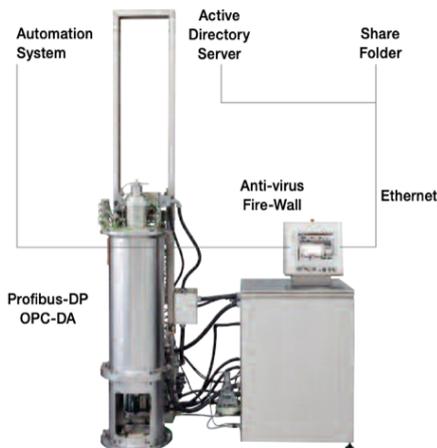


Figure 7. Sorvall CC40NX with connectivity

Wide selection of rotor and cores

Rotors

Two types of rotors are available for each Sorvall CC40NX and CC40SNX Ultracentrifuges. One is a regular-flow type and the other is a high-flow type. Both types of rotors are made of titanium alloy for strong corrosion resistance and high heat resistance.

O-rings and seals

O-rings and seals that contact the sample solution are made of materials that comply with USP Class VI are reusable multiple times.

Scale-up cores

In addition, scale-up cores are available to allow process development to start with smaller volumes and move later to manufacturing scale.

Linear scalability, with same particle separation, from 0.2 L to 3.2 L volume by different core length.

Noryl resin cores

Noryl resin is a superior material in terms of strength and chemical resistance. It shows satisfactory characteristics in saline solution in the range of pH 4 to pH 10. It can be damaged, however, by hydrocarbon fluids.

Titanium-alloy cores

There are several types of cores available made of either titanium alloy or Noryl resin. Titanium-alloy cores provide high temperature resistance and are suitable for steam-in-place (SIP) operations. Patent-approved, super light versions of the titanium cores* are similar in weight or lighter than Noryl resin cores of the same size. These light weight cores can achieve TCF of 118,000 x g at 40,000 rpm versus other similar cores available in the market.

*Available in Core (D2), Core (H), Core (A) and Core (AH)

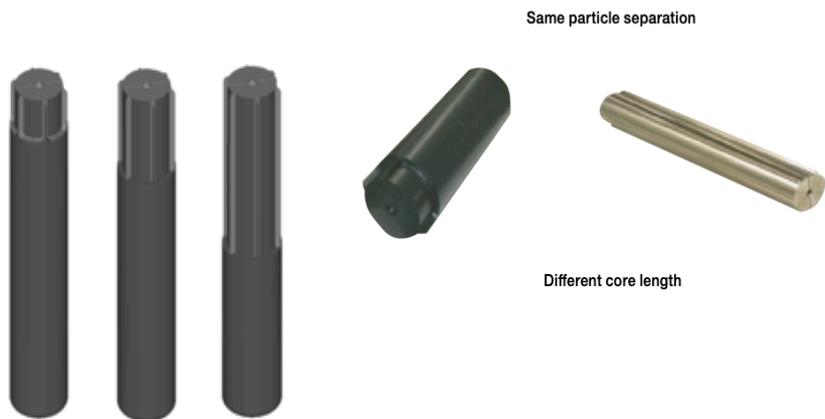
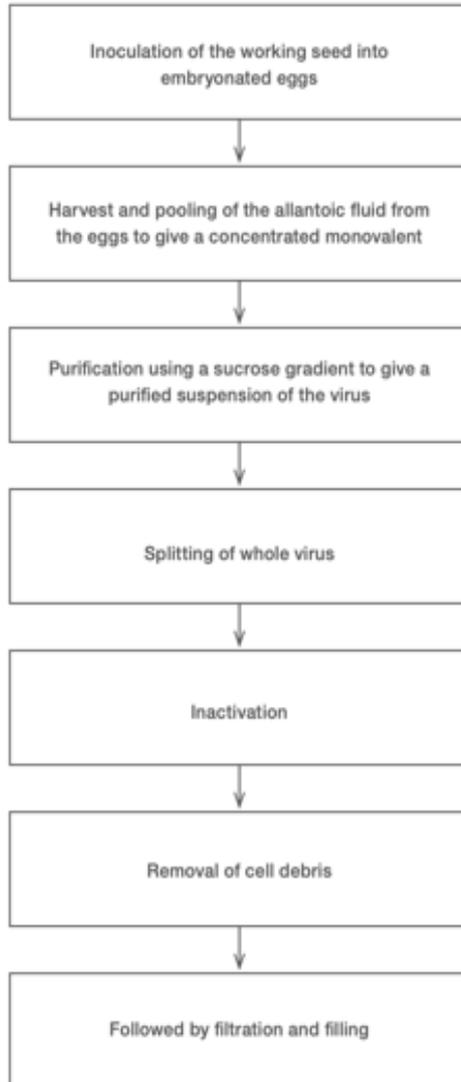


Figure 8. Scalable cores, with same particle separation and different core length for protocol linear transfer

Example of versatility on influenza vaccine



Sorvall CC40NX
Rotor C40CT31
Core (D2) 3.2 L



Density gradient separation

A density gradient is loaded into the rotor, the rotor is accelerated to zonal speed forming the vertical gradient. The buffer is continuously flown through the ultracentrifuge during acceleration to high-speed, then the product is loaded in continuous-flow. Product of interest is settling into isopycnic layer displacing supernatant to the waste. Once all the product is processed, the rotor is decelerated to stop. During rotor unloading, the fractions are analyzed by concentration and absorbance so the portion containing the purified and concentrated whole virus is harvested.

Sorvall CC40SNX
Rotor C40CTS6
Core (AH) 0.8 L



Pelleting separation

The product is processed in continuous-flow through the ultracentrifuge spinning at high speed. The debris pellets into the rotor and supernatant containing the antigen (Haemagglutinin (Ha) and Neuraminidase (Na) viral proteins) being the product of interest is harvested. The product is purified from debris in a large-volume batch. Once all the product is processed, the rotor is decelerated to stop, and the rotor with the pellet is removed for clean out of place.

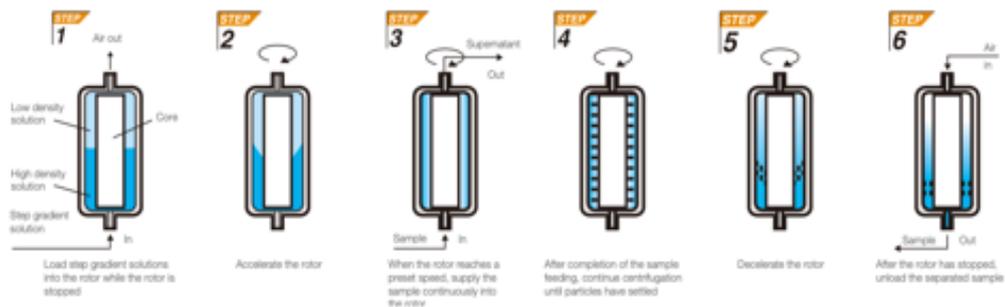
Figure 11. The manufacturing process of an inactivated influenza vaccine from split virus

Examples of other separations

Specifications

Applications	CC40NX Core	Max Speed/ Max RCF	RCF at Max Core Radius	Capacity	Material
Continuous flow isopycnic separation-which enables pelleting and clarification of the sample in the effluent	Core (D2)	40,000 rpm/ 118,000 x g	98,000 x g at 5.5 cm	3.2 L	Noryl Titanium
Continuous flow and batch-mode isopycnic separation	Linear scalable core	40,000 rpm 118,000 x g	98,000 x g at 5.5 cm	0.2 L 0.4 L 0.8 L 1.6 L 3.2 L	Noryl
Batch rate-zonal separation	Core (E)	40,000 rpm 118,000 x g	37,600 x g at 2.1 cm	8.0 L	Noryl
Similar application as Core(D), with added pre-clarifier on the sample entrance	Core (F)	40,000 rpm 118,000 x g	98,000 x g at 5.5 cm	3.2 L + 0.3 L	Noryl
Large-volume continuous flow isopycnic separation	Core (G)	40,000 rpm 118,000 x g	48,300 x g at 2.7 cm	7.7 L	Noryl

Figure 12. Example of separation applications and gradient separation



Clean in place, steam in place

Cleaning

To clean the rotor and the parts in contact with the sample, in place or out of place cleaning can be used.

The process for cleaning may be automatized with a washing cycle circulating hot water, water/air mix, spinning the rotor. The product contact path is free of any dead zone. It is fully drainable in place. No need for daily maintenance, limiting operator handling.

In case of sticky waste material inside the rotor, it is possible to remove the rotor for clean out of place and either install a bypass pipe, or upper shaft connecting piece, to seal the product line and perform clean in place of shafts, sealing unit and other product contact parts.

Sanitizing

To sterilize the rotor and the parts in contact with the sample, steam* or chemical sterilization can be used.

Different options are possible for rapidly cooling down the rotor with the titanium alloy cores.

*Steam generator, steam regulator and/or other utilities for SP are not included and should be prepared separately.

Active sample security

When the sample is active biohazard material, the Hepa™ filter installed on the main unit vacuum chamber vent and the Hepa filter installed on the face seal coolant tank ensure biocontainment.

The face seal coolant tank and line can be automatically sanitized by hot water setting temperature and contact time so the liquid can be safely handled. Level sensors are monitoring tank level for alerting operator in case of abnormal condition.

Description	Cat. No.
UC standard machine	
Sorvall CC40SNX standard machine, v2020 type	901207S1
Sorvall CC40NX standard machine, v2020 type	901206S1
Accessory	
Tool kit with SST hand press	S205021H
Template A in black painted steel	S409417A
Template B in stainless steel	S409417B
Rotor cart for Sorvall CC40SNX	S102222A
Rotor cart for Sorvall CC40NX	S205710B
FAT	S308110
cGMP document	S308048
Modification (factory installed)	
Control unit right hand side facing position	S312068A
Control unit left hand front facing position	S312069A
Control unit left hand side facing position	S312082A
Analog outputs and alarm relay contact	S312070A
Power cable for UPS	S312071A
Brake resistor remote	S312072A
Vacuum pump exhaust remote	S312073A
FSCL Phenol and hot water compatible	S312074A
FSCL automatic sanitization system	S312075A
LSOL Phenol compatible	S312076A
Tag medal in stainless steel	S312077A
Main unit in stainless steel	S312078A
Hepa filter	S312079A
Modification (field installed)	
Connecting piece for upper shaft CIP	S308475A
Connecting piece for upper and lower shafts CIP	On request
HMI masked cover removable	S312080A
Buffer tank for batch mode operation	S312081A
Aluminium travel case, Sorvall CC40NX Rotor	S205714
Aluminium travel case, Sorvall CC40NX Core	S2057142
Aluminium travel case, Sorvall CC40SNX Rotor	S206279
Aluminium travel case, Sorvall CC40SNX Core	S2062792
Modification (other)	
Other modification	On request

Sorvall CC40NX Ultracentrifuge rotors and cores specifications

Description								
Rotor Model No.	C40CT31					C40CT31	C40CT41 (High Flow) ¹	
Painted CIP-type (with aluminium travel box) Cat. No.	902017D3					902017D3	90201813	
Non-painted CIP-type (with aluminium travel box) Cat. No.	902017D6					902017D6	90201816	
Core type	Core (D2)	Ti-Core (D2) ²	Core (E)	Core (F)	Core (G)	Ti-Core (G)3	Core (H) ⁴	Ti-Core (H) ⁵
(with aluminium travel box) Cat. No.	S204856C	91202012	S301860D	S201219D	S201221C	S204477C	S203341D	91202110
Max speed	40,000 rpm					35,000 rpm	40,000 rpm	
Max RCF	118,000 x g					90,500 rpm	118,000 x g	
Rmax	66 mm					66mm	66 mm	
Core length	761 mm					761 mm	761 mm	
Rotor weight	31 kg					31 kg	31 kg	
Rotor material	Titanium alloy					Titanium alloy	Titanium alloy	
O-ring material	FKM [*]					FKM [*]	FKM [*]	
Process flow pressures and rate	1.5 bar max. (Up to 90 L/Hr when loading)		Batch	1.5 bar max. (Up to 90 L/Hr when loading)		1.5 bar max. (Up to 90 L/Hr when loading)	1.5 bar max. (Up to 90 L/Hr when loading)	
Rmin	55 mm	21 mm	55 mm	27 mm	27 mm	55 mm		
RCF at Rmin	98,000 x g	37,600 x g	98,000 x g	48,300 x g	37,000 x g	98,000 x g		
Capacity	3.2 L	8.0 L	3.2 L + 0.3 L ¹	7.7 L	7.7 L	3.2 L		

1. The C40CT41 rotor, using Core (H) and Ti-Core (H), is designed with 30% lower flow restriction compared to the C40CT31 rotor, which allows for a higher flow rate for viscous samples.
 2. The shape and size of Ti-Core (D2) are the same as Core (D2).
 3. The shape and size of Ti-Core (G) are the same as Core (G). C40CT31 rotor and Ti-Core (G) are factory set matched.
 4. The shape and size of Ti-Core (H) are the same as Core (H).
 5. A pre-clarifier adds the indicated 0.3 L.
 6. Core (H) Nonyl for C40CT41 rotor also available in 0.2 L (S2063108), 0.4 L (S2063118), 0.8 L (S1025348) and 1.6 L (S2063128) volume (max 35,000 rpm).
^{*} FKM: Fluorocastomer rubber, USP Class VI compliant.

Sorvall CC40SNX Ultracentrifuge rotors and cores specifications

Description					
Rotor Model No.	C40CTS5			C40CTS6 (High Flow) ⁷	
Painted CIP-type (with aluminium travel box) Cat. No.	902023D3			90202413	
Non-painted CIP-type (with aluminium travel box) Cat. No.	902023D6			90202416	
Core type	Core (A)	Ti-Core (A) ⁸	Core (B)	Core (A) ⁹	Ti-Core (A) ⁹
(with aluminium travel box) Cat. No.	S200332C	S204334C	S200335C	S204092C	S204335C
Max speed	40,000 rpm			40,000 rpm	
Max RCF	118000 x g			118000 x g	
Rmax	66mm			66 mm	
Core length	382 mm			382 mm	
Rotor weight	15 kg			15 kg	
Rotor material	Titanium alloy			Titanium alloy	
O-ring material	FKM [*]			FKM [*]	
Process flow pressures and rate	1.5 bar max. (Up to 90 L/Hr when loading)			1.5 bar max. (Up to 90 L/Hr when loading)	
Rmin	55 mm			55 mm	
RCF at Rmin	98,000 x g			98,000 x g	
Capacity	1.6 L		1.6 L + 0.15 L ¹⁰	1.6 L	
Core material	Noryl	Titanium	Noryl	Noryl	Titanium

7. The C40CTS6 rotor, using Core (A)⁸ and Ti-Core (A)⁸, is designed with 30% lower flow restriction compared to the C40CTS5 rotor, which allows for a higher flow rate for viscous samples.

8. The shape and size of Ti-Core (A) are the same as Core (A).

9. The shape and size of Ti-Core (A) are the same as Core (A).

10. A pre-clarifier adds the indicated 0.15 L.

11. Core (A)⁹ Noryl for C40CTS6 rotor also available in 0.2 L (S2057288), 0.4 L (S2057298) and 0.8 L (S2063098) volume (max 35,000 rpm).

* FKM: Fluoroelastomer rubber, USP Class VI compliant.

thermoscientific

Specifications

Model	CC40NX, v2020 type	CC40SNX, v2020 type
Cat. No.	901206S1	901207S1
Max speed	40,000 rpm	
Max RCF	118,000 x g	
Speed control accuracy	+/- 100 rpm	
Temperature control accuracy	+/- 2°C	
Speed setting range	from 1,000 rpm to 40,000 rpm	
Temperature setting range	from 0°C to 40°C	
Timer setting range	from 1 min. to 99 hours 59 min. (with HOLD function)	
Vacuum system	Oil rotary vacuum pump	
Drive system	Induction motor (direct drive)	
Control system	Microcomputer control	
Control panel specification	IP65 with color touch-sensitive LCD panel HMI Windows 10 OS	
Noise level	68 dB	
Cooling system	Integrated refrigerator (R513a)*	
Process connections	½ in. Sanitary Tri-Clamp	
Sample contact material	SUS630, FKM O-rings, RULON641 face seals, Titanium alloy, SUS316L, PTFE	
Lubricants	General and H1 FDA oil	
Language	English, French, German, Spanish	
Dimensions (WxDxH)	1,750 x 1,150 x 2,950 mm Height to top of the controller: 1,400 mm	1,750 x 1,150 x 2,160 mm Height to top of the controller: 1,400 mm
Weight	900 kg	770 kg
Power	AC 200, 208, 220, 230, 240 V +/- 10%, Single phase, 30A, 50/60Hz	

* This product complies with F-Gas REGULATION (EU) No 517/2014. It contains fluorinated greenhouse gases in a hermetically sealed system. See Technical Data Sheet for full details

Find out more at thermofisher.com/cc40

This product is intended for General Laboratory Use. It is the customer's responsibility to ensure that the performance of the product is suitable for customer's specific use or application. © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. Windows and Active Directory are trademarks of Microsoft

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ANEXO III: Balances económicos de los Escenarios 1 y 2
Balance económico del Escenario 1 Grano de café agotado:

CUENTA DE RESULTADOS	Año				
	0	1	2	3	4
Descripción (€)					
A1. Capital Inmovilizado	21000	80800	120000		
A2. Capital Circulante				10000	
A. FI - Fondos Invertidos	-21000	-80800	-120000	0	0
B1. Ingresos por Ventas				144000	144000
B2. Costes				-170000	-170000
B. Margen Bruto				31600	31600
C1. Amortización				-20000	-20000
C. BAI - Beneficio antes de Impuestos				-46000	-46000
D1. Impuestos				-24400	-24400
D. BDI - Beneficio después de Impuestos				-70400	-70400
E. FGO - Fondos Generados por las operaciones	-21000	-80000	-120000	-70400	-70400
F. FGO-R - Movimiento de Fondos Cash Flow Acumulado	-21000	-101000	-221000	-291400	-361800

Balance económico en el escenario 1: grano de café agotado (continuación)

Año								
5	6	7	8	9	10	11	12	13
0								
144000	144000	144000	144000	144000	144000	144000	144000	144000
-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000
-26000								
-20000	-20000	-20000	-20000	-20000	-20000	-20000	-20000	-20000
-46000								
-24400	-24400	-24400	-24400	-24400	-24400	-24400	-24400	-24400
-70400								
-70400								
-432200	-502600	-573000	-643400	-713800	-784200	-854600	-925000	-995400

Balance económico del Escenario 2 Kale:

CUENTA DE RESULTADOS	Año				
	0	1	2	3	4
Descripción (€)					
A1. Capital Inmovilizado	21000	80800	121200		
A2. Capital Circulante				10000	
A. FI - Fondos Invertidos	-21000	-80800	-121200	0	0
B1. Ingresos por Ventas				201600	201600
B2. Costes				-170000	-170000
B. Margen Bruto				31600	31600
C1. Amortización				-20200	-20200
C. BAI - Beneficio antes de Impuestos				11400	11400
D1. Impuestos				-35920	-35920
D. BDI - Beneficio después de Impuestos				-24520	-24520
E. FGO - Fondos Generados por las operaciones	-21000	-80800	-121200	-24520	-24520
F. FGO-R - Movimiento de Fondos Cash Flow Acumulado	-21000	-101800	-223000	-247520	-272040

Balance económico del Escenario 2: Kale (continuación)

Año								
5	6	7	8	9	10	11	12	13
0								
201600	201600	201600	201600	201600	201600	201600	201600	201600
-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000	-170000
31600								
-20200	-20200	-20200	-20200	-20200	-20200	-20200	-20200	-20200
11400								
-35920	-35920	-35920	-35920	-35920	-35920	-35920	-35920	-35920
-24520								
-24520								
-296560	-321080	-345600	-370120	-394640	-419160	-443680	-468200	-492720

ANEXO IV: Gráfica Viscosidad vs Volumen

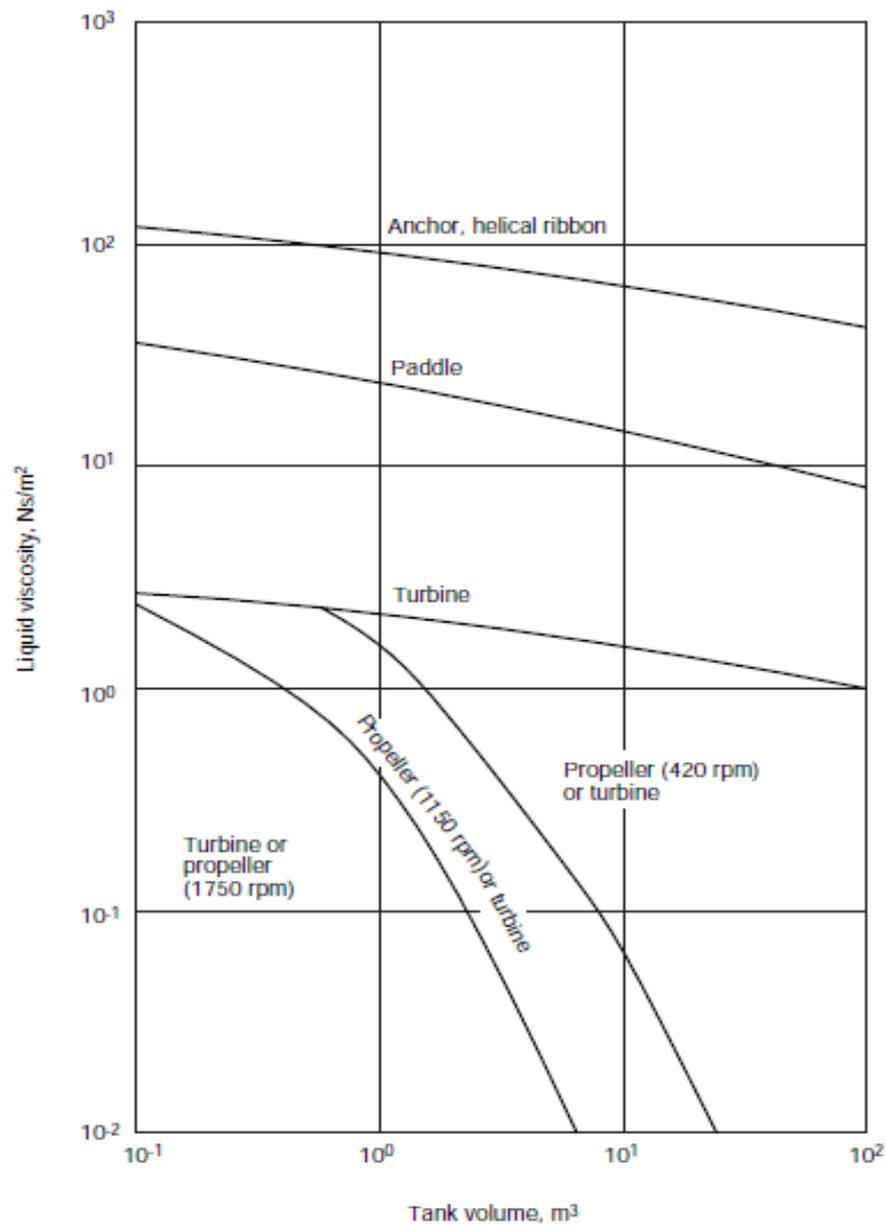


Figure 10.57. Agitator selection guide

ANEXO V: Gráfica Número de potencia vs Reynolds

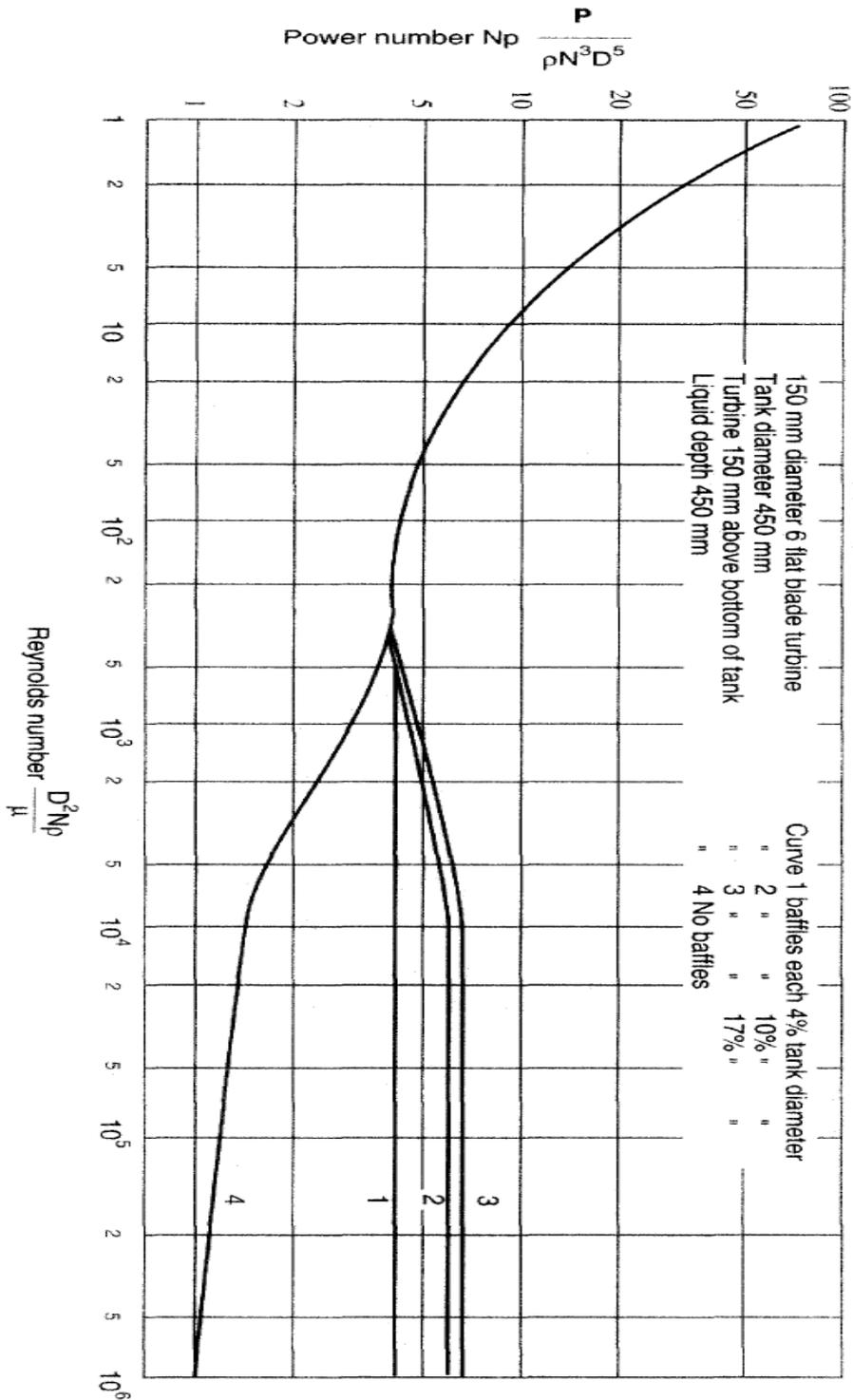


Figure 7.7. Power number as a function of Reynolds number for a turbine mixer