

INVESTIGACIÓN

Modelado de la extracción con hexano de molido de soja pretratado enzimáticamente

Por F. Grasso^{(1)*}, B. Maroto⁽¹⁾, C. Camusso⁽¹⁾ y N. Zaritzky⁽²⁾

^{(1)*} Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Av Valparaíso s/n - cc509 - 5000 Córdoba, Argentina
e-mail: fgrasso@agro.uncor.edu

⁽²⁾ Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

RESUMEN

Modelado de la extracción con hexano de molido de soja pretratado enzimáticamente

En este trabajo se estudia la influencia de las variables de proceso que pueden tener efecto sobre el rendimiento de la extracción con hexano a partir de soja molida pretratada enzimáticamente.

Se propone a partir de los resultados experimentales, un modelo matemático para el cálculo del rendimiento de la extracción. Los tests estadísticos utilizados para obtener este modelo demostraron que el rendimiento en aceite no depende del pH de la incubación enzimática mientras que si depende tanto de la temperatura como del tiempo de ataque enzimático sobre el molido de soja. El modelo ajustó satisfactoriamente los datos experimentales.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de soja – Degradación – Enzimas – Extracción con hexano – Modelo matemático.

SUMMARY

Modelling the hexane extraction of soybean enzymatically pretreated grits

In this work, the influence of the variables which can affect oil extraction from soybean enzymatically pretreated grit using hexane, were studied. From the experimental results, a mathematical model for calculating the extraction yield was proposed. The statistical tests used to obtain this model showed that the yield does not depend on the enzymatic incubation pH but on the temperature and time of enzymatic treatment and on the interaction between time and temperature. The proposed model fit the experimental data well.

KEY-WORDS: Soybean oil – Degradation – Enzymes – Hexane extraction – Mathematical model.

1. INTRODUCCIÓN

La extracción con solvente de aceites vegetales a partir de semillas oleaginosas involucra la solubilización de aceite libre desde células rotas y la extracción por difusión de aceite desde las estructuras celulares intactas de las semillas (Fan y Morris,

1948; Abraham et al, 1988). Para lograr la extracción de aceite, que se encuentra en vacuolas intracelulares, se deben, entonces, romper las paredes y membranas celulares (Dominguez y col., 1993). Los tratamientos mecánico y térmico causan ruptura de las estructuras celulares, pero en ocasiones no es suficiente y parte del aceite permanece sin extraer. El aceite se encuentra en las células vegetales, ligado a proteínas y carbohidratos, y es preciso destruir las paredes celulares para extraer el aceite y la proteína (Olsen, 1988); 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 celulolíticas y hemicelulolíticas, favorecen la extracción del aceite y proteína durante la producción de leche de soja. El aumento en la extractabilidad de la fracción proteica, causado por la hidrólisis de los carbohidratos y ruptura de enlaces que los unen a proteínas, mejora la velocidad de filtración de la suspensión acuosa.

La investigación de procesos alternativos de extracción de aceite de semillas se ha centrado últimamente en el empleo de este tipo de enzimas como auxiliares tecnológicos en la extracción de aceites vegetales que podría representar una nueva perspectiva de desarrollo para las industrias del sector debido a las condiciones suaves durante el procesado, lo cual mantiene la calidad del aceite y las proteínas (Smith y col., 1993; Dominguez y col., 1996 y Shankar y col., 1997).

La hidrólisis enzimática en el pretratamiento de semillas de soja tiene como objetivo lisar las paredes celulares mediante biodegradación.

En el presente trabajo, se propone llevar a cabo un estudio de las variables que pueden tener efecto sobre el rendimiento en aceite extraído con hexano a partir de soja molida pretratada con enzimas.

El análisis estadístico de los resultados experimentales permitirá contruir un modelo matemático

a fin de estimar el rendimiento esperado cuando son conocidos los parámetros operativos del pretratamiento.

2. PARTE EXPERIMENTAL

La soja empleada en los ensayos se caracterizó en trabajos anteriores (Grasso et al, 2002): Aceite = 16%, proteínas = 33,4%, fibra = 5,7%, hidratos de carbono = 35,5%, cenizas = 5,5%; expresados en base seca. El contenido de humedad inicial de las mismas fue de 8,1%. Las enzimas empleadas en los ensayos fueron provistas por GENENCOR International.

La metodología estadística empleada consiste en la planificación de los ensayos en bloques de efectos fijos unifactoriales para evaluar la influencia de las variables tiempo, temperatura y pH de incubación enzimática sobre el rendimiento de aceite para extracción con solvente. Cada variable se evalúa en tres niveles equidistantes con una repetición por ensayo para determinar los efectos fijos unifactoriales y los efectos de interacción entre variables significativas. Los efectos significativos se determinan mediante análisis de varianza y para cada uno de ellos se ajusta un modelo por regresión lineal y cuadrática. Por último, se ensaya un bloque para efectos multifactoriales e interacciones entre las variables identificadas como significativas con dos repeticiones. Con los resultados obtenidos, se ajusta un modelo por regresión múltiple que represente los rendimientos en aceites obtenidos dentro del intervalo estudiado (Montgomery, 1991).

Cada experimento consistió en inactivación de lipasas a 90 °C, incubación multienzimática con hemicelulasa (GC440), celulasa (Multifect GC), proteasa (Multifect Neutral), amilasa (Spezyme Fred), glucoamilasa (Optidex L-400) y pectinasa (Multifect XL) cada una a 0,5 % p/p calculado sobre el sustrato. Para cada ensayo se utilizó una muestra de molido de soja de 10 g y se ajustó la relación sólido/líquido (S/L) a 1:7 con solución tampón al pH determinado para cada ensayo (Grasso y col., 2002 y 2003). La temperatura se mantuvo constante durante el período de incubación establecido y se agitó la mezcla a velocidad constante (Va) de 200 rpm. Posteriormente, se separaron las fracciones por centrifugación. La fase sólida se secó en estufa a 60 °C hasta peso constante para evitar el deterioro del aceite a obtener y lograr la pérdida del agua incorporada durante la incubación enzimática. Sobre esta fracción sólida hidrolizada y secada se extrajo el aceite en un equipo Soxhlet durante 6 hs con hexano grado analítico. El rendimiento en aceite fue calculado por pesada de la miscela evaporada al vacío. El esquema de un ensayo se presenta en la Figura 1.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y MODELO MATEMATICO

El modelo matemático propuesto es una relación empírica derivada a partir de resultados expe-

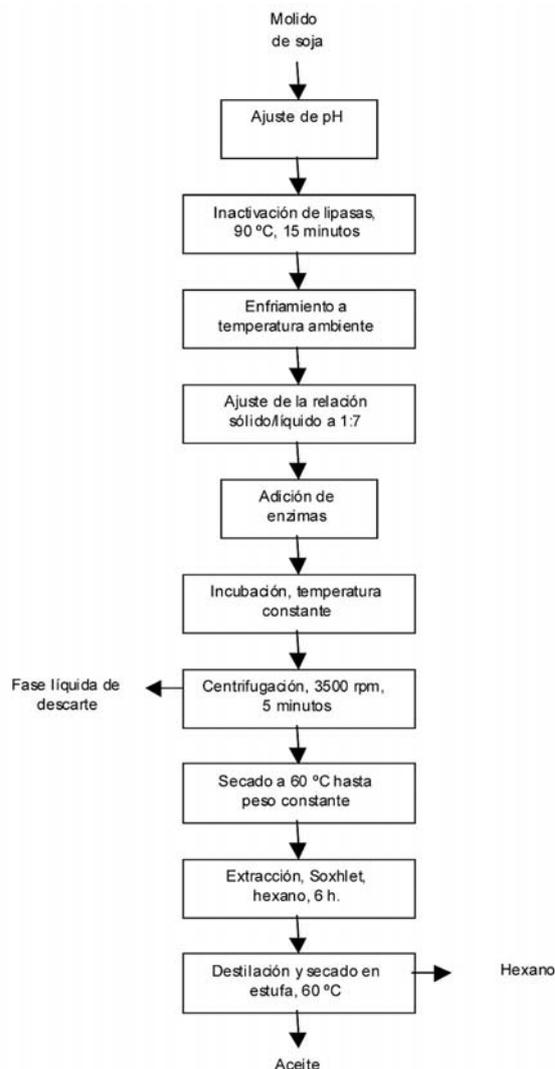


Figura 1 Diagrama de flujo de un ensayo de pretratamiento enzimático-extracción con hexano.

rimientales (Kadi y Fellag, 2001). El procedimiento usado es el siguiente (Montgomery, 1991):

- El análisis de varianza (ANOVA) de los resultados usando tests de independencia permite elegir los parámetros que tienen efecto significativo sobre el rendimiento.
- El ANOVA informa sobre las interacciones entre parámetros que tiene influencia sobre el rendimiento en aceite.
- El modelo se ajusta usando regresión múltiple en la cual se toman en cuenta todos los efectos en forma simultánea.

3.1. Influencia de los parámetros en el rendimiento

Se propone testear, utilizando ANOVA, la independencia entre el rendimiento y cada parámetro considerado en este estudio. Para cada uno de

ellos se presenta la tabla correspondiente a los resultados del ANOVA.

3.1.1. *Temperatura de incubación enzimática*

En la Tabla 1 se muestran los valores experimentales del rendimiento en aceite obtenido a 30, 50 y 70 °C para tiempos de pretratamiento enzimático de 4, 8 y 12 h.

El ANOVA de estos resultados se presentan en la Tabla 2. El valor Fisher calculado $F_o = 18,26$ es mayor que el valor Fisher tabulado $F_{0,05;2;4} = 6,94$. Este hecho concuerda con lo que se puede observar de los resultados experimentales de la Tabla 1: el rendimiento en aceite depende de la temperatura a la que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática.

Se ajustó la relación rendimiento en aceite-temperatura de incubación enzimática por regresión lineal, por el método de mínimos cuadrados, a partir de los resultados de la Tabla 1, obteniéndose una función lineal entre ambas variables. Por ejemplo, la regresión entre el rendimiento en aceite (Y) y la temperatura para tratamientos de 8 h de duración ajusta el siguiente modelo lineal, con un coeficiente de correlación del 95%:

$$Y = 21,53 - 0,15 T$$

3.1.2. *pH de incubación enzimática*

En la Tabla 3 se muestran los valores experimentales del rendimiento en aceite obtenido a pH de incubación de 5; 5,8 y 6,6 para temperaturas de pretratamiento enzimático de 30, 50 y 70 °C.

Si se observa la Tabla 3 se encuentra que el pH del tratamiento enzimático no tiene influencia significativa sobre el rendimiento en aceite. Este resultado se confirma por el test de independencia, en el cual resulta $F_o = 4,71$ y $F_{0,05;2;4} = 6,94$ (Tabla 4).

Tabla 1
Rendimiento en aceite (%)

Temperatura [°C]	Tiempo (horas)		
	4	8	12
30	18,78	16,38	19,23
50	13,26	15,00	15,79
70	12,72	10,26	11,22

Condiciones fijas: S/L = 1/7; Va = 200 rpm; pH = 5

Tabla 2
ANOVA para rendimiento en aceite y la temperatura de incubación enzimática.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F
Tratamientos	67,9526	2	33,9763	18,2566
Bloques	3,6760	2	1,8380	
Error	7,4441	4	1,8610	
Total	79,0729	8		

($F_{0,05;2;4} = 6,94$)

Tabla 3
Rendimiento en aceite (%)

PH	Temperatura [°C]		
	30	50	70
5	18,78	13,26	12,72
5,8	13,08	12,57	9,75
6,6	16,63	20,19	15,70

Condiciones fijas: S/L = 1/7; Va = 200 rpm; t = 4 horas

Tabla 4
ANOVA para rendimiento en aceite y el pH de incubación enzimática.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F
Tratamientos	48,9912	2	24,49563	4,7099
Bloques	19,3584	2	9,67921	
Error	20,8034	4	5,20086	
Total	89,1531	8		

($F_{0,05;2;4} = 6,94$)

3.1.3. *Tiempo de incubación enzimática*

En la Tabla 5 se muestran los valores experimentales del rendimiento en aceite obtenido a tiempos de incubación de 4, 8 y 12 h para pH de pretratamiento enzimático de 5; 5,8 y 6,6.

Se observa a partir de los valores experimentales de la Tabla 5 que la variable tiempo de incubación enzimática afecta el rendimiento en forma significativa. Esta observación se confirma por comparación entre $F_o = 7,78$ y $F_{0,05;2;4} = 6,94$ (Tabla 6).

Los resultados obtenidos en la Tabla 5 se ajustaron por regresión cuadrática, usando el método

Tabla 5
Rendimiento en aceite (%)

Tiempo [h]	pH		
	5	5,8	6,6
4	18,78	13,08	16,63
8	16,38	12,49	14,1
12	19,23	19,55	19,25

Condiciones fijas: S/L = 1/7; Va = 200 rpm; T = 30 °C.

Tabla 6
ANOVA para rendimiento en aceite y el tiempo de incubación enzimática.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F _o
Tratamientos	38,6984	2	19,3492	7,7837
Bloques	114,3334	2	7,1667	
Error	9,9434	4	2,4858	
Total	62,9752	8		

($F_{0,05;2;4} = 6,94$)

de mínimos cuadrados. Los mismos ajustaron a una función cuadrática. Por ejemplo, la regresión cuadrática entre el rendimiento en aceite y el tiempo para tratamientos a 30 °C ajusta a la siguiente ecuación con un coeficiente de correlación de 0,87:

$$Y = 26,43 - 2,57.t + 0,16.t^2$$

3.2. Interacciones entre los parámetros significativos

Se ha encontrado que el rendimiento en aceite extraído depende de las variables tiempo y temperatura de incubación enzimática. En esta sección, se testean los efectos de interacción entre las variables con efecto significativo sobre el rendimiento para obtener el modelo ajustado completo.

En la Tabla 7 se presentan los resultados experimentales del porcentaje de aceite en función del tiempo y de la temperatura de incubación enzimática. En la Tabla 8 se muestran los resultados del ANOVA para la interacción entre las variables que mostraron efecto significativo en el análisis de la sección anterior. Como puede observarse, tanto la temperatura como el tiempo de incubación enzimática son variables significativas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{Fisher}}$) como también es significativa la interacción entre ambas variables.

3.3. Modelo Matemático

Para obtener el modelo matemático ajustado para describir el rendimiento en aceite, se utiliza la

Tabla 7
Rendimiento de extracción (%) para efectos combinados de temperatura y tiempo de incubación enzimática.

Temperatura [°C]	Tiempo [h]		
	4	8	12
30	18,78	16,38	19,23
	19,23	15,94	19,33
50	13,26	15	15,79
	12,95	15,17	15,78
70	12,72	10,26	11,22
	12,89	10,2	11,18

Tabla 8
ANOVA para la interacción de variables significativas tiempo y temperatura.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	F
Temperatura	136,2072	2	68,1036	2168,521
Tiempo	8,13337	2	4,0666	129,4895
Interacción	18,2962	4	4,5740	145,6448
Error	0,2826	9	0,0314	
Total	162,9194	17		

Para cada efecto individual $F_{0,05;2;9} = 4,26$; para la interacción $F_{0,05;4;9} = 3,63$

técnica de regresión múltiple asumiendo las siguientes condiciones:

Cuando el tratamiento enzimático se realiza a pH constante durante un tiempo determinado, el rendimiento en aceite es una función lineal de la temperatura de pretratamiento.

Cuando el pH y la temperatura de tratamiento enzimático se fijan constantes, el rendimiento en aceite es función cuadrática del tiempo de incubación enzimática.

El rendimiento en aceite depende de la interacción entre el tiempo y la temperatura del pretratamiento enzimático.

El análisis de regresión permite ajustar el siguiente modelo:

$$Y = 13,74 - 0,168 T + 0,086 t^2 - 0,006 t.T + \text{error}$$

con un coeficiente de correlación de 0,9652 que indica un buen ajuste de los valores experimentales.

El análisis de residuos muestra que están distribuidos acorde a una distribución normal de probabilidades, determinado con un nivel de confianza del 95 %. Tanto la correlación como el análisis de residuos confirman la validez del modelo.

4. CONCLUSIONES

La investigación permitió afirmar que, en el intervalo estudiado para cada variable, el rendimiento de extracción con hexano de molido de soja pretratado enzimáticamente no depende del pH al que se realiza el pretratamiento.

Sin embargo, depende de la temperatura y el tiempo de tratamiento degradativo. La interacción entre ambas variables también ejerce efecto significativo sobre la cantidad de aceite obtenido.

El modelo:

$$Y = 13,74 - 0,168 T + 0,086 t^2 - 0,006 t.T + \text{error}$$

supera la prueba de ajuste al 95 % de confianza y el error relativo entre los valores teórico esperados y los resultados experimentales no supera el 5%.

Se puede explicar la dependencia con respecto a la temperatura debido a que la actividad catalítica de cualquier enzima es una función directa de esta variable, existiendo una temperatura de máxima actividad. El grado de ataque enzimático afecta la cantidad liberada de aceite ya que posibilita el acceso del solvente a través del sólido y contribuye a aumentar la cantidad de aceite extraíble por liberación de aceite químicamente enlazado a moléculas complejas.

La independencia del rendimiento en aceite respecto de la variable pH puede deberse al estrecho rango de pH estudiado y a las numerosas actividades enzimáticas presentes. Esto contribuye a observar un efecto no significativo de esta variable, ya que la combinación de enzimas exhibe un comportamiento no aditivo de cada actividad enzimática, las cuales presentan un pH óptimo individual.

Finalmente, la ecuación que representa este proceso no presenta un máximo de rendimiento en aceite en el intervalo estudiado. Si se observa la tendencia de esta función cuadrática, se deduce que existe un máximo a tiempos de incubación enzimática mayores a 12 horas y a temperaturas de hidrólisis menores a los 30 °C. Esto sugiere que debería realizarse un ajuste de los intervalos de ensayo de cada variable variables a fin de optimizar el proceso de pretratamiento enzimático.

NOMENCLATURA

T: temperatura en °C.

t: tiempo en horas.

Y: rendimiento en aceite, % en base seca.

S/L: relación sólido-líquido.

Va: velocidad de agitación.

Fo: valor de Fisher calculado a partir de las medias de cuadrados.

F_α, grados de libertad : valor de Fisher tabulado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham G, Hron Sr R. y Koltun S. 1988 Modelling the solvent extraction of oilseeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 129 -135.
- Domínguez H, Nuñez M y Lema J. 1993. Oil extractability from enzymatically treated soybean and sunflower: range of operational variables. *Food Chem.* **46**, 277-284.
- Dominguez H, Sineiro J, Núñez M y Lema J. 1996. Enzymatic treatment of sunflower kernels oil extraction. *Food Chem.* **28**, 537-545.
- Fan H y Morris J. 1948. Diffusion phenomena in solvent extraction of peanut oil. *Industrial and Engineering Chemistry* **40**, 195-199.
- Grasso F, Maroto B y Camusso C. 2002. Influencia de las variables de proceso en un pretratamiento enzimático para extracción de aceite de soja. *XIX Congreso Argentino de Química*. Versión en CD. Santa Fé, Argentina, Agosto de 2002.
- Grasso F, Maroto B y Camusso C. 2003. Pretratamiento enzimático para mejorar la extracción de aceite por solvente a partir de laminado de soja. *XIX Jornadas IRAM-Universidades y IV Foro Unilab*. Versión en CD, San Luis, Argentina, Octubre de 2003.
- Kadi H y Fellag H. 2001. Modeling of oil extraction from olive foot cake using hexano. *Grasas y Aceites* **52**, 369-372.
- Montgomery, D. 1991. *Design and analysis of experiment*, Wiley Inc, New York, USA.
- Olsen H. 1988. Aqueous enzymatic extraction of oil from seeds. *Asian Food Conference '88*, Thailand, Novo: A-0641a.
- Shankar D, Agrawal Y, Sarkar B y Singh B. 1997. Enzymatic hydrolysis in conjunction with conventional pretreatment to soybean for enhanced oil availability and recovery. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 1543-1547.
- Smith D, Agrawal Y, Sarkar B y Singh B. 1993. Enzymatic hydrolysis pretreatment for mechanical expelling of soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 885-890.

Recibido: 11/11/05
Aceptado: 14/11/06