

00567
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 201



FACULTAD DE QUIMICA

**“DESARROLLO DE UN PROCESO ENZIMATICO
PARA LA EXTRACCION DE ACEITES
VEGETALES”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS
(QUIMICA DE ALIMENTOS)

P R E S E N T A :

DAVID RUBIO HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I	INTRODUCCION	1
II	ANTECEDENTES	3
	Tecnología enzimática.....	3
	Tecnología de grasas y aceites	16
III	MATERIALES Y METODOS	25
	Plan de trabajo	25
	Materiales	27
	Métodos	31
IV	RESULTADOS	35
V	CONCLUSIONES	63
VI	BIBLIOGRAFIA	65

I INTRODUCCION

A pesar de que el uso de las enzimas en la producción y conservación de los alimentos se remonta a los primeros tiempos de la humanidad en la producción de quesos, vinos, leche agria, etc., en las últimas décadas, dentro del auge de la Biotecnología, se han intensificado los estudios de aplicación de las enzimas para mejorar y/o sustituir algunos procesos tradicionales de producción de alimentos o de aditivos para alimentos.

La utilización de enzimas en la Industria Alimentaria presenta muchas ventajas: son muy específicas en su forma de acción, funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, su velocidad de reacción puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de enzima y son fácilmente inactivadas después de haber alcanzado el cambio deseado. Las limitaciones para su uso dependen del tipo de enzima, las más comunes suelen ser su elevado costo y su disponibilidad a nivel industrial. Actualmente existe la tendencia a emplearlas en forma continua, de esta manera muchas reacciones enzimáticas se han vuelto atractivas para la industria, dado que los costos bajan debido a la alta eficiencia de utilización de la enzima.

El presente proyecto está basado en la experiencia obtenida a lo largo del desarrollo de dos procesos relacionados con la extracción enzimática de aceites vegetales: "Extracción de aceite de coco por un nuevo proceso enzimático" (McGlone, López-Munguía y Vernon, 1986) y "Extracción enzimática de aceite de aguacate" (Buenrostro y López-Munguía, 1986). Dados los buenos resultados obtenidos en dichos procesos, se pensó en adaptar esta tecnología a procesos de extracción de aceites de otros materiales. Se decidió aplicarla para obtener productos de naturaleza lipídica de un alto valor agregado y en los cuales los residuos o subproductos fueran de interés secundario.

Así, el objetivo principal de este trabajo es determinar la factibilidad técnica de la extracción de aceites de alto valor agregado por medios enzimáticos.

I ANTECEDENTES

INTRODUCCION A LA TECNOLOGIA ENZIMATICA

El área de la biotecnología ha sido considerada, en años recientes, como una de las opciones más atractivas y de mayor potencial en la solución de los problemas de alimentación, salud, energía y contaminación, cuya complejidad y magnitud crecen día con día.

La razón principal para ello es que siendo los microorganismos, las células vegetales y las animales, antes muy versátiles, es posible concebir — a través de diversas técnicas — que se pueda llegar a suministrar al hombre todos los productos que requiere para cubrir sus necesidades; desde drogas y agentes saborizantes hasta energéticos y compuestos químicos de amplio uso. Esto es precisamente lo que hace que la combinación entre las ciencias biológicas y la ingeniería, la denominada biotecnología, se haya convertido en un inmenso campo de estudio que presenta grandes atractivos.

El término biotecnología es ambivalente y se confunde con conceptos tales como ingeniería bioquímica, tecnología microbiana, tecnología enzimática, etc. pero el significado más aceptado es que consiste en el procesamiento industrial de materiales por microorganismos y otros agentes biológicos para proveer productos y servicios deseables. Por tratarse de una área multidisciplinaria, incorpora otras muy diversas, tales como tecnología enzimática, microbiología industrial, genética, química, ingeniería, etc..

Los procesos biológicos se llevan a cabo, en gran medida, por reacciones catalizadas por proteínas que se conocen como enzimas (20).

La idea de que en las reacciones biológicas interviene algún tipo de catálisis es conocida desde 1835, cuando J. Berzelius descubrió que el almidón se hidrolizaba más rápidamente en una disolución de diastasa de malta (actualmente identificada como la enzima amilasa) que en agua pura. Durante muchos años se pensó que las enzimas eran una parte fundamental de la estructura y vida de la célula. En 1897, Hans y Eduard Buchner consiguieron extraer de células de levadura las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica; este hecho demostró claramente que las enzimas pueden actuar fuera de la célula. Sin embargo, fué hasta 1926 cuando se aisló, por J.B. Sumner, la primera enzima pura y cristalizada (la ureasa). Sumner fué también el primero en demostrar que las enzimas son proteínas. Actualmente se conocen casi 2 000 enzimas y unas 200 se han obtenido en forma cristalina (22).

Las enzimas presentan las siguientes características generales (11 y 20):

1. Son muy específicas.
2. La velocidad de reacción es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la de los catalizadores inorgánicos.
3. Las condiciones de reacción, temperatura y presión relativamente bajas, hacen que su uso sea poco costoso.

Además, los recientes adelantos en diversas áreas han permitido que las enzimas tengan más aplicaciones porque:

4. Se pueden producir fácilmente y en gran cantidad mediante técnicas genéticas.
5. Se pueden reutilizar mediante técnicas de inmovilización.
6. Se pueden realizar reacciones de síntesis en varios pasos.

Las áreas de aplicación actual de la tecnología enzimática son muy diversas y comprenden desde la agricultura, la química, la energética y los alimentos hasta la de cosméticos y productos farmacéuticos.

USO DE ENZIMAS EN LA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Desde hace varias décadas la industria agroalimentaria ha utilizado las enzimas para mejorar y transformar las propiedades de algunas materias primas, al principio estas aplicaciones fueron extremadamente empíricas y difíciles de reproducir. La aplicación en escala industrial de la catálisis enzimática es el resultado de la elucidación de los principios fundamentales de esta área de la bioquímica y de la posibilidad de producir enzimas en gran escala, principalmente a partir de cultivos microbianos. Sin embargo, es necesario recordar que sólo los microorganismos considerados como "seguros" (como Bacillus subtilis, Aspergillus niger, etc) se pueden utilizar en la producción de enzimas aplicables en el campo de los alimentos. En la actualidad hay una creciente tendencia a usar enzimas de origen microbiano en lugar de las de origen vegetal o animal, tanto porque aquéllas son de más fácil obtención como porque poseen propiedades más adecuadas de termostabilidad, resisten mejor las fluctuaciones de pH, etc. (18).

El tecnólogo de alimentos enfoca las enzimas desde diferentes puntos de vista; desde luego que uno de los aspectos fundamentales lo constituyen los procesos en los que se produce un cambio mediante la adición de una enzima (ej. la producción de queso, la clarificación de jugos de frutas, etc.), o más aún los casos en que las materias primas se producen mediante reacciones enzimáticas: resolución de mezclas racémicas, producción de fructosa, producción de triptofano, etc..

Pero también el tecnólogo de alimentos enfrenta la presencia de enzimas en prácticamente todos los materiales que maneja, de tal forma que deberá crear, en ciertos casos, las condiciones adecuadas para que actúen enzimas endógenas responsables de cambios benéficos en los alimentos. En otras circunstancias, los cambios que ocasionan la acción de las enzimas operan en detrimento de la calidad del alimento, ya sea por pérdidas del valor nutritivo o por cambios indeseables en el color y la textura.

El tecnólogo podrá también beneficiarse de la termolabilidad de las enzimas; en ocasiones la estabilidad térmica de una enzima es tal, que su desestabilización o inactivación coinciden con un tratamiento térmico necesario en el procesamiento de alimentos, y así podrá establecerse un método de control de calidad indirecto (ej. la inactivación de la fosfatasa alcalina en la pasteurización de la leche).

El tecnólogo de alimentos enfoca las enzimas desde diferentes puntos de vista; desde luego que uno de los aspectos fundamentales lo constituyen los procesos en los que se produce un cambio mediante la adición de una enzima (ej. la producción de queso, la clarificación de jugos de frutas, etc.), o más aún los casos en que las materias primas se producen mediante reacciones enzimáticas: resolución de mezclas racémicas, producción de fructosa, producción de triptofano, etc..

Pero también el tecnólogo de alimentos enfrenta la presencia de enzimas en prácticamente todos los materiales que maneja, de tal forma que deberá crear, en ciertos casos, las condiciones adecuadas para que actúen enzimas endógenas responsables de cambios benéficos en los alimentos. En otras circunstancias, los cambios que ocasionan la acción de las enzimas operan en detrimento de la calidad del alimento, ya sea por pérdidas del valor nutritivo o por cambios indeseables en el color y la textura.

El tecnólogo podrá también beneficiarse de la termolabilidad de las enzimas; en ocasiones la estabilidad térmica de una enzima es tal, que su desestabilización o inactivación coinciden con un tratamiento térmico necesario en el procesamiento de alimentos, y así podrá establecerse un método de control de calidad indirecto (ej. la inactivación de la fosfatasa alcalina en la pasteurización de la leche).

Igualmente se ha propuesto a las enzimas como indicadores biológicos del estado fisiológico de diferentes vegetales (ej. la peroxidasa se relaciona con el daño celular, las esterases como indicadoras de contaminación fungal, etc.)

En el aspecto analítico, las enzimas permiten determinar cuantitativamente sustancias orgánicas. Hoy en día existen reactivos enzimáticos para determinar cerca de 30 sustancias (ej. glucosa, colesterol, ácido ascórbico y cítrico, lactosa, etc.).

En realidad, la mayor parte de las enzimas disponibles para su aplicación en alguna etapa del procesamiento de alimentos, pueden considerarse como aditivos y es justamente en estos términos que son consideradas para efectos de regulación y legislación. No cualquier enzima puede ser usada en alimentos, en el caso de las enzimas microbianas, por ejemplo, es necesario primero demostrar que no existe ningún riesgo tóxico por la enzima misma o por el microorganismo que la produjo. Esto resulta demasiado costoso y consume mucho tiempo, razón por la cual no es sorprendente encontrar que Bacillus subtilis y Aspergillus niger, dos microorganismos inocuos, que como ya se mencionó son considerados como GRAS (generalmente reconocidos como seguros) por la FDA (Food and Drug Administration de los EEUU), sean utilizados para producir la mayoría de las enzimas a nivel industrial (16).

En la tabla 1 se presentan las principales enzimas utilizadas en la industria de los alimentos (1 y 18).

TABLA 1 PRINCIPALES ENZIMAS UTILIZADAS EN LA IND. DE ALIMENTOS.

INDUSTRIA	ENZIMA
PANADERA Y CEREALES	alfa-amilasa Proteasa fúngica Lipoxidasa pentosanasa
CERVECERA	alfa-amilasa bacteriana Proteasa bacteriana Amiloglucosidasa fúngica Papaina beta-glucanasa
AZUCARERA	alfa-amilasa bacteriana Amiloglucosidasa fúngica Invertasa Glucosa isomerasa
LACTEA	Renina o sustitutos Penicilinas Niciasas Lactasa Catalasa
HELADOS	Lactasa
FRUTAS Y HORTALIZAS	Pectinasas Celulasas Naranginasas
HUEVO	Glucosa oxidasa Lipasas Proteasas
CARNES Y PESCADOS	Papaina Bromelina
VITIVINICOLA	Pectinasas Glucosa oxidasa

INMOVILIZACION DE ENZIMAS

En la actualidad la mayoría de las enzimas producidas que se utilizan en la industria alimenticia, son usadas en forma ineficiente. La reacción ocurre en bastante tiempo, requiriéndose una gran cantidad de enzima y contando con dificultades en el control del proceso. El producto puede además inhibir la acción de la enzima y limitar el éxito de la reacción. Las enzimas en las células vivientes son más eficientes porque actúan como catalizadores inmovilizados. Una enzima inmovilizada es una enzima activa pero insoluble, cuya movilidad difusional libre se encuentra restringida.

Nelson y Griffin en 1915, descubrieron accidentalmente en el laboratorio la fijación de una enzima activa por adsorción de invertasa en Alúmina y Carbón vegetal. Grubhofer y Schleith (1954) acoplaron por primera vez una enzima a un soporte por enlace covalente usando poliaminostireno diazotado, estudio en el que invirtieron varios años. Mosbach y Mattiason, en 1970-1971, encontraron por estudio en diferentes enzimas, que era más eficientes en su forma inmovilizada que en su forma libre (1 y 19).

En los últimos 10 años ha habido un importante número de métodos reportados para inmovilizar enzimas. Las ventajas del uso de enzimas inmovilizadas son:

- Capacidad de reuso.
- Son fácilmente separables de los reactantes al finalizar la reacción.
- Permiten un control más preciso de la reacción.
- Generalmente presentan un incremento en la estabilidad de operación.
- Reduce la inhibición por producto.
- No ocurre autodigestión de enzimas proteolíticas.
- Se reducen las posibilidades de reacciones inmunológicas.
- Permite el uso de enzimas de organismos patógenos.
- Permite la operación al alterar el pH óptimo por modificación característica de la carga del soporte.

Los procesos de inmovilización de enzimas pueden ser clasificados en dos categorías generales, pudiendo presentarse combinación de ellas: enzimas inclusas o atrapadas y enzimas ligadas (1 y 14). Sin profundizar mucho en el conocimiento de la inmovilización de enzimas, se puede pensar que mediante estas nuevas técnicas se mejorará considerablemente su modo de acción y por tanto, su aplicación en la tecnología de alimentos y otras áreas aumentará de manera importante. Los principales incentivos son el desarrollo de nuevos productos y la reducción en el costo de los productos existentes a través de un incremento en la vida de la enzima y en su productividad (15).

A continuación se mencionarán algunas de las principales características de las enzimas utilizadas en este trabajo:

AMILASAS

Las amilasas son las enzimas responsables de la hidrólisis del almidón, encontrándose ampliamente distribuidas en la naturaleza; actúan sobre almidón, glucógeno y derivados de otros polisacáridos hidrolizando los enlaces alfa - 1, 4 glucosídicos. Las amilasas pueden dividirse en tres grupos a saber: las alfa-amilasas, las beta-amilasas y las glucoamilasas.

La alfa-amilasa (alfa-1, 4 glucan-glucanohidrolasa, EC.3.2.1.1.) es una endoamilasa que hidroliza los enlaces alfa-1,4 glucosídicos del interior del sustrato y lo hace al azar, produciendo poder reductor. El modo de acción, propiedades y producto de reacción difieren dependiendo de la fuente de obtención de la enzima. Existen alfa-amilasas tanto en plantas como en tejidos de mamíferos y microorganismos. Se han obtenido alfa-amilasas con un alto grado de pureza a partir de cebada malteada, de Aspergillus oryzae, de la saliva humana, del páncreas porcino y de Bacillus subtilis (10).

PECTINASAS

Las pectinasas son enzimas que degradan a las pectinas, polisacáridos formados por moléculas de ácido D-galacturónico unidos por enlaces glucosídicos alfa - D - 1,4 en donde algunos grupos carboxílicos están esterificados con grupos metilos, y que se obtienen de plantas superiores y microorganismos. Las pectinasas se clasifican en tres grupos: las pectinesterasas, las poligalacturonasas y las pectintranseliminadas.

Las pectinesterasas (pectin pectil-hidrolasa, EC. 3.1.1.11.) hidrolizan los grupos metilos de los carboxilos del ácido D-galacturónico con la producción de metanol, las cantidades producidas no llegan a alcanzar niveles tóxicos. La actividad de esta enzima es determinada por medio de la relación de metanol producido o la precipitabilidad con calcio del ácido péctico formado.

Las poligalacturonasas (poli-alfa-1,4 galacturon glucano hidrolasa EC. 2.3.1.15) hidrolizan los enlaces glucosídicos de las pectinas en presencia de agua. Estas se subdividen en base a la forma de ataque sobre el sustrato y de la naturaleza de este en endo y exo polimetilgalacturonasas y en endo y exo poligalacturonasas. Se pueden diferenciar unas de otras mediante la relación de su actividad con el sustrato.

La presencia de NaCl juega un papel importante en la máxima actividad de las poligalacturonasas ya que parece ser que evita la inhibición por producto de la enzima; algunas de ellas requieren del ión calcio para una actividad óptima.

La pectintranseliminasa (poli-alfa-1,4-D-galacturon liasa, EC. 4.2.99.3.) rompe el enlace glucosídico por una eliminación trans de hidrógeno de los carbonos 4 y 5 del ácido D-galacturónico con la consecuente formación de un doble enlace. La actividad de la enzima se puede medir por el incremento en la absorbancia a 235 nm causada por la formación del doble enlace.

Las pectintranseliminases sólo son producidas por microorganismos, su pH óptimo se encuentra entre 8.5 y 9.5 y requieren del ión calcio para incrementar su actividad (4).

PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas de una manera ordenada debido a su especificidad para un determinado enlace peptídico. En base a esto, las proteasas pueden ser: endopeptidasas, las cuales hidrolizan los enlaces peptídicos internos y exopeptidasas, las que atacan a los aminoácidos terminales de las proteínas. Las exopeptidasas a su vez se subdividen en aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Las primeras actúan a partir del grupo amino terminal y las segundas sobre el carboxilo terminal de las proteínas.

A partir de 1960 se propuso un nuevo sistema de clasificar a las proteasas (Hartley) en base a la naturaleza química de su sitio activo. A continuación se mencionan los cuatro grupos propuestos:

Serino proteasas. Tienen un residuo serilo específico en su sitio activo, siendo todas ellas endopeptidasas. La tripsina, la quimotripsina, la elastasa y la subtilisina pertenecen a este grupo.

Sulfidril proteasas. Para su actividad dependen de la presencia de un grupo sulfidrilo en su sitio activo y son inhibidas por agentes quelantes y por iones de metales pesados. Ejemplo de estas enzimas son la papaína , la bromelina y la ficina.

Metalo proteasas. También conocidas como metaloenzimas, dependen para su actividad de la presencia de un ión metálico que se encuentra en relación estequiométrica con la molécula de la proteína. Las carboxipeptidasas y algunas aminopeptidasas pertenecen a este grupo.

Proteasas Ácidas. Estas poseen dos grupos carboxilo en su sitio activo y son inhibidas por bromuro de p-bromofenacilo o por reactivos diazo. Su pH óptimo de actividad se sitúa del lado ácido. Ejemplo de estas enzimas son la pepsina y la renina (4).

CELULASAS

Celulasas es el nombre común de las enzimas beta-1,4-glucan 4 glucanohidrolasas (EC. 3.2.1.4.) y pueden ser divididas en tres grupos:

- a) La Cl, que es un factor cuya acción no ha sido aclarada, se requiere para la hidrólisis de celulosa altamente cristalina.
- b) La glucanasa, que puede ser de dos tipos; la exo-beta-1,4-glucanasa y la endo-beta-1,4-glucanasa.
- c) Las beta-glucosidasas o celobiasa, que muestran la más alta afinidad hacia celobiosa como sustrato.

El pH óptimo de las celulasas está generalmente entre 4.5 y 6.5, las preparaciones comerciales de Aspergillus niger o Trichoderma viride muestran actividades óptimas entre 4.5 y 5.5 .

Las celulasas muestran también una sorprendente estabilidad al calentamiento; la celulasa de Myrothecium verrucaria en ausencia de sustrato tiene 20 por ciento de su actividad original después de calentarla 10 min. a 100 ° C. Las exocelulasas pierden su actividad completamente cuando se hierven por 2 min. , mientras que las endo pierden solamente de un 25 a un 37 % de su actividad (medida como degradación de carboximetilcelulosa). Incluso se han reportado temperaturas óptimas de 55 y 60 °C para algunas celulasas.

Las celulasas son fuertemente inhibidas por glucanolactonas, pero el efecto inhibitorio por metales pesados tales como el cobre o algunas sales de mercurio puede ser reversible con un poco de Cisteína (10).

INTRODUCCION A LA TECNOLOGIA DE GRASAS Y ACEITES.

Los lípidos son un grupo de compuestos de estructura heterogénea muy abundantes en la naturaleza, del que las grasas y aceites son los representantes más importantes. Están formados por carbono, oxígeno e hidrógeno y en ciertos casos también pueden contener fósforo y nitrógeno. Dentro de los compuestos clasificados como lípidos existe una gran variedad de sustancias que presentan poca o nula similitud en su estructura química, pero todas tienen la particularidad de que son solubles en disolventes orgánicos, e insolubles en agua; de hecho, esa es la definición de lípidos: "compuestos solubles en éter, cloroformo y otros disolventes no polares, pero insolubles en agua" (13 y 11). Sin embargo, algunos compuestos clasificados como tal, son solubles en agua como es el caso de las lecitinas (25).

Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas importantes como: 1) componentes estructurales de todas las membranas celulares, 2) transporte y almacenamiento de combustible catabólico, 3) cubierta protectora de muchos organismos y 4) componentes de la superficie celular relacionada con el reconocimiento de las células y con la inmunidad de los tejidos. Algunas sustancias clasificadas como lípidos poseen una intensa actividad biológica, como es el caso de algunas vitaminas y hormonas.

Los lípidos han sido clasificados de diferentes maneras; sin embargo, la más satisfactoria es la que se basa en su estructura, así se tienen:

A) Lípidos complejos saponificables, los cuales se caracterizan por tener ácidos grasos como componentes. Comprenden los acilglicéridos, los esfingolípidos, los fosfoacilglicéridos y las ceras. Reciben también el nombre de lípidos saponificables porque producen jabones (sales metálicas de ácidos grasos) por hidrólisis alcalina.

B) Lípidos sencillos, éstos no contienen ácidos grasos y por lo tanto no son saponificables, aquí se incluyen a los terpenos, los esteroides y las prostaglandinas.

En el área de los alimentos se tiene un especial interés por dos clases principales de lípidos: las grasas y los aceites, constituidos por ácidos grasos unidos por enlaces éster a una molécula de glicerol, formando triacilglicéridos principalmente. Por conveniencia se ha establecido que la diferencia entre una grasa y un aceite es que la primera es sólida a temperatura ambiente mientras que los segundos son líquidos en las mismas condiciones. Esta definición no es totalmente correcta y tiende a desaparecer. Actualmente se utiliza el término grasa para referirse a los triacilglicéridos sin importar su estado físico a temperatura ambiente, siendo los aceites la forma líquida de éstos (25).

Normalmente, los aceites son de origen vegetal —soya, algodón, cártamo, ajonjolí, etc.—, mientras que las grasas son de origen animal —cerdo, vaca, oveja, etc.. Las grasas y los aceites son nutrimentos fundamentales en la dieta de los animales, ya que representan la forma más concentrada de calorías en los alimentos. Además de su valor nutritivo, los lípidos contribuyen en muchos aspectos a la textura de los alimentos, sirven como vehículo de las vitaminas liposolubles e influyen en el sabor de muchos productos alimenticios. Las grasas son muy pobres conductores del calor y por ello el tejido adiposo sirve como aislante natural en los animales. Así, se puede afirmar que las principales fuentes de aceites y grasas son los tejidos animales y las semillas oleaginosas, ya que los frutos y los vegetales contienen en general muy bajas concentraciones, aunque existen excepciones como el aguacate, las aceitunas y algunos de nueces, que tienen un promedio de 20 % de lípidos (3 y 11).

En cuanto a la extracción de lípidos, parece ser que los primeros intentos para procesar las semillas oleaginosas ocurrieron desde tiempos remotos. Las antiguas escrituras de la India hablan de la molienda y subsecuente hervido de la semilla de algodón para la recuperación de aceite. Se dice que los antiguos chinos obtenían aceite triturando las semillas oleaginosas por medio de una piedra filosa, calentaban la masa obtenida en un recipiente abierto y presionaban ésta masa con una gran piedra.

Más adelante, varios tipos de prensa y prensas de tornillo manual fueron inventadas por griegos y romanos. No se sabe cual de los dos aceites, si el de oliva o el de coco, ha sido el que se ha usado por más tiempo, pero no hay duda que la extracción del aceite es una de las más antiguas industrias en el mundo.

El desarrollo de la prensa hidráulica fué el gran adelanto en el procesamiento de las semillas oleaginosas, tal prensa fué patentada en Inglaterra en 1798 por Joseph Bramah. El procesamiento hidráulico se volvió el método predominante en la industria de las semillas oleaginosas y continuó así hasta el siglo XX.

Los métodos continuos de procesamiento que incluyen prensas de tornillo y extracción por solventes fueron desarrollados en el presente siglo, sin embargo, pocos sistemas continuaron en operación antes de la primera guerra mundial. La prensa de tornillo se usó ampliamente en los Estados Unidos antes de la segunda guerra mundial, a ésta le siguió la extracción por solventes, pudiendo afirmarse que los dos procesos se desarrollaron juntos. La mayoría de las plantas modernas emplean cualquiera de éstos dos métodos o una combinación de ellos; cualquiera que se use depende de las condiciones locales y del capital disponible. En general una planta de extracción por solventes requiere de un capital más elevado.

Actualmente, el uso predominante de aceites y grasas es para propósitos comestibles. Entre los aceites comestibles, la principal materia prima es la soya junto con el girasol y la palma. En una menor escala se encuentran los aceites de coco, nabo y algodón (10).

USO DE LAS ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES

En los últimos años se han propuesto nuevos procesos, en los cuales se utilizan distintas mezclas enzimáticas para mejorar los rendimientos y la eficiencia de extracción de los aceites comestibles.

Estos métodos se basan en el hecho de que los aceites se encuentran, generalmente, dentro de distintas células vegetativas y unidos a otras macromoléculas, por lo tanto después de una hidrólisis parcial, la extracción del aceite puede ser conseguida. Dado que esas macromoléculas pueden incluir proteínas y una amplia variedad de carbohidratos (almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, etc.) el tratamiento hidrolítico puede ser llevado a cabo por medio de una mezcla enzimática adecuada (6).

A continuación se mencionan algunos de los resultados más importantes que se han obtenido con estos nuevos procesos:

Fullbrook, en 1983, desarrolló un proceso a nivel laboratorio en el cual se realiza una hidrólisis acuosa con varias mezclas enzimáticas, previa a la extracción con solventes del aceite de soya y otras oleaginosas. Reporta que además del ahorro en la energía y el solvente utilizado, se consigue aumentar los rendimientos de extracción así como la calidad del producto obtenido (13).

La compañía Genencor Inc. (Bimpon y colaboradores) reporta que con el uso de una mezcla de enzimas macerantes (Cytolase 104), también aplicada antes de la extracción con solvente, se consigue incrementar los rendimientos de extracción del aceite de oliva hasta en un 60 %. Esto principalmente por una mejor recuperación del aceite residual que normalmente permanece en el material sólido después de la separación de los líquidos. También reportan una mejor calidad del aceite extraído (menor índice de acidez) (23).

Un nuevo método, basado en la acción enzimática de poligalacturonasas, alfa-amilasa y proteasas, fué propuesto para la extracción del aceite de coco por Cintra, López-Munguía y Vernon en 1986. Este mismo método fué aplicado también, con buenos resultados, a la extracción de aceite de aguacate (Buenrostro y López-Munguía, 1986). Lo importante de este método es que en él se elimina en forma definitiva el uso de solventes orgánicos (6 y 10).

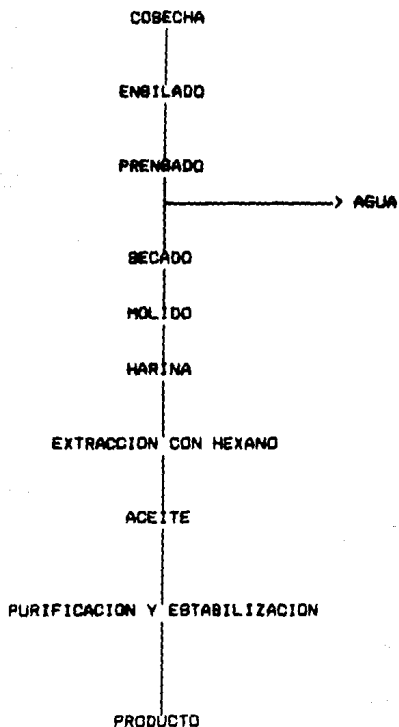
Recientemente fué publicada (Barríos, Olmos, Noyola y López-Munguía, 1990) la optimización de este método, concluyéndose que este proceso biológico está caracterizado por un costo de inversión muy inferior al del proceso tradicional y por necesidades energéticas poco importantes. Además, también se consigue mejorar tanto el rendimiento de extracción como la calidad del producto final (5).

Aunque todos estos resultados son muy prometedores, hace falta resolver varios problemas inherentes a cualquier innovación tecnológica, para poder pensar en su aplicación a nivel industrial.

Es importante mencionar aquí que también se han ensayado diversas técnicas de extracción de colorantes para alimentos, de naturaleza lípida y algunos no lípidicos, que utilizan mezclas enzimáticas (celulasas, proteasas, pectinasas, amilasas, lipasas, etc.) para una hidrólisis previa o simultánea a la extracción con solventes. Estos procesos se han ensayado en diversas materias primas como los desechos de la industria procesadora de crustáceos (7, 8 y 9), en frutas y flores (17, 21 y 24), en insectos (12), etc. En todos ellos se reportan mejoras notables en los rendimientos de extracción y la calidad del producto final.

En muchos casos, también se está estudiando la utilización de enzimas inmovilizadas con el objeto de disminuir los costos de producción.

Por otro lado, a manera de modelo de los procesos de extracción de aceites vegetales, a continuación se presenta el diagrama del proceso tradicional de extracción del aceite de la materia prima (M.P.) utilizada en este trabajo:



Se pueden mencionar como problemas principales de este proceso los siguientes aspectos:

- En el lapso comprendido entre la cosecha de la materia prima y la obtención de la harina, existen pérdidas considerables por oxidación del aceite; esto es debido, fundamentalmente, a la exposición del material al oxígeno, la luz y al tratamiento térmico aplicado.
- Dado que la extracción del aceite se lleva a cabo por medio de un solvente orgánico, el riesgo de la presencia de residuos tóxicos en el producto limita su comercialización.
- Los gastos energéticos del proceso, para el secado de la materia prima y la evaporación del solvente, son elevados y contribuyen considerablemente en el costo de producción.

Con el proceso alternativo que se propone en este trabajo se pretende resolver, al menos parcialmente, la problemática planteada.

III MATERIALES Y METODOS

PLAN DE TRABAJO

Este trabajo se dividió en dos etapas: en la primera se examinó la factibilidad técnica del proceso y en la segunda se procedió a optimizar la reacción enzimática y el proceso de separación del aceite del material vegetal que para efectos de este reporte denominaremos Materia Prima (M.P).

Los pasos que se siguieron en la primera etapa fueron:

- A) Análisis de la composición química de la materia prima para definir el tipo de enzimas a utilizar.
- B) Ensayos preliminares para determinar la relación adecuada de materia prima: agua que facilite la reacción enzimática y la extracción del aceite.
- C) Ensayos con las diferentes enzimas en forma individual y combinadas.
- D) Observación de la evolución del medio de reacción y evaluación del proceso enzimático.

La optimización del proceso tuvo la siguiente metodología:

- A) Definición de la reacción enzimática: tipo de enzima(s) y su concentración, pH, temperatura y tiempo de reacción.
- B) Optimización de la relación materia prima : agua.
- C) Definición del proceso de separación del aceite.
- D) Cuantificación de rendimientos parciales y totales de extracción del aceite.
- E) Definición global del proceso.

Por otro lado, podemos mencionar que el aceite a extraer es una mezcla de compuestos lipídicos, totalmente insoluble en agua, y presenta las siguientes características:

Concentración (g/kg M.P.)	79.8 ±	10.7
Humedad (%)	1.3 ±	0.6
Índice de Acidez	36.3 ±	7.8
Índice de Saponificación	123.2 ±	4.1
Índice de Esteres	86.5 ±	6.1
Viscosidad (cps)	957.5 ±	295.3

MATERIALES

La materia prima utilizada en el desarrollo de este proyecto fue proporcionada por la compañía patrocinadora y provenia de uno de sus centros de acopio.

En la tabla 2 se enumeran las enzimas utilizadas.

TABLA 2 LISTA DE ENZIMAS

ENZIMAS

Proteasa A

Proteasa B

Proteasa C

Celulasa A

Celulasa B

Pectinasa A

Pectinasa B

Pectinasa C

Alfa-amilasa A

Mezcla Comercial A

Mezcla Comercial B

Mezcla Comercial C

En la tabla 3 se presenta el equipo utilizado durante el desarrollo de este trabajo.

TABLA 3 EQUIPO Y MARCA

EQUIPO	MARCA
Picadora casera (tipo 320)	MOULINEX
Balanza granataria (mod.1500 D)	OHAUS
Balanza analítica (mod. GM BHD-7470)	SAUTER
Molino (Ciclone sample mills)	CICLONE U.D.
Baño de agua con agitación recíproca (mod. R76)	NEW BRUNSWICK SC.
Incubadora agitadora con temperatura controlada (mod. R25)	NEW BRUNSWICK BC.
Baño de agua con control de temperatura (mod. JB. 1)	GRANT
Centrífuga para tubos (mod. IEC-HT)	DAMON/IEC DIVISION
Centrífuga de discos (LAPX-202 BGT 24)	ALFA-LAVAL
Estufa de vacío (mod. 5831)	NATIONAL APPLIANCE CO.
Potenciómetro (mod. PHI 41)	BECKMAN
Espectrofotómetro UV (mod.9000-310)	HEWLETT PACKARD
Espectrofotómetro mod. Spectronic 20	BAUSCH AND LOMB
Fermentador LH (mod. 2000 serie I)	LH FERMENTATION

En la tabla 4 se enumeran los diversos aditivos utilizados en la etapa de extracción y solubilización del aceite.

TABLA 4 LISTA DE ADITIVOS

ADITIVO

Aditivo A

Aditivo B

Aditivo C

Aditivo D

Aditivo E

Aditivo F

Aditivo G

Aditivo H

Aditivo I

Aditivo Z

Es importante mencionar aquí que estos compuestos también fueron ensayados de manera individual y combinados.

En la tabla 5 se presentan los reactivos utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

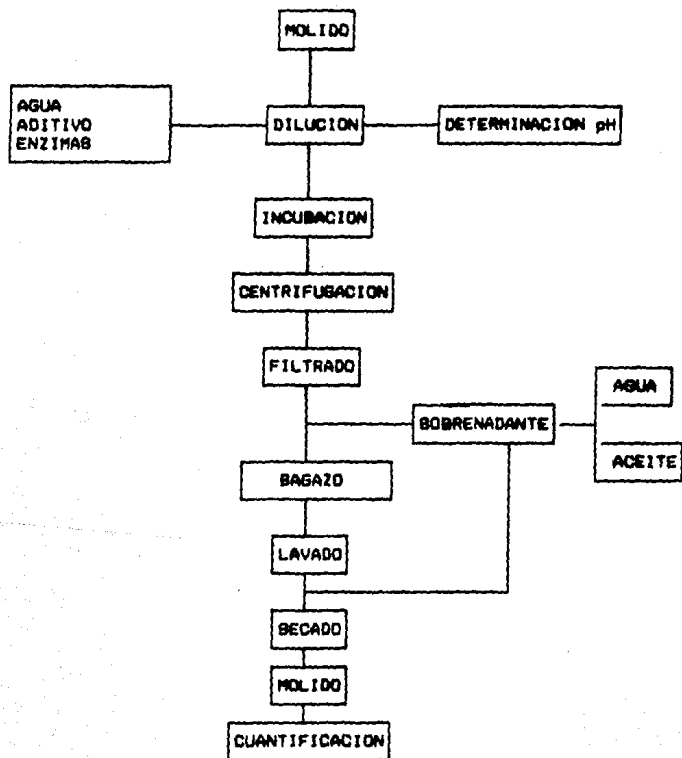
TABLA 5 REACTIVOS Y SU MARCA

REACTIVOS	MARCA
Acido Clorhídrico (G.R.)	J.T. BAKER S.A. DE C.V.
Hidróxido de Sodio (G.R.)	" "
Hexano (G.R.)	" "
Acetona (G.R.)	" "
Etanol (G.R.)	" "
Tolueno (G.R.)	" "
Hidróxido de Potasio (G.R.)	" "
Metanol (G.R.)	" "
Sulfato de Sodio (G.R.)	" "
Cloruro de Sodio (G.T.)	TECNICA QUIMICA S.A.

G.R. = grado reactivo.
 G.T. = grado técnico.

MÉTODOS

La materia prima utilizada en el transcurso de éste trabajo fué sometida a un proceso previo de fermentación láctica en condiciones ambientales durante 10-15 días. El proceso general originalmente pensado para la extracción del aceite fué el siguiente:



La molienda de la materia prima se realizó con una licuadora Moulinex casera, requiriendo de un tiempo aproximado de 2-3 minutos para conseguir el tamaño adecuado. Para cada experimento, se determinó el porcentaje de humedad a una muestra molida.

Antes de agregar la muestra molida al agua, en esta última se disolvían primero los aditivos y las enzimas. Estando ya bien mezclados los componentes del medio de reacción se determinó directamente el pH.

Los aditivos se agregaron debido a que en los ensayos preliminares se observó que el aceite extraído presentaba una alta resistencia a la solubilización al final de la reacción enzimática. Esto es, muy probablemente, consecuencia de algunas de las propiedades fisicoquímicas que presenta (alta viscosidad e insolubilidad en agua).

Para realizar la incubación se utilizaron, generalmente, matraces Erlenmeyer. Esta se llevo a cabo en incubadoras con control de temperatura y de agitación: la temperatura utilizada varió de 40 a 55 ° C (dependiendo del tipo de enzimas utilizadas en cada experimento), la agitación aplicada fue circular y se mantuvo fija a 100 rpm. Finalmente, el tiempo de incubación también varió entre 4, 8 y 12 horas.

Después de la incubación se aplicó, a todo el medio de reacción, una centrifugación exhaustiva (2 horas a 11 000 rpm) en una centrífuga de tubos.

Como se mencionó anteriormente, el aceite presenta una alta resistencia a la separación de la materia prima, por tal motivo fue necesario aplicar dos lavados con el objeto de separarla totalmente. El lavado consiste en suspender la materia prima residual en una solución acuosa con aditivos.

Al bagazo obtenido se le aplica un proceso de secado al vacío durante aproximadamente 6 horas a 55 ° C y 22 pulg. de Hg, posteriormente es molido hasta obtener una harina de un tamaño de partícula capaz de pasar por un tamiz del 40 .

Dado que el trabajo en el laboratorio dificulta la evaluación directa de la cantidad de aceite extraído de la materia prima — debido al manejo de muestras muy pequeñas (5 y 10 gramos) y a la baja concentración del aceite extraído— se decidió determinar la concentración del producto (método A.O.A.C.) en la materia prima, con y sin proceso enzimático. En base a estas determinaciones se calculó el porcentaje del rendimiento de extracción del aceite de cada experimento.

Los análisis realizados durante el desarrollo del proceso fueron:

A) Determinación del porcentaje de humedad inicial de la materia prima:

Se pesa una muestra de 10 g de materia prima picada en una caja de aluminio (previamente tarada). Se seca la muestra a una temperatura de 55 ° C (± 2) y una presión de 25 pulg. Hg (± 2) hasta peso constante (aprox. 6 horas). Se calcula el porcentaje de humedad como pérdida de peso de la muestra.

B) Determinación del pH de la mezcla de reacción:

Se realiza directamente en la mezcla de reacción por medio de un potenciómetro, justo antes de incubar la muestra.

C) Determinación del contenido de aceite en materia prima antes y después del proceso enzimático, basado en el método oficial del A.D.A.C. (2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En los ensayos preliminares que se realizaron con algunas de las enzimas se determinó la necesidad de realizar cada experimento por triplicado, esto fue debido a la alta variabilidad que se encontró en los resultados. Así mismo, se decidió también utilizar un testigo (unidad experimental con todos los elementos, excepto las enzimas) para determinar el efecto del proceso enzimático.

Para determinar el porcentaje de rendimiento de extracción del aceite se definió como 100 por ciento a la cantidad de aceite presente originalmente en la harina de la materia prima de cada lote trabajado, sin ningún tratamiento.

Todos los resultados fueron sujetos de análisis de varianza, comparación de medias o análisis factorial (según el caso), por medio de un programa computacional de estadística (SPSS, "Statistical Package for the Social Sciences"). En todos los casos se consideró que si el valor "F" calculado excedía en un 5 % al valor "F" tabulado, existía evidencia de un efecto significativo ($p < 0.05$).

IV RESULTADOS

De acuerdo a la composición química de la materia prima (tabla 6) se decidió utilizar las siguientes enzimas para tratar de extraer el aceite del tejido:

Proteasas: Proteasa A, Proteasa B, y Proteasa C.

Celulasas: Celulasa A y Celulasa B.

Pectinasas: Pectinasa A, Pectinasa B y Pectinasa C.

Amilasas: Alfa amilasa A.

Mezclas comerciales: Mezcla Comercial A, B y C.

Estas enzimas fueron probadas en forma individual y combinadas.

TABLA 6 ANALISIS PROXIMAL DE LA HARINA DE LA MATERIA PRIMA

COMPONENTE	PORCENTAJE
HUMEDAD	9.63 ± 1.5
PROTEINA	10.67 ± 1.83
GRASA	11.39 ± 1.85
FIBRA CRUDA	26.76 ± 2.91
CENIZAS	13.90 ± 6.81
EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO	29.12 ± 5.09
ACEITE	7.76 ± 1.44

Se realizaron varios ensayos con algunas de las enzimas mencionadas para determinar la dilución más adecuada (materia prima/agua P/V) para la reacción enzimática y para la extracción posterior del aceite. Inicialmente se encontró que la mejor dilución era de 1:6 (P/V).

Se realizaron ensayos con las enzimas mencionadas variando la temperatura y el tiempo de reacción de acuerdo con las especificaciones de la(s) enzima(s) utilizada(s):

El intervalo de temperatura varió desde 40 hasta 55 ° C .

El intervalo de tiempo fue de 4, 8 y 12 horas.

La concentración de la(s) enzima(s) se mantuvo constante en 1% P/P con respecto a la M.P.

El pH se dejó tal cual resulta de la preparación de la muestra, es decir 4.20

En la tabla 7 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en ensayos con algunas de las enzimas (las que presentaron mejores rendimientos), en las siguientes condiciones:

Relación materia prima/agua = 1 : 6 (P/V).

Concentración de cada enzima = 1 % (P/P en relación a la M.P.)

Temperatura = 55 °C.

Agitación = 4 rpm.

Tiempo = 4 horas.

TABLA 7 EFECTO DEL TIPO DE ENZIMAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE.

ENZIMAS	RENDIMIENTO DE EXTRACCION %
MEZCLA COMERCIAL A	10 %
MEZCLA COMERCIAL A ALFA AMILASA A	11.3 %
MEZCLA COMERCIAL A PROTEASA B	17 %
MEZCLA COMERCIAL A ALFA AMILASA A PROTEASA A	34 %
PROTEASA A ALFA AMILASA A PECTINASA A CELULASA B	28.5 %

(% medido en término de aceite residual en la materia prima)

A pesar de que los rendimientos de extracción obtenidos fueron bajos, se observó que al final de la reacción la mezcla presentaba cierto contenido de aceite que hacia pensar que si se extraía, pero por sus características fisicoquímicas, no se alcanzaba a liberar completamente del bagazo.

Así, se decidió realizar otros experimentos con diversos aditivos variando la temperatura (45 °C) y el tiempo (12 horas); las otras condiciones se mantuvieron iguales. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8.

TABLA 8 EFECTO DEL TIPO DE ENZIMAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE, CUANDO SE EMPLEAN DIVERSOS ADITIVOS.

ENZIMAS	RENDIMIENTO DE EXTRACCION
MEZCLA COMERCIAL A	17 %
MEZCLA COMERCIAL A PROTEASA A	36 %
MEZCLA COMERCIAL A PROTEASA B LIPASA	25 %
PROTEASA C ALFA AMILASA A PECTINASA B CELULASA A	30 %

Al observar los resultados de la tabla 8 se puede decir, de manera general, que aunque se mejoraron los rendimientos de extracción, éstos aún resultan bajos. Así, se decidió probar con las mezclas enzimáticas que resultaron más eficientes y ensayar con otras nuevas, pero aumentando la concentración de aditivos (2 %) y proporcionando uno o dos lavados (con una solución acuosa del aditivo) al bagazo residual. Como se puede observar en la tabla 9, en estas condiciones los rendimientos de extracción aumentaron significativamente, destacando (con más de 80 %) los obtenidos con las mezclas enzimáticas que en adelante se denominarán X a la primera y W a la segunda.

TABLA 9 EFECTO DEL TIPO DE ENZIMAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE.

ENZIMAS		RENDIMIENTO DE EXTRACCION
MEZCLA COMERCIAL C		58 %
MEZCLA COMERCIAL B		62 %
MEZCLA COMERCIAL A CELULASA A		63 %
MEZCLA COMERCIAL A PROTEASA B	(MEZCLA X)	80 %
MEZCLA COMERCIAL A CELULASA A PROTEASA B		64 %
MEZCLA COMERCIAL A PROTEASA A		66 %
MEZCLA COMERCIAL B PROTEASA B	(MEZCLA W)	85 %
MEZCLA COMERCIAL C PROTEASA B		68 %
PROTEASA A ALFA AMILASA A PECTINASA A CELULASA B		54 %
TESTIGO *		31 %

(* mismas condiciones pero sin enzimas)

Como consecuencia de estos resultados, se trabajó con las dos mezclas enzimáticas mencionadas (X y W) para estandarizar las condiciones de reacción que aseguraran un rendimiento satisfactorio (más del 80%). Esto se logró en las condiciones estipuladas a continuación:

Experimento I.

Sustrato: Materia prima molida.
Dilución: 1 a 6 (materia prima:agua P/V).
Enzimas : Mezcla X
Concentración : 1 % P/P.
Aditivos al 2 %
Temperatura : 45 ° C
Agitación : 4 rpm.
pH : 4.2 (el que resulta).
Tiempo : 12 horas.
Centrifugación: 1.5 horas a 11 000 rpm.
Filtrado, lavado (2 veces).
Centrifugación : 1.5 horas a 11 000 rpm.
Filtrado, secado y molido.
Rendimiento : Del 82 al 88 %.

Experimento II.

Sustrato: Materia prima molida
Dilución : 1 a 6 materia prima:agua (P/V).
Enzima : Mezcla W.
Concentración : 1 % P/P
Aditivo al 2 %.
Temperatura : 45 ° C
Agitación : 4.0 rpm.
pH : 4.2 (el que resulta).
Tiempo : 12 horas.
Centrifugación : 1.5 horas a 11 000 rpm.
Filtrado y lavado (2 veces).
Centrifugación : 1.5 horas a 11 000 rpm.
Filtrado, secado y molido.
Rendimiento : Del 82 al 85 %.

Se determinó que, en estas condiciones, la extracción enzimática del aceite es un proceso factible. Cabe señalar que todos los aditivos empleados en el proceso están en exceso, por lo que esta etapa es seguida de un estudio de optimización.

Por otro lado, se realizaron ensayos con varios aditivos con el objeto de definir la necesidad o no de efectuar los lavados del bagazo residual así como para optimizar la parte más importante del proceso de solubilización del aceite.

El objetivo fundamental era encontrar un aditivo o una mezcla de ellos, que permitiera la solubilización del producto durante el proceso enzimático y su separación al final de la centrifugación. Se realizaron ensayos con todos los aditivos enumerados en la tabla 4 de materiales y métodos.

En un principio se realizaron estas pruebas de aditivos en un sistema acuoso y empleando aceite puro; el agua a los volúmenes utilizados en los ensayos enzimáticos (30 ml.) y el aceite de acuerdo con lo que se tiene en el ensayo enzimático (una parte de materia prima por seis de agua), considerando la concentración teórica máxima.

En la figura 1 se presenta una curva estándar de dispersión del aceite, en proporciones del 10 al 100% del valor teórico extraíble, utilizando el aditivo A. Esto se hizo con el fin de tener una referencia y así poder evaluar el proceso enzimático mediante la absorbancia del sobrenadante.

El aditivo G se probó a concentraciones desde 0.1 hasta 1.0 % (P/V) en las siguientes condiciones: T = 45 °C , agitación 180 rpm. tiempo = 3.0 horas . En la figura 2 se muestra que la absorbancia máxima se logra a las concentraciones de 0.5 y 0.6 % .

El Aditivo H se probó a concentraciones desde 1 hasta 6 % (P/V) en las mismas condiciones que el aditivo G. Se encontró que la absorbancia máxima se consigue a una concentración del 3 % , según puede constatarse en la figura 3.

Con el fin de evaluar el efecto de mezclas de aditivos, se probó también una mezcla de A y B a diferentes relaciones, en las mismas condiciones que los aditivos anteriores y a dos concentraciones diferentes (0.625 y 1.25 % V/V). La absorbancia máxima se consiguió en ambas concentraciones, con la mezcla de 12.5 partes de A y 87.5 de B siendo mayor a la concentración de 0.625 % ; estos resultados se muestran en la figura 4.

La misma mezcla se probó con otras relaciones de concentración a la misma temperatura (45 °C) y agitación (180 rpm) pero aumentando el tiempo a 12 horas. De estos resultados se concluyó que la absorbancia máxima se consigue con el aditivo A solo, según se demuestra en la figura 5.

Dados los resultados anteriores, se decidió probar el Aditivo A en diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 2.0 % ,V/V) en las mismas condiciones que el experimento anterior (T=45 ° C , 180 rpm y 12 hrs.); se encontró que, como se muestra en la figura 6 la absorbancia máxima se consigue a una concentración de 0.4 % (V/V) .

Todos estos resultados, efectuados con aceite puro, permitieron concluir sobre la factibilidad de su solubilización, pero al momento de emplear algunos de estos aditivos en el proceso enzimático los rendimientos disminuyeron considerablemente (hasta 30 - 35 %). La explicación que se puede dar a este hecho, de acuerdo a lo expresado en el boletín técnico del fabricante de los aditivos , es que su comportamiento en el sistema puro (agua y aceite) puede ser diferente al comportamiento del sistema biológico (agua, aceite, materia prima y enzimas). Se menciona además, que esta es una de las limitantes más importantes al seguir este método de selección de los aditivos para un sistema dado.

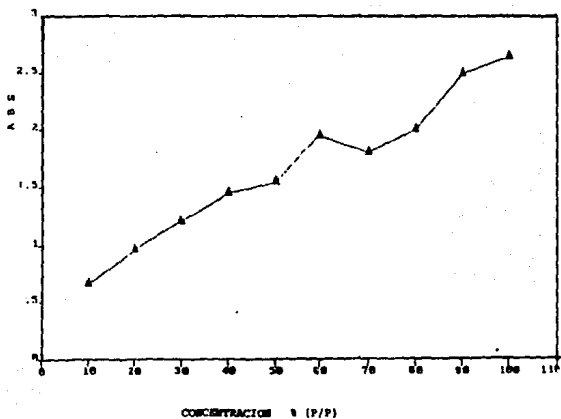


FIG. 1 CURVA ESTANDEAR DE DISPERSION DEL ACEITE.

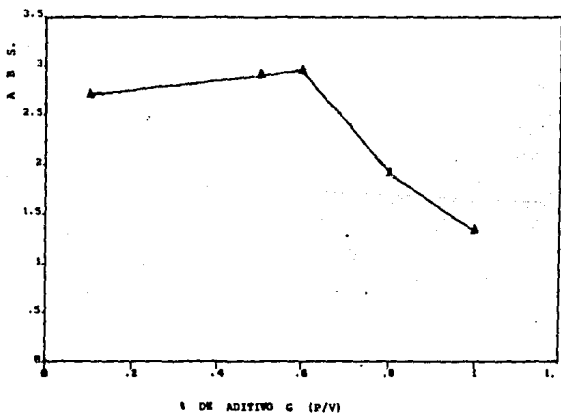


FIG. 2 EFECTO DE LA CONC. DEL ADITIVO G EN LA DISPERSION DEL ACEITE.

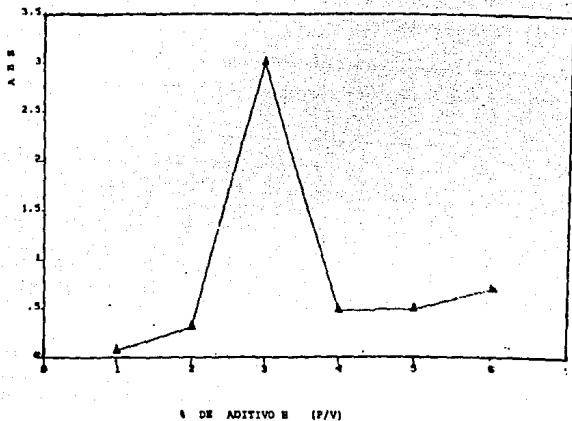


FIG. 3 EFECTO DE LA COMC. DEL ADITIVO W EN LA DISPERSION DEL ACEITE.

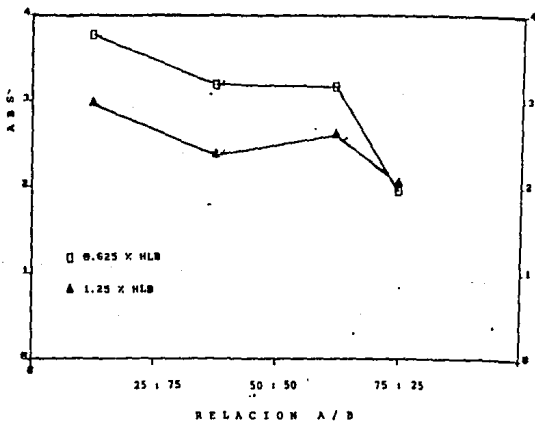


FIG. 4 EFECTO DE LA MEZCLA DE ADITIVO A y B EN LA DISPERSION DEL ACEITE.

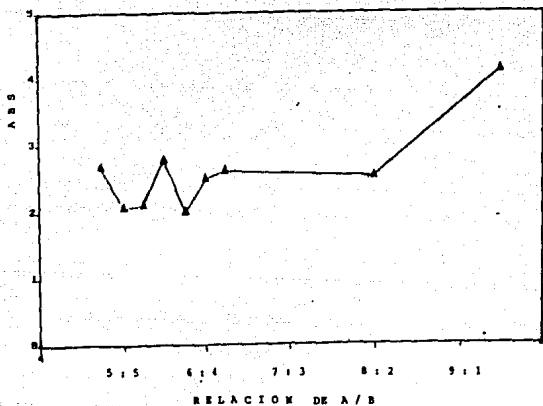


FIG. 5 EFECTO DE LA MEZCLA DE ADITIVO A Y B EN LA DISPERSION DEL ACEITE.

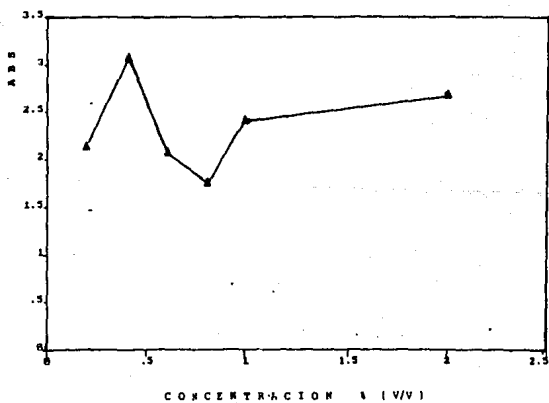


FIG. 6 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL ADITIVO A EN LA DISPERSION DEL ACEITE.

Como consecuencia de lo anterior se decidió hacer pruebas con algunos de los aditivos mencionados, a diferentes concentraciones y relaciones de mezcla, pero directamente en la materia prima durante el proceso enzimático.

En estas condiciones se encontró que con una de las mezclas de aditivos ensayadas (A e I) se consiguieron rendimientos de entre el 60 y el 70 % de extracción del aceite.

Con estos resultados se dió por terminada la primera etapa del proyecto, estableciéndose que es factible la extracción del aceite de la materia prima por medio de un proceso enzimático. Se decidió continuar los estudios en las condiciones mencionadas en el experimento I, utilizando únicamente la primera mezcla enzimática X dado que es más barata y disponible que la mezcla enzimática W.

Como se mencionó anteriormente, en la segunda etapa del proyecto se procedió a la optimización del proceso, incluyendo la continuación del estudio del efecto de aditivos. A continuación se presentan los resultados.

Efecto de la temperatura y el pH

Se realizó un diseño factorial para estudiar el efecto de la temperatura a tres niveles (40, 45 y 50 °C) y el del pH a dos niveles (4.2 y 6.0), realizando cada experimento por triplicado y manteniendo constantes los siguientes factores:

Tiempo de incubación = 12 horas.
 Dilución para la reacción = 1:6 (materia prima:agua, P/V)
 Tipo de enzimas = Mezcla X
 Concentración de enzimas = 1 % (P/P con respecto a la M.P.)
 Concentración del aditivo = 1.5 % de A.
 Centrifugación = 1.5 horas a 10 000 rpm.
 Filtrado y lavado (dos veces).
 Centrifugación = 1.5 horas a 10 000 rpm.
 Filtrado, secado y molido.

En la tabla 10 se muestran los rendimientos de extracción del aceite. El porcentaje de extracción se determinó con respecto a la cantidad original que contiene la materia prima (cada valor es el promedio de tres determinaciones).

TABLA 10 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE.

		TEMPERATURA (°C)			
		40	45	50	\bar{x}
pH	4.2	74.3 ± 7.6	89.6 ± 2.1	84.9 ± 5.6	82.9 ± 7.8
	6.0	71.9 ± 6.5	88.1 ± 1.7	80.4 ± 6.1	80.1 ± 8.1
	\bar{x}	73.1 ± 1.7	88.8 ± 1.1	82.6 ± 3.2	

El análisis estadístico (análisis factorial) de los resultados indica que no hay diferencias significativas en los porcentajes de extracción por el efecto del pH. Así, se determinó realizar los experimentos posteriores al pH original de la mezcla de reacción, es decir 4.2. Por otro lado, hay un efecto significativo de la temperatura, determinándose que el mayor rendimiento de extracción se consigue utilizando 45 ° C durante la incubación. Estos resultados se muestran en la figura 7.

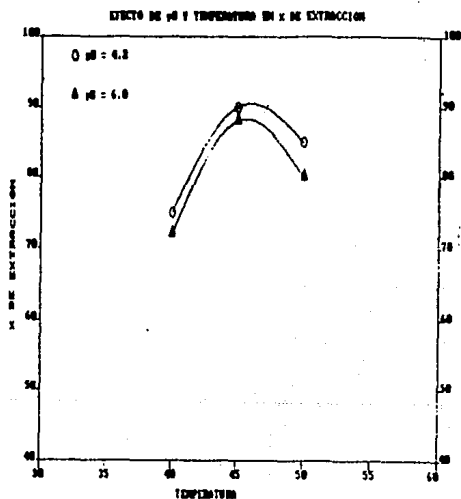


FIG. 7 EFECTO DEL pH Y LA TEMPERATURA EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION.

Además, se continuaron los ensayos, en el sistema biológico, con aditivos con el objeto de definir la necesidad de efectuar lavados de la materia prima residual. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Efecto de la mezcla de aditivos.

Se realizaron ensayos con la mezcla de aditivos A y B a una concentración de 1.5 % (V/V) y a diferentes relaciones de mezcla. Estos ensayos se llevaron a cabo en las condiciones óptimas encontradas en el experimento anterior y realizando un solo lavado del bagazo residual, los resultados se presentan en la tabla 11.

TABLA 11 EFECTO DE LA MEZCLA DE LOS ADITIVOS A Y B
EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE.

RELACION A/B	% DE EXTRACCION
65:35	9.6 ± 2.9
75:25	2.4 ± 1.9
85:15	8.9 ± 6.8
95:05	68.1 ± 1.0

Se observó claramente que la mezcla de A y B a 95 : 05 , es la que proporciona los mejores resultados. Es evidente que, como se ha demostrado con anterioridad, sólo la solubilización logra la separación del aceite de la materia prima.

Este resultado es comparable con el comportamiento observado para el sistema de ensayo reportado en la figura 5, aunque lo drástico del cambio observado a altas relaciones de A es sorprendente.

En las mismas condiciones se ensayaron los siguientes aditivos: A, C, D, E, G, H e I.

Con el aditivo H no se logró la solubilización mientras que los resultados de los otros aditivos se presentan en la tabla 12.

TABLA 12 RENDIMIENTOS DE EXTRACCION OBTENIDOS
AL VARIAR EL TIPO DE ADITIVOS.

ADITIVO	% DE EXTRACCION
ADITIVO G	34.6 ± 1.8
" I	51.7 ± 15.7
" A	66.5 ± 9.6
" C	53.4 ± 5.6
" E	36.0 ± 7.7
" D	30.1 ± 2.0

No obstante que el análisis estadístico de los resultados indica que no hay diferencias significativas entre el aditivo A, el I y el C (prueba de DUNCAN, $\alpha=0.05$), el mejor rendimiento de extracción se obtuvo con el aditivo A, observándose que es prácticamente igual al obtenido con la mezcla del A con el B (relación 95 : 05) del experimento anterior.

Con el objeto de facilitar el trabajo y por cuestión de costos, se decidió utilizar aditivo A sin mezclar, procediéndose entonces a determinar la concentración más adecuada.

Concentración de aditivo

Se ensayaron diferentes concentraciones del aditivo A (de 0.5 a 3.0 % V/V) en las mismas condiciones que los experimentos anteriores. Los resultados se presentan en la tabla 13.

TABLA 13 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL ADITIVO A EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE.

% DE ADITIVO A (V/V)	% DE EXTRACCION
0.0	12.7 \pm 4.6
0.5	66.3 \pm 1.8
1.0	69.8 \pm 1.3
1.5	67.9 \pm 3.0
2.0	57.1 \pm 3.5
2.5	59.2 \pm 9.4
3.0	78.5 \pm 3.3

Como se puede observar, el rango de variación en el porcentaje de extracción del aceite permanece más o menos constante (60 al 70 %) cuando se usaron concentraciones bajas del aditivo. Sin embargo, al utilizar un 3 % se consigue una mejor extracción, aunque, estadísticamente podría afirmarse que no hay diferencia entre las concentraciones. Es importante recalcar que estos resultados se obtuvieron aplicando un solo lavado a la materia prima residual.

Efecto del tiempo de reacción y concentración de la enzima.

Una vez definidas algunas de las condiciones óptimas del proceso (pH = 4.2, T = 45 °C, aditivo A al 3.0 % y dando un solo lavado a la materia prima residual), se realizó un diseño factorial para optimizar el tiempo de reacción y la concentración de la mezcla enzimática X.

El tiempo se probó a tres niveles (2, 6 y 10 horas) y la concentración de la mezcla enzimática X a cuatro (1, 2, 3 y 4 % P/P) con respecto a la materia prima. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

**TABLA 14 EFECTO DEL TIEMPO Y DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA
EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE.**

		TIEMPO (HORAS)			
		2	6	10	\bar{x}
C O N C E N T R A C I O N	1	42.6 ± 3.0	48.2 ± 4.3	62.6 ± 2.3	51.1 ± 9.4
	2	58.4 ± 2.3	69.3 ± 2.1	80.1 ± 5.3	69.2 ± 9.8
	3	60.3 ± 3.7	72.2 ± 2.8	84.1 ± 2.1	72.2 ± 10.6
	4	64.9 ± 0.5	71.4 ± 1.7	83.2 ± 0.6	73.2 ± 8.1
	\bar{x}	56.5 ± 9.0	65.3 ± 10.6	77.5 ± 9.5	
(% P/P)					

El análisis estadístico de los resultados (análisis factorial) indicó que hay un efecto significativo de ambos factores sobre el rendimiento de extracción del aceite.

En el caso del tiempo de reacción, se trata de un efecto lineal; esto es, a mayor tiempo mayor rendimiento de extracción. La concentración de la mezcla enzimática presenta un efecto pero es no lineal, también produce un aumento pero sólo hasta cierto punto, después del cual permanece más o menos constante; es decir, los rendimientos de extracción del aceite con 2, 3 y 4 % de enzima no presentan diferencias significativas. Estos resultados se pueden observar claramente en las figuras 8, 9 y 10.

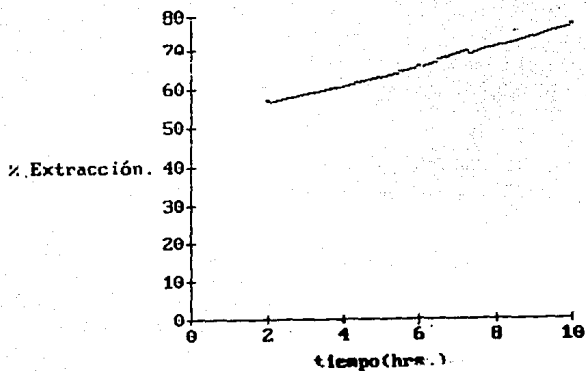


FIG. 8 EFECTO DEL TIEMPO EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION

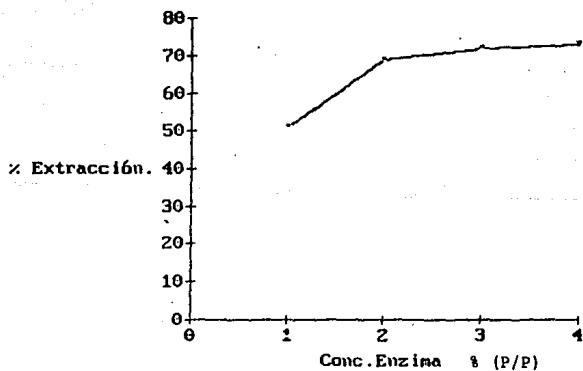


FIG. 9 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA ENZIMA EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION.

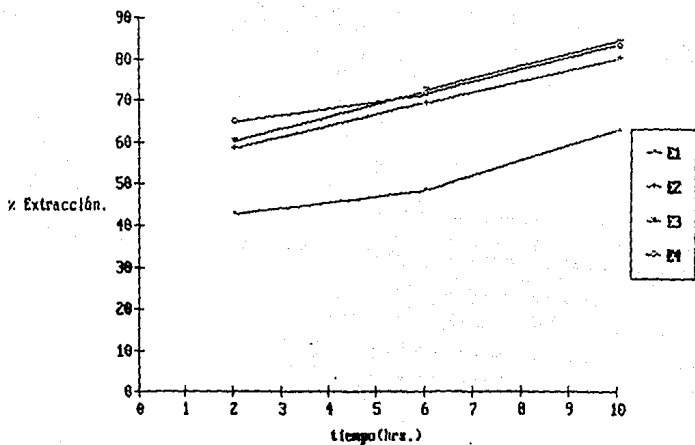


FIG. 10 EFECTO DEL TIEMPO DE REACCION Y DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION.
 (E1=1 % , E2=2 % , E3=3 % y E4=4 %)

De acuerdo con estos resultados, se podría pensar en utilizar una concentración de la mezcla enzimática X de 2 % con un tiempo de reacción de 6 horas para obtener un rendimiento de extracción aproximado del 70.0 % , que es ya satisfactorio.

Es conveniente señalar que en este proceso no es factible aplicar un estudio cinético enzimático clásico para determinar el efecto del tiempo y de la concentración de la enzima. Recuérdese primeramente que se trata de varias actividades enzimáticas actuando simultáneamente por lo que requeriría de un estudio más elaborado para determinar cual de ellas es la limitante. Por otro lado, la medición del rendimiento de extracción, objetivo del proyecto, no es una consecuencia inmediata de la acción de las enzimas sino que requiere además de la intervención del lavado con aditivo y de la centrifugación.

Esta es la razón por la cual, la concentración de la mezcla enzimática y el tiempo fueron estudiados como parametros afectando el proceso, fuera de un contexto cinético.

Relación Agua / Materia prima para la reacción.

Siguiendo un procedimiento similar, se realizaron ensayos para definir la mejor relación entre la materia prima y el agua. Se probaron cuatro niveles materia prima/agua (1:3, 1:4, 1:5 y 1:6), todos por triplicado. Es importante mencionar que después de la reacción enzimática a todos los bagazos residuales se les agregó la misma cantidad de solución de aditivo A (en una relación 1:6) para efectuarles el lavado. Los resultados se presentan en la tabla 15.

TABLA 15 EFECTO DE LA RELACION MATERIA PRIMA / AGUA
EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACEITE.

DILUCION (M.P. / AGUA P/V)	% DE EXTRACCION
1:3	74.4 ± 2.4
1:4	71.4 ± 6.2
1:5	71.2 ± 8.8
1:6	71.6 ± 7.4

Como se puede observar, no existen diferencias significativas en los porcentajes de extracción del aceite al variar la relación materia prima/agua para la reacción en estos niveles (Prueba de Duncan, alfa =0.05). Es factible entonces pensar que se puede reducir la cantidad de agua que se venia agregando a la reacción. En este sentido, se consigue disminuir uno de las principales limitantes a los que se enfrenta el proceso para su implementación, pues los requerimientos de agua son muy importantes.

Prueba semipiloto

Con el objeto de realizar pruebas de recuperación del producto obtenido en el proceso, se diseñó un experimento a mayor escala (con 2 Kg. de materia prima en lugar de los 5 g. que se venían utilizando) en las siguientes condiciones:

Relación materia prima / agua = 1 : 6 (P/V).
Enzimas = Mezcla enzimática X
Concentración = 1 % (P/P) con respecto a materia prima.
Concentración de aditivo A = 3% (V/V).
Temperatura = 45 °C
Agitación = 300 rpm (propela)
Tiempo = 12 horas.

Se empleó un fermentador Lh modelo 2000 serie I, en una jarra de 20 litros, para efectuar el proceso.

Al final de la reacción enzimática, la mezcla de reacción se filtró en una malla plástica para separar el bagazo, el sobrenadante se centrifugó en una centrifuga continua de discos mod.LAPX-202 de Alfa Laval. El equipo y las instalaciones fueron facilitadas por la empresa Alfa-Laval de México.

Después de varios intentos, se comprobó que en las condiciones de centrifugación del equipo propuesto por la empresa Alfa Laval no se logró la recuperación del producto. Es conveniente recordar aquí, que en los experimentos a nivel laboratorio la centrifugación a 12 000 rpm tampoco lograba la separación. Esto tal vez sea consecuencia de la poca cantidad de aceite que se encuentra disperso en la solución.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Una observación importante de este experimento, es que en estas condiciones se consiguió un alto rendimiento de extracción del aceite de la materia prima (89 %) sin necesidad del lavado que comúnmente se le aplicaba. Es muy probable que este incremento sea consecuencia del cambio en el tipo de agitación que se dió en este experimento.

Alternativas de recuperación del producto.

Dados los resultados anteriores, se decidió explorar otras alternativas con el fin de recuperar el producto:

- a) Adición de cloruro de sodio en distintas concentraciones y a diferentes temperaturas.
- b) Adición de un solvente orgánico.
- c) Modificación del pH original.

En ninguna de las pruebas realizadas, se logró la recuperación del producto.

La única opción que dió buenos resultados y mediante la cuál se pudo recuperar el producto fué la adición de un nuevo aditivo (Z); éste neutraliza la acción del aditivo A, logrando con ello la liberación del aceite extraído.

Así, de acuerdo a los resultados obtenidos en el laboratorio, se puede afirmar que la extracción del aceite de la materia prima estudiada, por medio de un proceso enzimático es factible y que las mejores condiciones para llevarla a cabo son:

Sustrato : materia prima molida.

Dilución : 1:3 (materia prima:agua, P/V).

Enzimas : Mezcla enzimática X

Concentración de la enzima : 2 % P/P con respecto a la M.P.

Aditivo A al 3 % (V/V)

Temperatura : 45 °C

Agitación : 300 rpm. (propela).

pH ; 4.2 (el que resulta).

Tiempo : 6 horas.

Filtración : malla plástica.

Secado y molido del bagazo residual.

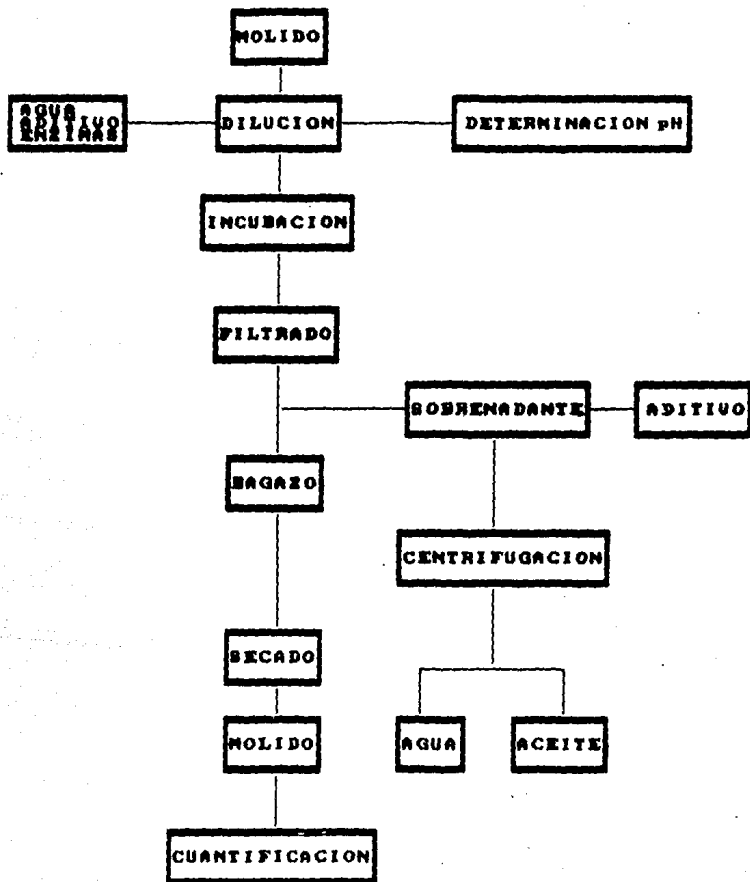
Aditivo Z al 3 % (V/V).

Centrifugación : 5 min. a 10 000 rpm.

Decantación y evaporación.

(En la tabla 16 se presenta el diagrama de flujo de éste proceso.)

TABLA 16 PROCESO FINAL PROPUESTO



Y CONCLUSIONES

- * En el presente trabajo se determinó que es técnicamente factible extraer aceites vegetales en un proceso de reacción enzimática acuosa en presencia de aditivos.
- * Se definió el tipo de enzimas más adecuado para el proceso, así como las condiciones principales de la reacción: concentración de las enzimas, temperatura, pH y relación materia prima / agua.
- * Se puso en evidencia la importancia de los aspectos mecánicos del proceso: molido de la materia prima y agitación durante la reacción.
- * Los rendimientos de extracción alcanzados en las pruebas en matraz fluctúan entre el 70 y 80 %, mientras que la primer prueba en tanque agitado alcanzó un 90 % (en ningún caso el rendimiento corresponde a la obtención del aceite sino a su eliminación de la materia prima).
- * Una vez liberado el aceite, se presentaron dificultades para su recuperación.
- * Se probaron diversas técnicas para su recuperación: adición de sales, adición de solventes orgánicos y modificación del pH, sin éxito alguno. Sólo se logró su recuperación por medio de la adición de un segundo aditivo.
- * Se definió el tipo y la concentración de los aditivos requeridos para la solubilización y separación del producto.

Así, se puede afirmar que el uso de enzimas para la extracción de aceites vegetales es un proceso alternativo muy atractivo y sus ventajas principales son:

- * La materia prima no requiere de ningún tratamiento térmico previo al proceso, por lo cual se evitan pérdidas por oxidación que se presentan en el proceso tradicional. Logrando con esto mejores rendimientos de extracción.
- * No requiere del uso de ningún solvente orgánico y por lo tanto, el producto final no presenta residuos de este tipo.
- * Dado que la materia prima es sometida, básicamente, a un proceso hidrolítico, esto puede tener como consecuencia un incremento en el valor nutritivo del bagazo residual además de la seguridad de la ausencia de residuos tóxicos. Con esto se obtendría un subproducto más atractivo para comercializar.

No obstante, es recomendable una mayor investigación — en lo referente a la recuperación del producto, así como en la recirculación del agua y el reuso de las enzimas — antes del escalamiento a nivel piloto de este proceso. Hasta entonces podrá ser evaluada su aplicación a nivel industrial.

VI BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, G.M. y Olvera T.M. 1981. Hidrólisis Continua de Sacarosa Mediante Invertasa Inmovilizada. Tesis (QFB). Fac. de Química, UNAM. México D.F.
2. A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. Ed. Williams S. 14 th. ed. Arlington, Virginia. USA.
3. Badui, Dergal S. 1981. Química de los Alimentos. Ed. Alhambra. Mexicana. México D.F.
4. Barrios V.A. 1990. Optimización y escalamiento de un proceso enzimático para la obtención de aceite de Coco. Tesis (QFB). Fac. de Química, UNAM.
5. Barrios V.A., Olmos D.A., Noyola R.A. y López-Munguía C.A. 1990. Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction. *Oléagineux*, Vol.45, No 1 .
6. Buenrostro, M. and López-Munguía, C.A. 1986. Enzymatic Extraction of Avocado Oil. *Biotechnology Letters*. 8 (7): 505-506.
7. Cano-López, A. , Simpson, B.K. and Haard N.F. 1987. Extraction of Carotenoprotein from Shrimp process wastes with the aid of Trypsin from Atlantic Cod. *J. of Food Science*. 52 (2): 503-506.

8. Chen, H.M. and Meyers S.P. 1983. Ensilage Treatment of Crawfish waste for improvement of Astaxanthin pigment Extraction. *J. of Food Science*. 48 (51): 1516-1520.
9. Chen, H.M. and Meyers S.P. 1982. Extraction of Astaxanthin Pigment from Crawfish waste using a Soy Oil process. *J. of Food Science*, vol.47: 892-896.
10. Cintra, M.D., López-Munguía C.A. and Vernon C.J. 1986. Coconut Oil Extraction by a New Enzymatic Process. *J. of Food Science* 51 (3): 695-697.
11. Fennema, R.D. 1985. *Food Chemistry*. 2^a Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. USA.
12. Francis, F.J. 1987. Lesser-Know Food Colorants. *Food Technol.* Abril 1987: 62-68.
13. Fullbrook, D.P. 1983. The Use of Enzymes in the Processing of Oil Seeds. *J. Am.Oil Chem. Soc.* 60(2): 476-478.
14. Institute of Food Technologist. 1988. *Food Biotechnology (Scientific Status Summary)*. *Food Technology* 1988: 133-146.
15. López B.J., y Martínez V.R. 1986. Análisis de modelos de mecanismos cinéticos enzimático. Tesis (I.Q.). Fac. de Química, UNAM. México D.F.
16. López-Munguía C.A. 1986. Las enzimas y los alimentos. *Tec. Alimentos*, 21 (2): 22-30 México D.F.

17. Matoushek, R.F. (Mo., assignor to Ralston Purina Company, St. Louis, Mo.) 1974. Xanthophyllic Extraction Process. United States Patent Office, Nº 3,783,099. Filed Nov. 8 1971, Ser.Nº 196,766.
18. Monsan P. 1987. Enzimas en Alimentos. En "Tecnología enzimática". UNAM, México D.F.
19. Moshy Raymond J. 1985. Impact of Biotechnology on food Product Development. Food Technol. 39 (10): 113-118
20. Quintero R.R. 1987. Introducción a la tecnología enzimática. En "Tecnología enzimática". UNAM, México.
21. Santos de Flores E. 1988. Colorantes en la Industria Alimentaria. Material presentado en Curso de Avances en Aditivos para la Industria de Alimentos. PUAL, UNAM. Julio 1988. México D.F.
22. Schwimmer S. 1981. Source Book of Food Enzymology. Avi. Publishing Co. Inc. Connecticut, U.S.A.
23. Simpson, C. , Mullins M.M. and Knauf M. S/F. Olive Oil Yield Improvement Using Enzymes. Boletín técnico de Genencor, Inc. San Francisco, CA. 94080.
24. Tafuya, M.A. y Garcia H.F. 1990. Colorantes. En "Biotecnología Alimentaria". En edición. UNAM, México D.F.
25. Vargas R.I. 1985. Tecnología de grasa y aceites. Monografía (QFB.), Fac. de Química, UNAM, México D.F.