Procesado acuoso de soja con tecnología enzimática: extracción de aceite y producción de aislados

Por H. Domínguez, M. J. Núñez y J. M. Lema

Dpto. Ingeniería Química. Universidad de Santiago de Compostela.
Avda. de las Ciencias s/n. 15706 Santiago de Compostela.

RESUMEN

Procesado acuoso de soja con tecnología enzimática: extracción de aceite y producción de aislados.

Se ha incorporado una etapa de tratamiento enzimático previa a la extracción acuosa en condiciones alcalinas durante el procesado para obtención de aceite y proteína de soja. La degradación de la estructura de la pared vegetal, causada por el ataque enzimático, aumenta la extractabilidad del aceite en un 10% respecto al aceite total extraíble. No se apreció efecto sobre el rendimiento de proteína debido posiblemente a que la posterior extracción a pH 9 inhibe los efectos de la acción enzimática. Tras la realización del proceso de extracción acuoso, se elimina en el suero un 30% de enzima activa, que puede ser reutilizada en el proceso.

PALABRAS-CLAVE: Aceite — Extracción acuosa — Proteína — Soja — Tecnología enzimática.

SUMMARY

Aqueous processing of soybeans with enzymatic technology: oil extraction and production of isolates.

An enzymatic treatment was incorporated before the alkaline extraction during the aqueous processing of soybeans for oil and protein. The degradation on the plant cell wall structure by the enzymatic action, enhances the oil extractability by 10% of the potential extractable oil. No significant effect on the protein extractability was detected, although this effect was probably masked by the alkaline extraction. After the aqueous extraction, 30% of active enzyme was eliminated in the whey. This can be recovered and reutilized in the next stage.

KEY-WORDS: Aqueous extraction — Enzymatic technology — Oil — Protein — Soybean.

1. INTRODUCCION

Los procesos convencionales de extracción de aceite de semillas (presión y/o disolventes), optimizados para la recuperación del aceite, pueden causar efectos adversos sobre las propiedades de la proteína si ésta se pretende emplear como ingrediente para formulación de productos para alimentación humana. La creciente importancia que la fracción proteica de las semillas ha adquirido frente a la fracción grasa, debida a i) los hábitos alimenticios cambiantes y la tendencia a reducir el consumo de grasas en la dieta, ii) el coste creciente de la proteína animal, ha incentivado la investigación para el aprovechamiento de esta fuente de proteína.

Dependiendo de las condiciones de pH durante el procesado, la proteína puede recuperarse como concentrado en la fase sólida o como aislado en la fase acuosa, este último de mayor pureza, aunque en ambos casos el contenido proteico es superior al de la harina desgrasada, que generalmente se emplea como material de partida. Existe la posibilidad de realizar la extracción conjunta del aceite y de la proteína a partir de semillas sin desgrasar, con un proceso acuoso que permita la separación de las distintas fracciones, mejorando el valor económico de los productos obtenidos frente a los provenientes del procesado convencional.

El proceso acuoso ofrece ventajas sobre los sistemas de extracción comúnmente empleados, pues no se emplean disolventes tóxicos o de manejo peligroso; además de la seguridad, permite flexibilidad de operación, ya que las puestas en marcha y paradas son más seguras, facilitando la operación discontinua, y se reducen los costes de inversión y operación por el menor tamaño de estas plantas frente a las de disolventes (Hagenmaier *et al.*, 1973; Hron *et al.*, 1982; Cruz Madueño, 1990). Durante el procesado acuoso se emplea agua como disolvente extractor, para eliminar el aceite y obtener simultáneamente un producto detoxificado adecuado para consumo humano (Staron et Guillaumin, 1979; Barraquio y van de Voort, 1988). Sin embargo, el agua presenta una menor eficacia de extracción, y se requiere una etapa de desmulsificación.

El proceso acuoso permite obtener un aceite limpio, claro y fácilmente refinable, puesto que las impurezas y componentes menores que lo acompañan son eliminados con el agua empleada como disolvente extractor. No sólo se obtiene un menor contenido en fósforo (Lanzani *et al.*, 1983; Olsen, 1988) sino que también se ha observado una reducción del contenido en clorofila en aceite de colza obtenido por procesado acuoso frente al de procesos convencionales (Laiho *et al.*, 1990).

La investigación de procesos alternativos de extracción de aceite de semillas se ha centrado últimamente en el empleo de enzimas como auxiliares tecnológicos (Lanzani *et al.*, 1975; Fullbrook, 1984; Bhatnagar y Johari, 1987). El aceite se encuentra en las células vegetales, ligado a proteínas y carbohidratos, y es preciso demoler las paredes

celulares para extraer el aceite y la proteína; la degradación que causa el ataque enzimático permite una separación de los componentes en distintas fracciones, de modo distinto al que logra la tecnología convencional. Se ha visto el efecto favorable de la digestión enzimática de las paredes celulares con pectinasas, amilasas o proteasas, que junto con enzimas celulolíticos y hemicelulolíticos favorecen la extracción de aceite y proteína durante la producción de concentrados (Gurtler *et al.*, 1981) o durante la producción de leche de soja (Lanzani *et al.*, 1987 y 1988). El aumento en la extractabilidad de la fracción proteica, causado por la hidrólisis de los carbohidratos y rotura de los enlaces que los unen a dichas proteínas, mejora la velocidad de filtración de la suspensión acuosa (Hang *et al.*, 1970; Graille, 1988).

En este trabajo se evalúa el efecto de un tratamiento enzimático durante el procesado acuoso de habas de soja; se compara la eficacia de extracción de aceite y proteína con la obtenida en muestras control. Se estudia el efecto de la relación enzima:semillas y el tiempo de tratamiento sobre la distribución de aceite y proteína, así como la calidad de los productos, y la actividad enzimática recuperable en el suero.

2. MATERIALES Y METODOS

Semillas. Las habas de soja (suministradas por una extractora local) se mantuvieron en bolsas de plástico cerradas a 4 °C hasta su uso, momento en que se trocearon, se eliminaron las cáscaras y se redujeron a un tamaño menor de 0.2 mm. El análisis de estas semillas indica que su composición en base seca es: 22.1% aceite, 40.3% proteína, 5.2% cenizas, 8.4% fibra total (FND) y 24% de fracción no nitrogenada.

Enzimas. Se emplearon enzimas comerciales, adecuadas para mejorar la extractabilidad del aceite de soja: Celluclast 1.5 L, un complejo celulolítico suministrado por Novo Nordisk A/S, y dos enzimas de actividad múltiple, Multifect y Olease, de Finnish Sugars Co. Ltd. y Biocon respectivamente.

Métodos analíticos. El contenido en humedad, cenizas, aceite, FND (fibra neutro detergente) y FAD (fibra ácido detergente) se determinaron según se recomienda en la metodología AOAC (1990). El contenido en proteína se calculó como nitrógeno Kjeldahl $\cdot 6.25$, que es una expresión generalmente empleada en estos procesos, aunque un valor más adecuado para soja es 5.52 (Mossé, 1990). La lisina disponible se determinó por el método del ácido TNBS (2,4,6-trinitrobencenosulfónico) (James y Ryley, 1986). La digestibilidad aparente *in vitro* de la proteína se midió por un método enzimático propuesto por Hsu *et al.*, (1977), que requiere la digestión con tripsina, quimotripsina y peptidasa. El contenido en aminoácidos se analizó tras hidrólisis con HCl 6 M, y posterior derivatización con fenilisotiocianato y se analizó por CLAR de fase reversa, en una estación Pico-Tag y cromatógrafo Waters. La Tasa de Eficacia de la Proteína, que mide la eficacia nutritiva en relación con la caseína, se calculó del modo que indican Hsu *et al.*, (1978). Para este cálculo se empleó el valor de la digestibilidad aparente *in vitro*, junto con los valo-

res del contenido en lisina, metionina+cisteína, treonina, isoleucina, leucina, valina, fenilalanina+tirosina, y puesto que no se determinó el contenido en triptófano, para este aminoácido se empleó un valor medio de los recogidos en la bibliografía para aislados. Para el análisis de la solubilidad de la proteína se dispersó la muestra molida en una disolución 0.2 M de NaCl hasta obtener una suspensión 1% (p/v); una vez ajustado el pH a 9 con NaOH se mantuvo agitada a temperatura ambiente durante 2 h. Las muestras se centrifugaron y se determinó por Kjeldahl el N contenido en el sobrenadante. El índice de solubilidad se calculó como porcentaje de la proteína total de las muestras que se recupera en el sobrenadante. La actividad celulolítica se midió sobre sustratos celulósicos: celulosa microcristalina Avicel (Sigma) para determinar actividad celobiohidrolasa, CMC (Panreac) para endoglucanasa y papel de filtro Whatman N.º 1 para determinar la actividad total (Canevascini & Gattlen, 1981). Los azúcares reductores y totales se determinaron colorimétricamente por el método del ácido DNS a 540 nm y con sulfato de hidracina en H₂SO₄ a 490 nm respectivamente.

Proceso experimental. Para la etapa de extracción alcalina del aceite y proteína de habas de soja se realizó el batido de las habas molidas en condiciones de pH, temperatura y relación agua:semillas seleccionadas experimentalmente o en base a resultados bibliográficos. Posteriormente se realizó la separación centrífuga de las fases obteniéndose en la fase líquida la proteína solubilizada y una emulsión de aceite en agua, y en la fase sólida un residuo fibroso. La proteína soluble se precipita isoelectricamente con HCl y tras una nueva etapa de centrifugación se obtiene la fase líquida, con agua y aceite, separada del aislado proteico (Fig. 1).

Condiciones operacionales. La relación agua:semillas, el pH y las condiciones de centrifugación se seleccionaron previamente en función de la máxima extracción de aceite y proteína, en un sistema de extracción acuosa sin tratamiento enzimático. El tamaño de partícula, que afecta a la eficacia de extracción de aceite y proteína, se redujo a < 0.2 mm (70 mesh), pues un molido insuficiente reduce el rendimiento de aceite y una excesiva reducción de tamaño favorecería la formación de emulsiones difíciles de romper. La temperatura de operación, que afecta a la extracción y calidad del aceite, se mantuvo a 50°C. Las habas de soja se procesaron sin someterlas a un tratamiento térmico previo para inactivar los enzimas endógenos, que podría reducir tanto el rendimiento de aceite como el de proteína al partir de muestras sin desgrasar (Marek *et al.*, 1990), aunque cuando se parte de harina desgrasada, los rendimientos de extracción de proteína y la pureza del producto obtenido son ligeramente superiores si han sido tratados térmicamente.

Una vez realizada la etapa de batido-extracción, y tras enfriar a temperatura ambiente, la pasta se centrifugó a 12.500 rpm durante 20 min en una centrífuga Beckman J2-21. Aunque el uso de una centrífuga de laboratorio no permite eliminar eficazmente el aceite, y presenta rendimientos menores que otros equipos continuos debido al corto recorrido medio del aceite en este sistema (Kim, 1989), es adecuado para fines comparativos y para realizar

la evaluación del efecto de la adición de enzimas. La cantidad de aceite extraído durante el proceso acuoso se determinó midiendo el contenido residual en los productos sólidos obtenidos: el residuo fibroso y el aislado.

Durante el batido y la centrifugación en dos etapas se empleó una relación agua:semillas 15:1, que permite facilidad operacional en el proceso discontinuo, aunque el empleo de una menor relación durante la resuspensión y segunda etapa de centrifugación podría favorecer la desmulsificación (Lawhon *et al.*, 1981) y la realización del proceso en continuo.

El pH durante la extracción se seleccionó para recuperar más aceite y proteína. Se empleó NaOH 0.2 M para modificar el pH de la suspensión de semillas molidas durante la extracción, pues este álcali permite solubilizar una elevada proporción de proteína (Taha *et al.*, 1986). Aunque a valores elevados de pH el aceite en el residuo se reduce, queda más aceite en el aislado, con la consiguiente reducción en la estabilidad del producto. A valores altos de pH y temperatura también aumenta el contenido en ácidos grasos libres del aceite. Se seleccionó un valor de pH 9, pues se solubiliza un elevado porcentaje de la proteína, se elimina el ácido fítico (que compleja minerales reduciendo su disponibilidad) (Tzeng *et al.*, 1990) y se favorece la inactivación de la lipoxigenasa, para no afectar la calidad del aceite. El procesado en condiciones alcalinas podría favorecer la formación de lisinoalanina en productos proteicos; este complejo se forma durante la reacción del grupo ϵ de la lisina con el doble enlace de la dehidroalanina, formada por deshidratación de la cisteína o la serina. Aunque no se ha demostrado que posea acción tóxica, la formación de lisinoalanina reduce la calidad nutritiva y digestibilidad de la proteína, y su concentración en productos proteicos no debe sobrepasar 500-1000 ppm (Barr, 1981; Gómez y Torre, 1989). Puesto que la

exposición de las habas de soja sin desgrasar a estas condiciones es menos perjudicial que si sólo se expone el aislado, no se prevé que en las condiciones de pH y temperatura empleadas se vea afectada la calidad nutritiva del producto obtenido (Struthers, 1981).

Proceso enzimático. La cantidad de proteína extraída depende de factores como la concentración del tampón, pH, concentración de sustrato, relación enzima:semillas y tiempo de tratamiento. Los dos primeros se seleccionaron previamente en función de la actividad enzimática sobre sustratos artificiales. La concentración de sustrato se fijó en las condiciones empleadas en la extracción a pH 9; el efecto del tiempo y la concentración de enzima se analizan en la siguiente sección. Puesto que el valor de pH óptimo para el desarrollo de la actividad enzimática es diferente del seleccionado para la extracción de aceite y proteína, es necesaria la realización de dos etapas separadas: una incubación con enzimas a 50 °C y pH ácido (4.5-4.8), condiciones óptimas para la actividad enzimática, y la otra a pH 9, para favorecer la extracción de aceite y proteína. La separación centrífuga de las fases sólida y líquidas, se realiza a 12.500 rpm durante 20 min.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Para determinar el efecto de la acción enzimática sobre la distribución de aceite y proteína en los productos, se estudiaron dos variables: la relación enzima:semilla y el tiempo de tratamiento.

Relación enzima:semilla

Se estudió su efecto en el rango 0.1-3 g/100 g semilla (base seca) para los distintos enzimas comerciales, en comparación con una muestra control (sin enzimas) (Tabla I). Se obtuvo una recuperación de sólidos en los aislados entre 35 y 39% en todos los casos, frente al 36% en las muestras control. A relaciones mayores de 1 se obtienen los máximos valores porque la acción enzimática favorece una mayor solubilización del material.

El rendimiento de extracción de proteína, osciló entre 68 y 73% de la inicialmente contenida en la muestras, siendo la pureza en el producto resultante tras la precipitación isoeléctrica y posterior centrifugación, del 70-76%. Comparando estos resultados con los del control se observa un ligero incremento en la recuperación de proteína a relaciones enzima:semilla superiores a 0.1 g/100 g. La pureza es, con oscilaciones, del mismo orden que en el control.

Asimismo en el aislado proteico se recupera un 7-9 % del aceite inicial y el contenido graso de los aislados es de 4-5 % de su peso seco. Los valores obtenidos son similares a los del control, aunque la retención de aceite es mayor en los aislados de muestras tratadas con Olease, a las mayores relaciones enzima:semillas.

Por lo que se refiere al residuo, su contenido proteico apenas se ve afectado por la concentración de enzima, y para cualquier relación enzima:semilla empleada se mantiene en torno al 20 %, ligeramente inferior al control.

Figura 1

Diagrama de flujo del proceso de extracción acuosa de habas de soja con incorporación del tratamiento enzimático.

Tabla I
Recuperación de aceite y proteína (% del inicial) y riqueza (% p/p, base seca) en el aislado en muestras procesadas con tecnología enzimática acuosa.

Relación E/S		Proteína		Aceite	
		Recuperación (% inicial)	Riqueza (% b.s.)	Recuperación (% inicial)	Riqueza (% b.s.)
Sin tratar		68.9	74.6	7.6	4.5
Celluclast	0.1	68.1	75.9	7.1	4.3
	0.5	71.5	75.0	7.1	4.2
	1	72.8	73.7	8.0	4.5
	1.5	72.1	72.5	7.0	3.9
	2	72.8	75.9	7.7	4.5
	3	72.4	70.7	7.6	4.2
Multifect	0.1	—	—	—	—
	0.5	69.4	74.6	7.6	4.5
	1	70.7	72.2	7.4	4.1
	1.5	70.2	73.8	6.9	4.0
	2	71.1	72.1	7.8	4.3
	3	70.2	72.8	7.5	4.2
Olease	0.1	68.1	73.1	7.3	4.3
	0.5	69.8	72.8	8.3	4.7
	1	71.1	72.1	7.7	4.3
	1.5	69.4	69.8	9.1	5.0
	2	71.9	74.5	8.4	4.7
	3	72.4	73.9	8.7	4.8

Todos los enzimas empleados favorecen la extractabilidad del aceite (medida como diferencia del aceite total y el contenido graso en los productos sólidos, residuo y aislado) cuando se usan en una relación de 0.5 g/100 g o mayor; este efecto corresponde a un aumento en la extractabilidad del aceite del residuo, pues en el aislado no se modifica el contenido graso. En la Fig. 2 se muestran los datos correspondientes al residuo, donde se observa el comportamiento diferenciado de cada

enzima. En general, a partir de 2 g/100 g no existe mejoría. Si a estos datos se superponen los del aislado, se pueden determinar las concentraciones de enzima por encima de las cuales la mejoría no es ostensible, y que se emplean en los experimentos posteriores: Celluclast: 2, Multifect: 1.5 y Olease 1 g enzima/100 g. Multifect es, en conjunto, la que proporciona los mejores resultados de aumento de rendimiento de extracción en más de 7 %.

Figura 2

Efecto de la relación enzima:semillas sobre el contenido graso del residuo sólido obtenido durante la extracción acuosa de habas de soja.

Figura 3

Efecto de la relación enzima:semillas sobre la concentración de azúcares reductores y proteína que se elimina en el suero.

En cuanto al suero, contiene una elevada porción de sólidos no precipitados (21-29%), con un ligero aumento en las muestras tratadas con enzimas. Dado que en las condiciones empleadas para la extracción acuosa se puede considerar la concentración de azúcares en el suero indicativa del grado de ataque enzimático de la pared vegetal, en la Fig. 3 se presentan los datos correspondientes. El aumento de azúcares reductores respecto a las muestras control (correspondiente a 21.7 mg/g m.s.) está en el rango 15-20 mg/g b.s., tras 1 h de tratamiento enzimático. Se puede apreciar un incremento continuo con la relación enzima:semilla en el intervalo estudiado, y aunque la conducta de los tres enzimas es similar, la reacción de hidrólisis transcurre con diferente extensión, y puede correlacionarse con la actividad celulolítica de los enzimas, siendo mayor el efecto producido por los enzimas más activos (Celluclast y Multifect). En el suero se elimina un 8-11% del contenido proteico inicial de las muestras. La cantidad de proteína añadida con los enzimas puede depreciarse, puesto que aunque se recuperase completamente, bien en el suero o en cualquiera de los productos sólidos, la mayor dosis enzimática supondría un aumento inferior a 0.3 g enzima/100 g semillas, y no representaría

más de 3 mg proteína enzimática en 400 mg proteína de soja.

Si bien los resultados obtenidos por diferentes autores en cuanto a extractabilidad de aceite señalan un efecto favorable de la aplicación del tratamiento enzimático, en la bibliografía se recogen efectos contradictorios de la acción del tratamiento enzimático sobre la extractabilidad de proteína. Lanzani *et al.*, (1988) llevaron a cabo un tratamiento similar al de este trabajo con enzimas comerciales, durante la producción de leche de soja, en la que la fase sólida (o residuo) es comparable residuo, y la fase acuosa comparable al aislado y suero. Los resultados no revelaron una mayor solubilización de sólidos y proteína en comparación con las muestras control, mientras que los datos obtenidos tras el tratamiento enzimático con un filtrado de celulasas fúngicas realizado por Abdo y King (1967) muestra que la proteína en el líquido aumenta considerablemente con la aplicación de un tratamiento enzimático, aumentando el contenido de 74 a 96 %. Marek *et al.*, (1990) observaron un aumento en la fracción de proteína solubilizada tras el tratamiento enzimático de colza, soja y maíz con celulasas de distinto origen.

Tabla II
Evolución de la recuperación de proteína y aceite (% total) y riqueza en el aislado (% p/p, base seca) en función del tiempo de extracción alcalina en muestras control y del tiempo de tratamiento enzimático previo a la extracción alcalina en muestras tratadas

Relación E/S		Proteína		Aceite	
		Recuperación (% inicial)	Riqueza (% b.s.)	Recuperación (% inicial)	Riqueza (% b.s.)
Sin tratar	0.25	58.2	64.9	7.7	4.7
	0.5	68.9	74.6	7.6	4.5
	1	68.5	69.9	7.3	4.1
	2	68.5	68.5	8.4	4.6
	4	69.8	66.6	9.0	4.6
	5	69.4	67.1	9.3	4.9
Celluclast	0.25	68.1	80.9	8.0	5.2
	0.5	69.8	84.3	7.3	4.8
	1	70.7	75.9	7.7	4.5
	2	71.1	81.2	6.3	3.9
	4	70.7	78.8	6.9	4.2
	5	71.7	81.8	6.5	4.1
Multifect	0.25	68.9	75.7	8.0	4.8
	0.5	68.9	71.4	8.1	4.6
	1	70.2	73.8	6.9	4.0
	2	68.9	69.9	8.5	4.7
	4	69.8	72.3	8.7	4.9
	5	70.3	70.3	6.4	3.5
Olease	0.25	67.7	70.1	11.2	6.3
	0.5	69.8	71.3	10.2	5.7
	1	71.1	72.1	7.7	4.7
	2	71.1	72.6	10.3	5.7
	4	71.7	76.4	10.2	5.9
	5	71.5	72.5	10.8	6.0

Efecto del tiempo de tratamiento

Una vez seleccionada la relación enzima:semillas óptima, como función de la extractabilidad del aceite y proteína, se estudió tanto el efecto del tiempo de tratamiento con enzimas (en el intervalo 0.25 - 5 h) sobre la eficacia de la etapa enzimática, como el efecto del tiempo de extracción alcalina sobre una muestra control (pH = 9). Todas las muestras tratadas con enzimas durante períodos de incubación en el intervalo estudiado se extrajeron a pH 9 durante 1/2 h, (puesto que a tiempos mayores no se apreció una diferencia significativa en las muestras control), tras períodos de incubación con enzimas en el intervalo estudiado (Tabla II).

La fracción de sólidos recuperada en el aislado aumenta ligeramente con el tiempo de extracción desde 35 a 41 %, alcanzando un máximo tras 4 h en las muestras control; sin embargo en las pruebas con enzimas no se apreciaron diferencias importantes.

Aunque se aprecia cierta tendencia a recuperar más proteína en el aislado, desde 58.2 % a 0.25 h hasta 68.5 % a las 2 h en las muestras control, el porcentaje de proteína recuperada en las muestras tratadas oscila entre 67.7 y 71.5% sin apreciarse claramente un efecto del tiempo de tratamiento enzimático. El contenido proteico se mantiene entre 76 y 84% para los aislados procedentes de muestras tratadas con Celluclast, y entre 70-76% para las otras dos enzimas. Al igual que se observó para distintas relaciones enzima:semillas, tampoco se aprecia que el tiempo de tratamiento afecte al porcentaje de aceite que se recupera en el aislado (7.3-11.2%). Los tiempos de tratamiento mayores de 2 h no causan un aumento adicional en la extracción del aceite y se mantiene un contenido graso en base seca entre 3.5 y 6.4%. La recuperación de aceite en el aislado no se reduce, incluso en algunos casos (muestras tratadas con Multifect o con Olease) aumenta ligeramente

respecto a las muestras control, manteniéndose en torno a un 6-11% del aceite total de la muestra inicial.

El tiempo de tratamiento enzimático, al igual que la relación enzima:semillas, apenas afecta a la distribución de sólidos totales en las diferentes fases sólidas y el suero. En el residuo se registró una reducción en el contenido en sólidos de 38.9 a 32.6 % en las muestras control, mientras que el efecto del tiempo de tratamiento enzimático sólo es apreciable en las muestras tratadas con Multifect (en las que se reduce de 39 a 33 %).

En la Fig. 4 se presenta el efecto del tiempo de tratamiento enzimático y extracción alcalina sobre el contenido graso en el residuo. El efecto del tiempo de extracción alcalina sobre la reducción del contenido graso, estudiado en muestras control durante 0.25-5 h, es mínimo para períodos mayores de 1 h. Esta conducta ha sido ya observada en otras semillas oleaginosas durante el procesado acuoso, presentando períodos de extracción óptimos de 0.3-1 h: cacahuete (Rhee *et al.*, 1972), girasol (Hagenmaier, 1974), semilla de palma (Kim, 1989), soja (Lawhon *et al.*, 1981). Para las muestras tratadas enzimáticamente, en función de la eliminación del aceite se podrían elegir períodos de tratamiento entre 2-4 h, aunque como se observa para muestras tratadas con Multifect, a 4-5 h aún se obtiene una reducción adicional del contenido graso del residuo.

En la Figura 5 se representa la proteína (no precipitada isoelectricamente) y los azúcares reductores contenidos en el suero tras la separación centrífuga, para la relación enzima:semillas elegida como óptima para los distintos enzimas, correspondientes a distintos períodos de hidrólisis en muestras tratadas y control. Mientras que en las muestras control se observa un aumento mínimo y continuado de la concentración de azúcares reductores en el suero, en las muestras tratadas se produce un aumento correspondiente a 10-15 mg/g m.s. durante las primeras 2 h.

Figura 4

Contenido graso del residuo durante el procesado acuoso de habas de soja en función del tiempo de hidrólisis enzimática (pH 4.8) en muestras tratadas, y del tiempo de extracción (pH 9) en las control.

Figura 5

Efecto del tiempo de extracción alcalina en muestras control y del tiempo de tratamiento enzimático sobre la concentración de azúcares reductores y proteína que se elimina en el suero.

El contenido en sólidos en el suero aumenta ligeramente con el tiempo de extracción alcalina en las muestras control, sin que se observe este efecto durante el tratamiento enzimático. Dada la elevada cantidad de sólidos no precipitados que se detectan en el suero y que contiene proteínas, azúcares, y polisacáridos solubles, la corriente habrá de reutilizarse tras una etapa de concentración no sólo para aprovechar los nutrientes, sino para evitar generar un efluente con elevada carga orgánica y contenido en sólidos. Este contenido sería superior si i) se emplea una menor relación agua:semillas, ii) si se recircula el suero líquido a la etapa de batido en función de la relación enzima:semillas, deseables desde el punto de vista operacional. La concentración de esta corriente por evaporación permitiría aprovechar los nutrientes para alimentación animal o para otros usos puesto que estas proteínas de bajo peso molecular, no precipitadas con ácido, presentan excelentes propiedades funcionales: solubilidad en amplios intervalos de pH, baja viscosidad y poder emulsificante (Cater *et al.*, 1973). Una alternativa adecuada para reducir el contenido en sólidos en la fase líquida y recuperar proteína es la tecnología de membranas de UF; el posterior empleo de membranas de ósmosis inversa para procesar el permeato del proceso de UF permite obtener un efluente reutilizable en el proceso.

Relación extractabilidad-degradación de la pared

La extracción de aceite se ve favorecida por el grado de ruptura de la pared, y así se constata con los resultados de la relación entre el incremento en la extractabilidad y la degradación de la pared celular, medida como aumento neto de azúcares reductores. A partir de los datos obtenidos para los distintos ensayos realizados a diferentes tiempos y relaciones enzima:semillas se pretende relacionar la degradación de la pared celular alcanzada (medida como producción neta de azúcares reductores, eliminados en el suero) con el aumento registrado en la extractabilidad del aceite (medido como diferencia del contenido total de las muestras de partida y el aceite residual en el aislado y el residuo).

La Fig. 6 presenta esta relación para los distintos enzimas empleados. Se aprecia que el aumento en la degradación de la pared provoca un aumento en la extractabilidad del aceite. Durante el procesado acuoso, con una etapa previa de ataque enzimático, se observa que un aumento de 10 mg de azúcares reductores/g m.s. causa aproximadamente un aumento de extractabilidad del aceite de 5 (medida como porcentaje del aceite total).

Los aumentos de extractabilidad alcanzables dependen del tipo de proceso base empleado. Así, en procesos optimizados para la extracción del aceite las mejorías en la extractabilidad son menores (Lanzani *et al.*, 1975). Hitze *et al.*, (1972) obtuvieron en un proceso acuoso de extracción de aceite de maíz un aumento de sólo 3%, puesto que el proceso de partida ya permitía eliminar un 91% del aceite total extraíble. Fullbrook (1984) obtuvo aumentos significativamente mayores partiendo de un proceso sin enzimas con un rendimiento menor del 15% de aceite total extraíble,

Figura 6

Relación entre la degradación de la pared celular, medida como incremento neto de azúcares reductores y el aumento en la extractabilidad del aceite durante el procesado acuoso de habas de soja. Aumento extracción de aceite = $0.4063 \cdot \text{Aumento az. reductores} - 0.099$. $r^2=0.7119$; $F=69.18$ ($P<0.01$).

que durante la producción de hidrolizados proteicos a pH alcalino, tras la realización de una etapa de incubación con carbohidrasas a pH 4.5, donde los aumentos en el rendimiento de extracción de aceite fueron menores.

Caracterización de los productos sólidos

Para la relación enzima:semillas encontrada como óptima y tras el tratamiento durante 2 h a pH 4.8, se analizó la composición promedio de los productos sólidos (residuo y aislado obtenidos de muestras control y tratadas) que se presenta en la Tabla III.

Aislado. El contenido en fibra total (FDN) se mantiene en un 2-2.5% del peso del producto. El contenido proteico es superior al 70% en aislados procedentes de muestras tratadas y sin tratar; el contenido en cenizas y azúcares es en general aceptablemente bajo, considerando que el producto no ha sido sometido a un lavado posterior y comparable al obtenido por otros autores en condiciones similares (Lawhon *et al.*, 1981). Un lavado con agua fría en una o más etapas podría aumentar el grado de pureza al eliminar aceite, azúcares y sales coprecipitadas con la proteína, elevando el contenido proteico del producto y mejorando su calidad, puesto que el aceite residual (que tiende a oxidarse), y los azúcares reductores (que sufren reacciones de Maillard) no sólo reducirían la estabilidad del producto, sino que reaccionan con la proteína, afectando a su valor nutritivo (Hurrell y Finot, 1985).

Los aislados presentan valores elevados de proteína soluble, medida a pH 9 y del coeficiente de digestibilidad *in vitro*, debido a que el material no ha sido sometido a tratamiento térmico en ninguna etapa del proceso. El porcentaje de lisina disponible, superior al 80% del total en todos los casos, indica que el procesado alcalino no afecta sensiblemente a la biodisponibilidad de este aminoácido.

Tabla III
Comparación de algunas de las principales características del residuo y del aislado proteico obtenido en el proceso con y sin enzimas (% b.s.).

	Aislado			
	control	Celluclast	Multifect	Olease
Aceite	4.5	3.9	4.7	5.7
Proteína (N-6.25)	74.6	81.2	69.9	72.6
FND	2.4	2.0	1.9	2.1
Cenizas	3.0	3.5	3.1	3.2
Azúcares	6.2	6.7	7.2	6.7
Proteína soluble (%)	85.6	86.2	86.1	85.9
C.D.A. (%)	88.0	88.8	89.0	88.0
Lisina disponible (g/16 g N)	5.6	5.5	5.0	5.5
REP-C	1.84	1.80	1.92	1.95

Características	Residuo			
	control	Celluclast	Multifect	Olease
Aceite	15.7	9.8	10.2	10.0
Proteína (N-6.25)	23.2	18.2	23.6	19.4
FND	32.5	30.2	30.1	32.0
Cenizas	5.5	6.8	6.8	7.6
Azúcares	3.1	4.9	5.2	5.0
Otros	23.3	31.8	26.1	28.0

Residuo. El efecto más destacable de la aplicación del tratamiento enzimático es la reducción en el contenido graso del residuo sólido. El aceite residual se reduce desde 15.7% en el control a un valor promedio para las tres muestras tratadas de 10% (d.b.). La mayor reducción en el contenido en fibra se registró en las muestras tratadas con Celluclast. Parte del aumento registrado en el contenido en cenizas puede explicarse por la adición de sales que modifican el pH durante el tratamiento enzimático.

El perfil aminoacídico de los aislados obtenidos se indica en la Tabla IV. No se aprecia variación significativa en el contenido individual de los aminoácidos, salvo la menor proporción de treonina, metionina+cisteína, leucina e isoleucina en aislados procedentes de muestras tratadas con Multifect. La proporción de lisina supera en todos los casos el valor recomendado por la FAO/WHO, y en general el contenido de los distintos aminoácidos se encuentra en una proporción similar a la recomendada.

Tabla IV
Composición de aminoácidos de los aislados obtenidos a partir de muestras control y de los tratados con enzimas (g/16 g N).

Aminoácido	control	Celluclast	Multifect	Olease
Ac. aspártico	13.17	14.21	14.82	14.01
Ac. glutámico	13.11	14.32	14.61	13.61
Serina	5.65	4.84	6.63	6.21
Glicina	4.12	4.45	5.55	5.10
Histidina	3.55	3.42	4.20	4.32
Arginina	6.96	7.38	7.39	7.88
Treonina	3.43	3.86	2.61	3.58
Alanina	8.50	8.09	8.60	9.03
Prolina	5.90	5.26	6.02	4.24
Amonio	5.16	3.93	5.25	3.64
Valina	4.29	4.50	3.00	4.31
Metionina + Cisteína	1.68	1.72	2.62	1.83
Isoleucina	4.20	5.08	2.95	3.05
Leucina	7.81	6.12	4.32	6.34
Fenilalanina + Tirosina	5.80	6.13	4.54	5.54
Lisina	6.11	6.00	5.69	6.70

Fracción de enzima activa en el suero

La fase líquida generada en el proceso acuoso se recicla generalmente a la etapa de batido (línea discontinua en la Fig. 1). Si se incorpora el tratamiento enzimático, los enzimas no adsorbidos se eliminan en esta fase líquida; si no han sido desactivados tras la hidrólisis a 50°C y pH 4.8, y la extracción a pH 9, podrían reutilizarse reciclando esta corriente, con el consiguiente ahorro de enzima. El pH básico con la disolución 0.01 N de NaOH -considerando que esta es la concentración de sales que se mantiene durante la extracción- reduce la actividad de las diferentes formulaciones comerciales sobre CMC, celulosa microcristalina y papel filtro en menos de un 30%, y tras 2 h hidrólisis a pH 4.8 y 50 °C la actividad se reduce en menos de un 15% de la actividad inicial.

En la Tabla V se indica la fracción de la actividad original (retenida en el suero tras la separación de las fases sólidas en las dos etapas de separación centrífuga) medida como producción de azúcares reductores tras la incubación de tres sustratos celulósicos (CMC, papel de filtro y celulosa microcristalina en las condiciones estándar de medida de actividad) con suero. La actividad residual se ha referido a la actividad inicialmente añadida en una relación de 2 g de enzima /100 g semillas.

Tabla V
Actividad celulolítica residual en el suero

Sustrato	Actividad residual (% inicial)		
	Celluclast	Multifect	Olease
CMC	28.23	26.39	24.67
C. microcristalina	30.17	37.42	27.60
Papel filtro	24.54	32.48	22.75

El relativamente elevado porcentaje de enzima activo podría explicarse considerando el efecto favorable de valores de pH alcalino sobre la desorción de este tipo de enzimas de sustratos celulósicos, aunque el sustrato no es comparable, pues las semillas no son materiales celulósicos. Otter *et al.*, (1989) observaron que a pH alcalino (10) y a temperatura desde 5 a 40 °C, en presencia de desorbentes, y durante períodos de segundos a 15 min se favorece la recuperación de 70% de celulasa activa. Las condiciones durante la extracción y separación centrífuga, (pH=9, durante 30 min a 50 °C y aproximadamente 1 h de separación de fases a temperatura menor 10 °C) podría favorecer la desorción de enzima activo; la concentración de NaOH y el pH del medio durante la extracción son óptimos, como indican estos autores para la desorción de la celobiohidrolasa, manteniendo la estabilidad, cuando se emplean surfactantes no iónicos como desorbentes, pues protegen al enzima frente a la desnaturalización. Aunque durante el procesado acuoso, no se añaden sustancias inductoras de desorción, la lecitina de soja posee

propiedades detergentes, que podrían explicar el efecto observado durante el procesado acuoso, puesto que la concentración en que se encuentra en el medio es del orden de 0.01 % (p/v), que resulta óptimo para estos surfactantes.

La recuperación de esta fracción de enzima activo podría permitir reducir en un 30% de la cantidad de enzima en la segunda etapa de hidrólisis. Convendría estudiar el efecto que el reciclado sucesivo tendría sobre la actividad enzimática residual y sobre la extractabilidad de aceite y proteína si el proceso se realizase de modo continuo, con reciclado del suero a la etapa de batido, así como la reducción de la relación agua:semillas y su efecto sobre la recuperación y calidad de los productos.

4. CONCLUSIONES

El procesado acuoso permite la incorporación de un tratamiento enzimático durante el proceso de obtención de aceite y proteína de soja, debido a la naturaleza y condiciones del proceso. En este trabajo se realizó una etapa de incubación con enzimas en condiciones análogas a las empleadas para la extracción alcalina, salvo el pH, que se mantuvo en el intervalo que favorece la máxima actividad enzimática.

- En las condiciones ensayadas no mejora la extractabilidad de las proteínas frente al tratamiento acuoso sin auxiliares enzimáticos. Las condiciones alcalinas favorecen la solubilización y extracción de proteína y posiblemente su efecto es mayor que el de la acción enzimática, que no es apreciable o queda enmascarada.
- El rendimiento en la extracción de aceite se mejora en un 10% respecto al proceso de extracción acuosa. Este valor es susceptible de mejorar con las condiciones de operación.
- La reutilización del enzima en etapas posteriores, supone un ahorro económico en el proceso al permitir reducir la cantidad de enzima empleada.

BIBLIOGRAFIA

- Abdo, K. M. and King, K. W. (1967).- "Enzymatic modification of the extractability of protein from soybeans, *Glycine max*".- *J. Agric. Food Chem.* **15**(12) 83-87.
- Barr, G. (1981).- "Soybean meal in calf milk replacers".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 313-319.
- Barraquio, V. L. and Van de Voort, F. R. (1988).- "Milk and soy proteins: their status in review".- *Can. Inst of Food Sci. Technol.* **21** (5) 477-493.
- Barry, J. L. (1989).- "L'influence des traitements technologiques sur la digestibilité des aliments".- *Biofutur*. **62**, 51-55.
- Bhatnagar, S. and Johari, B. N. (1987).- "Microbial enzymes in the processing of oil seeds".- *Current Science* **56**(15) 775-776.
- Canevascini, G. y Gattlen, C. (1981).- "A comparative investigation of various cellulase assay procedures".- *Biotechnol. & Bioeng.* **23**, 1573-1590.
- Cater, C. M., Rhee, K. C., Hagenmaier, R. D. y Mattil, K. F. (1973).- "Aqueous extraction-An alternative oilseed milling process".- *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51**, 137-141.
- Cruz Madueño, E. (1990).- "Extracción acuosa".- *Alimentación, Equipos y Tecnología* **9** (3) 51-58.
- Fullbrook, P. D. (1984).- "Extraction of vegetable oils".- UK Patent Application GB 2 127 425A. No 8227661.

- Gómez P., J. M. y Torre B., M.^a C. (1989).— "Influencia de la tecnología en el valor nutritivo de los alimentos. I: Proteínas".— *Alimentaria* **26**, 15-21.
- Graille J., Pina M. y Montet, D. (1988).— "Biotechnology of lipids: some possible applications".— *Oléagineux* **43** (4) 181-190.
- Gurtler, H., Olsen, H.A.S., Sculein, M., Adler-Nissen, J.L., Jensen, G. W. y Riisgaard, S. (1981).— "Improvement in and relating to an enzyme for decomposition of a high molecular carbohydrate, the isolated high molecular carbohydrate, a method for selection of a microorganism producing such enzyme and a method for production of such enzyme".— UK Patent Application. GB-A-2115820 (Novo Industri A/S).
- Hang, Y. D., Wilkens, W.F., Hill, A.S., Steinkraus, K. H. y Kackler, L. R. (1970).— "Enzymatic modification of the extractability of nitrogenous constituents from pea beans".— *J. Agr. Food Chem.* **18** (6) 1083-1085.
- Hagenmaier, R. D. (1974).— "Aqueous Processing of full-fat sunflower seeds: yields of oil and protein".— *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51** (10) 470-471.
- Hagenmaier, R., Cater, C. M. y Mattil, K. F. (1973).— "Aqueous processing of fresh coconuts for recovery of oil and coconut skim milk".— *J. Food Sci.* **38**, 516-518.
- Hitze, W., Stute, R., Ulrich, Woelk, H. U., Guillaume, R. y Walon, P. (1972).— "Process for obtaining oil from oil-containing grain germs".— GB-A-1402769 (CPC International Inc).
- Hron, R. J. Sr., Koltun, S. P. y Graci, A. V. Jr. (1982).— "Biorenewable solvents for vegetable oil extraction".— *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59** (9) 674A-682A.
- Hsu, H. W., Vavak, D., Satterlee, L. D. y Miller G. A. (1977).— "A multienzyme technique for estimating protein digestibility".— *J. Food Sci.* **42**, 1269-1273.
- Hsu, H. W., Sutton, N. E., Banjo, M. O., Satterlee, L. D. y Kendrick, J. G. (1978).— "The C-PER and T-PER assays for protein quality".— *Food Technol.* **12**, 69-73.
- Hurrel, R. F. y Finot, P. A. (1985).— En "Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseed". Cap. 8.-Ed. J. W. Finley y D.T. Hopkins.-Pub. por Am. Assoc. of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota.
- James, N. A. y Ryley, J. (1986).— "The rapid determination of chemically reactive lysine in the presence of carbohydrates by modified trinitrobenzenesulphonic acid procedure".— *J. Sci. Food Agric.* **37**, 151-156.
- Kim, S. H. (1989).— "Aqueous extraction of oil from palm kernel".— *J. Food Sci.* **54**, 491-492.
- Laiho, S., Tulisao, U., Oksanen, H. y Nyström, R. (1990).— "A process for the production of a vegetable-oil product".— WO-A- 91/13956 (Öljynpuristamo OY).
- Lanzani, A., Petrini, M. C., Cozzoli, O., Gallavresi, P., Carola, C. y Jacini G. (1975).— "On the use of enzymes for vegetable-oil extraction. A preliminary report".— *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **52**, 226-29.
- Lanzani, A., Camuratti, F., Cardillo, M., Cortesi, N., Mariani, C., Fedeli, E., Ponzetti, A. y Pieralisi, G. (1983).— "Tecnologia di estrazione di farine a partire da semi di girasole. Nota II".— *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **60**, 353-363.
- Lanzani, A., Bondioli, P., Meago, L., Fedeli, E., Ponzetti, A. y Pieralisi, G. (1987).— "Tecnologia di produzione del latte di soia. Nota I".— *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **64**, 43-48.
- Lanzani, A., Bondioli, P., Manganiello, B., Cardillo, M. y Fedeli, E. (1988).— "Tecnologia di produzione del latte di soia. Nota II".— *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **65**, 267-270.
- Lawhon, J. T., Rhee, K. C. y Lusas, E. W. (1981).— "Soy protein ingredients prepared by new processes-Aqueous processing and industrial membrane isolation".— *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 377-384.
- Marek, E., Schalinatus, E., Weigelt, E., Mieth, G., Kerns, G. y Kude, J. (1990).— "On the application of enzymes in the production of vegetable oil".— *Prog. Biotechnol.* **6**, 471-474.
- Mossé J. (1990).— "Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content".— *J. Agric. Food Chem.* **38**, 18-24.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. K. Helrich Ed. 15th ed. (1990).— Pub. by the A.O.A.C. Inc. Arlington. Virginia 22201. USA.
- Olsen, H. S. (1988).— "Aqueous enzymatic extraction of oil from seeds".— Paper presented at the Asean Food Conference. Thailand. Novo: A-06041 a.
- Otter, D. E., Munro, P. A., Scott, G. K. Geddes, R. (1989).— "Desorption of *Trichoderma reesei* cellulase from cellulose by a range of desorbents".— *Biotechnol. and Bioeng.* **34**, 291-298.
- Rhee, K. C., Cater, C. M. y Mattil, K. F. (1972).— "Simultaneous recovery of protein and oil from raw peanuts in an aqueous system".— *J. Food Sci.* **37**, 90-93.
- Staron, T. et Guillaumin, R. (1979).— "Une méthode d'extraction des protéines et de l'huile de colza, par l'eau".— *Rev. Fr. Corps Gras* **26**, 441-446.
- Struthers, B. J. (1981).— "Lysinoalanine: Production, significance and control in preparation and use of soya and other food proteins".— *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 501-502.
- Taha, F. S., Mohamed S. S. and El-Nockrashy, A. S. (1986).— "Light coloured protein isolates for nutritious beverages".— *Grasas y Aceites* **37**, 8-13.
- Tzeng, Y.-M., Diosady, L. L. and Rubin, L. J. (1990).— "Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing".— *J. Food Sci.* **55**, 1147-1151.

Recibido: Junio 1994

Aceptado: Marzo 1995