



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

DESGOMADO ENZIMÁTICO DE ACEITES

DANIELA LORENA LAMAS

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2014

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química durante el período comprendido entre Septiembre de 2009 y Diciembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. Liliana Ceci y la Dra. Diana Constenla.

[Firma del Alumno]



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación  
Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de .....(.....)

## RESUMEN

Desde sus primeros avances, la biotecnología moderna ha revolucionado los procesos productivos de sectores variados. Esta tecnología, ha hecho realidad muchas de las expectativas creadas en su entorno, para la mejora de la calidad de vida. Entre los sectores donde la biotecnología ha tenido un particular desarrollo, se destaca, el sector alimentación, con una importante aplicación de la tecnología enzimática a la industria aceitera.

El aceite, se presenta como el principal producto de la molienda de la semilla de girasol, y en el mercado mundial, el aceite de girasol se posiciona como el cuarto en orden de importancia.

La producción mundial de girasol, tiene cuatro principales protagonistas: la Federación Rusa, Ucrania, y la Unión Europea. Los tres son grandes competidores en el Hemisferio Norte. El único país relevante en el Hemisferio Sur es la Argentina, y se ha destacado históricamente como primer exportador mundial de aceite de girasol.

Los mercados internacionales de aceite comestible, se caracterizan por la alta competitividad y las crecientes exigencias de calidad, lo que conlleva a la mejora de métodos para la caracterización y control de calidad de las materias primas, productos y subproductos. Además, constituye un desafío la implementación y desarrollo de tecnologías o métodos alternativos que beneficien las condiciones de procesamiento y almacenamiento del producto final.

La calidad y estabilidad del aceite de girasol, resulta fundamental para su aceptación y comercialización, estas propiedades se ven influenciadas por la presencia de algunos componentes minoritarios como tocoferoles, ácidos grasos libres, fosfolípidos, ceras y metales que tienen propiedades antioxidantes y pro-oxidantes.

Los fosfolípidos, las ceras y los iones metálicos, son compuestos que deben ser eliminados durante el proceso de refinado del aceite. Históricamente, estos componentes se eliminaban mediante procesos físicos o químicos, y en las últimas décadas, se han investigado y desarrollado metodologías

alternativas que además de ser eficientes y seguras no sean perjudiciales para el medio ambiente.

En este sentido, una de las estrategias más competentes es la utilización de enzimas que son catalizadores biológicos altamente específicos, biodegradables y fácilmente inactivadas.

Este conjunto único de características de las que gozan las enzimas para su uso como catalizadores ha sido explotado a nivel industrial, habiéndose introducido hace más de una década, en el refinado de aceites comestibles.

En los últimos años, se han propuesto algunos procesos de desgomado enzimático, a escala laboratorio y de plantas piloto. Esta técnica mejora la calidad del producto y permite aumentar el rendimiento de aceite, disminuyendo su contenido de fosfolípidos.

El objetivo general de este trabajo de tesis está orientado a estudiar procesos de desgomado enzimático que puedan ser incluidos en forma eficiente en el procesamiento de aceites vegetales a escala industrial.

El objetivo específico es la optimización del proceso de desgomado enzimático en aceites de girasol crudos, tendiente a lograr un proceso integral de refinado que sea eficiente.

En el *Capítulo I*, se presenta una introducción sobre la situación actual del complejo oleaginoso en Argentina y la importancia de la biotecnología en el procesamiento de aceites vegetales. Se describe el estado del arte del desgomado enzimático, dando una revisión de los antecedentes en investigación y se exponen el marco teórico y los fundamentos del objeto de estudio.

En el *Capítulo II*, se explica la metodología utilizada en el trabajo de tesis, se describen los procesos de desgomado aplicados, y se especifican las muestras de aceite de girasol y las enzimas utilizadas. Se describe también la metodología aplicada para el análisis de los aceites y las gomas que se obtienen en los procesos de desgomado.

En el *Capítulo III*, se evalúa la eficiencia y el rendimiento del proceso de desgomado enzimático, y se presentan los resultados obtenidos en los estudios realizados usando reactores de diferente capacidad.

En el *Capítulo IV*, se investigan las condiciones de reacción y se optimizan los procesos de desgomado enzimático.

En el *Capítulo V*, se analiza el efecto de desgomado sobre el contenido de fosfolípidos del aceite tratado.

En el *Capítulo VI*, se analiza el efecto de desgomado sobre el contenido de ceras del aceite tratado.

En el *Capítulo VII*, se analizan los cambios en la calidad y composición físicoquímica del aceite de girasol durante el proceso de desgomado enzimático y se realiza un estudio de su estabilidad oxidativa.

Finalmente, en el *Capítulo VIII* se resumen las conclusiones generales y se exponen los trabajos futuros propuestos que pueden realizarse a partir de metodologías desarrolladas en esta tesis y los conocimientos adquiridos.

**Palabras clave:** aceite de girasol, desgomado enzimático, fosfolípidos, ceras, calidad, estabilidad.

## ABSTRACT

Since its developments, modern biotechnology has revolutionized the production processes of various sectors. This technology has achieved the expectations created, for the improvement in life quality. Among the sectors where biotechnology has had an important development, stands, the food sector, with an important application of enzymatic technology in oil industry.

Oil is the main product of grinding of sunflower seed, and in the world market, sunflower oil is positioned as the fourth in order of importance.

The world production of sunflower has four main protagonists: the Russian Federation, Ukraine, and the European Union. All three are major competitors in the Northern Hemisphere. The only relevant country in the Southern Hemisphere is Argentina, and is known historically as the world's leading exporter of sunflower oil. The international edible oil markets are characterized by high competitiveness and increasing demands for quality, which leads to the improvement of methods for the characterization and quality control of raw materials, products and by-products. In addition, is a challenge, the implementation and development of alternative methods or technologies that will benefit the final product storage and processing conditions.

The quality and stability of sunflower oil, is critical for its acceptance and commercialization. These properties are influenced by the presence of some minor components such as tocopherols, free fatty acids, phospholipids, waxes and metals that have antioxidant and pro-oxidant properties.

Phospholipids, waxes and metal ions, are compounds that must to be eliminated during the process of oil refining. Historically, these components were removed by physical or chemical processes, but in recent decades, alternative methodologies have been researched and developed that besides to being efficient and safe are not harmful to the environment.

In this sense, one of the most competent strategies is the use of enzymes, which are biological catalysts, highly specific, biodegradable and easily inactivated. This unique set of features of the enzymes for use as

catalysts has been exploited at industrial level, being introduced for more than one decade ago, in the refining of edible oils.

In recent years, there are proposed some enzymatic degumming process, a laboratory scale and pilot plant. This technique improves the quality of the product and can increase the oil yield, reducing its content of phospholipids.

The overall objective of this thesis is aimed to study enzymatic degumming processes that can be included efficiently in processing vegetable oils on an industrial scale.

The specific objective is the optimization of enzymatic degumming process of crude sunflower oil, aimed at achieving an integrated refining process that would be efficient.

*Chapter I* is an introduction on the current situation of the oil complex in Argentina and the importance of biotechnology in processing vegetable oils. The state of the art of enzymatic degumming is described, giving a review of the background research and the theoretical framework and the fundamentals of the study object.

In *Chapter II*, the methodology used in the thesis is explained, degumming processes applied are described, and samples of sunflower oil and enzymes used are specified. The methodology used for the analysis of oils and gums obtained in degumming processes is also described.

In *Chapter III*, the efficiency and performance of the enzymatic degumming process is evaluated, and the results obtained in studies using different capacity reactors, are presented.

In *Chapter IV*, the reaction conditions are investigated and enzymatic degumming processes are optimized.

In *Chapter V*, the effect of degumming on the phospholipid content of the treated oil is analyzed.

In *Chapter VI*, the degumming effect on wax content of the treated oil is analyzed.

In *Chapter VII*, the changes in the quality and physicochemical composition of sunflower oil during enzymatic degumming is analyzed and oxidative stability study is performed.

Finally, in *Chapter VIII* summarizes the general conclusions and proposed future work that can be performed from methodologies developed in this thesis and foreground.

Keywords: sunflower oil, enzymatic degumming, phospholipids, waxes, quality and stability.

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido y han hecho posible el desarrollo y concreción del presente trabajo.

El primer agradecimiento es a mi director de beca, y a mis directoras de tesis por brindarme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis bajo su dirección. A mi directora la *Dra. Liliana Ceci*, una mención especial y afectuosa por sus explicaciones, su acompañamiento, su colaboración general durante toda la tesis, y principalmente durante la corrección de la misma.

A mis directores de estancia doctoral, la *Dra. Encarnación Jurado Alameda*, y los *Dres. Miguel García Román* y *Germán Luzón* reconocidos profesionales de la Universidad de Granada, por ofrecerme todos sus conocimientos y experiencia. A mis compañeros de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, por un año compartido de anécdotas y vivencias intensas que quedarán eternamente en mis recuerdos.

Al *Dr. Albert J. Dijkstra*, por quien siento una profunda admiración, por proporcionarme ayuda e información en cada oportunidad requerida, porque su sabiduría y humildad lo han llevado a posicionarse a mi par, lo que inmediatamente lo ha elevado a estratos superiores.

Al *Ing. Ken Carlson de Danisco*, por aportar su ayuda espontáneamente.

A la *Dra. María Teresa García Cubero*, de la Universidad de Valladolid por su predisposición al trabajo y sus augurios de éxito.

A la *Planta Piloto de Ingeniería Química, el Departamento de Ingeniería Química* (PLAPIQUI-UNS-CONICET) y el *Departamento de Ingeniería Química* de la *Facultad de Ciencias* de la *Universidad de Granada* (UGR), por haberme permitido realizar parte del trabajo en sus instituciones. A la *Universidad*

*Nacional del Sur*, por haberme brindado una formación de excelencia desde la escuela secundaria.

A las instituciones y entidades que mediante diversos tipos de financiamiento posibilitaron la realización del presente trabajo. Al *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*, *Universidad Nacional del Sur (UNS)*, *Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)*, la *Junta de Andalucía* y el programa *Erasmus Mundus*.

Al consorcio *EADIC II del programa Erasmus Mundus*, por haberme brindado la oportunidad de vivir una experiencia en el exterior única, un pilar fundamental en mi crecimiento personal y profesional durante mi etapa doctoral. A *Livia Mercatelli* de la Universidad de Bologna, por su interés constante en mi enriquecimiento cognitivo y personal. Al consorcio SUD-UE y la Universidad de Burgos por la predisposición a concretar trabajos futuros en tiempo y forma, respetando la concreción de mi etapa doctoral. Una mención especial a todo el equipo de trabajo de Relaciones Internacionales de la Universidad de Burgos por su compromiso y eficiencia, especialmente a *Cristina Zaldívar* y *Asunción Albuín*. A la *Dra. Sagrario Beltrán* de la Universidad de Burgos, por su confianza y espera. A *Eider Inunciaga Serna* de la Universidad de Deusto de Bilbao, mi tutora posdoctoral, un afectuoso agradecimiento.

Al laboratorio *Lanaqui*, a *OMHSA*, *Novozymes* y *Danisco* por colaborar con el trabajo y proveer parte del material de estudio.

Al *personal de la Biblioteca de PLAPIQUI* y del *Departamento de Agronomía y Economía*, por su predisposición y eficiencia en el apoyo

bibliográfico. Gracias por su ayuda a la *Dra. María Alicia Volpe*, la *Dra. Soledad Díaz*, la *Dra. Adriana Brandolín*, la *Dra. Lidia Quinzani*, y a *Nora Pascual*.

A la *Dra Sonia Vigna* y el *Ing. Marcelo Köenig* de OMHSA por la información proporcionada. Al *Ing Lucio Mareto* de Cargill, por sus opiniones personales, y al *Ing. Mauricio Odone* de Bunge, Puerto General San Martín por sus comentarios.

A *Laura*, mi amiga y compañera de oficina, responsable de muchas de mis alegrías iniciales, aliada de momentos de sentimientos encontrados.

A *mis compañeros* de grupo, especialmente a *Camila*.

A *mis compañeros de docencia del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur* y de la *Universidad Nacional de Mar del Plata*, por estar presente en distintas fases de la presente.

A *Dani R.* por haberme permitido desarrollar una faceta diferente de mi vida personal y profesional.

A *Vanina* y *Juani*, por su colaboración.

A mi *mamá*, mi *papá*, mi *hermana*, a *Luna nuestro sol*, a *Juani*, y a *Ale*, por acompañarme en los momentos difíciles, muy difíciles.

A *Marcial*, por su ayuda incondicional pasada, presente y futura, por sus consejos y opiniones, por ser mi revisor oficial, mi guía y tutor, porque sin ese vínculo nada hubiese sido igual.

A *Mechi Berrueta*, mi compañera de oficina del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero por su compañía y aliento en momento realmente muy complicados.

A la Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ingeniería, al Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, INIDEP, por todos

los permisos para ausentarme de mi trabajo, especialmente al *Ing. Emilio Manca* y a la *Dra. Agueda Massa*. Gracias *Agueda* por permitirme trabajar con libertad, por dejarme ser yo en el mundo de la investigación, por ayudarme, acompañarme en lo profesional y personal, por alentarme, por aceptarme, por escucharme y entenderme, pero por sobre todas las cosas, gracias por valorarme.

Mi total y eterno agradecimiento, a la *Ing. María Isabel Yeannes*, por saber entender mis necesidades, por alentarme, por ayudarme, por pensar en lo mejor para mí y mi futuro, por ser mi guía, por ser un modelo a seguir. Gracias *Marisa* por considerarme, porque tus enseñanzas enriquecieron mi camino, por entender mi deseo de hacer, por valorar mi entusiasmo, por confiar en mí, por acompañar mi idea de construir y por compartir mi pasión por la investigación.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### CAPÍTULO I

<b>FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Descripción de la situación actual de la industria aceitera.....	2
1.2 Consideraciones generales.....	4
1.3 Marco teórico.....	5
1.3.1 El aceite de girasol.....	5
1.3.1.1 Los fosfolípidos.....	6
1.3.1.2 Las ceras.....	8
1.3.2 Las enzimas.....	8
1.4 Justificación y fundamento de la investigación.....	13
1.4.1 Procesamiento de aceites vegetales.....	13
1.4.2 El proceso de desgomado y el desgomado enzimático, estado del arte.....	15
1.5 Planteo y definición de la problemática.....	19

### CAPÍTULO II

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 Materiales.....	22
2.1.1 Aceite de girasol.....	22
2.1.2 Enzimas.....	22
2.1.2.1 Fosfolipasa A1.....	22
2.1.2.2 Fosfolipasa A2.....	23
2.1.2.3 Aciltransferasa.....	23
2.1.3 Equipos.....	24
2.1.3.1 Sistema de reactores batch en paralelo.....	24
2.1.3.2 Reactor batch de 1000mL.....	25
2.2 Métodos.....	25
2.2.1 El proceso de desgomado.....	25
2.1.1.1 Desgomado acuoso.....	25
2.1.1.2 Desgomado enzimático.....	26
2.1.1.2.1 Estudio de la eficiencia y rendimiento de las reacciones enzimáticas.....	31
2.1.1.2.2 Estudio de la recuperación de aceite desgomado y gomas crudas.....	34
2.2.2 Caracterización del aceite de girasol crudo y de los aceites desgomados.....	34
2.2.2.1 Determinación de la viscosidad.....	35
2.2.2.2 Determinación de la densidad.....	35
2.2.2.3 Determinación del color.....	35

2.2.2.4	Determinación del contenido de humedad y materia volátil.....	36
2.2.2.5	Determinación de impurezas insolubles.....	36
2.2.2.6	Determinación de la acidez libre.....	37
2.2.2.7	Determinación del valor de peróxidos.....	37
2.2.2.8	Determinación del valor de p-anisidina.....	38
2.2.2.9	Determinación del índice de TOTOX.....	38
2.2.2.10	Determinación del índice de estabilidad oxidativa (Rancimat)...	39
2.2.2.11	Determinación del contenido de fósforo.....	39
2.2.2.12	Determinación del contenido de fosfolípidos.....	40
2.2.2.13	Determinación del contenido de ceras por cromatografía.....	42
2.2.2.14	Determinación de los contenidos de calcio, magnesio, hierro y cobre por espectrometría de emisión de plasma.....	45
2.2.3	Determinación de características químicas de las gomas.....	46
2.2.3.1	Determinación de materia insoluble en hexano.....	46
2.2.3.2	Determinación de material insoluble en acetona.....	46
2.2.3.3	Determinación de humedad y materia volátil.....	46
2.2.3.4	Determinación de aceite ocluido.....	47
2.2.4	Análisis estadístico.....	47

### **CAPÍTULO III**

	<b>CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA. EFICIENCIA Y RENDIMIENTO DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS Y LOS PROCESOS DE DESGOMADO.....</b>	<b>49</b>
3.1	Caracterización de los aceites de girasol crudos de extracción.....	50
3.2	Estudio de la eficiencia y el rendimiento de las reacciones enzimáticas...	51
3.2.1	Desgomado usando el sistema de tres reactores batch (100 mL) en paralelo.....	51
3.2.2	Desgomado usando un reactor batch (1000mL).....	58
3.2.3	Discusión de los resultados obtenidos.....	63
3.3	Recuperación de aceite desgomado y gomas crudas.....	67
3.4	Estudio del aceite ocluido en las gomas.....	69
3.5	Conclusiones.....	72

### **CAPÍTULO IV**

	<b>OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE DESGOMADO ENZIMÁTICO.....</b>	<b>74</b>
4.1	Modelo de ajuste para el proceso de desgomado con la enzima PLA1 (Lecitase® Ultra).....	75
4.2	Modelo de ajuste para el proceso de desgomado con la enzima LAT (LysoMax® Oil).....	80
4.3	Optimización de los parámetros de los procesos de desgomado enzimático.....	85
4.3.1	Optimización de los ensayos de desgomado con PLA1.....	85
4.3.2	Optimización de los ensayos de desgomado con LAT.....	88
4.4	Conclusiones.....	92

### **CAPÍTULO V**

<b>LOS FOSFOLÍPIDOS DURANTE LOS PROCESOS DE DESGOMADO.....</b>	<b>94</b>
5.1 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de fosfolípidos totales de los aceites.....	95
5.2 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de fosfolípidos individuales de los aceites.....	98
5.3 Conclusiones.....	103
 <b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>EFFECTO DEL DESGOMADO SOBRE EL CONTENIDO DE CERAS DEL ACEITE.....</b>	<b>104</b>
6.1 Introducción.....	105
6.2 Contenidos de ceras del aceite de girasol crudo.....	105
6.3 Efectos de los procesos de desgomado acuoso y enzimáticos sobre los contenidos de ceras totales del aceite.....	108
6.4 Efectos de los procesos de desgomado acuoso y enzimáticos sobre los contenidos de ceras solubles, parcialmente solubles y cristalizables...	110
 <b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>CALIDAD Y ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DESGOMADO CON ENZIMAS.....</b>	<b>114</b>
7.1 Introducción.....	115
7.2 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre las propiedades físicas de los aceites.....	117
7.3 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de fósforo y fosfolípidos de los aceites.....	122
7.4 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los parámetros relacionados con el deterioro hidrolítico y la oxidación de los aceites.....	124
7.5 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de metales de los aceite.....	129
7.6 Conclusiones.....	133
 <b>CAPÍTULO VIII</b>	
<b>CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJOS PROPUESTOS A FUTURO..</b>	<b>136</b>
8.1 Conclusiones generales.....	137
8.2 Trabajos propuestos a futuro.....	142
<b>DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>144</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>147</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>150</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

2.1	Especificaciones de origen y características de la enzima fosfolipasa A1.....	22
2.2	Especificaciones de origen y características de la enzima fosfolipasa A2.....	23
2.3	Especificaciones de origen y características de la enzima aciltransferasa.....	24
2.4	Factores y niveles del diseño factorial fraccionario $2^{5-1}$ .....	28
2.5	Matriz de ensayos generada por el diseño experimental.....	29
2.6	Condiciones de los ensayos para el desgomado enzimático en reactor “batch” de 1000 g bajo condiciones optimizadas.....	30
2.7	Condiciones de trabajo empleadas en la determinación de fosfolípidos.....	41
2.8	Condiciones de trabajo empleadas en la determinación de ceras.....	45
3.1	Caracterización de los aceites de girasol crudos. Parámetros químicos.....	50
3.2	ANOVA para los contenidos de fósforo residual (mg/kg) durante los procesos de desgomado enzimático, sin enzima y acuoso.....	52
3.3	Rendimiento de las reacciones de desgomado enzimático, sin enzima y acuoso para reducir el contenido de fósforo.....	53
3.4	ANOVA para los contenidos de ácidos grasos libres (g equivalentes de ácido oleico/100 g) durante los procesos de desgomado enzimático, sin enzima y acuoso.....	55
3.5	Resultados de la prueba de Duncan de comparación de medias ( $\alpha = 0,05$ ) para los contenidos de ácidos grasos libres del aceite desgomado por los diferentes procesos.....	56
3.6	Rendimiento porcentual de las reacciones de desgomado enzimático con fosfolipasas (PLA1 y PLA2) medido en base al contenido de AGL del aceite..	57
3.7	ANOVA para los contenidos de fósforo residual (mg/kg) durante los procesos de desgomado enzimático, y acuoso.....	60
3.8	Rendimiento de las reacciones de desgomado enzimático y acuoso para reducir el contenido de fósforo.....	61
3.9	Resultados de la prueba de Duncan de comparación de medias ( $\alpha = 0,05$ ) para Los contenidos de ácidos grasos libres del aceite desgomado por los diferentes procesos.....	62
3.10	ANOVA para la recuperación de aceite desgomado (%) de los procesos de desgomados enzimático con PLA1 y LAT y acuoso.....	69
3.11	Composición de las gomas obtenidas en los procesos de desgomados enzimáticos y acuoso.....	70
4.1	Matriz experimental para la enzima PLA1 (Lecitase® Ultra) y contenidos de fósforo obtenidos como respuesta.....	75
4.2	ANOVA para el diseño factorial $2^{5-1}$ seleccionado para el desgomado con PLA1.....	77
4.3	Coeficientes de regresión estimados por el modelo para Lecitase® Ultra.....	79
4.4	Matriz experimental para la enzima LAT (LysoMax® Oil) y contenidos de fósforo obtenidos como respuesta.....	81
4.5	ANOVA para el diseño factorial $2^{5-1}$ seleccionado para el desgomado con LAT	82
4.6	Coeficientes de regresión estimados por el modelo para LAT.....	84
4.7	Optimización numérica del diseño experimental para el desgomado con PLA1 minimizando el contenido de fósforo.....	86
4.8	Optimización numérica del diseño experimental para el desgomado con LAT	

	minimizando el contenido de fósforo.....	89
5.1	ANOVA para los contenidos de PLS (mg/kg) del aceite durante los procesos de desgomado enzimático y acuoso.....	97
6.1	Contenido de ceras en el aceite crudo.....	107
6.2	ANOVA para los contenidos de ceras del aceite (mg/kg) durante los procesos de desgomado enzimáticos y acuoso.....	109
6.3	Contenidos de ceras solubles (C36-C39), parcialmente solubles (C40-C43) y cristalizables (C44-C48) del aceite desgomado con agua y enzimas en condiciones optimizadas durante 90 min.....	112
7.1	Propiedades físicas de los aceites crudo y desgomado con enzimas.....	118
7.2	Contenidos de fósforo, fosfolípidos e impurezas insolubles en hexano para los aceites crudo y desgomado con enzimas.....	122
7.3	Determinaciones analíticas relacionadas con el deterioro hidrolítico y la oxidación de los aceites crudo y desgomado con enzimas.....	124

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Perfil de producción de semillas y aceite de girasol por campaña (años 2008-2013) Fuente: elaboración propia en base a datos de Bolsa de Cereales (2014) y Dirección de Mercados Agrícolas (2014).....	3
1.2	Esquema simplificado del proceso de desgomado enzimático. Adaptado de Galhardo y Dayton, 2012.....	5
1.3	Estructura química de la molécula de fosfolípidos.....	7
1.4	Clasificación de las fosfolipasas según la escisión del enlace éster para el que son específicas.....	10
1.5	Reacción de aciltransferasa. Transferencia de un grupo acilo de la posición sn-2 de la fosfatidilcolina al colesterol. Fuente: Danisco Technical Memorandum LysoMax® Oil 1535-2s.....	12
1.6	Sustancias indeseables eliminadas en los distintos pasos de los procesos de refinado químico y físico de aceites vegetales.....	14
1.7	Esquema del proceso EnzyMax®. Adaptado de Dahlke (1997).....	18
2.1	Sistema de tres reactores “batch” en paralelo.....	25
2.2	Reactor Batch de 1000 mL usado en los ensayos de desgomado enzimático en condiciones optimizadas.....	25
3.1	Evolución de los contenidos de fósforo residual para los procesos de desgomado enzimático, sin enzima (con buffer) y acuoso.....	51
3.2	Evolución de los contenidos de AGL para los procesos de desgomado enzimático, sin enzima (con buffer) y acuoso.....	55
3.3	Evolución de los contenidos de fósforo residual para los procesos de desgomado enzimático y acuoso.....	59
3.4	Evolución de los contenidos de AGL para los procesos de desgomado enzimático y acuoso.....	62
3.5	Recuperación de aceite desgomado y gomas luego de la separación centrífuga para tiempos de proceso de 90 min.....	68
4.1	Gráfico de Box-Cox del diseño factorial $2^{5-1}$ para el desgomado con PLA1.....	76
4.2	Gráfico de Pareto del diseño factorial $2^{5-1}$ para el desgomado con PLA1.....	78
4.3	Gráfico de Box-Cox del diseño factorial $2^{5-1}$ para el desgomado con LAT.....	81
4.4	Gráfico de Pareto del diseño factorial $2^{5-1}$ para el desgomado con LAT.....	83
4.5	Medidas del cambio en el contenido de fósforo y su superficie de respuesta como una función de la temperatura y el pH del buffer para el aceite desgomado por Lecitase® Ultra (PLA1).....	86
4.6	Curvas de contorno para el aceite desgomado por Lecitase® Ultra (PLA1) como una función del tiempo y la dosis de enzima.....	87
4.7	Medidas del cambio en el contenido de fósforo y sus superficies de respuesta como una función de la temperatura y el pH del buffer para el aceite desgomado por LysoMax® Oil (LAT).....	90
4.8	Diagramas de contorno para el aceite desgomado por LysoMax® Oil como una función del tiempo y la dosis de enzima.....	91
5.1	Cromatograma HPLC-UV del aceite de girasol crudo de extracción.....	95
5.2	Evolución de los contenidos de PLS totales del aceite para los procesos de desgomado enzimático y acuoso.....	96

5.3	Distribución porcentual de los PLS individuales en el aceite crudo.....	99
5.4	Evolución de los contenidos de fosfolípidos individuales para los procesos de desgomado enzimático y acuoso.....	100
5.5	Composición relativa porcentual de los PLS mayoritarios de los aceites desgomados con agua y enzimas durante 90 min.....	102
6.1	Cromatograma de la fracción de ceras del aceite de girasol de extracción crudo (Lote 2).....	106
6.2	Evolución del contenido de ceras totales del aceite para los procesos de desgomado enzimáticos y acuoso.....	109
6.3	Perfiles de ceras solubles (C36-C39), parcialmente solubles (C40-C43) y cristalizables (C44-C48) de los aceites desgomados con agua y enzimas en condiciones optimizadas durante 90 min.....	111
7.1	Parámetros de color HunterLab <i>a</i> y <i>b</i> para aceite de girasol crudo y desgomado con enzimas.....	121
7.2	Contenidos de metales para aceite de girasol crudo y desgomado con enzimas en condiciones optimizadas.....	130
7.3	Disminución porcentual de los contenidos de PLS individuales, Ca y Mg en el aceite desgomado con enzimas respecto al aceite crudo.....	132

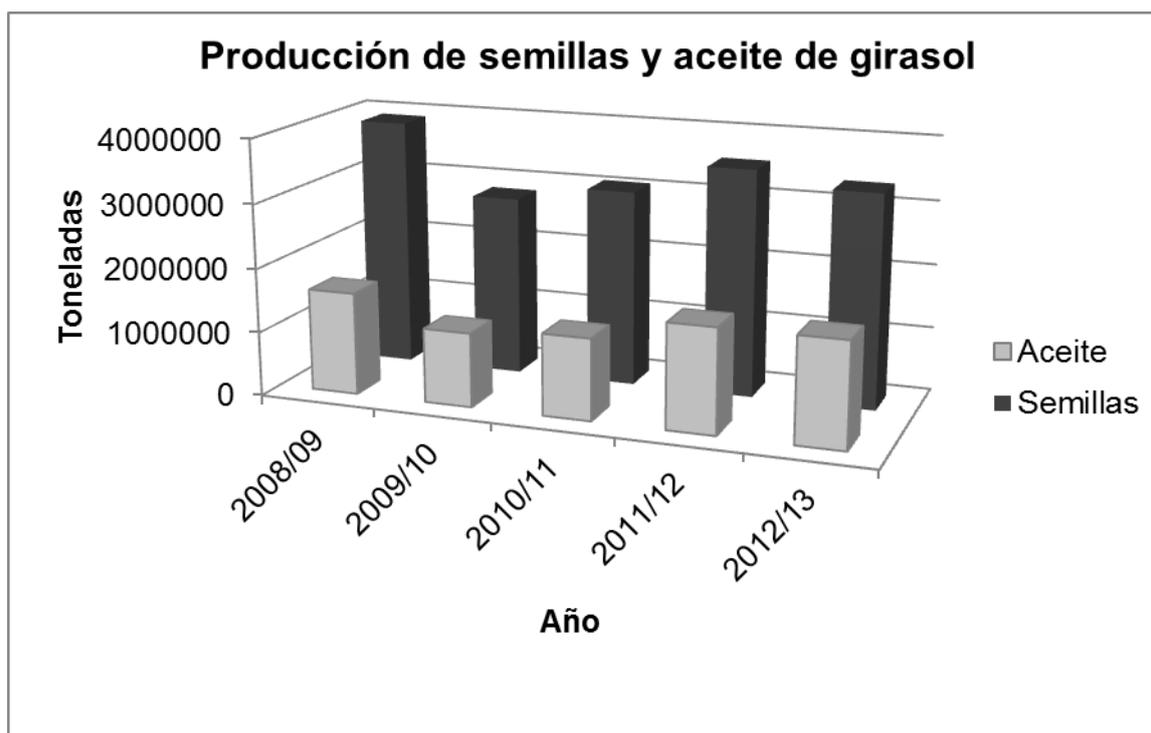
**CAPÍTULO I:**  
**FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN**

## 1.1 Descripción de la situación actual de la industria aceitera

En los últimos años, la producción e industrialización de oleaginosas en Argentina ha demostrado un crecimiento sostenido. Los aumentos de la superficie implantada y de la producción primaria reflejan la competitividad de los actores, en tanto que las continuas inversiones en la industria, dirigidas a modernizar plantas e incrementar la obtención de aceite y pellets, la han transformado en una de las más eficientes del mundo. El denominado “complejo oleaginoso” es hoy el principal bloque exportador y uno de los pilares de la economía nacional. La industria de aceites muestra una estrecha dependencia con relación a dos factores: por un lado, la demanda mundial de alimentos, sustentada en el aumento de la población, y por otro, especialmente en los últimos años, la expansión de la producción de biodiesel en nuestro país. La producción argentina de oleaginosas se destaca en el contexto mundial por el girasol y la soja, que continuamente mejoran su genética y protagonizan incrementos en la producción.

Los volúmenes de oleaginosas producidos, industrializados y exportados explican la importancia estratégica alcanzada por el complejo oleaginoso en la economía nacional. El mercado argentino correspondiente al girasol, logró un volumen de producción de 3,3 millones de toneladas durante el ciclo 2012/13 (Bolsa de Cereales, 2014).

La cosecha 2013/2014, sufrió un descenso a 2,3 millones de toneladas, como consecuencia de la caída interanual del área implantada (17% menos respecto a la siembra de la campaña 2012/13), como así también del rinde registrado (2,5% menor que rinde de la campaña 2012/13). La Figura 1.1 muestra la producción de semillas y aceite de girasol para las últimas 5 campañas evaluadas. A pesar de la mencionada reducción, se puede afirmar que en los últimos cinco años, la producción de semillas de girasol se ha mantenido estable con un promedio de 3 millones de toneladas.



**Figura 1.1-** Perfil de producción de semillas y aceite de girasol por campaña (años 2008-2013). Fuente: elaboración propia en base a datos de Bolsa de Cereales (2014) y Dirección de Mercados Agrícolas (2014).

Argentina, con un volumen estabilizado promedio de 1,5 millones de toneladas de aceite de girasol en las últimas cinco campañas agrícolas, se consolida como el tercer exportador mundial, detrás de Rusia y Ucrania. De ese total se estima que un 70 % se destina a la exportación, incluyendo un 7% correspondiente al aceite refinado.

La transformación de la industria aceitera argentina responde a fuerzas de mercados nacionales e internacionales. En lo que respecta a los mercados nacionales, en los últimos tiempos, se produjo un cambio sustancial en el sector primario a partir de la introducción de nuevas tecnologías en el cultivo. Esto modificó las condiciones básicas de oferta, generando mayor disponibilidad y mejor calidad de materias primas. En la industrialización se produjo un cambio en el procesamiento de las semillas con la introducción de mejoras tecnológicas, componente también de las condiciones básicas de oferta.

Estos últimos hechos, además, fueron acompañados por cambios a nivel externo, uno de ellos es la creciente importancia del consumo de aceites vegetales que se registra a nivel mundial. La industria aceitera crece de la mano de un mercado en crecimiento, y su performance resulta eficiente, como efecto de la inversión, modernización tecnológica, aumento de escala de la producción y ubicación estratégica (Locatelli et al., 2013).

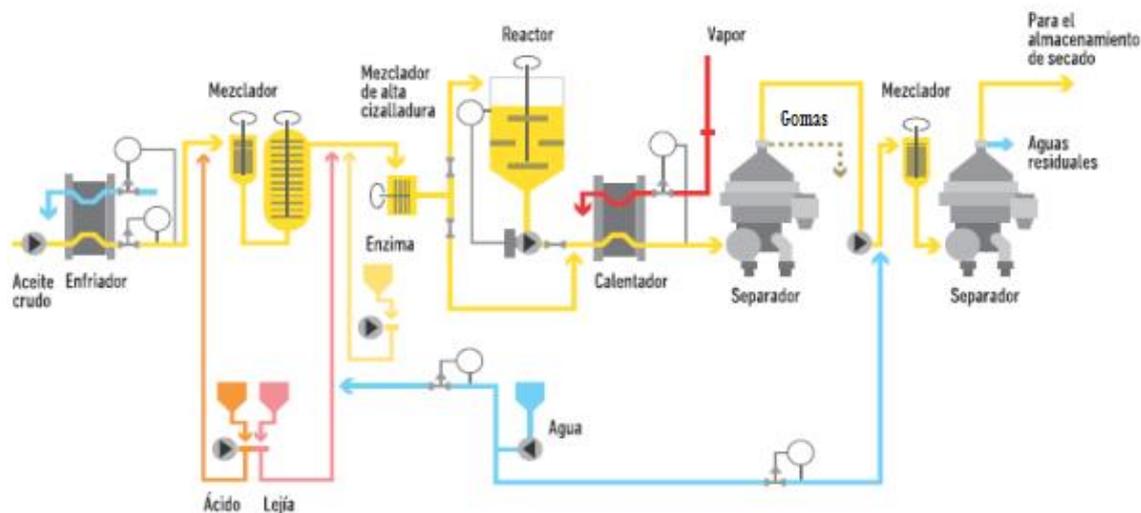
Ante este panorama, crece el incentivo para profundizar y proponer la introducción de nuevas tecnologías y metodologías, que contribuyan a la expansión y mejora de uno de los sectores agroindustriales más pujantes de la economía argentina.

## 1.2 Consideraciones generales

El proceso de desgomado tiene por objetivo principal la remoción de los fosfolípidos contenidos en el aceite crudo, dando como producto un aceite sin fosfolípidos y originando un subproducto que se denomina “goma”, debido a su aspecto viscoso. Este proceso se puede realizar a través de enzimas específicas. Generalmente, el proceso de desgomado enzimático comprende el ajuste de la temperatura óptima del aceite para la reacción de la enzima, la adición de ácido y posterior agregado de un álcali, para lograr el pH óptimo deseado para la reacción enzimática, la adición de enzima y el agitado continuo, a través de mezcladores. Después de un período determinado durante el que se produce la reacción en el tanque o reactor, el aceite es llevado a la temperatura requerida para la separación en la centrífuga. Este proceso, se esquematiza en la Figura 1.2.

La finalidad del mezclado es producir una emulsión estable con la enzima en la fase acuosa y los fosfolípidos hidratables depositados en la interfase aceite/agua. La emulsión formada, se mantiene con agitación homogénea y constante, hasta que reaccionan todos los fosfolípidos existentes. Cuando los fosfolípidos (PLS) hidratables (HP, por sus siglas en inglés) y no hidratables (NHP, por sus siglas en inglés) presentes en el aceite, se convierten en sus productos de reacción (lisofosfolípidos (LPS) y ácidos grasos (AG), o diacilgliceroles (DAG) y fosforilésteres), la reacción enzimática es completa (Galhardo y Dayton, 2012).

En este capítulo, se describe el aceite de girasol y las enzimas utilizadas durante el trabajo de tesis.



**Figura 1.2-** Esquema simplificado del proceso de desgomado enzimático. Adaptado de Galhardo y Dayton, 2012.

### 1.3 Marco teórico

#### 1.3.1 El aceite de girasol

El girasol (*Helianthus annuus L.*), pertenece a la familia de las Compositae (Salunkhe y

Desai, 1984), presenta como composición media del grano 2,9 a 6,2% de humedad, 21,4 a 28,2% de proteína cruda, 38,0 a 60,5% de lípidos, 2,3 a 3,0% de fibras, 2,7 a 3,9% de ceniza y 12,4 a 28,9% de carbohidratos (Canella et al., 1976). La almendra o pepa, ocupa el 70% del grano. Un contenido de aceite de 55% en la pepa, representa 40% de aceite en el grano entero (Bockisch, 1998).

El aceite de girasol, está compuesto principalmente por triglicéridos, acompañados de mínimas cantidades de fosfolípidos, tocoferoles, ácidos grasos, esteroides, ceras, hidrocarburos y pigmentos (Allen et al., 1982, Veldstra y Klere, 1993). La presencia de algunos de ellos es beneficiosa, como es el caso de los tocoferoles que contribuyen a la estabilidad oxidativa del aceite,

mientras que la de otros es no deseada, como por ejemplo el caso de los fosfolípidos que causan inconvenientes en la estabilidad física del producto final.

El aceite puede ser extraído por prensado en frío o en caliente, seguido de la extracción por solvente. En este trabajo se utilizaron muestras de aceite de girasol crudo de extracción con hexano, provistas por la Empresa Oleaginosa Moreno Hermanos S.A.

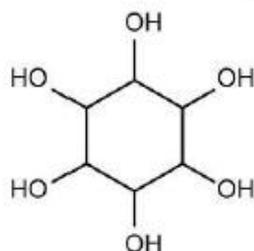
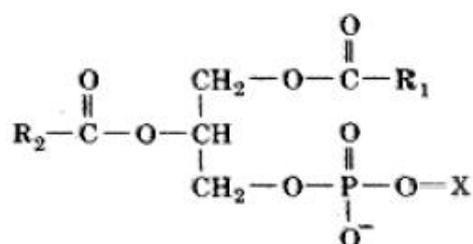
A continuación se describen los constituyentes del aceite de girasol objeto de estudio en este trabajo.

### 1.3.1.1 Los fosfolípidos

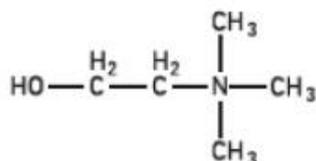
Los fosfolípidos son un tipo de lípidos anfipáticos compuestos por una molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato en la posición sn-3. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a una base nitrogenada (colina, serina o etanolamina) o a un polialcohol como el inositol (Figura 1.3). Comúnmente se clasifican como "hidratables" o "no hidratables". El grado de afinidad por el agua del grupo fosfodiéster es lo que le confiere al fosfolípido (PL) características hidrosolubles, debido a la carga del fosfato que le otorga polaridad. La parte de esta macromolécula constituida por las cadenas hidrocarbonadas le concede la característica de liposoluble. Es por esa razón, que los fosfolípidos más "hidratables" son los que poseen mayor poder o propiedades emulsionantes y son al mismo tiempo, los responsables de la mayor parte de las pérdidas de aceite cuando se separan las gomas a través del desgomado acuoso (Galhardo et al., 2010).

El ácido fosfatídico (PA) tiene un grupo fosfato libre solamente esterificado con el glicerol en la posición sn-3, por lo tanto, posee dos grupos hidroxilo que tienen una gran afinidad por iones divalentes como calcio y magnesio. Las sales formadas con estos metales alcalinos, son estables y neutras, y forman parte de los fosfolípidos no hidratables. La fosfatidiletanolamina (PE) tiene una carga positiva en el grupo amino, y una carga negativa en el grupo hidroxilo restante del fosfato si el pH es neutro. En estas condiciones, la PE puede formar una sal

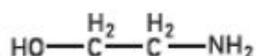
interna con un anillo de seis miembros. Así, el PA y la PE son definidos como NHP. Para el caso de la PE las condiciones cambian con el pH del medio, ya que a pHs ácidos, menores que 3, sólo estará presente la carga positiva del amino y cuando el pH es alcalino ( $\text{pH} > 9$ ) sólo estará presente la carga negativa del fosfato siendo el fosfolípido en ambas condiciones, totalmente hidratable (Dijkstra, 2013).



X= Inositol (Fosfatidilinositol)



X= Colina (Fosfatidilcolina)



X= Etanolamina (Fosfatidiletanolamina)

X=Hidrógeno (Ácido Fosfatídico)

**Figura 1.3-** Estructura química de la molécula de fosfolípidos.

En cuanto al fosfatidil inositol (PI) y la fosfatidil colina (PC), los mismos son normalmente designados como HP, debido a que poseen gran polaridad en el grupo fosfodiéster. A cualquier valor de pH el PI es hidratable porque tiene

cinco grupos hidroxilo. La PC tiene un grupo amino cuaternario con una carga positiva. Este grupo es voluminoso, con lo cual existe un impedimento estérico para formar una sal interna con el fosfato cargado negativamente, y así, la carga positiva siempre permanecerá aislada (Dijkstra, 2010). La PC presenta mayor afinidad por el agua que cualquiera de los otros fosfolípidos naturalmente presentes en el aceite crudo, por lo tanto, debe ser identificada como el fosfolípido de mayor poder emulsionante (Galhardo et al, 2010).

De esta manera, la PC existe en el aceite como un zwitterión, que es hidratable; el PI existe como un complejo con potasio o magnesio y es totalmente hidratable debido a su grupo inositol hidrofílico. La PE también existe como ion anfótero, que se combina con iones metálicos. Si éstos son monovalentes como el potasio, la PE es hidratable, pero los iones bivalentes originan la no hidratabilidad. El PA existe como ácido parcialmente disociado combinado formando un complejo con un ion metálico, y es también hidratable cuando este ion es monovalente y no hidratable cuando es bivalente.

### **1.3.1.2 Las ceras**

Las ceras son ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos de cadena larga, que contienen usualmente entre 36 y 60 átomos de carbono. Algunas fracciones de ceras son pocos solubles en los glicéridos a bajas temperaturas, cristalizan y producen turbiedad en el aceite, perjudicando su procesamiento y comercialización. Por ello, deben ser reducidas cuando sus concentraciones son importantes, como en los aceites de girasol, para obtener un producto claro sin riesgo de turbidez.

### **1.3.2 Las enzimas**

Las enzimas son catalizadores de origen biológico que presentan una alta especificidad y proporcionan una capacidad de transformación altamente selectiva y versátil, de gran impacto en el mundo químico. La biocatálisis o biotransformación es el proceso por el cual se produce la conversión de un compuesto químico en otro, mediante el uso de un catalizador de origen biológico o biocatalizador, que puede ser una enzima o sistema enzimático aislado.

Debido a su origen biológico, las enzimas actúan en medios acuosos, en condiciones suaves de temperatura y pH, por lo que no requieren el uso de disolventes orgánicos potencialmente peligrosos o contaminantes, ni grandes aportes de energía necesarios para alcanzar temperaturas elevadas. En algunos casos, la producción de ciertos compuestos por medio de tecnologías enzimáticas puede llegar a minimizar el requerimiento energético hasta un 60% y disminuir el gasto de agua hasta el 80% (Vandamme y Soetaert, 2004).

El reactor enzimático es la unidad de proceso en la que se efectúa la conversión de sustratos a productos, en condiciones ambientales controladas. En el proceso de desgomado enzimático, a escala laboratorio, se utilizan enzimas comerciales, en la modalidad por lotes. En esta modalidad la enzima se emplea libre en solución, y luego de realizar la reacción correspondiente, sigue formando parte del producto de reacción, por lo que debe separarse o inactivarse (Illanes, 1994).

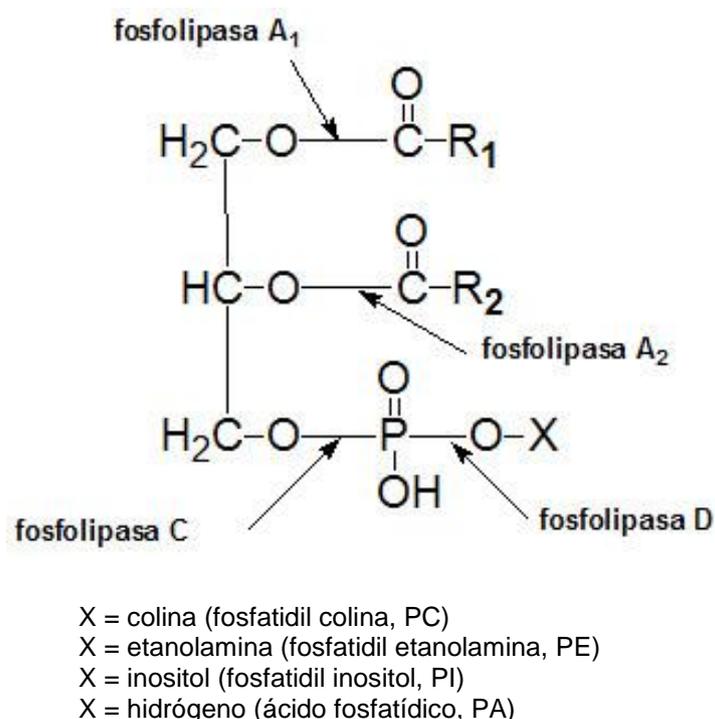
Existen varios tipos de enzimas de interés para el procesamiento de aceites vegetales, como la fosfolipasa A1, (PLA1), y la fosfolipasa A2, (PLA2) que remueven el ácido graso de la posición 1 y 2 respectivamente con respecto al glicerol, la fosfolipasa B, (PLB) que elimina ambos ácidos grasos del grupo glicerol, la fosfolipasa C, (PLC), que cataliza la hidrólisis del enlace fosfato-glicerol en la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y entre otro grupo de enzimas microbianas, la aciltransferasa lipídica (LAT) con actividad PLA2 (LysoMax® Oil de Danisco) que transfiere un ácido graso a un esteroles que se encuentre presente en el aceite para convertirlo en un éster de ácido graso. Esta enzima actúa sobre todos los fosfolípidos presentes en el aceite, así, en un momento dado, la totalidad de los fosfátidos de la solución enzimática líquida terminan convertidos en lisofosfátidos, que retienen una cantidad menor de aceite que los fosfátidos originales (Dijkstra, 2011).

Las diferentes enzimas que se encuentran comercialmente disponibles para el procesamiento de aceites vegetales, varían en el modo que actúan sobre los fosfolípidos, pero todas aumentan el rendimiento de la fase oleosa recuperada por el proceso de desgomado (Galhardo & Hitchman, 2011).

A continuación se describen las enzimas utilizadas en esta tesis, la fosfolipasa A1 y A2; y la aciltransferasa provistas por Novozyme y Danisco respectivamente.

Las fosfolipasas forman una clase diversa de enzimas optimizadas para hidrolizar fosfolípidos en enlaces éster específicos. Existen dos conjuntos generales de fosfolipasas, las hidrolasas de acilo y las fosfodiesterasas. Dentro de cada conjunto, las enzimas se clasifican de acuerdo a la escisión del enlace éster para el que son específicas.

La Figura 1.4 muestra la estructura molecular de estos fosfolípidos e indica qué fosfolipasa cataliza la hidrólisis del enlace respectivo.



**Figura1.4-** Clasificación de las fosfolipasas según la escisión del enlace éster para el que son específicas.

La fosfolipasa A1 (PLA1, EC 3.1.1.32) cataliza la reacción de hidrólisis en fosfolípidos, actuando sobre la posición sn-1, generando 2 acil-fosfolípidos y ácidos grasos libres (AGL). La misma presenta alta especificidad catalítica en

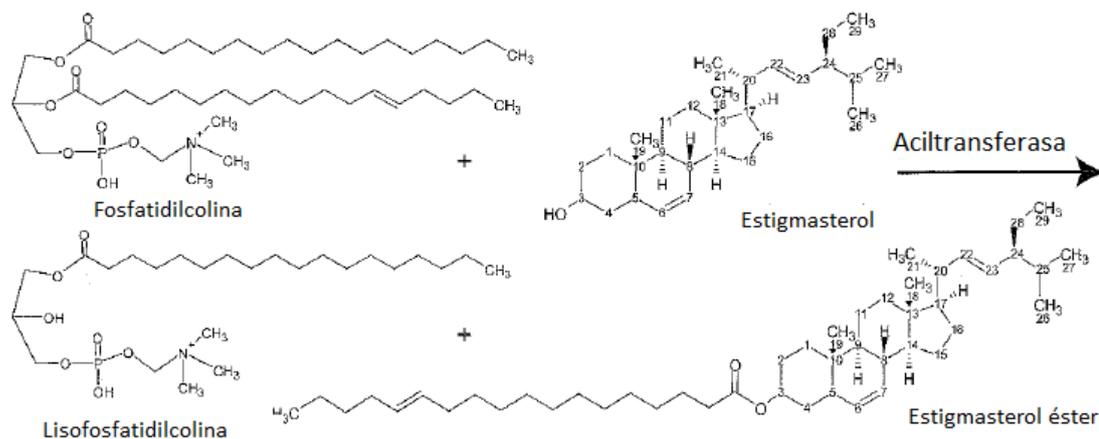
el aceite, cuando el temperatura de reacción está por encima de 40 °C (Yang et al., 2006).

La fosfolipasa MAXAPAL® A2 es una enzima líquida obtenida por cultivo sumergido de una cepa seleccionada de *Aspergillus niger*. Se clasifica de acuerdo a la escisión del enlace éster para el que es específica (PLA2, EC.3.1.1.4), que corresponde a los ácidos grasos a partir de la posición sn-2 con respecto al glicerol dando como resultado un lisofosfolípido más un ácido graso.

El término "lípidos aciltransferasa" tal como se utiliza para describir una enzima que tiene actividad de aciltransferasa (EC. 2.3.1.43), se refiere a la capacidad del catalizador para transferir un grupo acilo desde un lípido a uno o más sustratos aceptores, tales como un esteroles, un estanol, un carbohidrato, o una proteína. Para algunos aspectos el "aceptor de acilo" puede ser cualquier compuesto que comprende un grupo hidroxilo (OH), pero para la industria aceitera el interés se centra en la capacidad de la lípidos aciltransferasa de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroles y / o un estanol.

El aceptor de acilo puede encontrarse de manera natural en el aceite, o alternativamente, puede ser añadido, por ejemplo, un esteroles y / o estanol pueden añadirse al aceite antes o durante el proceso de desgomado. Conjuntamente, la lípidos aciltransferasa también pueden exhibir una o más de las siguientes actividades fosfolipasa: actividad fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4) y / o actividad de fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32). La enzima lípidos aciltransferasa puede tener también actividad de fosfolipasa B (EC 3.1.1.5) (Soe & Brown, 2011).

En la siguiente figura (Figura 1.5) puede observarse la reacción de la transferasa. Así, en presencia de un estigmaesteroles, la enzima actúa sobre la fosfatidilcolina y transfiere un grupo de acilos de la posición sn-2 del fosfolípido al esteroles, dando como resultado lisofosfatidilcolina, y estigmaesteroles éster.



**Figura 1.5-** Reacción de aciltransferasa. Transferencia de un grupo acilo de la posición sn-2 de la fosfatidilcolina al colesterol. Fuente: Danisco Technical Memorandum LysoMax® Oil 1535-2s.

#### 1.4 Justificación y fundamento de la investigación

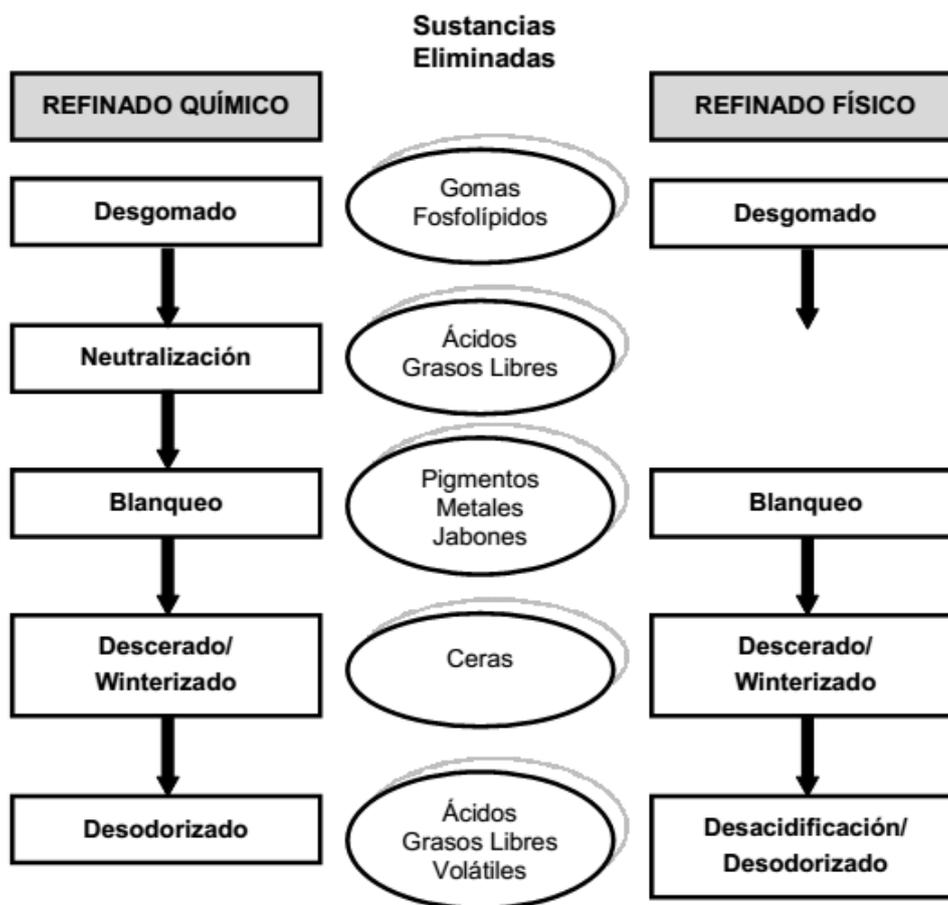
Los aceites vegetales crudos tienen una serie de componentes en suspensión que les imparten turbidez e inestabilidad desde el punto de vista organoléptico y de sus propiedades para el almacenaje. En el aceite de girasol crudo se destacan los fosfolípidos, cuyos contenidos pueden superar el 1 %, las ceras en concentraciones que pueden superar los 1000 mg/kg y los iones metálicos (cobre, hierro, etc.). Estos compuestos se pueden eliminar mediante procesos de desgomado y descerado. Al reemplazar en dichos procesos, compuestos químicos o etapas físicas por un proceso enzimático, se reduce el uso de energía, la generación de subproductos, la obtención de agua de desecho, y como resultado de una catálisis enzimática más específica, se obtiene mayor rendimiento (Cowan et al., 2008).

El procesamiento enzimático de los aceites y las grasas constituye una alternativa innovadora y sostenible que disminuye el impacto ambiental, cuando se compara con los procesos convencionales. Luego del lanzamiento al mercado de enzimas producidas microbiológicamente, se ha atraído el interés de los tecnólogos para su incorporación en los procesos industriales factibles de ser biológicamente reemplazados.

### 1.4.1 Procesamiento de aceites vegetales

A fin de conseguir un producto más agradable para el consumo, el proceso de refinado pretende otorgar a los aceites, características y propiedades que los conviertan en productos deseables. Los procesos de refinado se han ido modificando a través del tiempo con la intención de optimizar las propiedades organolépticas del aceite comestible. Durante la extracción del aceite crudo por solventes o prensado, se arrastran compuestos no triglicéridos, como ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, resinas, glucósidos, carotenos, pigmentos, material mucilaginoso, trazas de metales y pesticidas. En el desarrollo de las etapas de refinado, se pierden componentes que por sus propiedades sería importante mantener, como carotenos, tocoferoles y vitaminas. Los tocoferoles son antioxidantes naturales, los cuales le otorgan a los lípidos estabilidad y resistencia a la oxidación. Así, el refinado tiene como finalidad eliminar componentes indeseables, tratando de preservar en el mayor grado posible, la calidad de los constituyentes esenciales, en este caso los triglicéridos (Autino, 2009).

De los dos métodos disponibles para el refinado de aceites vegetales, el más importante y generalmente usado es el llamado refinado químico (Carlson, 1993; Denise, 1996; Dahlke & Eichelsbacher, 1998). Durante el refinado químico, el aceite es depurado de gomas y ácidos grasos libres durante las etapas de desgomado y neutralización (Givon y Tirtiaux, 2000). La neutralización se utiliza para eliminar impurezas consistentes en ácidos grasos libres, fibras y algunos materiales que proporcionan color. El aceite neutralizado tiene un color no adecuado para fines alimenticios. Es necesario blanquearlo para quitar los jabones formados durante la neutralización, impurezas no volátiles y pigmentos. Esto se hace con tierras de blanqueo que consisten en carbón activado u otro adsorbente. Después de un tiempo de contacto, la mezcla aceite/tierra simplemente se filtra para continuar el procesamiento (Figura 1.6).



**Figura 1.6-** Sustancias indeseables eliminadas en los distintos pasos de los procesos de refinado químico y físico de aceites vegetales.

El otro método, es el denominado refinado físico, que tiene mayor requerimiento de equipamiento, pero involucra una menor cantidad de pasos (Buchold, 1995). El método clásico de refinado físico, consiste en aplicar un proceso de desgomado especial, seguido por el blanqueo y la etapa de desacidificación y desodorizado en la que se eliminan los ácidos grasos libres y los compuestos volátiles. Las condiciones operativas de temperatura y vacío, deben ser cuidadosamente controladas para permitir la destilación y remoción por vapor de los ácidos (Givon y Tirtiaux, 2000). El refinado físico se presenta como un método de menor impacto ambiental, en el que prácticamente no hay agua de desecho y las pérdidas de aceite se ven reducidas (Buchold, 1995). Sin embargo, el requisito que presenta este método para ser satisfactorio, consiste en lograr un contenido de fosfolípidos bajo, prácticamente un contenido de fósforo residual menor que 10 mg/kg (Buchold, 1995; B. Yang et

al., 2006; Jahani et al., 2008; Prabhakaran & Rakshit, 2009; Galhardo et al., 2010; Jiang et al., 2011). Así, a este proceso se lo denomina desgomado efectivo (Buchold, 1995). El proceso es aún más cercano al ideal, si el contenido de fósforo residual logrado es menor que 5 mg/kg (Narayana et al., 2002). Esta exigencia se debe a que los fosfolípidos no eliminados durante el desgomado, interfieren por sí mismos en el proceso de refinación física, afectando el sabor y la capacidad de almacenaje del aceite refinado (Dijkstra, 1998). Además, un proceso de desgomado adecuado es vital para el refinado físico satisfactorio del aceite (B. Yang et al., 2006).

La refinación del aceite de girasol, requiere un paso adicional para remover las ceras que le confieren turbidez. El “winterizado” es un proceso clásico de descerado en aceites vegetales que consiste en enfriar el producto, lentamente y en condiciones controladas a temperaturas de 6-8 °C para lograr la cristalización de las ceras y separarlas luego por filtración (Seguine, 1980; Leibovitz & Ruckenstein, 1984). El winterizado es eficiente cuando el contenido de ceras en el aceite se encuentra por debajo de 500 mg/kg. En los aceites de girasol provenientes de semillas híbridas, que pueden contener más de 1000 mg/kg de ceras, este proceso resulta ineficiente y caro, debido a las bajas velocidades de filtración, las mayores pérdidas de aceite y el más alto requerimiento de sustancias “ayuda-filtrantes” (Haraldsson, 1983).

En la etapa final del proceso, denominada desodorizado, se eliminan sustancias volátiles que imparten olores y sabores indeseables, como ácidos grasos libres, aldehídos, cetonas, pero también son arrastrados esteroides y otros compuestos deseables de la fracción insaponificable por sus características antioxidantes y saludables (Dorrel & Vick, 1997). Esta operación se realiza generalmente mediante la inyección de vapor y bajo vacío.

#### **1.4.2 El proceso de desgomado y el desgomado enzimático, estado del arte**

Hasta 1990, el desgomado se limitaba a los procesos acuoso y ácido. Luego, varios métodos se desarrollaron y adoptaron industrialmente con la intención de posibilitar que el aceite desgomado sea refinado físicamente después de la decoloración (Dijkstra, 2013).

Los procesos destacados son el desgomado total, el súper desgomado, el desgomado soft y el proceso de ultrafiltración (Givon y Tirtiaux, 2000; Klaus, 2008; Autino, 2009; Jiang et al., 2011).

El desgomado con agua es el método más adecuado para remover los fosfolípidos hidratables, y se utiliza en todos los casos para la recuperación de los fosfolípidos o la “lecitina” como se los denomina genéricamente. El aceite crudo pasa a través de un intercambiador de calor a placas calefaccionado mediante vapor, hasta alcanzar 75-85 °C, y luego se le adiciona agua en porcentaje equivalente al contenido de fosfolípidos. Se realiza la mezcla rápida con mezcladores dinámicos, o con mezcladores estáticos, de menor eficiencia, que requieren un tiempo de hidratación mínimo de 30 minutos. El contenido de fósforo típico logrado en el aceite desgomado puede ubicarse entre 80 y 200 mg/kg, dependiendo del tipo y la calidad del aceite crudo (Givon y Tirtiaux, 2000; Klaus, 2008; Autino, 2009).

Con la técnica de desgomado ácido simple, el aceite crudo a una temperatura entre 80 y 90 °C se mezcla con ácido fosfórico o cítrico, seguido por un tiempo de reacción de 5-20 minutos para permitir la destrucción de los complejos de calcio y magnesio de los fosfolípidos no hidratables. Luego, se mezcla con 2-5 % de agua a fin de hidratar los compuestos formados, antes de enviarlo al separador centrífugo. El contenido de fósforo residual resulta aproximadamente de 30 mg/kg de aceite (Givon y Tirtiaux, 2000).

A principios de los noventa, se comenzaron a desarrollar y presentar algunos procesos de desgomado enzimático, a escalas laboratorio y piloto. En el año 1992, las empresas Lurgi y Röhm patentaron el proceso EnzyMax®. El procedimiento original utilizaba una fosfolipasa A2 (PLA2) de páncreas porcino producida por Röhm, disuelta en agua con citrato de sodio y dodecil sulfato de sodio, que es un emulsionante muy fuerte (Aalrust et al., 1993). A continuación, la mezcla enzima/agua se añadía al aceite previamente calentado a 50-75 °C valiéndose de la capacidad de la enzima porcina de tolerar el calor. En este procedimiento, se formaba una emulsión y la enzima se dejaba reaccionar con los fosfolípidos durante 3 a 4 horas antes de la centrifugación, resultando un aceite con contenido de fósforo residual de 3 mg/kg. Explicaciones posteriores,

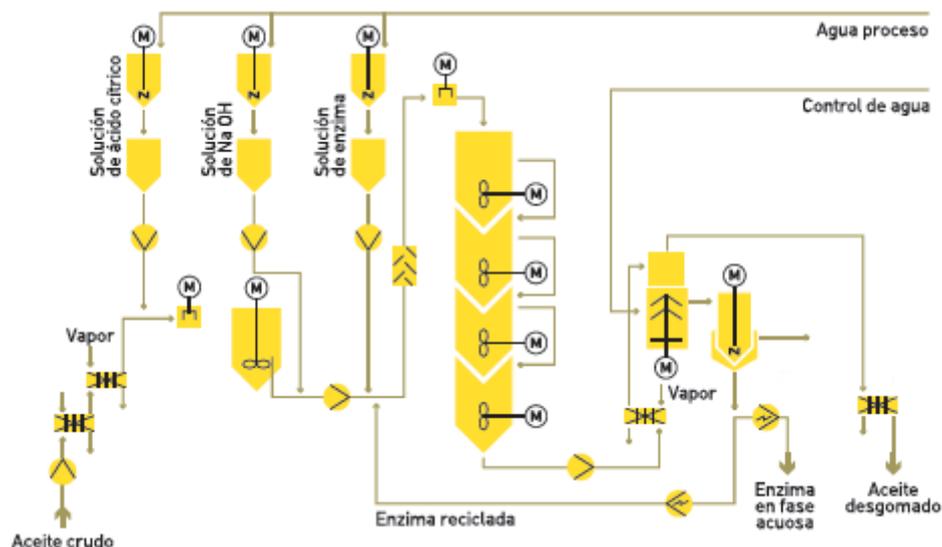
indicaron que la hidrólisis enzimática de una molécula de fosfolípido formaba lisolecitina soluble en agua, lo que le permitía ser separada del aceite (Buchold, 1993; Dahlke & Eichelsbacher, 1998). Utilizando fosfolipasas de tipo A2, se hidrolizan los grupos acilos de los fosfolípidos en la posición sn-2 respecto del glicerol, formando un lisofosfolípido y un AG (Figura 1.2). En esos estudios, no consideraron el uso de las fosfolipasas C o D, ya que ninguna de ellas estaba disponible en el mercado en el momento del desarrollo y tampoco publicaron datos sobre la composición de las gomas obtenidas después de la reacción y la separación en la aplicación a escala industrial. Los autores de la patente inicial, descartaron el uso de aceites crudos con alto contenido de fósforo y se centraron en el uso de aceite ya desgomado con agua, rico en fosfolípidos no hidratables cuyo contenido de fósforo residual era menor que 250 mg/kg.

Dahlke (1997) y Dahlke & Eichelsbacher (1998) proporcionaron también detalles sobre el proceso EnzyMax® y reforzaron la idea que fue diseñado para eliminar sólo fosfolípidos no hidratables del aceite, a partir de una PLA2. La Figura 1.2 esquematiza el proceso estudiado. De acuerdo con Dahlke (1997), el lisofosfolípido resultante de la reacción de la enzima era insoluble en aceite, y por lo tanto, era eliminado en la fase acuosa, y el ácido graso libre formado permanecía en el aceite.

Las fases del proceso EnzyMax® descritas fueron:

- 1) El ajuste de la temperatura óptima del aceite para la reacción de la enzima.
- 2) La adición de ácido cítrico y la retención del aceite con ácido durante un periodo de tiempo determinado.
- 3) La adición de soda cáustica para amortiguar la fase de agua y lograr el pH óptimo deseado para la reacción enzimática.
- 4) La adición de enzima y agua al aceite, a través de mezcladores (estáticos y mecánicos).
- 5) La reacción en el reactor (hasta 6 horas).

- 6) El calentamiento del aceite a la temperatura óptima para la separación en la centrífuga.
- 7) La separación de lisofosfolípidos y el aceite en la centrífuga.



**Figura 1.7-** Esquema del proceso EnzyMax®. Adaptado de Dahlke (1997).

La enzima pancreática usada, obtenida como subproducto en la extracción de insulina (Buchold, 1995), presentaba el inconveniente de tener un pH óptimo muy por encima del pH ácido de los aceites vegetales, debido a su origen animal. Los citratos utilizados como solución reguladora para la reacción, manifestaban complicaciones en algunas instalaciones porque causaban daños en las centrifugas al depositarse en el rotor. A su vez, el uso en alimentos generaba problemas con los países con normas Kosher y Halal, por razones de índole religiosa. Todos estos inconvenientes interrumpieron el avance del proceso por unos años, pero luego del lanzamiento al mercado de enzimas producidas microbiológicamente, se renovó el interés.

Con el avance de la biotecnología, y junto a los beneficios del menor impacto ambiental por lograr bioprocesos que reemplacen etapas físicas o químicas, el desgomado enzimático protagonizó en la última década investigaciones mundiales a escala piloto e industrial. Entre los primeros

estudios a escala laboratorio con fosfolipasas de origen microbiano, se puede citar el realizado con fosfolipasa A1 (PLA1) de *Fusarium oxysporum* cuyo pH óptimo se aproxima a 5, que permitió obtener aceites desgomados tipo Kosher (Clausen, 2001). La PLA1 produce idéntica reacción que la PLA2 pero en la posición sn-1 del fosfolípido (Figura 1.4). Así, en la última década se han desarrollado una amplia variedad de fosfolipasas microbianas con diferentes propiedades capaces de conseguir valores de fósforo residual ideales para el refinado físico. Entre ellas se destacan la PLA1 de *Termomyces lanuginosa* de Novozymes, (B. Yang et al., 2006), la fosfolipasa C (PLC) de *Verenium* (Gramatikova et al., 2011) y la aciltransferasa de Danisco (Soe & Brown, 2011). Dichas enzimas no presentan las desventajas mencionadas previamente y además ofrecen beneficios para la ingeniería de procesos.

### 1.5 Planteo y definición de la problemática

La revolución industrial que se inició en Europa, se ha extendido desde hace tiempo a gran parte del resto del mundo, elevando los niveles de vida y brindando prosperidad a millones de personas. Sin embargo, dichos cambios han traído sus consecuencias y una de ellas, es la asociación de una industrialización creciente con el cambio climático, situación que ahora es reconocida por la mayoría de los investigadores del área respectiva y por la comunidad en general.

Teniendo en cuenta el impacto que tienen los procesos industriales sobre el medio ambiente, se han desarrollado en el área de la industria alimentaria de los aceites y las grasas, una serie de operaciones biotecnológicas, (síntesis de ésteres, desgomado e interesterificación) con la finalidad de reducir el impacto ambiental.

Utilizando enzimas, los aceites de girasol crudos de calidades muy diversas podrían desgomarse eficientemente, en condiciones suaves, de escaso impacto ambiental y sin requerir costosos equipamientos.

El objetivo general de esta investigación es desarrollar procesos enzimáticos que puedan ser incluidos en forma eficiente en el procesamiento de aceites vegetales a escala industrial.

Entre los objetivos específicos se plantea conseguir la optimización del proceso de desgomado enzimático en aceites de girasol crudos, evaluando parámetros como concentración de enzima, pH, temperatura y utilizando diferentes tipos de enzimas de origen microbiano (fosfolipasas y transferasas). Al mismo tiempo, se intenta examinar el efecto sinérgico de la combinación de diferentes enzimas, tendientes a lograr un proceso que sea eficiente.

Por otro lado, se espera evaluar el efecto del proceso de desgomado enzimático sobre el contenido de ceras, la calidad y la estabilidad oxidativa de los aceites.

**CAPÍTULO II:**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Materiales

### 2.1.1 Aceite de girasol

En este trabajo se utilizaron tres lotes de aceite de girasol crudo de extracción, correspondientes a distintas cosechas (2010-2012) de la región de Necochea-Quequén. Las muestras fueron provistas por la Empresa Oleaginosa Moreno Hermanos S. A., Planta Quequén de la provincia de Buenos Aires.

### 2.1.1 Enzimas

#### 2.1.2.1 Fosfolipasa A1

Los ensayos de desgomado enzimático, se realizaron con la enzima Lecitase® Ultra, fosfolipasa A ácida (PLA1, EC 3.1.1.32) que cataliza la reacción de hidrólisis de fosfolípidos, actuando sobre la posición sn-1 y generando 2-acil-fosfolípidos y ácidos grasos libres (Capítulo I). La enzima fue provista por Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) y sus características y propiedades, obtenidas a partir de sus especificaciones comerciales, se presentan en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1-** Especificaciones de origen y características de la enzima fosfolipasa A1

<b>Enzima PLA1</b>	
<b>Nombre Comercial</b>	Lecitase® Ultra
<b>Aspecto físico</b>	Líquido amarronado traslúcido
<b>Origen</b>	Fermentación sumergida de un OGM <sup>a</sup> Organismo productor: <i>Aspergillus oryzae</i> Organismo donante: <i>Thermomyces lanuginosus</i>
<b>Actividad</b>	10000 Unidades de Fosfolipasa (PLU) <sup>b</sup> /g
<b>pH óptimo</b>	5
<b>Temperatura óptima</b>	50 °C

<sup>a</sup>Organismo Genéticamente Modificado.

<sup>b</sup>Una PLU es la cantidad de enzima que libera 1 µmol/min de ácidos grasos libres (AGL) a partir de L-α-fosfatidilcolina como sustrato en las condiciones de ensayo (pH = 7, Temperatura = 37 °C).

### 2.1.1.1 Fosfolipasa A2

La enzima fosfolipasa MAXAPAL® A2 (PLA2) fue provista por DSM Food Specialities SA México (México DF, México). Según sus especificaciones comerciales, es una enzima líquida obtenida por cultivo sumergido de una cepa seleccionada de *Aspergillus niger*. Se clasifica de acuerdo a la escisión del enlace éster para el que es específica (EC 3.1.1.4), que corresponde a los ácidos grasos a partir de la posición sn-2 con respecto al glicerol dando como resultado un 1-acil-liso-fosfolípido más un ácido graso. En condiciones de actividad óptima, MAXAPAL® A2 es activa en el intervalo de pH 5,0 a 9,5 con un máximo de actividad a pH 8,0, y en el intervalo de temperatura 4-80 °C con una temperatura óptima a 45 °C. La enzima es resistente a las condiciones de altas temperaturas. Esta enzima no posee actividades enzimáticas secundarias. Las características y propiedades de la enzima se presentan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2-** Especificaciones de origen y características de la enzima fosfolipasa A2

Enzima PLA2	
<b>Nombre Comercial</b>	Maxapal® A2
<b>Aspecto físico</b>	Líquido amarronado opaco
<b>Origen</b>	Fermentación sumergida de un OGM <sup>a</sup> Organismo productor: <i>Aspergillus niger</i> Organismo donante: no declarado
<b>Actividad</b>	10000 Unidades Cromogénicas de Fosfolipasa (CPU) <sup>b</sup> /g
<b>pH óptimo</b>	8 (activa de 5 a 9,5)
<b>Temperatura óptima</b>	45 °C (activa de 4 a 80 °C)

<sup>a</sup>Organismo Genéticamente Modificado.

<sup>b</sup>Una CPU es la cantidad de enzima que libera 1 µmol/min de AGL a partir de yema de huevo como sustrato a 40 °C y pH = 8,0.

### 2.1.1.1 Aciltransferasa

La enzima aciltransferasa LysoMax® Oil (LAT) fue provista por Danisco & Genencor (Arroyito, Córdoba, Argentina). Además de la capacidad de transferir un grupo acilo de la posición sn-2 desde un fosfolípido a un esteroil o un estanol (EC 2.3.1.43), la lípido aciltransferasa exhibe actividad de

fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4) en ausencia de esteroides y también de lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5) como actividad secundaria. Las especificaciones se resumen en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3-** Especificaciones de origen y características de la enzima aciltransferasa

<b>Aciltransferasa</b>	
<b>Nombre Comercial</b>	LysoMax® Oil
<b>Aspecto físico</b>	Líquido amarronado traslúcido
<b>Origen</b>	Fermentación sumergida de un OGM <sup>a</sup> Organismo productor: <i>Aeromonas</i> spp. Organismo donante: <i>Bacillus</i> spp.
<b>Actividad</b>	18 Unidades transferasa <sup>b</sup> /mg
<b>pH óptimo</b>	5-7 (estable en un rango de 5 a 10)
<b>Temperatura óptima</b>	50-60 °C

<sup>a</sup>Organismo Genéticamente Modificado.

<sup>b</sup>Una Unidad de transferasa es la cantidad de enzima que forma un  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de colesterol éster a partir de fosfatidilcolina y colesterol como sustratos a 37 °C y pH = 7,4.

### 2.1.3 Equipos

Este apartado se consigna para describir los diferentes reactores que se utilizaron para realizar los ensayos de desgomado de laboratorio.

#### 2.1.3.1 Sistema de reactores batch en paralelo

Este diseño consistió en dos o tres reactores conectados en paralelo. La unidad del reactor está integrada por: un recipiente de reacción de vidrio de capacidad = 100 g con una camisa calefaccionada mediante un baño de circulación de agua termostatizada, un agitador magnético y un termómetro digital con una termocupla para medir la temperatura de la muestra durante el proceso de desgomado. El tiempo de reacción fue medido mediante un cronómetro. Este sistema se muestra en la Figura 2.2 y se proyectó a fin de evitar que la reducción del volumen ocasionado por la toma de muestra para el análisis interfiriera en la cinética de la reacción, permitiendo obtener muestras a diferentes tiempos, manteniendo el volumen constante.



**Figura 2.2-** Sistema de tres reactores “batch” en paralelo.

### 2.1.3.2 Reactor batch de 1000mL

La finalidad de la utilización de este diseño residió en permitir el escalado del proceso aumentando el volumen de sustrato inicial. Para ello se utilizó un reactor de 1000 mL (Figura 2.3), con agitación mediante paletas y con camisa calefaccionada mediante agua termostatazada proveniente de un baño de circulación. En el mismo se efectuaron desgomados acuosos y enzimáticos en condiciones optimizadas, resultantes del análisis de diseño experimental.



**Figura 2.3-** Reactor Batch de 1000 mL usado en los ensayos de desgomado enzimático en condiciones optimizadas.

## 2.1 Métodos

### 2.1.1 El proceso de desgomado

#### 2.1.1.1 Desgomado acuoso

Se realizaron ensayos a través del sistema de reactores “batch” de 100 mL de capacidad en paralelo descrito en el punto 2.1.3.1 (Figura 2.2). Este sistema permite procesar tres muestras en paralelo con agitación magnética continua y homogénea para analizar tres tiempos de desgomado simultáneamente, manteniendo constante el volumen total de muestra durante todo el proceso. En cada reactor, se utilizó: aceite de girasol crudo ( $50 \pm 0,0001$  g), concentración de agua 3 % v/m, temperatura = 60 °C (List et al., 1981; Dijkstra 1994; Givon y Tirtiaux, 2000; Autino, 2009). Alícuotas de la mezcla de reacción (10 mL) fueron extraídas de cada reactor a distintos tiempos establecidos, después de agregado del agua (60, 120 y 180 min). Luego se centrifugaron ( $2400 \times g$ , 10 min) para recuperar las fases oleosa y acuosa conteniendo las gomas. Las muestras procesadas se conservaron hasta su análisis a temperatura de 5°C, protegidas de la luz.

Este ensayo de desgomado acuoso se realizó a fin de poder realizar una comparación adecuada sobre la eficiencia y el rendimiento del proceso objeto de estudio de esta tesis. Para el mismo se seleccionó una temperatura de 60 °C ya que había sido sugerida como temperatura óptima para el desgomado acuoso de aceites de soja, proporcionando una mejor extracción de fósforo y la preservación del color de la lecitina obtenida (List et al., 2001).

### 2.2.1.2 Desgomado enzimático

Para estas experiencias se usaron alternativamente las enzimas PLA1 (Lecitase® Ultra), PLA2 (MAXAPAL® A2) y LAT (LysoMax® Oil). Las condiciones de trabajo fueron: concentración de buffer (ácido cítrico/ citrato de sodio 0,1 M, pH 5) igual a 2 % v/m, variando la dosis de enzima medida en U/kg de aceite a 50 °C de temperatura. Una muestra de  $50 \pm 0,0001$  g de aceite de girasol crudo se llevó a la temperatura de reacción y luego se agregó la cantidad de enzima detallada disuelta en el buffer (100 o 200 U/kg de aceite, según correspondía). La agitación magnética fue homogénea durante todo el tiempo del proceso.

En un ensayo preliminar alícuotas de la mezcla de reacción (10 mL) fueron extraídas a distintos tiempos después de agregada la enzima (30, 60, 120 y 180 min). La inactivación de la misma se realizó calentando 30 minutos a

100 °C. Se centrifugó 10 minutos a 2400 x g para recuperar el aceite y la fase acuosa conteniendo las gomas.

En una segunda etapa, se trabajó con los reactores en paralelo. Después de 60 minutos de agregada la enzima, se extrajo una alícuota (10 mL) de la muestra del reactor 1. De la misma manera se procedió con el reactor 2 a los 120 minutos; y del reactor 3, a los 180 minutos después de iniciada la reacción. Esto permitió el trabajo con los tres reactores en paralelo para tres diferentes tiempos de reacción. La extracción de las alícuotas correspondientes a cada tiempo de reacción, de cada reactor individual permitió mantener constante el volumen total de mezcla de reacción. La inactivación de la enzima se realizó en la forma descrita anteriormente.

En todas las experiencias se realizaron “blancos de enzima” en las mismas condiciones de reacción agregando el mismo volumen de buffer sin enzima. Esto permitió estudiar el proceso sin enzima agregada, para evaluar el efecto del buffer sobre el desgomado y poder cuantificar el efecto atribuible a las enzimas. El buffer utilizado en estas experiencias tiene en su composición ácido cítrico y citrato de sodio de probada acción sobre el desgomado de aceites vegetales (Clausen, 2001).

#### *Diseño experimental de desgomado enzimático a escala laboratorio*

En este protocolo se aplicó el diseño experimental factorial al proceso de desgomado enzimático de aceite de girasol para evaluar el efecto de las distintas variables: pH, temperatura, concentración de la enzima, tiempo de desgomado y relación buffer/aceite (sustrato), a fin de encontrar las condiciones óptimas de operación que minimicen el fósforo residual, utilizando las enzimas que mejores resultados habían arrojado en el ensayos previos: PLA1 (Lecitase® Ultra), y LAT (LysoMax® Oil), y realizar un estudio comparativo de sus condiciones de reacción.

Luego de la revisión bibliográfica y la realización de ensayos preliminares se seleccionaron las variables del proceso (factores) más relevantes y los niveles de estos factores (Tabla 2.4). Considerando que las variables de interés fueron muchas ( $k = 5$ ) se optó por un diseño factorial

fraccionario  $2^{k-1}$  (Montgomery, 2005). El diseño fue realizado utilizando el Software Design Expert versión 7.0 (Stat-Ease, Inc.).

**Tabla 2.4-** Factores y niveles del diseño factorial fraccionario  $2^{5-1}$

Factores	Niveles	
A. pH	5	6
B. Temperatura (°C)	50	60
C. Dosis de enzima (U/kg de aceite)	100	200
D. Tiempo (min)	30	90
E. Relación Buffer/Sustrato (% v/m)	1	3
<b>Respuesta: Concentración de fósforo, mg/kg</b>		

El ensayo fue realizado en el sistema de reactores en paralelo, con aproximadamente 100 g de aceite de girasol crudo, variando la relación de buffer/sustrato, la temperatura, el tiempo, el pH y la concentración de enzima. Alícuotas de la mezcla de reacción (10 mL) fueron extraídas a los 30 y 90 minutos después del agregado de la solución de enzima y se calentaron durante 30 minutos a 100°C para detener la reacción enzimática. Luego se centrifugaron (10 minutos, 2400 x g) para recuperar las fases oleosa y acuosa. Las muestras procesadas se conservaron hasta su análisis a temperatura de 5 °C, protegidas de la luz.

La matriz de ensayos generada por el diseño en Software Design Expert 7.0, indicó 16 ensayos aleatorios que se realizaron por duplicado. La Tabla 2.5 muestra los niveles de los factores, aplicados a cada ensayo.

Un análisis de varianza (ANOVA) se usó para determinar los efectos significativos de las variables de proceso sobre el contenido de fósforo residual (respuesta). Se generó una ecuación polinómica para representar el contenido de fósforo residual en los aceites desgomados en función de las variables significativas del proceso, mediante análisis de regresión múltiple. El mismo fue realizado asignando valores codificados a los diferentes factores, iguales a - 1 para el nivel más bajo y + 1 para el más alto.

**Tabla 2.5-** Matriz de ensayos generada por el diseño experimental

Ensayos	A	B	C	D	E
1	5,0	50	100	30	3
2	6,0	50	100	30	1
3	5,0	60	100	30	1
4	6,0	60	100	30	3
5	5,0	50	200	30	1
6	6,0	50	200	30	3
7	5,0	60	200	30	3
8	6,0	60	200	30	1
9	5,0	50	100	90	1
10	6,0	50	100	90	3
11	5,0	60	100	90	3
12	6,0	60	100	90	1
13	5,0	50	200	90	3
14	6,0	50	200	90	1
15	5,0	60	200	90	1
16	6,0	60	200	90	3

La función deseabilidad fue usada para optimizar el modelo minimizando los contenidos de fósforo residual en los aceites desgomados enzimáticamente. Para representar el contenido de fósforo residual como función de dos factores, manteniendo el resto en su valor óptimo, se utilizaron Superficies de Respuesta.

Los resultados obtenidos fueron confirmados con ensayos posteriores utilizando el mismo dispositivo, en condiciones optimizadas y condiciones adversas elegidas al azar para completar el estudio.

#### *Desgomado enzimático a mayor escala en condiciones óptimas*

El diseño experimental permitió obtener las condiciones de reacción óptimas para la reacción enzimática de las enzimas investigadas. A partir de los parámetros optimizados, se planteó este ensayo a mayor escala. Para la sistematización del proceso con Lecitase® Ultra, PLA1, el ensayo fue realizado en un sistema “batch” con agitación mecánica continua, variando el tiempo a una relación buffer (ácido cítrico/ citrato de sodio 0,1 M)/sustrato fija del 3% v/m, temperatura de 50 °C, pH del buffer = 5 y concentración de enzima de 200 U/kg aceite (Tabla 2.6).

En el caso del estudio con LysoMax® Oil, LAT, las condiciones fueron: 190 U/kg de aceite para la dosificación de la enzima, pH = 5,2, relación buffer/sustrato fija de 1% v/m y 54 ° C de temperatura.

El proceso para la combinación de enzimas, se realizó respetando los parámetros obtenidos para la fosfolipasa A1, que demostró ser la más exigente en cuanto a condiciones de pH y temperatura, como se verá más adelante cuando se muestra el análisis de resultados del diseño experimental.

**Tabla 2.6-** Condiciones de los ensayos para el desgomado enzimático en reactor “batch” de 1000 mL bajo condiciones optimizadas

Ensayo	Agente	Dosis (U/kg aceite)	pH	Temperatura (°C)	Tiempos (min)	B/S (% v/m)
1	PLA1	200	5,0	50	10 - 90	3
2	LAT	190	5,2	54	10 - 90	1
3	PLA1-LAT	100-100	5,0	50	10 - 90	3

B/S = Relación buffer/sustrato.

Alícuotas de la mezcla de reacción (25 mL) fueron extraídas a distintos tiempos (10, 20, 30, 40, 60 y 90 min), después del agregado de la solución de enzima y se calentaron durante 30 minutos a 100 °C para detener la reacción enzimática. Luego se centrifugaron (10 minutos, 2400 x g) para recuperar las fases oleosa y acuosa. Las muestras procesadas se conservaron hasta su análisis a temperatura de 5 °C, protegidas de la luz.

### Observaciones

El punto clave de las experiencias realizadas, fue el modo de lograr y mantener una mezcla íntima entre las enzimas disueltas en el medio acuoso, y los fosfolípidos presentes en el aceite a procesar. El contacto íntimo enzimas/aceite resultó posible utilizando agitadores magnéticos y/o mecánicos conformes al volumen de materia prima empleada. De esta manera se logró la reacción eficiente entre los catalizadores biológicos y el sustrato, debido a que los fosfolípidos hidratables migran inmediatamente a la interfase formada, y los no hidratables lo hacen con un tiempo de retención y agitación mayor (Dijkstra, 2013).

La separación centrífuga no acusó problemas a escala laboratorio. La reacción no incluía la reutilización de enzima, por lo tanto, después de la

inactivación y centrifugación, la fase de gomas obtenida se destinó al análisis de recuperación y rendimiento. Los diseños experimentados se ajustaron a las especificaciones comerciales de las enzimas utilizadas en cuanto a pH y temperatura, y reprodujeron esencialmente condiciones para un potencial proceso a escala industrial, de modo que su concreción y evaluación fue significativa para realizar el estudio de la eficiencia del proceso.

#### 2.2.1.2.1 Estudio de la eficiencia y rendimiento de las reacciones enzimáticas

Para evaluar la eficiencia de los procesos de desgomado enzimático se determinó el contenido de fósforo residual en los lotes de aceite crudo y en los aceites desgomados. La eficiencia de cada proceso de desgomado se estimó en base a su capacidad para reducir el contenido de fósforo usando la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = \frac{(P_i - P_r)}{P_i} \quad (2.1)$$

Donde:

$P_i$  = contenido de fósforo inicial del aceite crudo (mg/kg).

$P_r$  = contenido real de fósforo en los aceites desgomados (mg/kg).

El rendimiento porcentual para reducir el contenido de fósforo se calculó mediante la ecuación 2.2:

$$Rendimiento (\%) = Eficiencia \times 100 \quad (2.2)$$

En la sección 2.2.2.10 se describe la determinación del contenido de fósforo utilizada en las ecuaciones 2.1 y 2.2 para el cálculo de eficiencia y rendimiento.

Si todo el fósforo del aceite crudo se eliminara, el contenido real de fósforo del aceite desgomado sería nulo ( $P_r = 0$ ), la eficiencia alcanzaría su valor máximo (Eficiencia = 1) y se registraría un rendimiento en la reducción del contenido de fósforo igual a 100 %.

Los aceites crudos tienen un valor de acidez libre que indica el grado de deterioro hidrolítico. Por otro lado, los procesos de desgomado usando las enzimas PLA1 y PLA2, debido a sus actividades hidrolíticas sobre las posiciones sn-1 y sn-2 de los fosfolípidos, forman AGL como producto. Por ello, estas enzimas generan un incremento en el valor de acidez libre de los aceites. Además, el contacto del aceite con un buffer que contiene ácido cítrico, usado como vehículo para la enzima, produce un aumento en el valor de acidez del aceite debido al equilibrio de partición del ácido cítrico entre las fases oleosa y acuosa. Así, la acidez libre de un aceite desgomado con PLA1 o PLA2 se podría estimar como:

$$A_{AD} = A_i + \Delta A_{SE} + \Delta A_E \quad (2.3)$$

Donde:

$A_{AD}$  = valor de acidez libre del aceite desgomado con PLA1 o PLA2.

$A_i$  = valor de acidez libre inicial del aceite crudo antes del proceso de desgomado.

$\Delta A_{SE}$  = Aumento del valor de acidez libre generado por el equilibrio de partición del ácido cítrico del buffer entre las fases oleosa y acuosa.

$\Delta A_E$  = Aumento del valor de acidez libre inducido por la reacción enzimática.

Expresando todos los términos de la ecuación en g equivalentes de ácido oleico por cada 100 g de aceite.

El aumento de acidez generado por el equilibrio de partición del ácido cítrico se puede estimar como:

$$\Delta A_{SE} = A_{SE} - A_i \quad (2.4)$$

Donde:

$A_{SE}$  = valor de acidez (g equivalentes de ácido oleico/100 g) del aceite desgomado con buffer en las mismas condiciones que los aceites desgomados enzimáticamente.

Reemplazando la ecuación 2.4 en la ecuación 2.3 se puede estimar el aumento de acidez generado por las reacciones enzimáticas con PLA1 y PLA2:

$$\Delta A_E = A_{AD} - A_{SE} \quad (2.5)$$

Por otro lado, el incremento en el valor de acidez de los aceites desgomados, considerando que todo el fósforo inicial reacciona liberando un mol de AGL como ácido oleico equivalente por cada átomo gramo de fósforo que reacciona, se puede calcular usando la siguiente ecuación:

$$\Delta A_T = P_i \times f \quad (2.6)$$

Donde:

$\Delta A_T$  = Aumento del valor de acidez libre (g de ácido oleico equivalente/100 g) teórico si reacciona todo el fósforo presente inicialmente en el aceite por la acción enzimática.

$f = 9,11 \times 10^{-4}$  = Factor de conversión de los mg/kg de fósforo a g de ácido oleico por cada 100 g de aceite.

La eficiencia de las reacciones con PLA1 se puede medir a partir de las ecuaciones 2.5 y 2.6:

$$Eficiencia = \frac{\Delta A_E}{\Delta A_T} \quad (2.7)$$

La ecuación 2.7 puede usarse para estimar la eficiencia de las reacciones enzimáticas con PLA1 y PLA2 en base a los AGL producidos durante estas reacciones, estimando luego el rendimiento a través de la ecuación 2.2.

Cuando todo el fósforo presente en el aceite reacciona mediante estas reacciones enzimáticas ( $\Delta A_E = \Delta A_T$ ) se alcanzará una eficiencia igual a 1 y un rendimiento igual a 100 %.

En la sección 2.2.2.6 se describe la determinación del contenido de acidez utilizada en las ecuaciones 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7.

### 2.2.1.2.2 Estudio de la recuperación de aceite desgomado y gomas crudas

El rendimiento práctico de los procesos de desgomado se obtuvo experimentalmente midiendo los porcentajes de recuperación de aceite desgomado y gomas crudas (List et al., 2001; Soe & Brown, 2011). Para ello, se pesó una alícuota de la mezcla gomas/aceite desgomado antes de la separación centrífuga en un recipiente previamente tarado. Al finalizar la etapa de centrifugado se procedió a la separación de las fases y pesado de la fase oleosa superior en otro recipiente previamente tarado. La fase acuosa (conteniendo la goma) quedó retenida en la capa inferior, en el recipiente de centrifugado.

La recuperación de aceite desgomado y gomas se calculó usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Aceite Desgomado (\%)} = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (2.8)$$

$$\text{Gomas (\%)} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \times 100 \quad (2.9)$$

Donde:

$m_1$  = masa de muestra (fase oleosa + acuosa) antes de centrifugar en g.

$m_2$  = masa del aceite desgomado post-centrifugado en g.

### 2.2.2 Caracterización del aceite de girasol crudo y de los aceites desgomados

Las muestras de aceite crudo, fueron procesadas y analizadas inmediatamente después de haber sido recibidas, a fin de evitar cambios fisicoquímicos consumados por el almacenaje. La conservación de las mismas hasta su desgomado, se realizó bajo atmósfera de nitrógeno, en la oscuridad y a temperatura de refrigeración (aproximadamente 5 °C).

Los aceites desgomados fueron obtenidos por centrifugación (10 minutos, 2400 x g) después del proceso de desgomado y recuperación de la fase oleosa superior (punto 2.2.1.2.).

### 2.2.2.1 Determinación de la viscosidad

Las medidas de la viscosidad de los aceites crudos y desgomados, se realizaron con un reómetro Anton Paar Physica MCR 301 con una celda P-PTD 200 para cilindros concéntricos. Se utilizó un cilindro interior rotante B-CC27/148/E con 26,66 mm de diámetro y 40 mm de alto y un cilindro externo C-CC27/55 con un diámetro de 28,92 mm.

Los registros de viscosidad se realizaron a 25 ° C para las muestras de aceite crudo y desgomado y se expresaron en mPa s. La temperatura seleccionada corresponde al valor del proceso de centrifugación del aceite previo a la etapa de separación de las fases oleosa y acuosa.

### 2.2.2.2 Determinación de la densidad

Se determinó la masa por unidad de volumen para las muestras de aceite crudo y desgomado a 25 °C, expresada en g/cm<sup>3</sup>, utilizando un picnómetro según el Método Oficial Cc 10c-95 (AOCS, 2009). La temperatura seleccionada corresponde al valor del proceso de centrifugación del aceite previo a la etapa de separación de las fases oleosa y acuosa.

### 2.2.2.3 Determinación del color

Para llevar a cabo esta experiencia se utilizó un colorímetro triestímulo HunterLab UltraScan XE (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA) con una celda de vidrio óptico de 10 mm de espesor. El color total transmitido a través de la muestra se midió con un ángulo de 10° respecto del observador con iluminante D 65. La escala de color de HunterLab es visualmente más uniforme que cualquier otra escala de color. En una escala de color uniforme, las diferencias entre los puntos marcados en el espacio de color corresponden a las diferencias visuales entre los colores representados. Los resultados se expresaron según la escala de valores para los parámetros indicados por el colorímetro HunterLab: "L" (luminosidad: 0 = negro, 100 = blanco), "a" (-a =

verde hasta  $+a = \text{rojo}$ ) y " $b$ " ( $-b = \text{azul}$  hasta  $+b = \text{amarillo}$ ). Para los aceites desgomados se determinaron los cambios de color total ( $\Delta E$ ) y los cambios de cromaticidad ( $\Delta C$ ) respecto a los crudos de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\Delta E = \sqrt{(L)^2 + (a)^2 + (b)^2} \quad (2.10)$$

$$\Delta C = \sqrt{(\Delta a)^2 + (b)^2} \quad (2.11)$$

Donde:

$$\Delta L = L - L_0$$

$L$  y  $L_0$  corresponden al valor de luminosidad para los aceites desgomados y crudo, respectivamente.

$$\Delta a = a - a_0$$

$a$  y  $a_0$  corresponden al valor del parámetro " $a$ " para los aceites desgomados y crudo, respectivamente.

$$\Delta b = b - b_0$$

$b$  y  $b_0$  corresponden al valor del parámetro " $b$ " para los aceites desgomados y crudo, respectivamente.

#### 2.2.2.4 Determinación del contenido de humedad y materia volátil

El análisis consistió en eliminar la humedad y otros componentes volátiles de la muestra, en una estufa de vacío, hasta peso constante, empleando el Método Oficial Ca 2d-25 (AOCS, 2009). Puesto que el agua tiende a depositarse sobre el fondo en las muestras, se tuvo la precaución de homogeneizarlas antes del análisis y así, distribuirla uniformemente. La temperatura de trabajo fue de  $55^\circ\text{C}$ , y la presión interna de vacío de la estufa  $40 \text{ mmHg}$ . Los resultados se expresaron en g de humedad y materia volátil por cada  $100 \text{ g}$  de aceite.

#### 2.2.2.5 Determinación de impurezas insolubles

La determinación de sustancias extrañas en las muestras de aceite crudo, se realizó utilizando el Método Oficial Ca 3a-46 (AOCS, 2009) usando hexano como solvente. El método involucra disolución del aceite en hexano y filtración bajo vacío en embudo de placa de vidrio filtrante. Después de varios lavados con porciones de hexano, se realiza un secado en estufa y pesada del residuo obtenido. Los resultados se expresaron como g de materia insoluble por cada 100 g de muestra.

#### **2.2.2.6 Determinación de la acidez libre**

Para evaluar el valor de acidez libre se utilizó el método IUPAC 2.201 (IUPAC, 1992). Esta norma tiene por objeto determinar los ácidos grasos libres contenidos en grasas y aceites, animales y vegetales. El método consiste en disolver el aceite en una mezcla alcohol/éter etílico y titularlo con una solución valorada de hidróxido de potasio alcohólico en frío, usando fenolftaleína como indicador.

La acidez libre es una expresión convencional del porcentaje de AGL referidos a un ácido graso en particular (ácido oleico en el caso de aceites de girasol). Los resultados se expresaron en g de ácido oleico por cada 100 g de aceite.

#### **2.2.2.7 Determinación del valor de peróxidos**

Para la determinación del Valor de Peróxidos *VP* se utilizó el Método Oficial Cd 8-53 (AOCS, 2009). Este método determina todas las sustancias que oxidan el yoduro de potasio en las condiciones del ensayo, en términos de miliequivalentes de peróxidos (mEq) contenidos en 1 kg de muestra ensayada. Se supone que las sustancias determinadas son peróxidos u otros productos primarios similares de la oxidación del aceite. Durante la oxidación el VP presenta un máximo y luego disminuye, ya que los peróxidos comienzan a descomponerse dando origen a productos secundarios, como aldehídos y cetonas. Este método se aplica a estados de rancidez incipientes o medianamente avanzados. Si el estado de oxidación es muy avanzado, los resultados pueden ser erróneos.

La técnica consiste en una titulación yodométrica y se basa en la capacidad oxidante de los peróxidos para liberar yodo del yoduro de potasio en las condiciones del ensayo. El yodo liberado se titula con una solución estandarizada de tiosulfato de sodio, utilizando una solución de almidón como indicador.

### 2.2.2.8 Determinación del valor de p-anisidina

Este indicador del proceso de oxidación de los aceites, mide los productos secundarios de oxidación, fundamentalmente 2-alquenaes y 2,4-dialquenaes con dobles enlaces conjugados con el grupo carbonilo, derivados de la descomposición de los hidroperóxidos. Estos aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, con dobles enlaces conjugados, incrementan 4 a 5 veces la absorptividad molar del producto obtenido. La intensidad de color de los productos de reacción, depende no sólo de la concentración de aldehídos presentes en el aceite, sino también del tipo de aldehído (2-alquenaes y 2,4-dialquenaes absorben más que los otros aldehídos).

El procedimiento analítico usado fue el Método Oficial Cd 18-90 (AOCS, 2009) que se basa en que los componentes aldehídicos del aceite disuelto en isooctano como solvente, reaccionan con p-anisidina (p-metoxi anilina) en medio de ácido acético glacial, para dar un producto de color amarillo con un máximo de absorción a 350 nm.

El Valor de p-Anisidina  $VA$  se define por convención como, 100 veces la absorbancia medida a 350 nm, en una cubeta de 1 cm de paso de luz, conteniendo una solución con 1,00 g de aceite en 100 mL de mezcla solvente-reactivo, en las condiciones descriptas por el método.

### 2.2.2.9 Valor de Oxidación Total

El Valor de Oxidación Total (*Valor TOTOX* por sus siglas en inglés) combina ambas determinaciones ( $VP$  y  $VA$ ) y se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Valor TOTOX} = 2 \times VP + VA \quad (2.12)$$

Donde:

$VP$  = Valor de Peróxidos (determinado como se indicó en el punto 2.2.2.7).

$VA$  = Valor de *p*-Anisidina (determinado como se indicó en el punto 2.2.2.8).

#### **2.2.2.10 Determinación del índice de estabilidad oxidativa (Rancimat)**

El índice de estabilidad oxidativa (Oxidative Stability Index, OSI) es una medida de la resistencia a la oxidación que presenta un aceite sometido a un ensayo de oxidación acelerada. Este ensayo se realiza a elevada temperatura y flujo de aire y se basa en la determinación de la conductividad en agua de elevada pureza de los productos volátiles de la degradación oxidativa, principalmente ácido fórmico. En primera instancia, la velocidad de oxidación es baja hasta que se vence la resistencia a la oxidación y el proceso se acelera notablemente. Este período, llamado “tiempo de inducción”, es una medida de la resistencia a la oxidación, o Índice de Estabilidad Oxidativa (OSI). De este modo, es posible estimar este tiempo, que es el punto de máximo cambio en la conductividad o velocidad de oxidación. Matemáticamente, se lo define como el máximo de la derivada segunda de la conductividad con respecto al tiempo. El método “Rancimat” es de uso generalizado en la actualidad como una versión automatizada del método AOM (Active Oxygen Method), y puede medir el tiempo de inducción de una muestra a una dada temperatura y bajo un dado caudal de aire.

Las muestras de aceite se sometieron a oxidación acelerada en un equipo Rancimat (Metrohm) modelo 679 de acuerdo al Método Oficial AOCS Cd 12b-92 (AOCS, 2009). Las medidas fueron realizadas a una temperatura de 110°C con burbujeo continuo de una corriente de aire a una velocidad de 20 L/h. Los resultados se expresaron como tiempo de inducción en horas.

#### **2.2.2.11 Determinación del contenido de fósforo**

Se utilizó el Método Oficial espectrofotométrico Ca 12-55 (AOCS, 2009) que determina fósforo de origen orgánico e inorgánico en un aceite. La muestra se calcinó en presencia de óxido de zinc como catalizador y las cenizas

obtenidas del tratamiento a 550°C durante 2 horas en una mufla, se retomaron con ácido clorhídrico. Los iones ortofosfato presentes reaccionaron con molibdato de amonio para formar un compuesto de fosfomolibdato. Este compuesto se redujo a azul de molibdeno con sulfato de hidrazina y se midió su absorbancia a 650 nm.

La concentración de fósforo se determinó usando una curva de calibración realizada con diferentes concentraciones de fosfato inorgánico. Los resultados se expresaron como mg de fósforo por kg de aceite.

#### **2.2.2.12 Determinación del contenido de fosfolípidos**

La Cromatografía Líquida de Alta Performance o HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography), ha sido y continúa siendo la técnica más difundida en el análisis de fosfolípidos. Entre los métodos oficiales de AOCS sólo se incluyen técnicas de TLC (Thin Layer Chromatography) y HPLC-UV (Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a detector UltraVioleta) en el análisis de fosfolípidos.

Los fosfolípidos presentes en el aceite se concentraron y se separaron de los lípidos neutros mediante Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction, SPE) empleando cartuchos de extracción de fase diol de 0,500 g (J. T. Baker) siguiendo el procedimiento descrito por Carelli et al. (1997). Los fosfolípidos totales e individuales se cuantificaron por el método del estándar externo mediante cromatografía líquida empleando detector UV, según la norma para lecitinas de soja Ja 7b-91 (AOCS, 2009).

##### *Obtención del concentrado de fosfolípidos*

El cartucho de extracción fue previamente acondicionado mediante el pasaje de 2 mL de metanol, 2 mL de cloroformo y 4 mL de n-hexano, respetando este orden.

La muestra se preparó pesando aproximadamente 2,5 gramos de aceite en un matraz de 10 mL y llevando a volumen con cloroformo. De esta solución

se tomó una alícuota correspondiente a 50–150 mg de aceite y se sembró en el cartucho.

Los lípidos neutros fueron eluidos con 2,5 mL de cloroformo. Luego, los fosfolípidos se extrajeron con 7 mL de metanol conteniendo 0,5 mL/100 mL de solución hidróxido de amonio al 25%. Se recogieron en un recipiente de fondo cónico y el solvente se eliminó bajo corriente de nitrógeno. Luego, el residuo se llevó a 100  $\mu$ L con la fase móvil empleada en el análisis cromatográfico.

### *Análisis Cromatográfico*

La Tabla 2.7 muestra las condiciones de los análisis cromatográficos.

**Tabla 2.7-** Condiciones de trabajo empleadas en la determinación de fosfolípidos

<b>Cromatógrafo:</b>	HPLC Waters e2695 Alliance
<b>Columna:</b>	EC 250/4.6 Nucleosil 50-5 C18 de Macherey-Nagel
<b>Detector:</b>	Waters 2998 Photodiode Array Detector 206 nm(PDA)
<b>Fase móvil:</b>	Hexano/ Isopropanol/ buffer acetato-ácido acético pH=4,2 (8:8:1, v/v/v)
<b>Velocidad de flujo:</b>	2 mL/ min
<b>Volumen de inyección:</b>	10 $\mu$ L
<b>Procesador de datos:</b>	Milenium 2010 (Millipore Corporation)

### *Curvas de Calibrado*

Se utilizaron los siguientes patrones externos de fosfolípidos (Sigma, Missouri, USA) disueltos en la fase móvil en concentraciones variables (0,1-4,0 mg/mL).

*PE: L-  $\alpha$  – fosfatidiletanolamina de soja (98%)*

*AP: L-  $\alpha$  – sal de sodio del ácido fosfatídico de yema de huevo (98%)*

*PI: L-  $\alpha$  –fosfatidilinositol de soja (50%)*

*PC: L-  $\alpha$  – fosfatidilcolina de soja (98%)*

### *Cálculos*

El contenido de cada fosfolípido (*PL*), expresado como porcentaje en masa, se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$PL \left( \%, \frac{m}{m} \right) = \frac{[PL] \cdot V}{m} \cdot 100 \quad (2.13)$$

Dónde:

$[PL]$  = concentración de fosfolípido en mg/mL, determinada a partir de la curva de calibración.

$V$  = volumen total del concentrado de fosfolípidos en mL que constituye la muestra a inyectar en el sistema HPLC = 0,1 mL.

$m$  = masa de la muestra colocada en el cartucho de extracción expresada en mg.

#### 2.2.2.13 Determinación del contenido de ceras por cromatografía

La técnica utilizada está basada en la norma para aceite de Oliva (COI, 2003) adaptado a aceites de girasol (Carelli et al., 2002b), y consiste en el fraccionamiento del aceite y el estándar interno, mediante cromatografía en columna de gel de sílice hidratado; seguida de la recuperación de la fracción de polaridad inferior a los triglicéridos, la cual es secada y diluida con n-heptano. Finalmente, se realiza el análisis por Cromatografía Gaseosa Capilar con inyector on-column y detector de ionización de llama.

##### *Preparación de las soluciones de estándares*

Se emplearon los siguientes estándares (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)).

C32: Laurato de araquidilo ( $C_{32}H_{64}O_2$ ), 99% de pureza

C34 Palmitato de estearilo ( $C_{34}H_{68}O_2$ ) pureza 99%

C36: Estearato de estearilo ( $C_{36}H_{72}O_2$ ) pureza 99%

C38: Araquidato de oleilo ( $C_{38}H_{74}O_2$ ), 99% de pureza

C40: Araquidato de araquidilo ( $C_{40}H_{80}O_2$ ), 99% de pureza

C42: Araquidato de behenilo ( $C_{42}H_{84}O_2$ ) 99% de pureza

C44: Behenato de behenilo ( $C_{44}H_{88}O_2$ ), 99% de pureza

#### *Solución I (mezcla de estándares de ceras)*

Empleada para el análisis cualitativo permitiendo la identificación de los picos correspondientes a ceras en los cromatogramas por comparación de sus tiempos de retención con los de esta mezcla. Se preparó pesando con precisión =  $\pm 0,1$  mg) aproximadamente 10 mg de los estándares de C32 a C44, los que se diluyeron hasta 10 mL con heptano grado cromatográfico.

#### *Solución II (estándar interno)*

Se pesó con precisión =  $\pm 0,1$  mg aproximadamente 25 mg de laurato de araquidilo (C32) y se llevó a un volumen de 25 mL con n-hexano grado cromatográfico en matraz aforado. De esta solución madre se tomaron 5 mL y se diluyeron a 25 mL.

#### *Solución de colorante (Sudán I)*

Utilizada para visualizar la finalización de la elución de ceras en la cromatografía de columna. Se preparó una solución al 1% en n-hexano (1 g en 100 mL) del colorante Sudán I.

#### *Acondicionamiento de la sílica gel*

Aproximadamente 100 g de sílica gel (tamaño de partícula = 0,063 - 0,200 mm, 70-230 mesh, Merck N° 7754) se colocaron en una cápsula de porcelana, que luego se llevó a una mufla durante 4 horas, a una temperatura de 500 °C. Seguidamente se retiró y se dejó enfriar en desecador. Se la pesó y colocó en frasco color caramelo, se añadió un 2% en peso de agua, y se agitó vigorosamente 15 minutos. Antes de su uso, se mantuvo en reposo por un tiempo de 12 horas.

#### *Preparación de la columna*

En una columna de vidrio para cromatografía de 15 mm de diámetro interior, 40 cm de longitud y robinete de teflón, se colocaron 15 mL de n-hexano

y se introdujo un tapón de algodón tipo quirúrgico con la ayuda de una varilla, procurando eliminar las burbujas de aire. A continuación se introdujeron 15 gramos de gel de sílice hidratado al 2% suspendido en hexano. La columna fue oscilada para eliminar posibles burbujas de aire y nivelar la superficie de la sílica que queda retenida en la columna. Se eluyeron 30 mL de n-hexano para eliminar posibles impurezas.

### *Cromatografía en columna*

Se pesaron en balanza de precisión ( $\pm 0,1$  mg) aproximadamente 500 mg de aceite, previamente calentando a  $80^{\circ}\text{C}$  para disolver posibles ceras precipitadas e inmediatamente se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de la solución II (estándar interno) para los aceites crudos, y 1000  $\mu\text{L}$  para los aceites desgomados, y dos gotas de la solución de colorante. La muestra así preparada, se transfirió a la columna de cromatografía con ayuda de dos porciones de 2 mL de n-hexano. El disolvente se dejó fluir hasta que se situó aproximadamente 1 mm por encima de la fase sólida del absorbente. A continuación se inició la elución cromatográfica con n-hexano: éter etílico para cromatografía, en la relación (98,5:1,5 v/v) a una velocidad de elución de 3 mL/min. Cuando el frente del colorante se acercó a aproximadamente 2 cm de la base de la columna, el proceso se consideró finalizado. El colorante Sudán I posee un frente de avance comprendido entre las ceras y los triglicéridos, lo que permite visualizar la completa elución de las ceras. La temperatura ambiente para la elución de las ceras se debe mantener en  $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el solvente de la fracción resultante en evaporador rotatorio a  $40^{\circ}\text{C}$  bajo vacío y se recuperó con hexano y trasvasó a un vial de fondo cónico. Se llevó a sequedad con una corriente de  $\text{N}_2$  y se diluyó con n-heptano de grado cromatográfico para su análisis cromatográfico gaseoso.

### *Análisis cromatográfico*

Las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla 2.8.

**Tabla 2.8-** Condiciones de trabajo empleadas en la determinación de ceras

<b>Cromatógrafo gaseoso</b>	Perkin Elmer AutoSystem XL
<b>Columna</b>	Capilar de sílica fundida, fase estacionaria HP5 (5% difenil – 95% dimetil-polisiloxano), 15 m x 0,32 mm, espesor film = 0,52 µm (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)
<b>Detector</b>	FID a 350 °C
<b>Gas Carrier</b>	H <sub>2</sub> , 3 mL/min, presión en la cabeza de la columna: 8 psi
<b>Inyector</b>	“On-Column” (80 °C – 40°C/ min – 320 °C)
<b>Volumen de inyección</b>	2 µL
<b>Temperatura de columna</b>	80°C (1 min) – 20 C°/ min – 240 °C – 5 °C/min – 325 °C (6 min) – 20°C/min – 340 °C (10 min)
<b>Procesador de datos</b>	TotalChrom Workstation Version 6.3.1 (Perkin Elmer, MA, USA)

#### 2.2.2.14 Determinación de los contenidos de calcio, magnesio, hierro y cobre por espectrometría de emisión de plasma

El principio de análisis consiste en eliminar la materia orgánica por incineración de la muestra y disolver el residuo en ácido clorhídrico diluido. La solución obtenida se nebuliza en un equipo de emisión atómica midiéndose la emisión del metal a la longitud de onda específica.

Se pesaron  $5 \pm 0,001$  g de muestra en un crisol de porcelana. Se colocó el crisol en una camisa calefactora, bajo campana, hasta que cesó el desprendimiento de humo y la muestra apareció totalmente carbonizada. Se llevó a la mufla a 550 °C hasta cenizas blancas.

Se trató las cenizas con 5 mL de HCl 6 N hasta humedecerlas totalmente y a continuación se desecó cuidadosamente sobre una placa calefactora a temperatura moderada. Luego, se añadieron 15 mL de HCl 3 N y se calentó el crisol sobre la placa calefactora hasta que la solución comenzó a hervir. Se enfrió y filtró a través de papel Whatman N° 541 en matraz volumétrico de 100 mL. Se lavó el residuo con agua y se filtró recogiendo los

lavados en el matraz. Se enfrió y se enrasó a volumen con agua destilada. Las muestras fueron analizadas por Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma con Acoplamiento Inductivo (ICP-AES) mediante el método 6010C (EPA, 2007), en el Laboratorio de Análisis Químicos (LANAQUI), CERZOS (CONICET-UNS), con un equipo Shimadzu ICP-9000 que es un espectrómetro simultáneo, no secuencial que permite analizar al mismo tiempo varios elementos, posibilitando la elección de longitudes de onda no interferidas.

### **2.2.3 Determinación de características químicas de las gomas**

#### **2.2.3.1 Determinación de materia insoluble en hexano**

El contenido de materiales insolubles en hexano (IH) se determinó en las gomas resultantes mediante el Método Oficial Ja 3-87 (AOCS, 2009). El método involucra disolución de la goma en hexano, filtración bajo vacío en embudo de placa de vidrio filtrante, secado en estufa y pesada del residuo obtenido. Los resultados se expresaron como g de materia insoluble por cada 100 g de muestra. La materia insoluble en hexano incluye tierra, harina y otras sustancias extrañas.

#### **2.2.3.2 Determinación de material insoluble en acetona**

Se determinó el material insoluble en acetona (IA) en las gomas resultantes mediante el Método Oficial Ja 4-46 (AOCS, 2009). Este método consiste en realizar sucesivas extracciones de la muestra con acetona fría (0-5 °C) saturada con material insoluble en acetona purificado, sobre baño de hielo con períodos de agitación y luego de reposo. Posteriormente, se obtuvo el residuo insoluble en acetona por centrifugación y secado en estufa hasta masa constante. El porcentaje (m/m) de material insoluble en acetona se calculó mediante la diferencia entre el porcentaje de residuo seco obtenido mediante este procedimiento y el porcentaje de material insoluble en hexano obtenido mediante el método indicado en el punto 2.3.1 de este capítulo.

#### **2.2.3.3 Determinación de humedad y materia volátil**

Se determinó la humedad y la materia volátil contenidas en las gomas resultantes de los procesos de desgomado con enzimas en condiciones optimizadas, y en el desgomado acuoso. La determinación se realizó con una termobalanza Sartorius MA-35 a 55° C. Los resultados se expresaron como g de humedad y materia volátil por cada 100 g de muestra.

#### 2.2.3.4 Determinación de aceite ocluido

El porcentaje de aceite ocluido o perdido en la fase de gomas se estimó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Aceite ocluido (\%)} = 100 - (H + IH + IA) \quad (2.14)$$

Donde:

$H$  = humedad y materia volátil de las gomas obtenidas (%).

$IH$  = materia insoluble en hexano (%).

$IA$  = material insoluble en acetona (%).

#### 2.2.4 Análisis estadístico

Las determinaciones analíticas sobre el aceite crudo fueron realizadas por duplicado, excepto las determinaciones cromatográficas (fosfolípidos, esteroides y ceras) que se hicieron por duplicado, inyectando dos veces cada réplica en el cromatógrafo.

Todos los ensayos de desgomado con reactor "batch" de 100 mL de capacidad fueron realizados por duplicado. Las determinaciones analíticas sobre las muestras de aceite desgomado que involucraron análisis de fósforo residual y acidez libre fueron realizadas por duplicado de las réplicas independientes de los ensayos de desgomado.

El análisis estadístico aplicado al diseño experimental para la optimización de las variables de procesamiento del desgomado enzimático, minimizando el contenido de fósforo residual como respuesta, se describió en este Capítulo (punto 2.2.1.2.).

Para los ensayos de desgomado utilizando el reactor de 1000 mL de capacidad, se procesó una sola muestra. Para evaluar la eficiencia de los procesos de desgomado enzimático, se realizaron determinaciones de fósforo residual y acidez libre por triplicado sobre las muestras de aceite obtenidas. Para los análisis de calidad y estabilidad de los aceites desgomados a tiempo final, se procedió de igual forma que la indicada para los análisis del aceite crudo. Las determinaciones analíticas sobre las borras obtenidas a tiempo final fueron realizadas por cuadruplicado.

Los resultados se expresaron como valor medio  $\pm$  desvío estándar. Las diferencias entre los valores medios fueron consideradas significativas a valor  $p \leq 0,05$ , mediante ANOVA (Oneway Analysis of Variance), utilizando el ajuste del test de Duncan calculado con el Software InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

**CAPÍTULO III:**  
**CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.**  
**EFICIENCIA Y RENDIMIENTO DE LAS**  
**REACCIONES ENZIMÁTICAS Y LOS PROCESOS**  
**DE DESGOMADO**

### 3.1. Caracterización de los aceites de girasol crudos de extracción

Las determinaciones para caracterizar la materia prima fueron realizadas para todos los lotes de aceite de extracción con los que se efectuaron los experimentos en la presente tesis. Los resultados de los parámetros químicos evaluados se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1-** Caracterización de los aceites de girasol crudos. Parámetros químicos

Muestra	Humedad y Mat. Volátil (%)	Acidez Libre <sup>1</sup> (%)	Impurezas Insolubles (%)	Fósforo (mg/kg)
Lote 1	0,1206 <sup>b</sup> ± 0,0081	1,20 <sup>b</sup> ± 0,04	0,0870 <sup>b</sup> ± 0,003	592,0 <sup>b</sup> ± 7,9
Lote 2	0,0930 <sup>a</sup> ± 0,0083	1,09 <sup>a</sup> ± 0,02	0,0871 <sup>b</sup> ± 0,0028	487,1 <sup>a</sup> ± 9,8
Lote 3	0,1093 <sup>a,b</sup> ± 0,0063	1,02 <sup>a</sup> ± 0,01	0,0717 <sup>a</sup> ± 0,0050	476,0 <sup>a</sup> ± 12,7

<sup>1</sup> Expresada como ácido oleico.

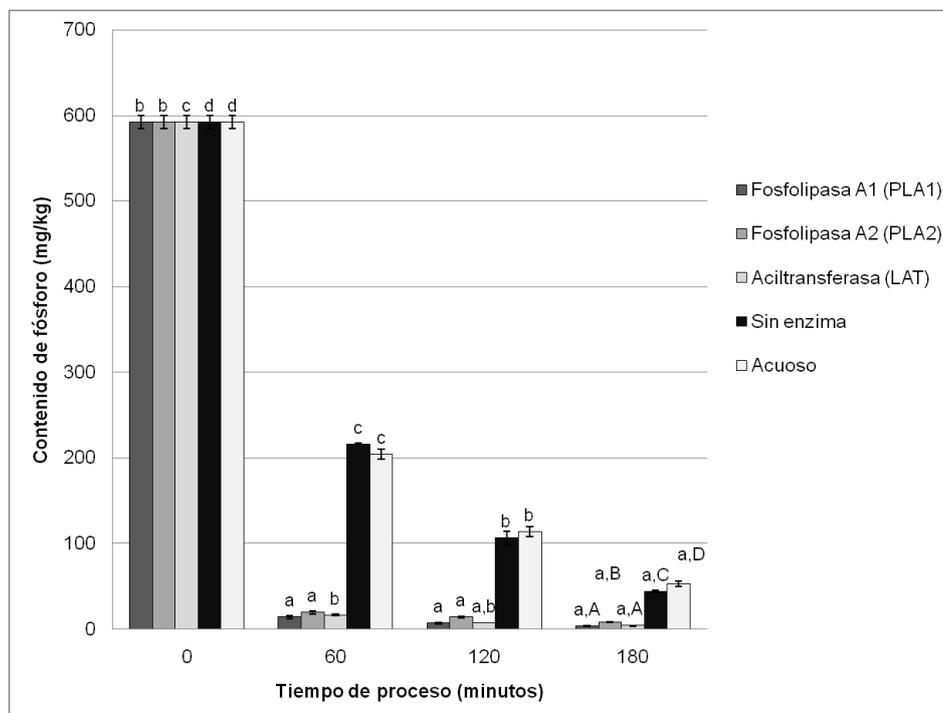
Valores medios de dos réplicas analizadas por duplicado ± desviación estándar. Valores medios seguidos por igual letra en una misma columna no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

El lote 1 presentó un mayor contenido de fósforo, sin embargo los tres lotes presentaron contenidos de fósforo en el rango 342-657 mg/kg, observado previamente para aceites de girasol crudos obtenidos mediante extracción con hexano en la misma planta de procesamiento y del mismo origen geográfico (Carelli et al., 2002a). El lote 1 también presentó mayor acidez, aunque los tres lotes se ajustaron a los valores de acidez libre medidos en un estudio previo, ubicados entre 1,95 y 3,34 mg de hidróxido de potasio por gramo de aceite o 0,98 y 1,68 g de ácido oleico/100 g de aceite (Bredan et al., 2000). El mayor contenido de humedad del lote 1 es consistente con su mayor acidez, dado que es conocido que la acidez libre en los aceites crudos se origina a partir del deterioro hidrolítico mediante la acción de lipasas.

### 3.2. Estudio de la eficiencia y el rendimiento de las reacciones enzimáticas

#### 3.2.1. Desgomado usando el sistema de tres reactores batch (100 mL) en paralelo

En la Figura 3.1 se muestran los contenidos de fósforo residual obtenidos mediante experiencias de desgomado enzimático empleando el sistema de reactores batch en paralelo, aceite crudo (Lote 1) y las enzimas PLA1, PLA2 y LAT. Se ensayaron tres tiempos de reacción 60, 120 y 180 min.



**Figura 3.1-** Evolución de los contenidos de fósforo residual para los procesos de desgomado enzimático, sin enzima (con buffer) y acuoso.

Equipo: tres reactores batch (100 mL) en paralelo, Desgomados Enzimáticos: PLA1, PLA2 y LAT (200 U/kg), temperatura = 50 °C, pH del buffer = 5, relación buffer/sustrato = 2 % v/m, desgomado sin enzimas: sólo con buffer en iguales condiciones que los desgomados enzimáticos, desgomado acuoso: agua = 3 % v/m, temperatura = 60 °C, masa inicial de aceite 50 g.

Valores medios de dos réplicas analizadas por duplicado  $\pm$  desviación estándar.

Valores medios seguidos por igual letra minúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para cada proceso.

Valores medios seguidos por igual letra mayúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para tiempos de desgomado de 180 min.

Los contenidos de fósforo residual para ensayos de desgomado sin enzima (realizados sólo con buffer en las mismas condiciones) y de desgomado acuoso para los mismos tiempos de ensayo se pueden observar también en la Figura 3.1.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados del ANOVA doble usando procesos y tiempos como fuentes de variación y contenido de fósforo residual como variable dependiente. Se observaron diferencias significativas entre procesos y entre tiempos ( $p < 0,0001$ ) y además una interacción significativa ( $p < 0,0001$ ) entre ambos.

**Tabla 3.2-** ANOVA para los contenidos de fósforo residual (mg/kg) durante los procesos de desgomado enzimático, sin enzima y acuoso

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F	Valor-p
Modelo	2303741	19	121250	5266	< 0,0001
Tiempo (min)	2184867	3	728289	31629	< 0,0001
Proceso	68230	4	17058	741	< 0,0001
Tiempo x Proceso	50644	12	4220	183	< 0,0001
Error	461	20	23		
Total	2304201	39			

Las enzimas cuyas actividades primarias involucran la hidrólisis de los grupos acilos de los fosfolípidos, PLA1 y PLA2, se caracterizaron por una disminución brusca del contenido de fósforo residual en los primeros 60 min de desgomado (Figura 3.1). La enzima PLA1 fue capaz de reducir el contenido de fósforo residual por debajo de 10 mg/kg ( $7,0 \pm 0,5$  mg/kg) a los 120 min, observándose valores inferiores a 5 mg/kg a tiempos de reacción de 180 min ( $3,9 \pm 0,2$  mg/kg). Sin embargo, PLA2 requirió más tiempo de reacción para bajar el contenido de fósforo del aceite desgomado por debajo de 10 mg/kg ( $8,3 \pm 0,7$  mg/kg a tiempo = 180 min). A pesar que el tiempo mínimo de reacción requerido para alcanzar un desgomado hasta 10 o 5 mg/kg depende del contenido inicial de fósforo, PLA1 demostró ser más eficiente que PLA2 a lo largo del tiempo. Esto fue confirmado con los valores de rendimiento porcentual estimados para estas dos enzimas (Tabla 3.3). A los 180 min, PLA1 mostró un rendimiento de reducción del contenido de fósforo igual a 99,3 % y PLA2

98,6 %. Cabe aclarar que estos ensayos fueron realizados con el lote de aceite crudo con mayor contenido de fósforo inicial (592,0 mg/kg). En todos los tiempos de reacción estudiados, el rendimiento para reducir el contenido de fósforo fue mayor con PLA1 que con PLA2.

**Tabla 3.3-** Rendimiento de las reacciones de desgomado enzimático, sin enzima y acuoso para reducir el contenido de fósforo

Proceso	Tiempo (min)	Rendimiento (%)
<b>Desgomado</b>	60	97,6
<b>Con</b>	120	98,8
<b>Fosfolipasa A1 (PLA1)</b>	180	99,3
<b>Desgomado</b>	60	96,7
<b>con</b>	120	97,6
<b>Fosfolipasa A2 (PLA2)</b>	180	98,6
<b>Desgomado</b>	60	97,2
<b>Con</b>	120	98,8
<b>Aciltransferasa (LAT)</b>	180	99,3
<b>Desgomado</b>	60	63,6
<b>Sin</b>	120	82,0
<b>Enzima</b>	180	92,5
<b>Desgomado</b>	60	65.4
<b>Acuoso</b>	120	80.8
	180	91.1

Los rendimientos porcentuales fueron obtenidos aplicando las ecuaciones 2.1 y 2.2 y usando los contenidos de fósforo promedios.

La enzima LAT mostró también una cinética de disminución significativa del contenido de fósforo en los primeros 60 min de reacción y luego se comportó como la enzima PLA1, produciendo aceites desgomados con contenidos de fósforo residual iguales a  $7,2 \pm 0,1$  mg/kg cuando se desarrolló la reacción enzimática durante 120 min y  $4,2 \pm 0,3$  mg/kg para tiempos de reacción de 180 min (Figura 3.1). La reacción con esta enzima, a los 180 min, redujo los contenidos de fósforo de los aceites con un alto rendimiento porcentual (99,3 %) igual al alcanzado con PLA1 para el mismo tiempo de reacción (Tabla 3.3).

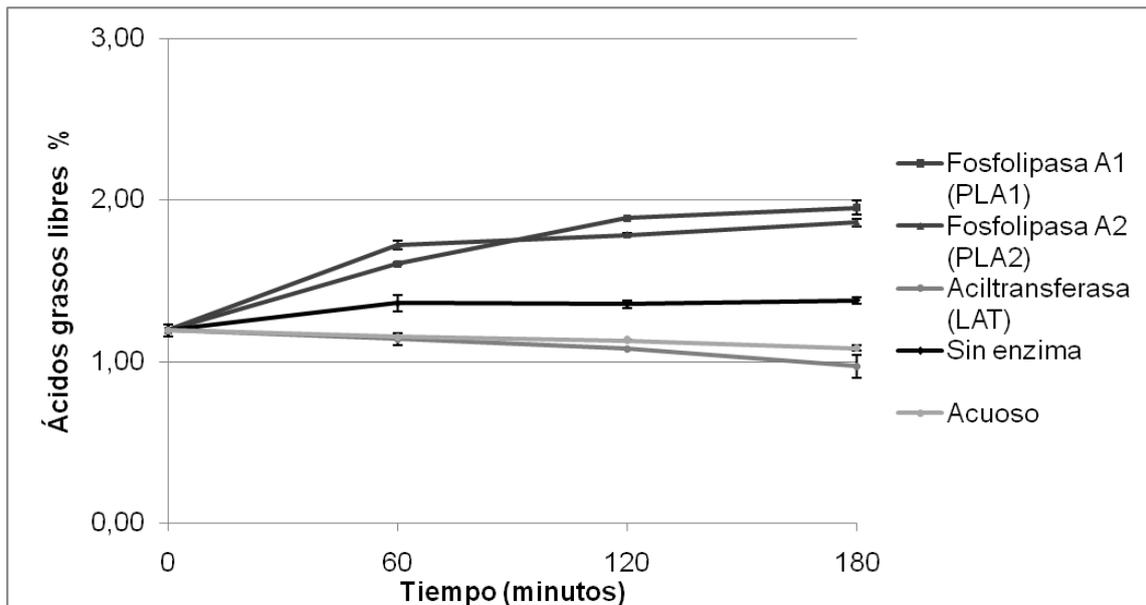
Los procesos de desgomado sin enzima y acuoso fueron menos efectivos que los procesos enzimáticos para reducir los contenidos de fósforo residual del aceite (Figura 3.1). Si el proceso se dejaba progresar durante 180 min, el aceite desgomado sin enzima presentaba menor contenido de fósforo ( $43,9 \pm 1,9$  mg/kg) que el desgomado con agua ( $52,8 \pm 3,1$  mg/kg). Es conocida la acción de desgomado que ejercen los ácidos, como el ácido cítrico, presente en el buffer usado en estos ensayos (Dijkstra, 1994). Ello justifica el menor contenido de fósforo del aceite desgomado con buffer en comparación al desgomado con agua. Para tiempos = 180 min, los rendimientos de reducción del contenido de fósforo fueron 92,5 % y 91,1 % para el desgomado sin enzima y acuoso, respectivamente (Tabla 3.3).

Para medir la eficiencia de las reacciones enzimáticas, es posible utilizar la medición de subproductos de reacción (Galhardo et al., 2010). Los AGL participan en la reacción cuando se utilizan las enzimas fosfolipasas y esterasas.

En la Figura 3.2 se presenta el contenido de AGL del aceite durante los procesos de desgomado enzimático (PLA1, PLA2 y LAT), sin enzima y acuoso usando el sistema de tres reactores batch (100 mL) en paralelo.

Al igual que para los contenidos de fósforo residual, se observaron diferencias significativas entre procesos y tiempos, así como una interacción tiempo x proceso también significativa para la acidez libre del aceite (Tabla 3.4).

Como puede observarse en la Figura 3.2, cuando el proceso de desgomado se llevó a cabo con el buffer sin enzima, se detectó un incremento en la acidez libre del aceite a los 60 min y luego se mantuvo constante durante el resto del tiempo de proceso. Esto es confirmado por los resultados de la prueba de Duncan de comparación de medias (Tabla 3.5). Estos resultados sugieren que en las condiciones de ensayo, cuando el proceso progresó durante 60 min, se alcanzó el equilibrio de partición del ácido cítrico del buffer entre las fases oleosa y acuosa. Por ello, la acidez libre del aceite desgomado sin enzima permaneció constante después de 60 min de proceso.



**Figura 3.2-** Evolución de los contenidos de AGL para los procesos de desgomado enzimático, sin enzima (con buffer) y acuoso.

Equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Figura 3.1.

Valores medios de dos réplicas analizadas por duplicado  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 3.4-** ANOVA para los contenidos de ácidos grasos libres (g equivalentes de ácido oleico/100 g) durante los procesos de desgomado enzimático, sin enzima y acuoso

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F	Valor-p
Modelo	3,67	19	0,19	182,91	< 0,0001
Tiempo (min)	0,44	3	0,15	137,46	< 0,0001
Proceso	2,29	4	0,57	543,23	< 0,0001
Tiempo x Proceso	0,94	12	0,08	74,16	< 0,0001
Error	0,02	20	$1,1 \times 10^{-03}$		
Total	3,69	39			

El aceite obtenido mediante desgomado acuoso disminuyó los valores promedio de acidez libre durante el desgomado, aunque sólo se detectó una disminución estadísticamente significativa a los 180 min (Figura 3.2 y Tabla 3.5). Estos resultados sugieren que cuando se prolongan los tiempos de desgomado podrían quedar AGL retenidos en la fase acuosa de gomas.

La enzima LAT, actúa transfiriendo los grupos acilo de los PLS a esteroides, formando ésteres de esteroides y no genera AGL durante su reacción. Por ello, no se observaron incrementos en la acidez libre de los aceites durante el proceso de desgomado con LAT (Figura 3.2 y Tabla 3.5). Al igual que para el

desgomado acuoso, se observó una disminución en el contenido de AGL de los aceites desgomados con LAT, que fue significativa a los tiempos de procesamiento más largos (Tabla 3.5). Como ya se ha mencionado para el desgomado acuoso, esto podría ser debido a la retención de AGL en la fase acuosa, cuando los tiempos de procesamiento son muy extendidos. Además, Soe & Brown (2011), informaron en su patente que cualquier compuesto con grupos oxhidrilos, entre los que mencionan a los ácidos de frutas y específicamente al ácido cítrico, puede actuar como aceptor de acilo para esta enzima.

**Tabla 3.5-** Resultados de la prueba de Duncan de comparación de medias ( $\alpha = 0,05$ ) para los contenidos de ácidos grasos libres del aceite desgomado por los diferentes procesos

Proceso	0 min	60 min	120 min	180 min
<b>Fosfolipasa A1 (PLA1)</b>	1,20 <sup>a</sup>	1,61 <sup>b</sup>	1,89 <sup>c</sup>	1,96 <sup>c, D</sup>
<b>Fosfolipasa A2 (PLA2)</b>	1,20 <sup>a</sup>	1,72 <sup>b</sup>	1,79 <sup>b, c</sup>	1,86 <sup>c, D</sup>
<b>Aciltransferasa (LAT)</b>	1,20 <sup>b</sup>	1,14 <sup>b</sup>	1,08 <sup>a, b</sup>	0,97 <sup>a, A</sup>
<b>Sin Enzima</b>	1,20 <sup>a</sup>	1,37 <sup>b</sup>	1,36 <sup>b</sup>	1,38 <sup>b, C</sup>
<b>Acuoso</b>	1,20 <sup>b</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,13 <sup>a, b</sup>	1,09 <sup>a, B</sup>

Valores medios seguidos por igual letra minúscula para cada proceso (filas), no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

Valores medios seguidos por igual letra mayúscula para tiempos de desgomado de 180 min (última columna), no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

Los aceites desgomados con PLA1 y con PLA2 mostraron un incremento en sus valores de acidez libre (Figura 3.2) que en el caso de PLA1 ocurrió durante los primeros 120 min y en el caso de PLA2 prosiguió durante los 180 min (Tabla 3.5). Estas dos enzimas por su actividad de hidrolasas generan AGL como subproducto. Al final de las experiencias de desgomado con estas dos enzimas, los valores promedio de acidez libre fueron más altos para el aceite desgomado con PLA1 pero el análisis estadístico no demostró diferencias significativas con el desgomado usando PLA2 (Tabla 3.5). Winter et al. (1998) informaron incrementos del orden de 0,2 - 0,3 % en la acidez libre de los aceites de colza desgomados con PLA2 de origen pancreático porcino y

aumentos mayores que 0,3 % para los aceites desgomados con fosfolipasas de origen microbiano (*Aspergillus* sp.). J. G. Yang et al. (2006) también detectaron aumentos en la acidez libre de aceites de colza y soja desgomados con Lecitase® Ultra de alrededor de 0,15 %.

La Tabla 3.6 muestra los rendimientos calculados para las reacciones de desgomado con PLA1 y con PLA2 que generan AGL como subproducto. Es posible observar que, para PLA2 durante todo el proceso y para PLA1 hasta los 120 min, los rendimientos son inferiores a los calculados teniendo en cuenta la reducción del contenido de fósforo de los aceites (Tabla 3.3). La menor acidez libre de los aceites desgomados con estas enzimas sugiere actividades secundarias de transacilasa. Abe et al. (2008) estudiaron una PLA2 de macrófagos alveolares de ratones, e informaron actividades de transacilasa capaces de transferir grupos acilos desde sus sustratos naturales PC y PE, hacia alcoholes lipofílicos como ceramida, en condiciones ácidas. Estas actividades se observaron paralelamente a las actividades de PLA2 y lisofosfolipasa (LPL). Una reacción de transacilación de este tipo produciría lisofosfolípidos hidratables, lo que reduciría el contenido residual de fósforo en los aceites, sin generar AGL como subproducto. Las PLB de origen fúngico que catalizan simultáneamente la hidrólisis de PLS en las posiciones sn-1 y sn-2 se comportan también como transacilasas, transfiriendo un AGL a un lisofosfolípido para sintetizar un nuevo PL (Ganendren et al., 2004; Köhler et al., 2006). Este nuevo PL, podría ser hidratable y así, se reduciría el contenido de fósforo residual en los aceites, sin la aparición de AGL como subproducto.

**Tabla 3.6-** Rendimiento porcentual de las reacciones de desgomado enzimático con fosfolipasas (PLA1 y PLA2) medido en base al contenido de AGL del aceite

Proceso	60 min	120 min	180 min
<b>Fosfolipasa A1 (PLA1)</b>	44,5	98,3	107,6
<b>Fosfolipasa A2 (PLA2)</b>	64,9	79,8	89,0

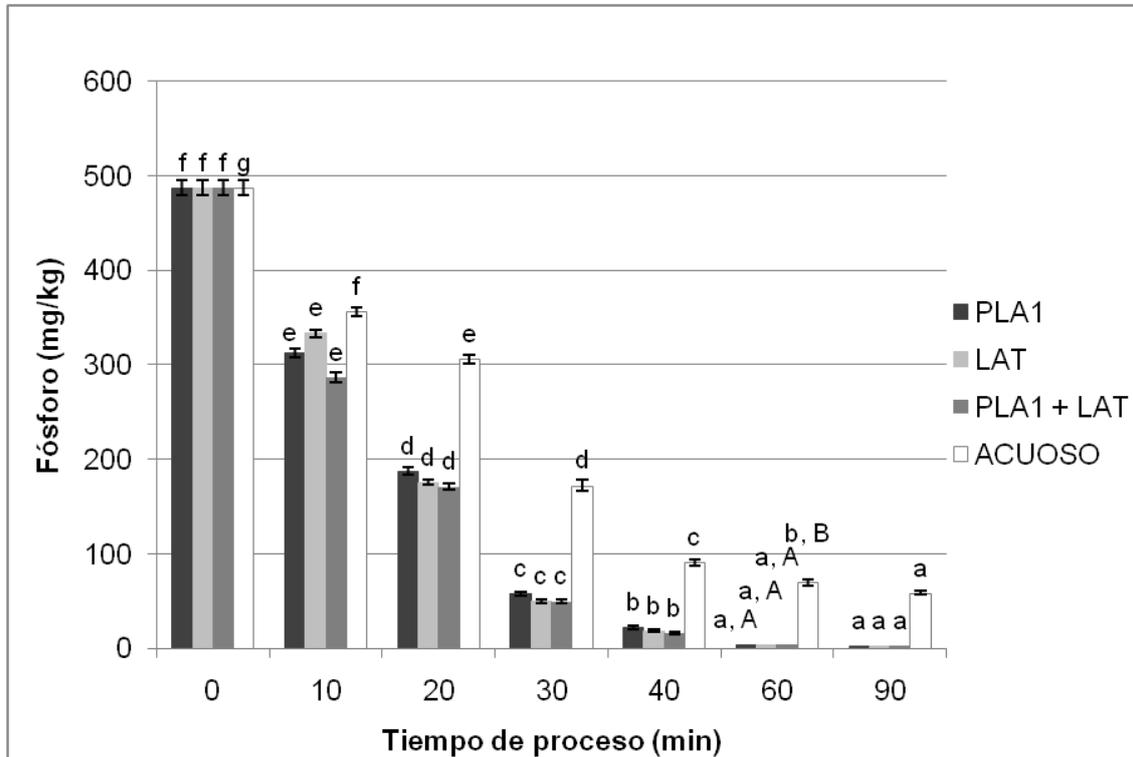
Los rendimientos (%) fueron obtenidos aplicando las ecuaciones 2.7 y 2.2 y usando los valores promedio de acidez libre y contenido inicial de fósforo del aceite.

Por otro lado, también se puede observar que cuando se prolongaba el proceso con PLA1 por 180 min, se observaba un rendimiento mayor que 100 % (Tabla 3.6), estimado en base a los AGL presentes en el aceite. El rendimiento estimado en base a la reducción del contenido de fósforo en estas condiciones fue 99,3 % (Tabla 3.3). Estos resultados sugieren que la PLA1 podría contener actividades de lipasa que generan AGL a partir de los triglicéridos (TGS), aunque dichas actividades no son significativas y sólo se evidenciaron en tiempos de procesamiento prolongados. Estudios realizados con fosfolipasas producidas por hongos del género *Aspergillus* en el desgomado de aceites de colza, demostraron que los preparados enzimáticos de origen microbiano contenían algo de actividad de lipasa adicional (Winter et al., 1998). Clausen (2001) sugirió que estas actividades de lipasa inherentes de las PLA1 microbianas, no afectan el proceso de desgomado y no generan efectos adversos sobre el nivel de AGL de los aceites desgomados. En el caso del aceite de girasol crudo desgomado con PLA1 y con PLA2 en este trabajo de tesis la acidez libre después del desgomado alcanzó un valor máximo de 1,96 g equivalentes de ácido oleico por cada 100 g, que no dificulta la aplicabilidad de cualquier proceso de refinado. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA: United States Department of Agriculture) entre las especificaciones para aceites de girasol crudo fija valores 2,0 - 3,0 % como ácido oleico (USDA, 2013).

### 3.2.2. Desgomado usando un reactor batch (1000 mL)

Estas experiencias fueron planteadas a fin de evaluar las reacciones de desgomado con las enzimas (PLA1 y LAT) que demostraron mayor eficiencia para reducir el contenido de fósforo en el sistema de tres reactores batch de 100 mL en paralelo. Los ensayos se realizaron en las condiciones optimizadas para cada enzima: temperatura, pH del buffer, relación buffer/sustrato y concentración de enzima. El análisis completo del estudio de optimización de las condiciones de trabajo para obtener el menor contenido de fósforo residual con las distintas enzimas se presenta detalladamente en el Capítulo IV. Se evaluó también una mezcla de ambas enzimas en las condiciones optimizadas para PLA1 que resultó ser más exigente que LAT respecto a las condiciones ambientales. Los procesos enzimáticos fueron comparados con un proceso de

desgomado acuoso. Los resultados obtenidos para los contenidos de fósforo residual se muestran en la Figura 3.3.



**Figura 3.3-** Evolución de los contenidos de fósforo residual para los procesos de desgomado enzimático y acuoso.

Equipo: reactor batch (1000 mL) Desgomados Enzimáticos en condiciones optimizadas: PLA1 (200 U/kg, temperatura = 50 °C, pH del buffer = 5, relación buffer/sustrato = 3 % v/m), LAT (190 U/kg, temperatura = 54 °C, pH del buffer = 5,2 relación buffer/sustrato = 1 % v/m), PLA1 + LAT (100 U/kg + 100 U/kg, iguales condiciones que PLA1) y desgomado acuoso: agua = 3 % v/m, temperatura = 60 °C, masa inicial de aceite 1000 g.

Valores medios de una réplica analizada por triplicado  $\pm$  desviación estándar.

Valores medios seguidos por igual letra minúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para cada proceso.

Valores medios seguidos por igual letra mayúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para tiempos de desgomado estudiados.

En todos los procesos enzimáticos se observó una disminución progresiva y significativa del contenido de fósforo residual del aceite durante los primeros 60 min (Figura 3.3). Después de una hora, aunque los contenidos de fósforo no mostraron diferencias significativas, los valores promedio se redujeron lentamente. En los tres procesos enzimáticos, se registraron valores promedio de fósforo por debajo de 5 mg/kg a los 60 min de procesamiento,

siendo estos valores promedio iguales a 4,0 para PLA1 y LAT y 3,7 para la mezcla de ambas enzimas. Sin embargo, la prueba de Duncan no reveló diferencias significativas entre los tres procesos enzimáticos para 60 min de tiempo de reacción (Figura 3.3).

**Tabla 3.7-** ANOVA para los contenidos de fósforo residual (mg/kg) durante los procesos de desgomado enzimático, y acuoso

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F	Valor-p
Modelo	2464856	27	91291	5338	<0,0001
Tiempo (min)	2358640	6	393107	22986	<0,0001
Proceso	77133	3	25711	1503	<0,0001
Tiempo x Proceso	29082	18	1616	94	<0,0001
Error	958	56	17		
Total	2465814	83			

La evolución de los procesos enzimáticos en función del tiempo mostró la misma tendencia que la observada para el sistema de tres reactores batch de 100 mL en paralelo. La diferencia radicó en que, para alcanzar contenidos de fósforo inferiores que 5 mg/kg con un aceite crudo con 592,0 mg promedio de fósforo por kg, como el que se usó en el equipo de tres reactores batch en paralelo, requería un tiempo más largo (180 min). El aceite usado en el reactor batch de 1000 mL, con menor contenido inicial de fósforo requirió sólo 60 min para alcanzar valores de 3,7 - 4,0 mg/kg en promedio.

Los rendimientos de las reacciones enzimáticas para reducir los contenidos de fósforo a valores menores que 5 mg/kg ( $t = 60$  min), fueron estimados en 99,2 % (Tabla 3.8) y no mostraron diferencias con los observados para los tres reactores batch de 100 mL en paralelo (99,3 %). Si en el reactor batch de 1000 mL el proceso se prolonga hasta 90 min se obtienen rendimientos de hasta 99,5 %.

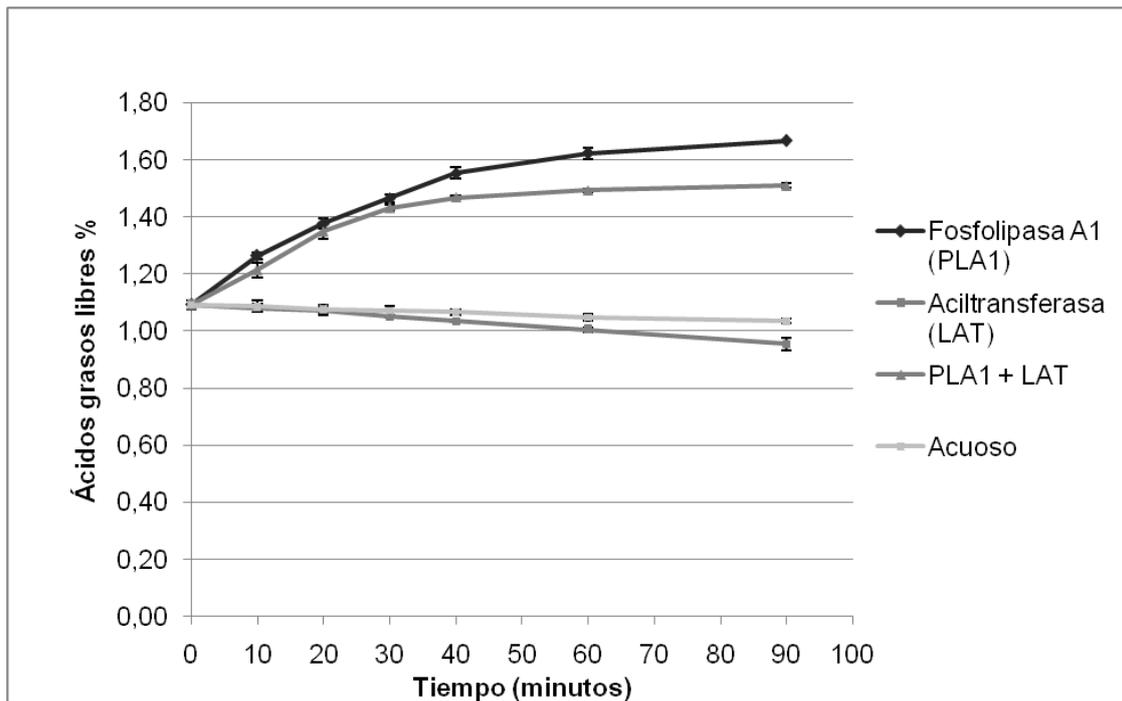
El proceso de desgomado acuoso produjo una disminución significativa en el contenido de fósforo durante los 90 min y fue menos eficiente para reducir el contenido de fósforo que los procesos enzimáticos con un rendimiento máximo de 88,0 % (Figura 3.3 y Tabla 3.8).

**Tabla 3.8-** Rendimiento de las reacciones de desgomado enzimático y acuoso para reducir el contenido de fósforo

Proceso	Tiempo (min)	Rendimiento (%)
<b>Desgomado con Fosfolipasa A1 (PLA1)</b>	10	35,8
	20	61,4
	30	88,2
	40	95,5
	60	99,2
	90	99,4
<b>Desgomado Con Aciltransferasa (LAT)</b>	10	31,8
	20	64,3
	30	89,9
	40	96,2
	60	99,2
	90	99,4
<b>Desgomado Con Fosfolipasa A1 + Aciltransferasa (PLA1 + LAT)</b>	10	41,1
	20	64,9
	30	89,8
	40	96,7
	60	99,2
	90	99,5
<b>Desgomado Acuoso</b>	10	27,0
	20	37,2
	30	64,7
	40	81,3
	60	85,7
	90	88,0

Los rendimientos porcentuales fueron obtenidos aplicando las ecuaciones 2.1 y 2.2 y usando los contenidos de fósforo promedios.

El contenido de AGL del aceite mostró también las mismas tendencias a lo largo del tiempo para los desgomados con PLA1, LAT y acuoso, que aquéllas observadas para el sistema de tres reactores batch de 100 mL (Figura 3.4 y Tabla 3.9). Cuando se usó una mezcla de ambas enzimas se observó un incremento significativo de la acidez libre aunque de menor intensidad que cuando se usó sólo PLA1.



**Figura 3.4-** Evolución de los contenidos de AGL para los procesos de desgomado enzimático y acuoso.

Equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Figura 3.3.

Valores medios de una réplica analizada por triplicado  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 3.9-** Resultados de la prueba de Duncan de comparación de medias ( $\alpha = 0,05$ ) para los contenidos de ácidos grasos libres del aceite desgomado por los diferentes procesos

Tiempo (min)	Proceso			
	PLA1	LAT	PLA1 + LAT	Acuoso
0	1,09 <sup>a</sup>	1,09 <sup>e</sup>	1,09 <sup>a</sup>	1,09 <sup>c</sup>
10	1,26 <sup>b</sup>	1,08 <sup>e</sup>	1,21 <sup>b</sup>	1,09 <sup>c</sup>
20	1,38 <sup>c</sup>	1,07 <sup>d, e</sup>	1,35 <sup>c</sup>	1,08 <sup>b, c</sup>
30	1,46 <sup>d</sup>	1,05 <sup>c, d</sup>	1,43 <sup>d</sup>	1,07 <sup>b, c</sup>
40	1,55 <sup>e</sup>	1,03 <sup>c</sup>	1,47 <sup>e</sup>	1,07 <sup>b, c</sup>
60	1,62 <sup>f, D</sup>	1,01 <sup>b, A</sup>	1,49 <sup>e, f, C</sup>	1,05 <sup>a, b, B</sup>
90	1,67 <sup>g</sup>	0,96 <sup>a</sup>	1,51 <sup>f</sup>	1,03 <sup>a</sup>

Valores medios seguidos por igual letra minúscula para cada proceso (columna) no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

Valores medios seguidos por igual letra mayúscula para tiempos de desgomado de 60 min no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

Cuando el proceso se desarrollaba durante el tiempo necesario para reducir el valor de fósforo residual por debajo de 5 mg/kg ( $t = 60$  min) la acidez

libre se incrementó desde 1,09 hasta 1,62 y hasta 1,49 g equivalentes de ácido oleico/100 g usando PLA1 y PLA1 + LAT, respectivamente. El proceso de desgomado con LAT reducía la acidez libre hasta 1,00 g/100 g en el mismo tiempo de reacción.

En conclusión, en todos los casos estudiados, desarrollando el ensayo con enzimas, los valores obtenidos a partir de los 60 minutos de reacción corresponden a los óptimos para un posterior refinado físico (menos que 5 mg de fósforo/kg).

### 3.2.3. Discusión de los resultados obtenidos

En primer lugar, se debería destacar que en la actualidad son muy pocos los trabajos científicos disponibles sobre desgomado enzimático de aceites de girasol, siendo profusa la bibliografía referida a estos procesos en aceites de soja y colza o canola, como veremos a continuación.

Los primeros estudios de desgomado enzimático de aceites de colza, soja y girasol, crudos y desgomados con agua, realizados en escalas laboratorio e industrial usando PLA2 de origen pancreático porcino, permitieron obtener aceites con contenidos de fósforo residual menores que 10 mg/kg y hasta 4 mg/kg (Buchold, 1995). El proceso denominado EnzyMax® comprendía tres etapas: 1) Ajuste del buffer agregando soluciones de ácido cítrico e hidróxido de sodio al aceite para adecuar el pH al óptimo para la reacción enzimática, 2) Reactor enzimático donde se lleva la mezcla a la temperatura óptima para la reacción y se agrega la enzima y 3) Separación centrífuga de aceite desgomado y gomas. Dependiendo de la eficiencia y calidad del producto deseado se pueden agregar varias etapas de proceso enzimático para ajustar el tiempo de reacción requerido. En estos estudios se concluyó que para obtener aceites con menos de 10 mg/kg los tiempos de reacción variaban sustancialmente (2 - 6 horas). Los aceites de colza crudos requerían tiempos más largos lo que se adjudicó a la adsorción de la enzima sobre las gomas. Para los aceites con más altos contenidos de fosfolípidos se recomendó la aplicación previa de un proceso de desgomado acuoso.

Clausen (2001) estudió el desgomado enzimático a escala laboratorio de aceites de colza crudos (fósforo = 250-600 mg/kg) y desgomados con agua (fósforo = 50-250 mg/kg) comparando una nueva PLA1 de origen microbiano (Lecitase Novo de *Fusarium oxysporum*) y una PLA2 de origen pancreático porcino (Lecitase 10 L). Este proceso incluía: 1) Pre-tratamiento del aceite con solución de ácido cítrico durante 30 min, a la temperatura para la reacción enzimática, 2) Agregado de hidróxido de sodio para formar el buffer y ajustar el pH y 3) Agregado de la enzima. Los aceites desgomados con agua así tratados con la enzima PLA1 durante 2 horas tenían contenidos de fósforo residual menores que 10 mg/kg.

La enzima PLA1 de *Thermomyces lanuginosus* / *Fusarium oxysporum* (Lecitase<sup>®</sup> Ultra) se ha estudiado para un proceso de desgomado enzimático en escala laboratorio de aceites de colza (fósforo = 123,1 mg/kg) y de soja (fósforo = 150,4 mg/kg) (J. G. Yang et al., 2006). Las etapas que integran este proceso son: 1) Desgomado ácido durante 20 min a 80 °C con un buffer ácido cítrico/hidróxido de sodio al pH óptimo de la enzima (pH = 5) y 2) Desgomado enzimático reduciendo la temperatura al valor óptimo para la actividad enzimática (50 °C) y agregando la enzima disuelta en agua. En la etapa de desgomado ácido el contenido de fósforo se redujo hasta aproximadamente 35 mg/kg. Luego de 2 horas de tratamiento enzimático, se lograron valores de fósforo menores que 10 mg/kg y después de 5 horas, el contenido de fósforo se redujo hasta 6 mg/kg en el aceite de soja y hasta 8 mg/kg en el de colza. B. Yang et al. (2006) evaluaron la misma enzima para un proceso de desgomado de aceite de colza con diferentes contenidos de fósforo. El proceso a escala laboratorio estaba integrado por las siguientes etapas: 1) Desgomado ácido intenso con solución de ácido cítrico (45 %) a 80 °C durante 20 min que fue capaz de reducir el nivel de fósforo desde 212,4 hasta 33,5 mg/kg y 2) Desgomado enzimático enfriando el aceite a la temperatura óptima de la enzima, agregando solución de hidróxido de sodio y agua para ajustar el pH a su valor óptimo y agregando por último la enzima. En condiciones optimizadas de dosis de enzima (39,6 mg/kg), pH (4,9) y temperatura (48,3 °C) se necesitaron 6 horas de proceso enzimático para reducir el nivel de fósforo del aceite a 3,3 mg/kg. En este trabajo se describe también una prueba piloto para

procesamiento continuo de un aceite de colza (17 tn/h) con un contenido inicial de fósforo de 120,5 mg/kg y los siguientes caudales: 20 L/h de solución de ácido cítrico al 45 %, 8,8 L/h de solución acuosa de enzima al 10 % y un contenido total de agua de 2 - 3 %. Los tiempos de proceso fueron, 30 min en el tanque de retención de ácido cítrico y 6 horas en el reactor enzimático, respectivamente. La solución de ácido cítrico se mantuvo a una velocidad constante y el pH se ajustó agregando solución al 4% de hidróxido de sodio, gradualmente y monitoreando en línea el pH de las gomas separadas. El reactor se diseñó con dos torres en serie de tres etapas cada una que equivalen a 6 reactores de tanque agitado en serie. Luego del desgomado enzimático se continuó con un proceso de desgomado físico incluyendo blanqueo y desodorizado. El aceite ingresó a la primera etapa de reacción enzimática con un nivel de fósforo de 63,3 mg/kg y abandonó el proceso enzimático con menos de 10 mg de fósforo/kg que se redujo hasta 3 mg/kg después del blanqueo y 1- 2 mg/kg después del desodorizado. Este proceso continuo a escala piloto fue también aplicado con éxito a aceites de soja con un contenido inicial de fósforo de 121,5 mg/kg (B. Yang et al., 2008). El aceite de salvado de arroz fue desgomado también con Lecitase<sup>®</sup> Ultra en el laboratorio hasta menos de 10 mg de fósforo/kg durante aproximadamente 4 horas y hasta menos de 5 mg/kg después de 6,5 h, pero en este último caso, con una acidez libre mayor que 2 g de ácido oleico/100 g, no aconsejable desde el punto de vista tecnológico (Jahani et al., 2008).

Soe & Brown (2011) patentaron una aplicación de un método de desgomado de aceite comestible crudo (entendiendo por aceite comestible a los aceites vegetales), que utiliza la enzima LAT y lograron contenidos de fósforo inferiores a 5 mg/kg de aceite. Esta patente es aplicable a aceites obtenidos por prensado, extracción con solventes, o mezclas de ambos y se puede emplear en aceites con niveles de fósforo comprendidos entre 50 y 3000 mg/kg, especialmente 400-1200 mg/kg. Se recomienda preferiblemente para aceites de soja, maíz, girasol y colza o canola. La patente propone los siguientes pasos: 1) Mezclado del aceite crudo con agua (0,1- 5,0 %) y la enzima, 2) Agitación de la mezcla entre 10 y 180 min a temperaturas entre 45 °C y 90 °C y 3) Separación de las fases de aceite y de goma. La empresa

Danisco A/S comercializa la enzima LysoMax<sup>®</sup> Oil, sugiriendo su uso para el desgomado de aceites vegetales a 55 °C durante 20-30 min con agua en una proporción 1- 2 %.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con reactores de 100 mL de capacidad, muestran claramente la mayor eficiencia de los procesos enzimáticos aplicados sobre un aceite de girasol crudo para reducir los contenidos de fósforo residual. Las enzimas PLA1 y LAT permiten obtener aceites con menos de 5 mg de fósforo por kg requeridos para los procesos de refinado más exigentes con un rendimiento para reducir el contenido de fósforo de hasta 99,3 %. La reducción del contenido de fósforo en los aceites es la mejor herramienta para evaluar la eficiencia de las reacciones enzimáticas. El aumento de la acidez libre inducido por la actividad de lipasa inherente en PLA1 no tiene efectos adversos sobre los procesos de refinado.

En el reactor de 1000 mL, no se observaron diferencias significativas entre el uso de PLA1, LAT o la mezcla de ambas enzimas con un rendimiento de reducción de fósforo de hasta 99,5 %. La enzima PLA1 produce un incremento de la acidez libre del aceite pero la magnitud de este incremento cuando se la usa sola o combinada con LAT no tiene efectos adversos sobre los procesos de refinado. Los resultados obtenidos con el reactor de 1000 mL de capacidad confirman totalmente lo observado con reactores en menor escala (100 mL).

Los resultados aquí obtenidos permiten concluir que:

- Con las enzimas PLA1 y LAT se pueden desarrollar procesos de desgomado enzimático de aceites de girasol, reduciendo los contenidos de fósforo residual por debajo de 5 mg/kg, sin requerir el uso de procesos previos de desgomado ácido o acuoso.
- El proceso involucra una sola etapa de reacción enzimática entre el aceite crudo y la enzima disuelta en un buffer, en condiciones optimizadas de relación buffer/sustrato, temperatura, pH del buffer y dosis de enzima.
- El tiempo de reacción enzimática debe ser ajustado teniendo en cuenta el contenido de fósforo del aceite crudo. Se ha demostrado que, con aceites de

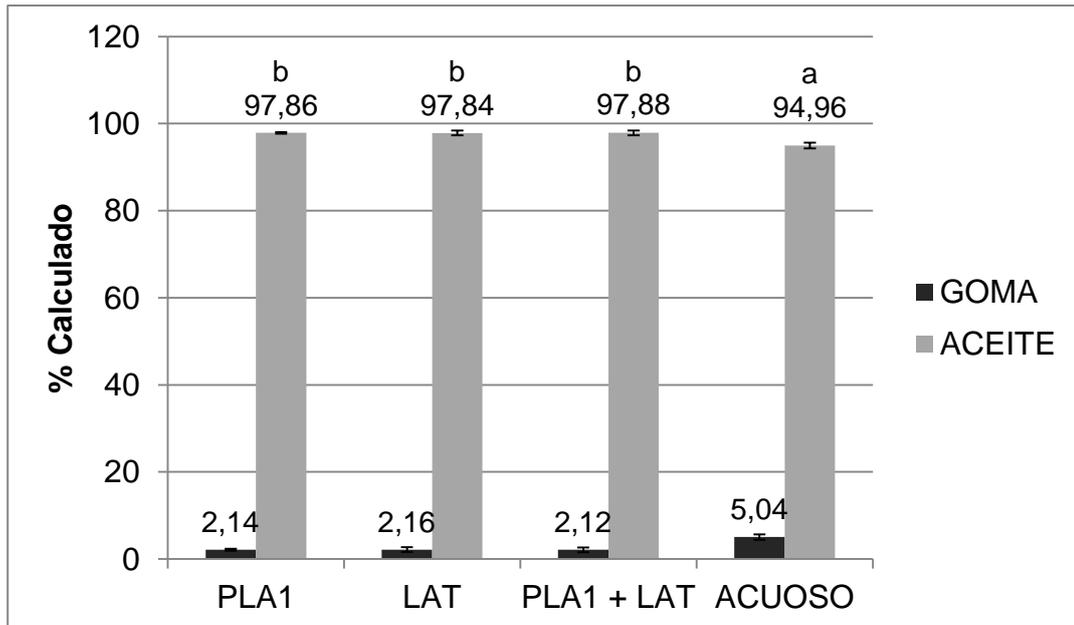
hasta prácticamente 600 mg de fósforo/kg, se requieren sólo 3 horas para lograr una reducción del contenido de fósforo de más de 99 %. Además, este período de tiempo se redujo significativamente (tiempo = 1 hora) cuando el aceite tenía un menor contenido inicial de fósforo. El período de 3 horas se encuentra dentro del rango 2 - 6 horas, informado en bibliografía para procesos con las enzimas PLA2 y PLA1 llevados a cabo en dos etapas, una de desgomado ácido intenso (20 - 30 min a temperaturas de aproximadamente 80 °C) y luego la etapa de reacción enzimática a temperaturas más bajas.

- Este proceso se puede aplicar usando cualquiera de las enzimas (PLA1 o LAT) o una mezcla de ambas en el caso que se requiera una menor concentración de AGL para los procesos de refinado. No son necesarias modificaciones en equipos ni insumos. La combinación de enzimas, aumenta ligeramente la proporción de ácidos grasos y manifiesta la combinación de la capacidad fosfolipolítica de la fosfolipasa A1 y la función transferasa de la enzima LysoMax<sup>®</sup> Oil.
- El proceso no utiliza una etapa inicial de desgomado ácido intenso, evitando el uso de altas concentraciones de ácido cítrico, lo que reduce los daños por incrustaciones en los equipos y minimiza el impacto ambiental.
- La técnica implica un ahorro de energía con respecto al proceso en dos etapas que requiere un calentamiento para realizar el desgomado ácido y luego un enfriamiento para ajustar la temperatura a la óptima para la reacción enzimática en general cercana a los 50 °C.

### 3.3. Recuperación de aceite desgomado y gomas crudas

La recuperación del aceite y la fase goma cruda o húmeda, son medidas que también pueden ser utilizadas como una aproximación válida para estimar el rendimiento práctico del proceso (List et al., 2001; Soe & Brown, 2011).

Los resultados obtenidos de los porcentajes de recuperación de aceite desgomado y gomas para los procesos enzimáticos con PLA1 y LAT y de desgomado acuoso se muestran en las Figura 3.5.



**Figura 3.5-** Recuperación de aceite desgomado y gomas luego de la separación centrífuga para tiempos de proceso de 90 min.

Aceite de girasol crudo Lote 2 (contenido inicial de fósforo = 487,1 mg/kg).

Equipo y condiciones de ensayo indicados al pie de la Figura 3.3.

Valores medios  $\pm$  desviación estándar de cuatro muestras de un ensayo de desgomado.

Valores medios seguidos por igual letra no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

Los análisis de recuperación del aceite estudiado, permiten observar un aumento aproximado de 3 % para el desgomado enzimático respecto del desgomado acuoso. Estos porcentajes corresponden a la alícuota tomada a partir de la mezcla de reacción y sometida al proceso de separación centrífuga en iguales condiciones para el estudio del rendimiento práctico del proceso. Estos resultados reflejan una estimación aproximada del método a una mayor escala mediante el empleo de caudalímetros industriales, como se realiza normalmente en las plantas de desgomado.

El ANOVA detectó diferencias significativas entre los diferentes procesos de desgomado (Tabla 3.10). Sin embargo, como puede observarse en la Figura 3.5, la prueba de Duncan no reveló diferencias significativas entre los diferentes procesos enzimáticos.

**Tabla 3.10-** ANOVA para la recuperación de aceite desgomado (%) de los procesos de desgomados enzimático con PLA1 y LAT y acuoso

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F	Valor-p
Modelo	25,37	3	8,46	25,08	<0,0001
Proceso	25,37	3	8,46	25,08	<0,0001
Error	4,05	12	0,34		
Total	29,42	15			

Varios autores reportaron aumentos de rendimiento de aceite para el desgomado enzimático con estas enzimas. Münch (2005), usando PLA1 para aceites de soja, girasol y colza refirió un alto rendimiento de aceite sin cuantificarlo. Galhardo et al., (2010) estudiaron el desgomado de un aceite de soja crudo conteniendo 2,5 % de fosfolípidos con Lecitase® Ultra (PLA1) y PLC, mediante procesos de desgomado acuoso y desgomado profundo y reportaron incrementos del rendimiento de aceite que pueden oscilar entre 2,2 y 2,6 %. Soe & Brown (2011) revelaron que el rendimiento de aceite de soja se puede incrementar 1 - 2 % como porcentaje de fase oleosa, usando la enzima LAT (LysoMax® Oil), en comparación con el mismo aceite tratado por proceso de desgomado con agua sin la adición de enzima. Estos resultados son concordantes con los valores obtenidos en el presente trabajo.

El desgomado acuoso con enzimas cambia el balance de masa y permite un mayor rendimiento de aceite comparado con un proceso no enzimático. Esto se debe a que las reacciones enzimáticas reducen la fase goma y aumentan la fase de aceite desgomado, quedando ésteres de esteroides y AGL, como subproductos de reacción en la fase oleosa. Otro factor que contribuye al mayor rendimiento de aceite es la transformación de fosfolípidos en lisofosfolípidos, lo que mejora la separación de las fases aceite y goma. Los lisofosfolípidos son más solubles en agua que los fosfolípidos, y por lo tanto, se separan del aceite con mayor facilidad durante el centrifugado.

### 3.4. Estudio del aceite ocluido en las gomas

Otra forma de evaluar el rendimiento del proceso, es a través de la determinación del aceite ocluido en las gomas. La fase de gomas, obtenida después de la separación centrífuga, está constituida esencialmente por agua, fosfátidos, impurezas insolubles y aceite ocluido.

Los PLS, LPL, glicolípidos y otros compuestos polares son insolubles en acetona (IA), mientras que los TGS, DAG y AG son solubles en acetona. Por lo tanto, el análisis del material insoluble en acetona permite establecer una relación del aceite y las impurezas presentes en las gomas, con el contenido de PLS que corresponde a la mayor parte de la fracción insoluble en acetona (Autino, 2009; Galhardo et al., 2010). En la Tabla 3.11 se muestran los resultados obtenidos para la composición de las gomas de los diferentes procesos de desgomados enzimáticos y acuoso.

**Tabla 3.11-** Composición de las gomas obtenidas en los procesos de desgomados enzimáticos y acuoso

Composición	PLA1	LAT	PLA1 + LAT	Acuoso
H (%)	45,85 ± 1,47 <sup>a</sup>	46,83 ± 0,54 <sup>a</sup>	47,81 ± 1,12 <sup>a</sup>	44,72 ± 2,34 <sup>a</sup>
IH (%)	0,41 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>a</sup>
IA (%)	35,13 ± 1,40 <sup>b</sup>	34,63 ± 2,68 <sup>b</sup>	34,35 ± 2,44 <sup>b</sup>	30,11 ± 2,70 <sup>a</sup>
AO (%)	18,60 ± 0,04 <sup>a</sup>	18,13 ± 2,58 <sup>a</sup>	17,45 ± 3,34 <sup>a</sup>	24,77 ± 0,28 <sup>b</sup>

H = Humedad y materia volátil, IH = Insoluble en hexano (%), IA = Insoluble en acetona (%), AO = Aceite ocluido (%).

Aceite de girasol crudo Lote 2 (contenido inicial de fósforo = 487,1 mg/kg).

Equipo y condiciones de ensayo indicados al pie de la Figura 3.3.

Valores medios ± desviación estándar de cuatro muestras de un ensayo de desgomado.

Valores medios seguidos por igual letra en una misma fila no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

El contenido de humedad y materia volátil de las gomas obtenidas no mostró diferencias significativas ( $p = 0,1283$ ) entre los procesos de desgomados enzimáticos y acuoso. Tampoco se observaron diferencias significativas ( $p = 0,3900$ ) en los contenidos de impurezas insolubles en hexano al comparar los procesos enzimáticos y acuoso.

Las determinaciones de pérdida de aceite retenido por las gomas muestran valores menores a 19 % para la reacción con las enzimas aplicadas (Tabla 3.11). Galhardo et al. (2010) indicaron que el contenido de aceite ocluido en las gomas obtenidas en un estudio sobre aceite de soja, utilizando la enzima PLA1, resultaba alrededor del 15 %. Los valores de pérdida de aceite del desgomado enzimático, muestran marcadas reducciones con respecto al desgomado acuoso, cuando se evalúa el rendimiento por este método. El valor conseguido para las gomas obtenidas por el proceso de desgomado acuoso,

es concordante con valores para gomas obtenidas por el mismo proceso en planta industrial para aceite de soja (Ceci et al., 2008).

La fracción insoluble en acetona fue significativamente más elevada ( $p = 0,0008$ ) para las gomas obtenidas mediante procesos enzimáticos, en comparación con aquéllas producidas por desgomado acuoso, sugiriendo esencialmente un mayor contenido de fosfátidos (Tabla 3.11). Sin embargo no se observaron diferencias significativas en los contenidos de material insoluble en acetona entre los diferentes procesos enzimáticos. Estos contenidos se aproximaron en promedio a 65 - 66 % en base seca para los procesos enzimáticos, siendo 54,5 % en base seca para el desgomado acuoso. Galhardo et al. (2010) informaron 60 - 65 % de material IA en las gomas secas obtenidas mediante desgomado de aceite de soja con PLA1, en concordancia con lo obtenido en este trabajo de tesis, mientras que las gomas secas obtenidas mediante desgomado acuoso tenían valores ubicados entre 62 % y 70 %. Los mencionados autores concluyen que, el porcentaje de IA es solamente una indicación aproximada de la eficiencia del proceso, pero es importante destacar que no se lo puede tomar aisladamente como factor de optimización del mismo.

La reacción enzimática es la explicación del aumento del rendimiento de aceite en el desgomado. La conversión de fosfolípidos en productos solubles no es el único mecanismo de aumentar el rendimiento de aceite. La reducción de la retención de aceite por parte de los fosfolípidos residuales es otro mecanismo muy importante. Cuando se eliminan todos los ácidos grasos de los fosfolípidos, el éster de fosfato de glicerol resultante no retiene prácticamente aceite. En este contexto, es muy posible que la PLA1 sea más eficaz que la PLA2. En el glicerol los ácidos grasos tienen una preferencia por las posiciones 1,3, es por eso que los 1,2-diglicéridos isomerizan fácilmente a 1,3-diglicéridos. Así, los fosfolípidos que son atacados por la PLA1 tienen un ácido graso en la posición 2, que migra a la posición 1, y puede ser hidrolizado nuevamente para formar ésteres de glicerol fosfato (Dijkstra, 2011). Galhardo et al. (2010) reportaron que la mitad de los ácidos grasos generados por la reacción enzimática de la PLA1, pasan a la fase aceite contribuyendo a la disminución del aceite retenido en las gomas. En el caso de la enzima LAT, su capacidad de esterificación, es la responsable del aumento del rendimiento, cuando la

materia prima a tratar es rica en esteroides ya que, los ésteres de esteroides quedan en la fase oleosa.

### 3.5. Conclusiones

Durante el proceso de desgomado enzimático se observó una destacada disminución del contenido de fósforo residual con respecto al del aceite crudo. Este detrimento se debe a que los fosfolípidos fueron fácilmente hidrolizados y a partir de esa reacción se liberaron lisofosfolípidos cuya capacidad emulsionante, es más alta que la de sus precursores originales para emulsiones O/W (siglas en inglés para aceite/agua), mientras que los glicerofosfolípidos son más hidrofílicos. Esta diferencia de comportamiento químico entre las especies producidas, explica la simplicidad de separación de fases de aceite y goma, y la disminución de pérdida de aceite respecto de las mermas producidas con los desgomados convencionales. A su vez, las gomas obtenidas cuando se utilizaron enzimas, fueron reducidas en volumen, en comparación con las obtenidas en el proceso de desgomado acuoso. Esto concernió al comportamiento enzimático, ya que con PLA1 la fase de gomas retuvo menos aceite por la liberación de ácidos grasos generados en su reacción que pasan al aceite, y con la LAT, las gomas obtenidas se redujeron debido a que los esteroides de la fase oleosa, fueron esterificados por los AG de los fosfolípidos durante la reacción y retenidos en dicha fase.

Los valores del rendimiento muestran un aumento de hasta 11,5 % del desgomado enzimático, respecto del acuoso, en lo que respecta a la disminución del contenido de fósforo residual en el aceite. La fracción de gomas se reduce 3 % respecto al desgomado acuoso y la proporción de aceite ocluido en las gomas disminuye alrededor de 7 % cuando se aplica un proceso de desgomado enzimático. Mediante los procesos de desgomado enzimático con PLA1 y LAT es posible obtener aceites para refinado físico que requieren contenidos de fósforo residual por debajo de 5 mg/kg.

El aceite tratado con la enzima LAT presenta una menor acidez libre que el obtenido mediante desgomado acuoso lo que resulta beneficioso para el posterior proceso de desodorizado por destilación. Además esta enzima aporta ésteres de esteroides con casi diez veces mayor liposolubilidad que los esteroides

libres y con capacidad para reducir el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria según la FDA (siglas en inglés de la Administración de Drogas y Medicamentos de Estados Unidos) (Palou Oliver et al., 2005).

Este trabajo de tesis, agrega el estudio de una combinación de enzimas que no ha sido analizada previamente. Esta combinación, no muestra diferencias significativas acentuadas cuando se evalúa la eficiencia del proceso de desgomado enzimático, no observándose efectos sinérgicos entre ambas enzimas. Sin embargo es destacado observar, que el contenido de ácidos grasos liberados por la reacción fosfolipolítica, no aumenta de manera considerable cuando las enzimas trabajan juntas, debido a la combinación de la actividad PLA1, y LAT que evidencian.

Este estudio permite concluir, que es necesario tener en cuenta el contenido inicial de fósforo, como herramienta para optimizar los tiempos requeridos para los procesos de desgomado enzimático.

**CAPÍTULO IV:**  
**OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS**  
**DE DESGOMADO ENZIMÁTICO**

#### 4.1 Modelo de ajuste para el proceso de desgomado con la enzima PLA1 (Lecitase® Ultra)

A fin de encontrar las condiciones óptimas de operación que minimicen el fósforo residual, se utilizó el diseño experimental acoplado a la metodología de superficie de respuesta. La descripción detallada fue realizada en el Capítulo II punto 2.2.1.2. El efecto de las distintas variables: pH, temperatura, concentración de la enzima, tiempo de desgomado y relación buffer/aceite (sustrato), se analizó utilizando las enzimas que mejores resultados habían arrojado en el ensayos previos: PLA1 (Lecitase® Ultra), y LAT (LysoMax® Oil).

La Tabla 4.1 muestra los niveles de cada factor correspondientes a la matriz de ensayos generada por el diseño y los contenidos de fósforo obtenidos como respuesta para los ensayos realizados con Lecitase® Ultra. Para los ensayos realizados con PLA1, el contenido de fósforo residual osciló en promedio entre 2,86 y 19,27 mg/kg.

**Tabla 4.1-** Matriz experimental para la enzima PLA1 (Lecitase® Ultra) y contenidos de fósforo obtenidos como respuesta

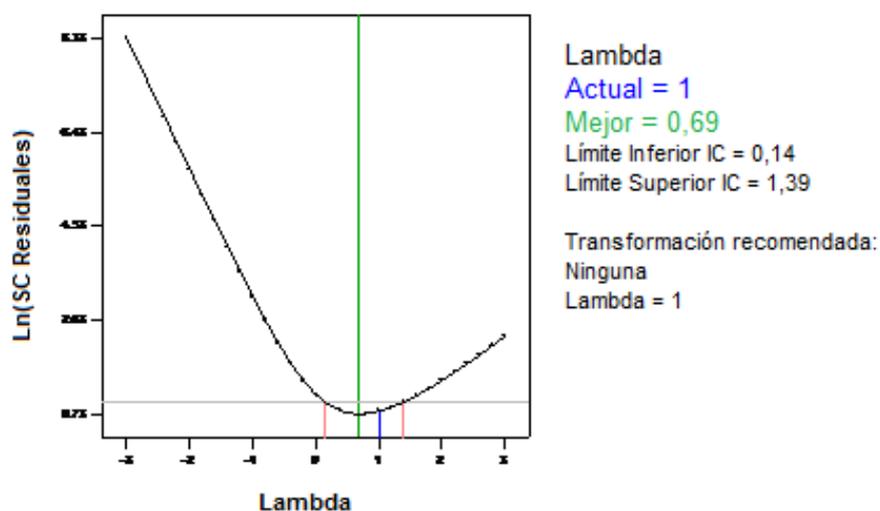
Factores					Fósforo
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	(mg/kg) <sup>1</sup>
6	50	200	90	1	4,00 ± 0,04
6	60	100	30	3	8,09 ± 0,15
6	60	100	90	1	7,68 ± 0,28
5	50	100	90	1	13,05 ± 0,10
5	50	200	30	1	15,25 ± 0,42
5	60	100	30	1	17,01 ± 0,24
6	50	200	30	3	9,99 ± 0,31
5	50	100	30	3	8,14 ± 0,50
5	60	200	30	3	19,27 ± 0,54
5	50	200	90	3	2,86 ± 0,32
6	50	100	30	1	16,30 ± 0,49
6	60	200	90	3	11,81 ± 0,33
5	60	100	90	3	10,14 ± 0,43
5	60	200	90	1	15,91 ± 0,12
6	50	100	90	3	19,11 ± 0,58
6	60	200	30	1	14,24 ± 0,41

Equipo: reactores batch (100 mL) en paralelo, masa inicial de aceite (Lote 2) = 50 g.

Factores actuales: *A* = pH del buffer, *B* = temperatura (°C), *C* = dosis de enzima (U/kg), *D* = tiempo (min), *E* = relación buffer/sustrato (% v/m).

<sup>1</sup> Valores medios de dos réplicas analizadas por duplicado ± desviación estándar.

Los resultados obtenidos para los contenidos de fósforo residual de los aceites desgomados con PLA1, no requirieron transformación para el análisis estadístico, como se puede observar en el gráfico de Box-Cox para el diseño (Figura 4.1). Este gráfico representa el logaritmo natural de la suma de cuadrados de los residuales en función del parámetro de transformación (lambda) y recomienda una transformación de la respuesta según la ley de potencias, si es necesaria. Está basado en que el mejor valor de lambda corresponde al mínimo de esta curva y si el intervalo de 95 % de confianza incluye lambda = 1 no recomienda transformar la respuesta.



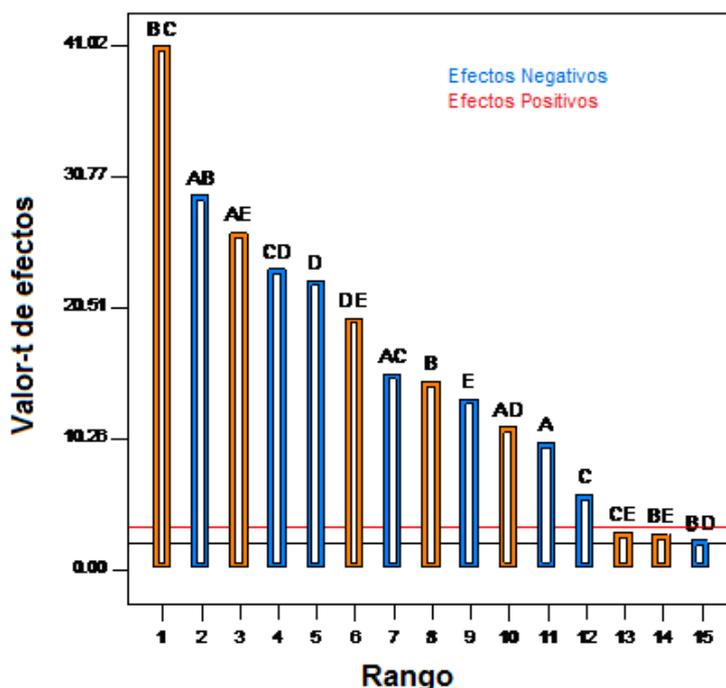
**Figura 4.1-** Gráfico de Box-Cox del diseño factorial  $2^{5-1}$  para el desgomado con PLA1.

Los resultados del ANOVA (Tabla 4.2) indicaron que el modelo fue significativo ( $p < 0,0001$ ) y que el contenido de fósforo fue significativamente influenciado ( $p < 0,0001$ ) por todos los factores principales evaluados: pH del buffer, temperatura, concentración de enzima, tiempo y relación buffer/sustrato. Aunque como puede observarse en el gráfico de Pareto de la Figura 4.2, todos los factores principales superaron el límite más exigente de Bonferroni, el tiempo y la temperatura de reacción tuvieron los efectos más significativos siendo menos relevantes por su significación el pH del buffer y la dosis de enzima.

En lo que respecta a las interacciones entre dos factores, algunas fueron significativas, siendo el valor  $p$  en todos los casos  $< 0,0001$  (Tabla 4.2). Cuatro de estas interacciones, en el siguiente orden: BC, AB, AE y CD, tuvieron una mayor significación que los propios efectos principales (Figura 4.2). La dosis de enzima y el pH del buffer participaron en estas interacciones de mayor significación. Las interacciones CE, BE y BD no fueron significativas dentro del modelo (valores  $p = 0,0092 - 0,0117$  y  $0,0328$  respectivamente) y no superaron el límite de Bonferroni del gráfico de Pareto.

**Tabla 4.2-** ANOVA para el diseño factorial  $2^{5-1}$  seleccionado para el desgomado con PLA1

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	Valor p
Modelo	765,73	15	51,05	374,64	$< 0,0001$
<i>A</i> -pH del buffer	13,52	1	13,52	99,22	$< 0,0001$
<i>B</i> -Temperatura (°C)	29,84	1	29,84	218,97	$< 0,0001$
<i>C</i> -Dosis Enzima (U/kg)	4,79	1	4,79	35,15	$< 0,0001$
<i>D</i> -Tiempo (min)	70,21	1	70,21	515,26	$< 0,0001$
<i>E</i> -Buffer/sustrato (% v/m)	24,54	1	24,54	180,06	$< 0,0001$
<i>AB</i>	117,20	1	117,20	860,09	$< 0,0001$
<i>AC</i>	32,32	1	32,32	237,20	$< 0,0001$
<i>AD</i>	17,08	1	17,08	125,36	$< 0,0001$
<i>AE</i>	95,08	1	95,08	697,79	$< 0,0001$
<i>BC</i>	229,30	1	229,30	1682,79	$< 0,0001$
<i>BD</i>	0,74	1	0,74	5,46	0,0328
<i>BE</i>	1,10	1	1,10	8,09	0,0117
<i>CD</i>	75,77	1	75,77	556,04	$< 0,0001$
<i>CE</i>	1,19	1	1,19	8,76	0,0092
<i>DE</i>	53,04	1	53,04	389,29	$< 0,0001$
Error puro	2,18	16	0,14		
Corr. Total	767,91	31			



**Figura 4.2-** Gráfico de Pareto del diseño factorial  $2^{5-1}$  para el desgomado con PLA1. Línea inferior: límite valor  $t = 2,20099$ , línea superior: límite de Bonferroni =  $3,72829$ .

La Tabla 4.3 resume los valores arrojados por el modelo de los coeficientes de regresión estimados para el análisis con Lecitase® Ultra. La temperatura de reacción contribuye positivamente al modelo de regresión, dado que su incremento induce un aumento en el contenido de fósforo, mientras que, el resto de los factores principales estudiados, lo hacen negativamente, disminuyendo el contenido de fósforo cuando se incrementan dichos factores (Figura 4.2).

**Tabla 4.3-** Coeficientes de regresión estimados por el modelo para Lecitase® Ultra

Parámetro	CE ± IC
Intersección	12,06 ± 0,27
<b>Factores Principales</b>	
<i>A.</i> pH del buffer	-0,65 ± 0,27
<i>B.</i> Temperatura	0,97 ± 0,27
<i>C.</i> Dosis de enzima	-0,39 ± 0,27
<i>D.</i> Tiempo	-1,48 ± 0,27
<i>E.</i> Relación buffer/sustrato	-0,88 ± 0,27
<b>Interacciones</b>	
<i>AB</i>	-1,91 ± 0,27
<i>AC</i>	-1,00 ± 0,27
<i>AD</i>	0,73 ± 0,27
<i>AE</i>	1,72 ± 0,27
<i>BC</i>	2,68 ± 0,27
<i>BD</i>	-0,15 ± 0,27
<i>BE</i>	0,19 ± 0,27
<i>CD</i>	-1,54 ± 0,27
<i>CE</i>	0,19 ± 0,27
<i>DE</i>	1,29 ± 0,27

CE = coeficientes de regresión estimados para la ecuación final en término de factores codificados, IC = intervalo de confianza (95 %).

$R^2 = 0,9972$ ,  $R^2$  Ajustado = 0,9945,  $R^2$  Predicho = 0,9886, Adecuación de la Precisión = 62,869, PRESS (Siglas en inglés de Suma de Cuadrados de los Residuales Predichos)= 8,72.

La siguiente ecuación final fue obtenida para el modelo, en función de los factores actuales:

$$\begin{aligned}
 \text{Fósforo } \left(\frac{mg}{kg}\right) = & -110 + 37,0 \times A + 2,78 \times B - 3,22 \times 10^{-1} \times C - 1,93 \times \\
 & 10^{-1} \times D - 25,0 \times E - 7,65 \times 10^{-1} \times A \times B - 4,02 \times 10^{-2} \times A \times C + 4,87 \times \\
 & 10^{-2} \times A \times D + 3,45 \times A \times E + 1,07 \times 10^{-2} \times B \times C - 1,02 \times 10^{-3} \times B \times D + \\
 & 3,71 \times 10^{-2} \times B \times E - 1,02 \times 10^{-3} \times C \times D + 3,86 \times 10^{-3} \times C \times E + 4,29 \times \\
 & 10^{-2} \times D \times E
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

Puede observarse en la Tabla 4.3 que el valor  $R^2$  Predicho es razonable con el valor  $R^2$  Ajustado ya que la diferencia entre ambos es menor que 0,2. Además, la relación señal/ruido, medida a través del valor de adecuación de la

precisión es mucho mayor que el valor mínimo deseable igual a 4, resultando por ello, también adecuada. Esto confirma la buena exactitud y adecuación del modelo y justifica el análisis de las tendencias de respuesta asociadas y su optimización.

#### **4.2 Modelo de ajuste para el proceso de desgomado con la enzima LAT (LysoMax® Oil)**

El contenido de fósforo de los aceites desgomados con la enzima LAT osciló entre 2,61 y 17,90 mg/kg (Tabla 4.4). Los más bajos contenidos de fósforo fueron similares a los obtenidos con la enzima PLA1, confirmando los resultados obtenidos en cuanto a que ambas enzimas presentan iguales rendimientos después de 90 minutos de reacción (Capítulo III).

Los niveles de fósforo como respuesta para el diseño experimental, al igual que para el desgomado con PLA1, no requirieron transformación para el análisis estadístico. Esto está fundamentado en que, el valor del parámetro de transformación  $\Lambda = 1$ , está incluido dentro del intervalo de 95 % de confianza para el mínimo de la curva de Box-Cox (Figura 4.3).

Los resultados del ANOVA (Tabla 4.5) indican que el modelo fue significativo ( $p < 0,0001$ ) y que el contenido de fósforo fue significativamente influenciado por los factores principales: pH del buffer, temperatura, concentración de enzima y tiempo de reacción. La relación buffer/sustrato fue el único factor no significativo ( $p = 0,1520$ ) dado que, esta enzima por ser una aciltransferasa, a diferencia de la PLA1 que es una hidrolasa, no requiere agua para su reacción. El buffer además de regular el pH aporta esencialmente agua al medio de reacción.

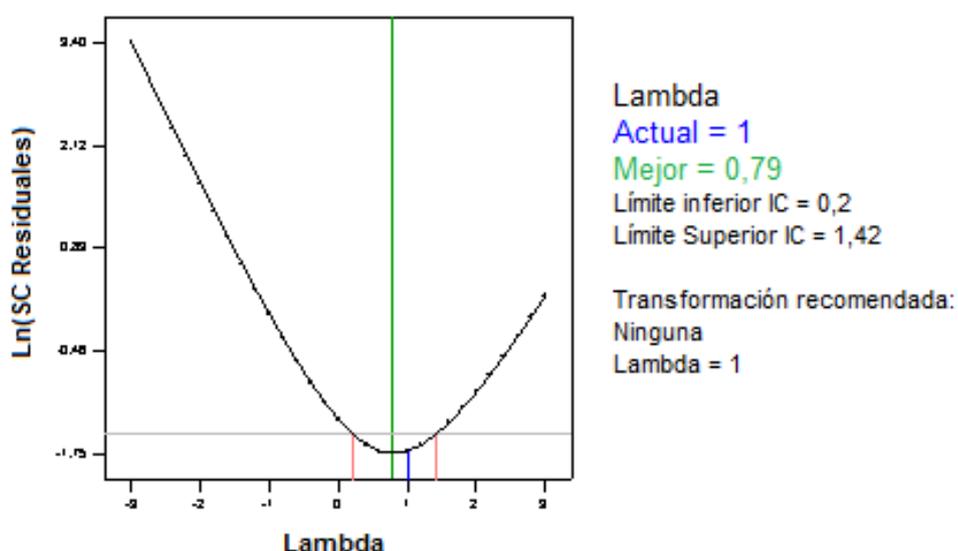
**Tabla 4.4-** Matriz experimental para la enzima LAT (LysoMax® Oil) y contenidos de fósforo obtenidos como respuesta

Factores					Fósforo
<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	(mg/kg) <sup>1</sup>
6	50	200	90	1	2,72 ± 0,05
6	60	100	30	3	8,14 ± 0,11
6	60	100	90	1	3,80 ± 0,24
5	50	100	90	1	7,77 ± 0,21
5	50	200	30	1	8,70 ± 0,08
5	60	100	30	1	17,07 ± 0,21
6	50	200	30	3	11,85 ± 0,15
5	50	100	30	3	11,42 ± 0,24
5	60	200	30	3	13,07 ± 0,17
5	50	200	90	3	17,90 ± 0,11
6	50	100	30	1	3,51 ± 0,14
6	60	200	90	3	8,31 ± 0,06
5	60	100	90	3	7,49 ± 0,04
5	60	200	90	1	2,61 ± 0,04
6	50	100	90	3	13,1 ± 0,10
6	60	200	30	1	6,13 ± 0,08

Equipo: reactores batch (100 mL) en paralelo, masa inicial de aceite (Lote 2) = 50 g.

Factores actuales: *A* = pH del buffer, *B* = temperatura (°C), *C* = dosis de enzima (U/kg), *D* = tiempo (min), *E* = relación buffer/sustrato (% v/m).

<sup>1</sup> Valores medios de dos réplicas analizadas por duplicado ± desviación estándar.

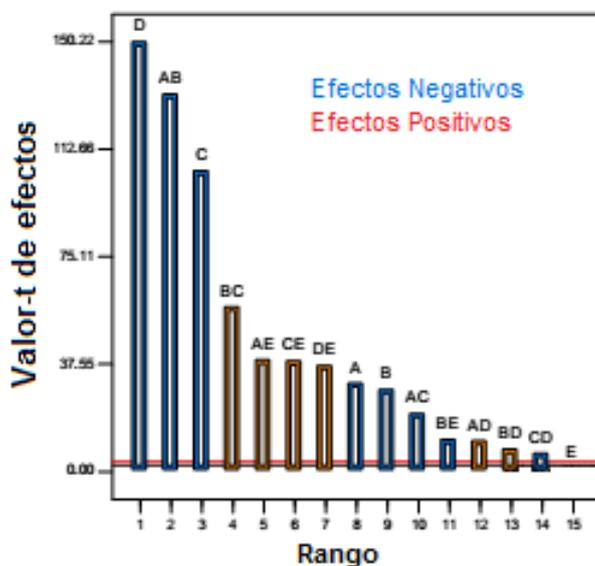
**Figura 4.3-** Gráfico de Box-Cox del diseño factorial  $2^{5-1}$  para el desgomado con LAT.

**Tabla 4.5-** ANOVA para el diseño factorial  $2^{5-1}$  seleccionado para el desgomado con LAT

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	Valor p
Modelo	685,61	15	45,71	4085,59	< 0,0001
<i>A</i> -pH del buffer	10,72	1	10,72	958,07	< 0,0001
<i>B</i> -Temperatura (°C)	9,20	1	9,20	822,53	< 0,0001
<i>C</i> -Dosis Enzima (U/kg)	123,72	1	123,72	11058,45	< 0,0001
<i>D</i> -Tiempo (min)	252,45	1	252,45	22565,40	< 0,0001
<i>E</i> -Buffer/sustrato (% v/m)	0,025	1	0,025	2,26	0,1520
<i>AB</i>	194,74	1	194,74	17406,49	< 0,0001
<i>AC</i>	4,61	1	4,61	411,67	< 0,0001
<i>AD</i>	1,29	1	1,29	115,13	< 0,0001
<i>AE</i>	17,11	1	17,11	1529,50	< 0,0001
<i>BC</i>	37,11	1	37,11	3317,02	< 0,0001
<i>BD</i>	0,68	1	0,68	60,66	< 0,0001
<i>BE</i>	1,41	1	1,41	126,14	< 0,0001
<i>CD</i>	0,46	1	0,46	40,76	< 0,0001
<i>CE</i>	16,70	1	16,70	1493,11	< 0,0001
<i>DE</i>	15,40	1	15,40	1376,65	< 0,0001
Error puro	0,18	16	0,011		
Corr. Total	685,79	31			

En lo que respecta a la magnitud de la significación de los efectos de los factores principales (Figura 4.4), igual que para el desgomado con PLA1, el efecto más significativo se observó para el tiempo de reacción (Factor D). Sin embargo, en el proceso de desgomado con la enzima LAT, el tiempo de reacción tuvo el efecto más significativo, superando inclusive el nivel de significación de cualquiera de las interacciones entre dos factores principales. Esto no ocurrió en el desgomado con PLA1 donde los efectos de varias interacciones fueron más relevantes que los efectos de los factores principales.

La dosis de enzima (Factor C) se ubicó después del tiempo de reacción en cuanto a su significación para el desgomado con LAT (Figura 4.4). Esto constituye otra diferencia entre ambas enzimas, dado que para PLA1 la dosis de enzima tenía el efecto principal menos relevante y sólo se destacaba dentro de las interacciones más significativas. En el desgomado con LAT, el pH del buffer y la temperatura de reacción presentaron efectos principales de menor significación estadística.



**Figura 4.4-** Gráfico de Pareto del diseño factorial  $2^{5-1}$  para el desgomado con LAT. Línea inferior: límite valor  $t = 2,20099$ , línea superior: límite de Bonferroni =  $3,72829$ .

En el modelo para el desgomado con la enzima LAT, como lo indica el gráfico de Pareto (Figura 4.4), todas las interacciones entre dos factores tuvieron efectos estadísticamente significativos, superando el valor límite de Bonferroni. Las interacciones más relevantes desde el punto de vista de su significación involucraron al pH del buffer (Factor A) y la temperatura (Factor B). Para el desgomado con la enzima LAT, estos dos factores se hicieron significativos dentro del modelo, a través de sus interacciones.

En el proceso de desgomado con la enzima LAT, todos los efectos principales tuvieron contribuciones negativas dentro del modelo (Figura 4.4), induciendo a disminuir el contenido de fósforo de los aceites desgomados, cuando aumentaban cualquiera de estos factores principales dentro del rango de estudio por este modelo. En el estudio realizado usando PLA1 la temperatura tenía una contribución positiva dentro del modelo (ver punto 4.1). Estos resultados sugieren que, considerando sólo los factores principales, para minimizar el contenido de fósforo la enzima PLA1 requeriría temperaturas más bajas, mientras que la enzima LAT funcionaría mejor a temperaturas más altas.

La Tabla 4.6 muestra los coeficientes y sus intervalos de confianza, estimados por el modelo de regresión para el desgomado con la enzima LAT, en término de factores codificados.

**Tabla 4.6-** Coeficientes de regresión estimados por el modelo para LAT

<b>Parámetro</b>	<b>CE ± IC</b>
Intersección	8,98 ± 0,08
<b>Factores Principales</b>	
<i>A.</i> pH del buffer	-0,58 ± 0,08
<i>B.</i> Temperatura	-0,54 ± 0,08
<i>C.</i> Dosis de enzima	-1,97 ± 0,08
<i>D.</i> Tiempo	-2,81 ± 0,08
<i>E.</i> Relación buffer/sustrato	0,028 ± 0,08
<b>Interacciones</b>	
<i>AB</i>	-2,47 ± 0,08
<i>AC</i>	-0,38 ± 0,08
<i>AD</i>	0,20 ± 0,08
<i>AE</i>	0,73 ± 0,08
<i>BC</i>	1,08 ± 0,08
<i>BD</i>	0,15 ± 0,08
<i>BE</i>	-0,21 ± 0,08
<i>CD</i>	-0,12 ± 0,08
<i>CE</i>	0,72 ± 0,08
<i>DE</i>	0,69 ± 0,08

CE = coeficientes de regresión estimados para la ecuación final en término de factores codificados, IC = intervalo de confianza (95 %).

$R^2 = 0,9997$ ,  $R^2$  Ajustado = 0,9995,  $R^2$  Predicho = 0,9990, Adecuación de la Precisión = 204,502, PRESS (Siglas en inglés de Suma de Cuadrados de los Residuales Predichos) = 0,72.

La siguiente ecuación final fue propuesta por el modelo de regresión para estimar el contenido de fósforo residual del aceite en función de los factores actuales:

$$\begin{aligned}
 \text{Fósforo } \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = & -217 + 51,7 A + 4,70 B - 2,17 10^{-1} C - 2,55 10^{-1} D - \\
 & 9,26 E - 9,87 10^{-1} A B - 1,52 10^{-2} A C + 1,34 10^{-2} A D + 1,46 A E + \\
 & 4,31 10^{-3} B C + 9,71 10^{-4} B D - 4,20 \times 10^{-2} B E - 7,96 10^{-5} C D + \\
 & 1,45 10^{-2} C E + 2,31 10^{-2} D E
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

Puede observarse en la Tabla 4.6 que el valor de  $R^2$  predicho es razonable con el valor de  $R^2$  ajustado, ya que no difieren entre ellos en un valor mayor que 0,2. Además, el modelo demuestra una proporción señal/ruido deseable (Adecuación de la Precisión > 4), indicando una señal adecuada respecto al ruido. Se puede concluir que, es posible utilizar este modelo para navegar por el espacio de diseño.

### 4.3 Optimización de los parámetros de los procesos de desgomado enzimático

.A continuación se describen los resultados obtenidos en la optimización final de los procesos de desgomado para ambas enzimas estudiadas, usando el modelo de superficie de respuesta (RSM) combinado con el análisis de regresión y el diseño experimental.

#### 4.3.1 Optimización de los ensayos de desgomado con PLA1

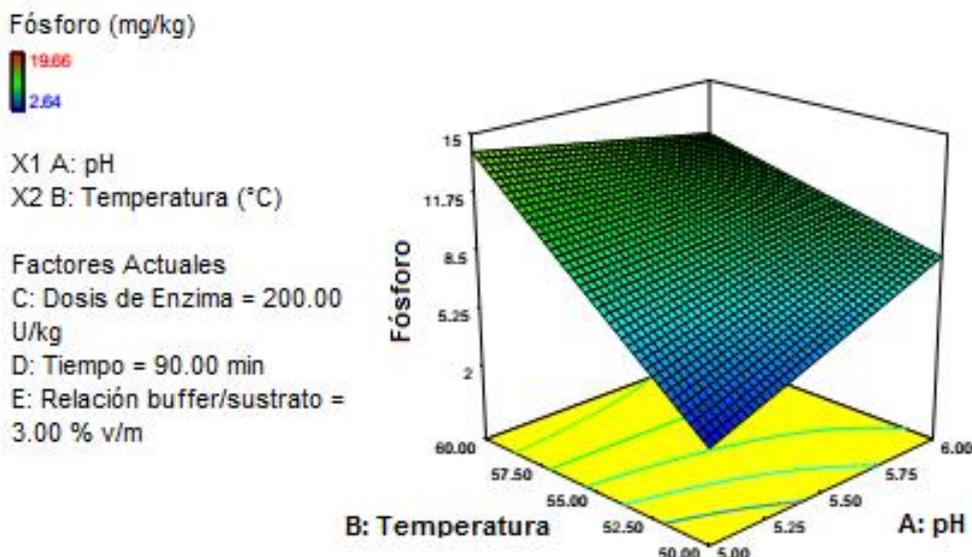
En la Tabla 4.7 se muestran las soluciones obtenidas para la optimización numérica del proceso de desgomado con Lecitase® Ultra (PLA1) minimizando el contenido de fósforo del aceite desgomado. El contenido mínimo de fósforo predicho por el modelo (3,03 mg/kg) se obtuvo a 50 °C, pH de buffer = 5 durante 90 minutos de reacción, utilizando una dosificación de enzima de 200 U/kg y una relación buffer/sustrato = 3 % v/m. Estas condiciones para los diferentes factores estudiados mostraron el valor máximo para la función deseabilidad (0,977). Esta función matemática asigna números entre 0 y 1 para las diferentes soluciones de optimización numérica, siendo 0 para las soluciones completamente indeseables y 1 para aquéllas completamente deseables o ideales para alcanzar el objetivo fijado, en este caso minimizar el contenido de fósforo residual del aceite desgomado. Estos resultados confirman la alta eficiencia de la enzima PLA1 para lograr contenidos de fósforo

que no pueden ser alcanzados por el proceso de desgomado acuoso (Capítulo III).

**Tabla 4.7-** Optimización numérica del diseño experimental para el desgomado con PLA1 minimizando el contenido de fósforo

Solución	Factores					Fósforo (mg/kg)	Deseabilidad
	A	B	C	D	E		
1	5,00	50,00	200,00	90,00	3,00	3,03	0,977
2	5,02	50,36	200,00	89,33	3,00	3,41	0,955
3	5,11	50,00	199,97	90,00	3,00	3,45	0,952
4	5,01	50,00	199,97	90,00	2,40	3,69	0,938
5	5,00	50,00	200,00	90,00	2,35	3,72	0,937

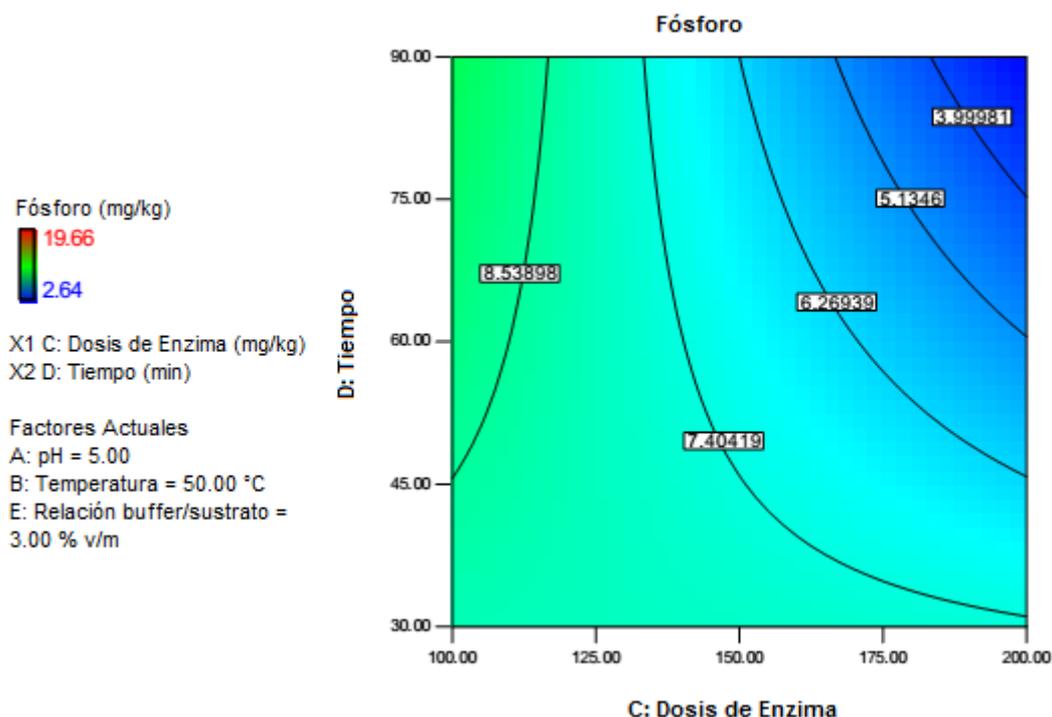
La superficie de respuesta tridimensional (3D) en función del pH del buffer y la temperatura y las curvas de contorno de la respuesta para la dosificación de la enzima vs tiempo se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6 respectivamente.



**Figura 4.5-** Medidas del cambio en el contenido de fósforo y su superficie de respuesta como una función de la temperatura y el pH del buffer para el aceite desgomado por Lecitase® Ultra (PLA1).

La Figura 4.5 permite divisar el efecto negativo del incremento de temperatura y pH sobre el contenido de fósforo residual. El aumento del fósforo a temperaturas superiores a 50 °C se puede atribuir a la desnaturalización

parcial de la enzima y la pérdida de su actividad hidrolítica (Jahani et al., 2008). Además, el aumento en valores de pH por encima de 5 resulta en un mayor contenido de fósforo debido a que la enzima tiene el pH óptimo = 5.



**Figura 4.6-** Curvas de contorno para el aceite desgomado por Lecitase® Ultra (PLA1) como una función del tiempo y la dosis de enzima.

Estos resultados son concordantes con las especificaciones comerciales, que indican que la enzima Lecitase® Ultra es una lipasa ácida que exhibe actividad máxima a pH = 5,0. J G Yang et al. (2006) informaron que la actividad máxima de la enzima se presentaba a pH = 5, cuando se trabajaba sobre aceite de colza desgomado previamente en medio ácido. Además, B. Yang et al. (2006) reportaron que la actividad fosfolipasa de la enzima Lecitase® Ultra, predominaba cuando la temperatura era superior a 40 °C, y su máximo se exhibía a 50 °C. Estos autores, encontraron que las condiciones óptimas de la enzima eran pH = 4,9 y la temperatura = 48,3 °C cuando se aplicaba la metodología de superficie de respuesta al desgomado enzimático en ensayos a escala de laboratorio de aceite de colza desgomado previamente con ácido. Para el procesamiento en planta (400 toneladas de aceite de colza procesadas por día) el pH tenía un fuerte impacto sobre el desempeño del

desgomado enzimático y recomendaron valores de pH entre 4,6 y 5,1 para lograr niveles de fósforo residual por debajo de 10 mg/kg. En experiencias posteriores realizadas en la misma planta de procesamiento con aceite de soja en idénticas condiciones se sugirió mantener el pH entre 4,8 y 5,1 (B. Yang, 2008).

El tiempo de reacción entre las variables individuales y la dosis de enzima a través de su interacción con la temperatura tienen el máximo efecto sobre el contenido de fósforo. En las curvas de contorno de la Figura 4.6, se observa que el contenido de fósforo se reduce al incrementar el tiempo de reacción y la dosis enzimática, en condiciones óptimas de temperatura y pH y manteniendo un máximo contenido de fase acuosa (3 %) para hacer más eficiente la reacción de hidrolasa de esta enzima. En el caso de un aceite de girasol crudo con contenidos de fósforo inicial cercanos a 500 mg/kg, se requerirá la máxima dosis de enzima (200 U/kg) y un tiempo de 90 min de reacción enzimática para lograr contenidos de fósforo cercanos a 3 mg/kg. Es claro que si se reduce la concentración de enzima, el tiempo de reacción deberá ser incrementado para lograr el mismo objetivo. Si el aceite crudo tuviera un menor contenido de fósforo se podría reducir la dosis de enzima y ajustar el tiempo de reacción para lograr idéntico objetivo.

#### 4.3.2 Optimización de los ensayos de desgomado con LAT

En la Tabla 4.7 se muestran las soluciones numéricas para la optimización del contenido mínimo de fósforo, todas se logran a concentraciones de enzima y tiempos de reacción próximos a los valores máximos ensayados. La función de deseabilidad para varias de estas soluciones resulta con un valor ideal igual a 1. Si se tienen en cuenta todas las soluciones con deseabilidad igual a 1, se podrían seleccionar las dos siguientes por poseer menores contenidos de fósforo predichos por el modelo:

- i) Tiempo de reacción = 89 minutos, dosis de enzima = 197 U/kg de aceite, pH del buffer = 5,9, temperatura = 59 °C y relación buffer/sustrato = 1,46. Fósforo predicho = 1,74 mg/kg.

- ii) Tiempo de reacción = 90 minutos, dosis de enzima = 190 U/kg de aceite, pH del buffer = 5,2, temperatura = 54 °C y relación buffer/sustrato = 1,05. Fósforo predicho = 2,39 mg/kg.

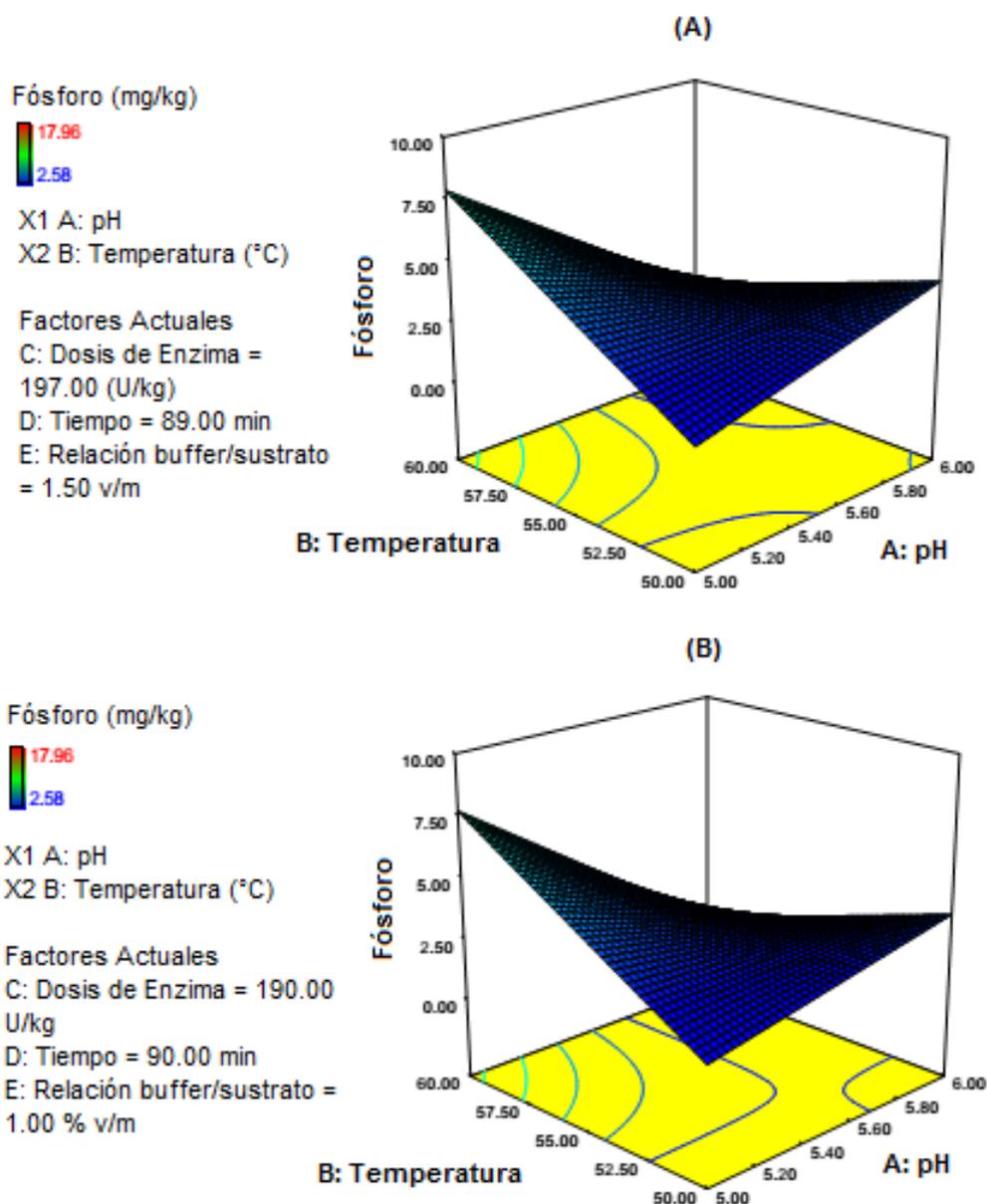
**Tabla 4.8-** Optimización numérica del diseño experimental para el desgomado con LAT minimizando el contenido de fósforo

Solución	Factores					Fósforo (mg/kg)	Deseabilidad
	A	B	C	D	E		
1	5,82	56,17	188,23	88,50	1,10	2,51	1,000
2	5,91	58,71	196,88	88,83	2,21	2,56	1,000
3	5,95	51,43	198,51	88,33	1,01	2,57	1,000
4	6,00	59,43	180,66	83,29	1,61	2,59	1,000
5	5,65	54,53	199,87	89,99	1,22	2,57	1,000
6	5,18	54,02	190,23	89,92	1,01	2,46	1,000
7	5,50	51,60	199,61	89,72	1,18	2,48	1,000
8	5,99	57,83	192,17	87,73	1,68	2,52	1,000
9	5,99	59,58	190,54	79,24	1,66	2,42	1,000
10	5,77	50,30	199,37	89,89	1,11	2,54	1,000
<b>11</b>	<b>5,91</b>	<b>59,13</b>	<b>197,36</b>	<b>88,60</b>	<b>1,46</b>	<b>1,74</b>	<b>1,000</b>
12	5,99	56,08	173,30	89,70	1,01	2,46	1,000
13	5,99	56,08	187,88	87,95	1,42	2,58	1,000
<b>14</b>	<b>5,16</b>	<b>54,54</b>	<b>190,41</b>	<b>89,85</b>	<b>1,05</b>	<b>2,39</b>	<b>1,000</b>
15	5,05	50,20	196,13	80,50	1,05	2,53	1,000
16	5,67	52,51	199,39	89,25	1,18	2,55	1,000
17	5,81	54,58	197,30	89,93	1,30	2,51	1,000
18	5,00	50,01	194,90	89,95	2,70	2,58	1,000
19	5,98	56,79	196,65	88,80	1,26	2,14	1,000
20	5,96	55,01	199,67	78,95	1,00	2,55	1,000
21	5,22	50,00	200,00	75,55	1,00	3,07	0,968
22	6,00	60,00	200,00	90,00	2,96	3,44	0,944

Las dos soluciones de optimización numérica más adecuadas involucraron diferentes valores de pH: 5,2 y 5,9 (Tabla 4.7). Soe & Brown (2011) han sugerido una ventaja adicional del proceso enzimático con la enzima lípido aciltransferasa ya que el pH no necesitaba ser ajustado porque la enzima lograba desgomar óptimamente desde valores de pH 5,0-5,5 hasta 6,5-7,0, demostrando una alta reactividad.

Los niveles óptimos alcanzados y la marcada interacción entre el pH y la temperatura son claramente demostrados por este estudio. La Figura 4.7 muestra el efecto de la temperatura y del pH sobre el contenido de fósforo residual. Cuando ambos factores convienen en el mayor o menor valor, el

contenido de fósforo alcanza el nivel más bajo. La enzima aciltransferasa trabaja bien en toda la gama de pH y temperaturas seleccionados en este trabajo.

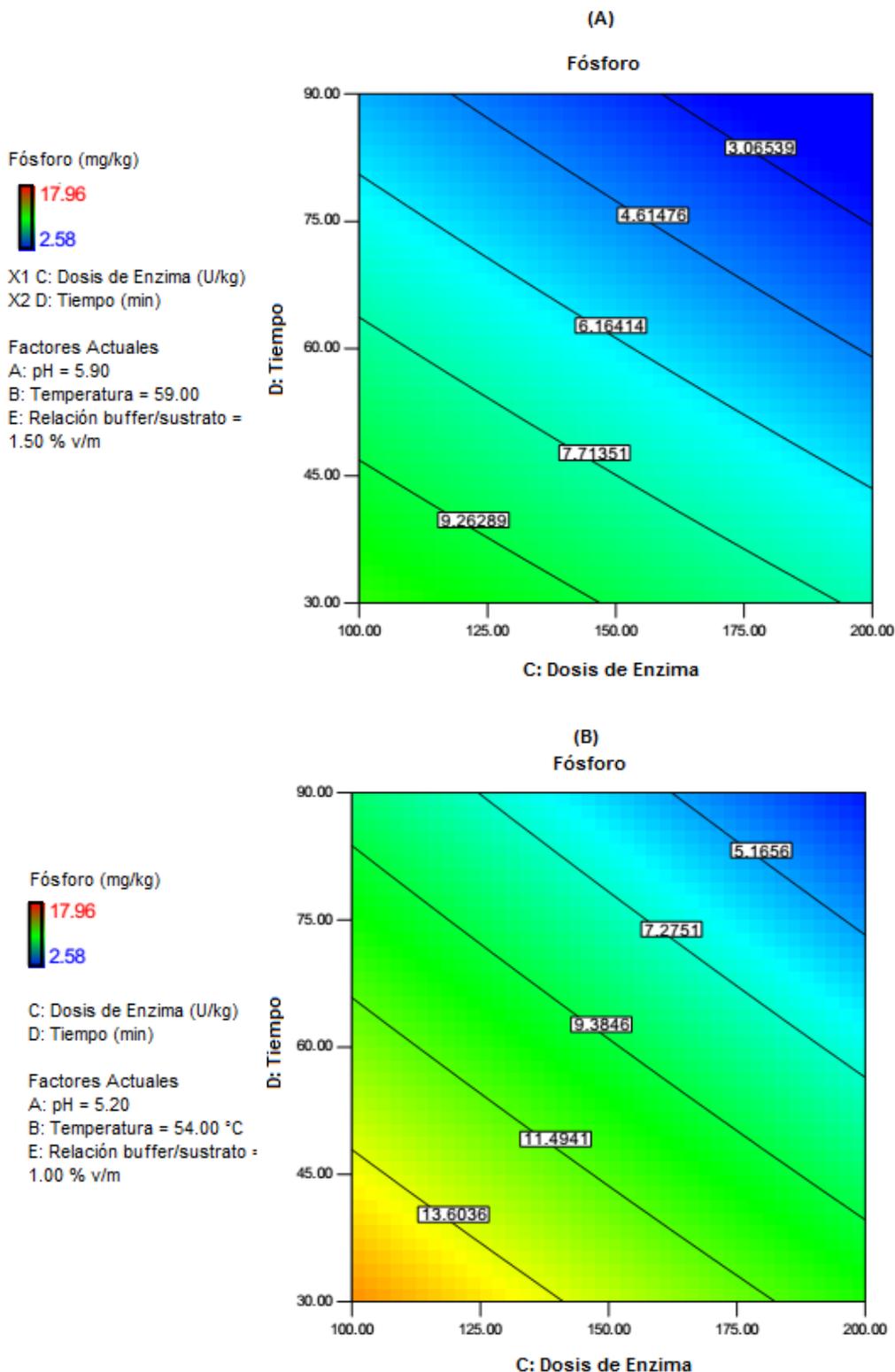


**Figura 4.7-** Medidas del cambio en el contenido de fósforo y sus superficies de respuesta como una función de la temperatura y el pH del buffer para el aceite desgomado por LysoMax® Oil (LAT).

- (A) Factores C-E fijos en los valores de optimización numérica (solución 11, Tabla 4.7).  
(B) Factores C-E fijos en los valores de optimización numérica (solución 14, Tabla 4.7).

Entre las variables individuales, la dosis de enzima y el tiempo de reacción tienen el máximo efecto sobre el contenido de fósforo. Las curvas de contorno (Figura 4.8) correspondientes a estos dos factores muestran que el

contenido de fósforo es reducido al incrementar el tiempo de reacción y la dosificación de enzima.



**Figura. 4.8-** Diagramas de contorno para el aceite desgomado por LysoMax® Oil como una función del tiempo y la dosis de enzima.

- (A) Factores A, B y E fijos en los valores de optimización numérica (solución 11, Tabla 4.7).
- (B) Factores A, B y E fijos en los valores de optimización numérica (solución 14, Tabla 4.7).

Con dosis de enzima próximas a 200 U/kg de aceite y tiempos de reacción aproximados a 90 min, se pueden obtener aceites desgomados con niveles de fósforo por debajo de 3 mg/kg, partiendo de un aceite con un contenido inicial de fósforo próximo a 500 mg/kg.

Finalmente, la relación buffer/aceite para las dos soluciones óptimas se aproxima al valor más bajo ensayado, confirmando que a diferencia de la fosfolipasa, la enzima LAT por su actividad de aciltransferasa necesita menos agua en el medio de reacción para tener una alta reactividad. La patente de aplicación de la enzima lípido aciltransferasa, ensaya contenidos de agua entre 0,1 y 5 % m/m y sugiere preferiblemente, contenidos de agua menores que 1-2 % argumentando que resultan en una eficiente actividad enzimática y además conducen a una reducción de costos del proceso de desgomado (Soe & Brown, 2011).

#### 4.4 Conclusiones

El diseño experimental permitió demostrar que las condiciones de reacción tienen un efecto significativo en la eficiencia de los procesos de desgomado enzimático. La dosis de enzima fue la variable más significativamente influyente sobre el proceso de desgomado enzimático de las dos enzimas estudiadas. Lecitase® Ultra se ve afectada por todos los factores principales estudiados (pH, temperatura, dosificación de la enzima, el tiempo, y la relación buffer/sustrato). LysoMax® Oil no está significativamente afectada por la relación de buffer/sustrato como factor principal. Sin embargo, este factor influencia significativamente el proceso de desgomado mediante sus interacciones. Las condiciones óptimas para lograr el contenido mínimo de fósforo residual en el aceite se obtuvieron a: temperatura = 50 °C, pH del buffer = 5, relación buffer/sustrato = 3 % v/m, concentración de enzima = 200 U/kg de aceite de dosis de enzima, durante 90 minutos, para la fosfolipasa A1 Lecitase® Ultra. El desgomado con la enzima lípido aciltransferasa LysoMax® Oil exhibió su actividad máxima y mínimos contenidos de fósforo en los aceites desgomados para los valores extremos de temperaturas y pHs ensayados. Los mínimos contenidos de fósforo se observaron a pH = 5,9 y temperatura = 59 °C, y un segundo valor óptimo a pH = 5,2 y temperatura =

54 °C. Estos resultados obtenidos indican que el pH y la temperatura no tienen que ser estrictamente controlados dentro del rango operativo de la enzima. Además, la enzima LAT a diferencia de la enzima PLA1, se desempeñó mejor con bajas relaciones buffer/sustrato siendo los valores óptimos 1,0-1,5 % debido a la naturaleza de su actividad enzimática como se ha explicado previamente. En condiciones óptimas, el proceso de desgomado con LysoMax® Oil o Lecitase® Ultra disminuye de manera eficiente el contenido de fósforo en el aceite de girasol crudo por debajo de 3 mg/kg, que es comparable con el valor de respuesta predicha por los modelos propuestos.

Estos procesos de desgomado enzimático, deberían ser ajustados en cuanto a dosis de enzima y tiempo de reacción, manteniendo el resto de los factores en los valores óptimos, teniendo en cuenta el contenido inicial de fósforo del aceite a desgomar.

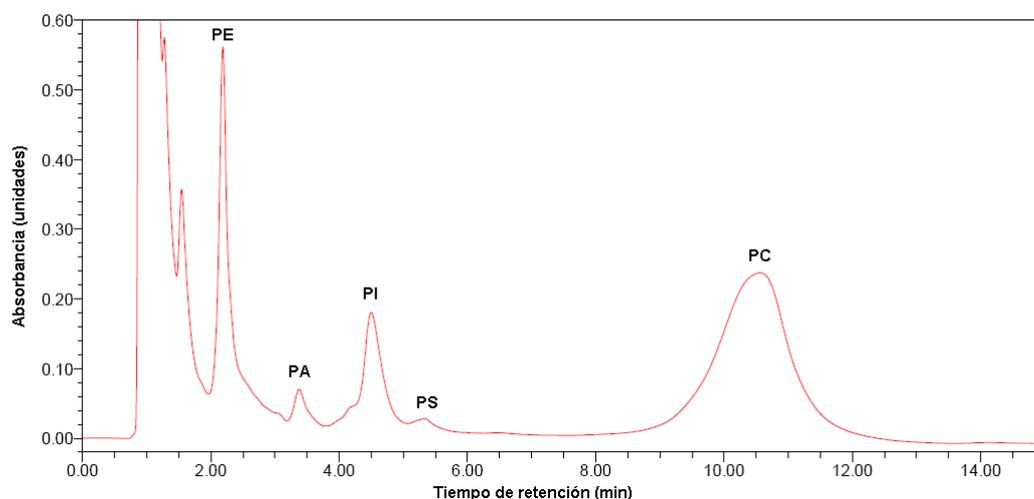
Los resultados sugieren que el diseño a partir del Software Design Expert, combinado con el modelado de la superficie de respuesta ha demostrado ser eficaz en la determinación de las condiciones óptimas para el desgomado enzimático de aceite de girasol. Es considerado apreciar que ambas enzimas son una buena perspectiva para el desgomado de aceites vegetales siendo factible estandarizar las condiciones de reacción para el uso indistinto de cualquiera de las dos enzimas estudiadas, en la misma planta de refinado de aceites.

**CAPÍTULO V:**  
**LOS FOSFOLÍPIDOS DURANTE LOS**  
**PROCESOS DE DESGOMADO**

### 5.1 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de fosfolípidos totales de los aceites

Los fosfolípidos (PLS) son componentes naturales de la semilla de girasol, que pasan al aceite durante la extracción, aumentando su contenido con los tratamientos térmicos y la intensidad de extracción (Carrín & Carelli, 2010). Son un tipo de lípidos anfipáticos que se reducen durante los procesos de desgomado, cuya estructura química se ha presentado en el Capítulo I de esta tesis y entre los que se destacan PC, PI, PE y PA. Son los principales componentes no-triglicéridos del aceite de girasol (Dorrel & Vick, 1997).

La Figura 5.1 muestra un cromatograma HPLC-UV de la fracción de PLS del aceite de girasol crudo obtenido por extracción con solvente, empleado en este estudio. Se pueden observar cuatro PLS principales identificados mediante el método de estándar externo como PE, PA, PI y PC que representan aproximadamente 97,5 % del área total correspondiente a PLS. Por ello, en este trabajo de tesis, se estimará como PLS totales a la suma de las concentraciones de estos cuatro PLS mayoritarios. No se considerarán las concentraciones de fosfatidil serina (PS) y otros fosfolípidos minoritarios cuyas áreas totales representan un valor aproximado de 2,5 %.

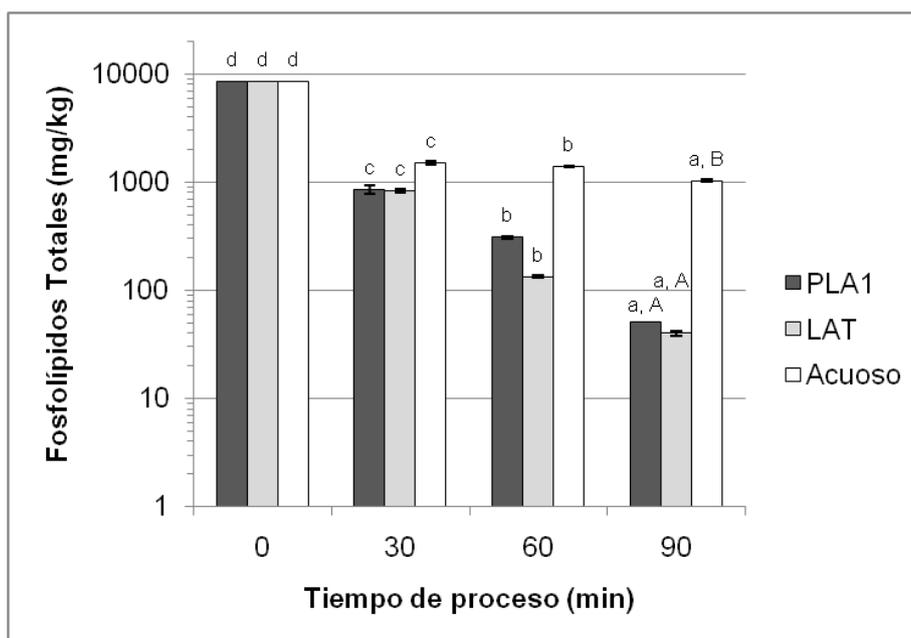


**Figura 5.1-** Cromatograma HPLC-UV del aceite de girasol crudo de extracción (Lote 2).

PE = Fosfatidil etanolamina – PA = Ácido fosfatídico – PI = Fosfatidil inositol – PS = Fosfatidil serina – PC = Fosfatidil colina.

Varios estudios realizados revelan que la concentración relativa de los distintos fosfolípidos en el aceite, depende del método de extracción (Carelli et al., 1997; Brevedan et al., 2000). Los aceites obtenidos por extracción con solvente tienen un mayor contenido de fosfolípidos (0,59-1,32 % m/m) que los obtenidos por prensado (0,24-0,74% m/m) (Carelli et al., 2002a, Carrín & Carelli, 2010). El valor obtenido en este estudio, (0,84 % m/m en promedio) es concordante con los datos reportados por Brevedan et al. (2000) para aceites de girasol de extracción obtenidos del mismo origen geográfico.

La Figura 5.2 muestra la evolución del contenido de PLS totales en los aceites desgomados con agua y mediante los procesos de desgomado enzimático con fosfolipasa (PLA1) y aciltransferasa (LAT) en condiciones optimizadas de pH del buffer, temperatura, dosis de enzima y relación buffer/sustrato.



**Figura 5.2-** Evolución de los contenidos de PLS totales del aceite para los procesos de desgomado enzimático y acuoso.

Equipo: reactor batch (1000 mL) Desgomados Enzimáticos en condiciones optimizadas: PLA1 (200 U/kg, temperatura = 50 °C, pH del buffer = 5,0, relación buffer/sustrato = 3 % v/m), LAT (190 U/kg, temperatura = 54 °C, pH del buffer = 5,2, relación buffer/sustrato = 1 % v/m), aceite de girasol Lote 2 (Fósforo inicial = 487,1 mg/kg), masa inicial de aceite 1000 g.

Valores medios de una réplica analizada por duplicado inyectando cada uno dos veces en el cromatógrafo  $\pm$  desviación estándar.

Valores medios seguidos por igual letra minúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para cada proceso.

Valores medios seguidos por igual letra mayúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para tiempos de desgomado de 90 min.

El ANOVA doble teniendo en cuenta los procesos y los tiempos de desgomado como fuentes de variación reveló diferencias significativas para ambas variables, pero también, una interacción significativa entre ambas (Tabla 5.1). Por ello, se llevó a cabo el análisis estadístico evaluando cada proceso en función del tiempo y las diferencias entre procesos para cada tiempo.

**Tabla 5.1-** ANOVA para los contenidos de PLS (mg/kg) del aceite durante los procesos de desgomado enzimático y acuoso

<b>Fuente de Variación</b>	<b>S.C.</b>	<b>G.L.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F</b>	<b>Valor-p</b>
Modelo	273.202.228	11	24.836.566	23.714	<0,0001
Tiempo (min)	269.493.354	3	89.831.118	85.771	<0,0001
Proceso	2.643.136	2	1.321.568	1262	<0,0001
Tiempo x Proceso	1.065.739	6	177.623	170	<0,0001
Error	12.568	12	1.047		
Total	273.214.797	23			

El proceso de desgomado acuoso redujo significativamente ( $p < 0,0001$ ) los niveles de PLS totales desde 0,84 hasta 0,10 %, lo que equivale a una reducción aproximada de 88 %. Estos resultados están de acuerdo con los rendimientos observados para disminuir los contenidos de fósforo (88 %) usando el mismo reactor y condiciones experimentales (Capítulo III). Se observó una disminución más abrupta en los primeros 30 min de desgomado y luego, esta disminución continuó hasta los 90 min, pero en una forma más lenta (Figura 5.2).

Como puede observarse en la Figura 5.2, los contenidos de PLS totales del aceite desgomado con las enzimas PLA1 o LAT durante 90 min (50 y 40 mg/kg, respectivamente) no diferían significativamente; sin embargo, ambos contenidos eran significativamente más bajos que el del aceite desgomado con agua (1,0 g/kg). Mediante ambos procesos de desgomado enzimático se logró una reducción del contenido de PLS totales de 99,4-99,5 %, también concordante con la disminución observada en el contenido de fósforo (99,4 %, Capítulo III).

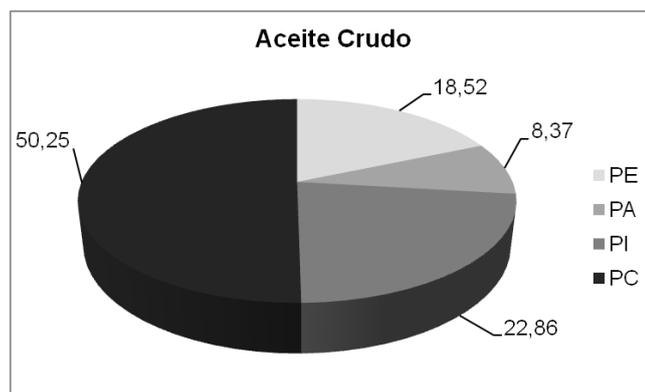
Estos resultados confirman que el análisis del contenido de fósforo en los aceites es una buena herramienta para seguir la evolución de los procesos

de desgomado, tanto acuoso como enzimáticos, y evaluar sus eficiencias y condiciones óptimas.

Generalmente, para estimar el contenido de PLS en los aceites, se aplica un factor igual a 30, con la intención de convertir el porcentaje de fósforo total en su contenido equivalente de PLS. Sin embargo, este factor aplicado en el presente trabajo, arrojó valores en los aceites crudos notablemente superiores a los obtenidos por el análisis cromatográfico. Posiblemente este factor sobreestima los PLS debido a que los aceites crudos contienen fósforo de otras fuentes no relacionadas con los PLS (Carelli et al., 2002a). Factores de conversión fósforo-PLS menores para los aceites de girasol desgomados en comparación con los crudos han sido informados previamente (Carelli et al., 2002a). Por otro lado, como en el procedimiento cromatográfico no son cuantificados todos los PLS, el factor sería subestimado. Además, dicho factor dependerá esencialmente de la composición de la fracción de PLS y de los ácidos grasos presentes en ellos que son diferentes en los aceites crudos y desgomados con agua o enzimas. Evidentemente, estos factores no son aconsejables para estimar los contenidos de PLS totales durante los procesos de desgomado, lo que condujo a utilizar en este trabajo procedimientos mediante HPLC más confiables para estimar los niveles de los PLS más relevantes.

## **5.2 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de fosfolípidos individuales de los aceites**

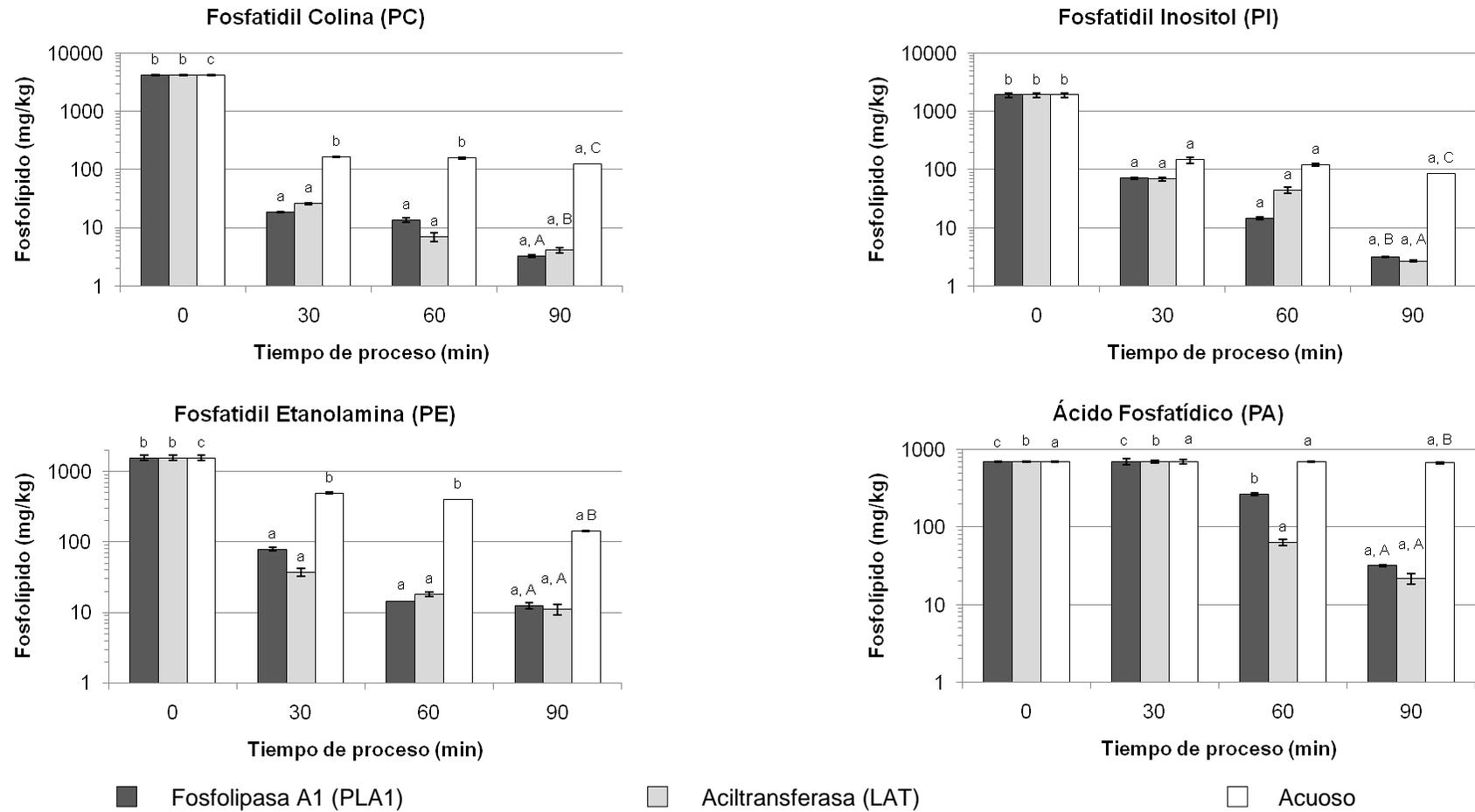
La concentración más alta observada en la fracción de PLS del aceite crudo, correspondió a la PC y en la distribución porcentual, los fosfolípidos hidratables HP (PC y PI) alcanzaron el 73 % del contenido total (Figura 5.3). En aceites de girasol de la misma región geográfica, obtenidos mediante extracción por solvente, se ha informado en estudios previos (Carelli et al., 2002a), un rango amplio de variación de los porcentajes de estos dos PLS más fácilmente hidratables (44,4-82,5 %). Además, se midió 17,0-25,6 % de PE y 10,7-22,0 % de PA no hidratable.



**Figura 5.3-** Distribución porcentual de los PLS individuales en el aceite crudo. Valores medios de una réplica analizada por duplicado inyectando cada uno dos veces en el cromatógrafo.

La Figura 5.4 muestra los cambios en los contenidos de PLS individuales más relevantes durante los procesos de desgomado acuoso y enzimáticos con las enzimas PLA1 o LAT en condiciones optimizadas.

En el aceite desgomado con agua los PLS más hidratables, PC y PI, se redujeron drásticamente durante los primeros 30 min (Figura 5.4). Si se prolongaba el tiempo de desgomado, ambos PLS se reducían de una manera significativamente más lenta. Después de 90 min de desgomado acuoso, los contenidos de PC y PI, disminuyeron en promedio 97,0 y 95,5 %, respectivamente. La PE demostró una menor hidratabilidad disminuyendo 90,9 % después del tratamiento de desgomado acuoso durante 90 min. Otros autores han concluido que PC y PI se hidratan considerablemente más rápido que PE y PA durante los procesos de desgomado acuoso (Dijkstra 1994; Bredvan et al., 2000). Por ello, se ha sugerido que un desgomado eficiente debe reducir los NHP PE y PA, además de eliminar los HP.



**Figura 5.4-** Evolución de los contenidos de fosfolípidos individuales para los procesos de desgomado enzimático y acuoso. Equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Figura 5.2. Valores medios de una réplica analizada por duplicado inyectando cada uno dos veces en el cromatógrafo ± desviación estándar. Valores medios seguidos por igual letra minúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para cada proceso. Valores medios seguidos por igual letra mayúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para tiempos de desgomado = 90 min.

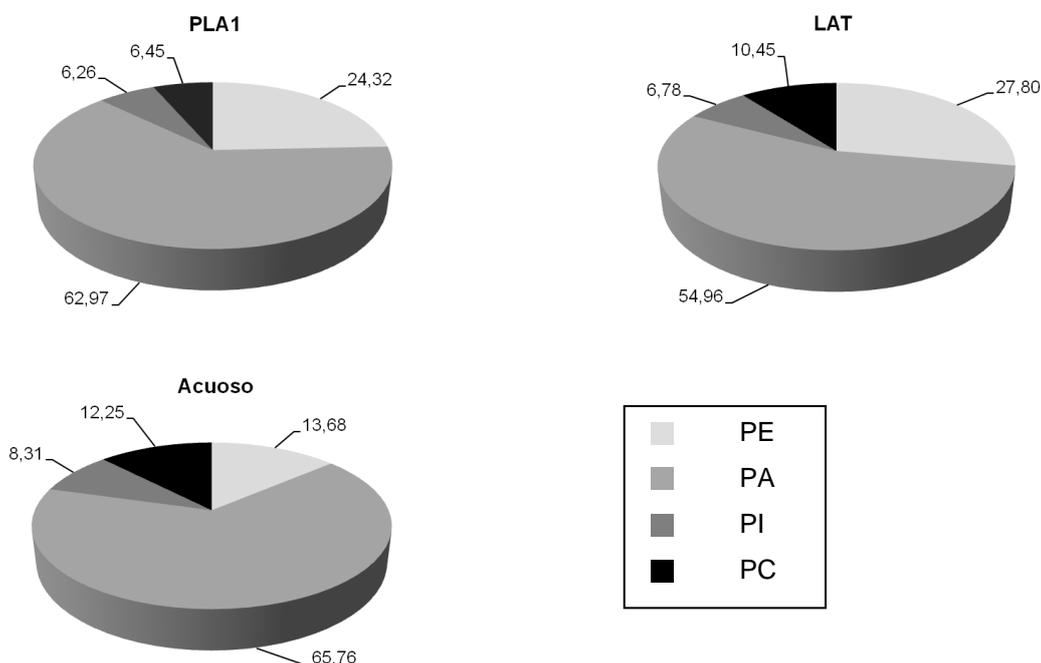
El desgomado acuoso no fue capaz de reducir la concentración de PA, la que no se modificó significativamente durante todo el tiempo de procesamiento, manteniéndose en un valor promedio igual a aproximadamente 700 mg/kg (Figura 5.4). Sobre el final del procesamiento se observó una disminución en el valor promedio que se aproximó a 4 % aunque no fue significativa desde el punto de vista estadístico. Estos resultados confirman la calificación del PA como NHP. Los NHP, principalmente sales de calcio y magnesio de PA y liso-PA, glicerofosfatos y fosfatos inorgánicos quedan en el aceite después del desgomado acuoso (Padley et al., 1994). Se han expresado las siguientes conclusiones sobre la velocidad de hidratación de los PLS (Seagers, 1985; Dijkstra, 1994):

- PC es siempre hidratable como ion dipolar (“Zwitterion”).
- PI en el aceite forma complejos con iones potasio que son completamente hidratables.
- PE y PA son hidratables cuando están combinados con iones potasio y no hidratables cuando están formando complejos con iones divalentes.
- El PA existe como ácido parcialmente disociado.

El efecto de los procesos de desgomado enzimático utilizando PLA1 o LAT sobre los PLS mayoritarios puede observarse en la Figura 5.4. El patrón de distribución cualitativa se modifica durante el tratamiento con ambas enzimas a los 30 minutos de proceso. PC, PI y PE disminuyeron significativamente durante los primeros 30 min de desgomado observándose luego una disminución no significativa de los valores promedio. Al final del procesamiento, los procesos enzimáticos redujeron más significativamente estos PLS que el proceso de desgomado acuoso, observándose reducciones superiores a 99 % para estos tres PLS. Después de 90 min de proceso enzimático, se apreció una mayor selectividad de la enzima PLA1 por PC, dado que disminuye más significativamente los contenidos de este fosfolípido (99,9 %) mientras que la enzima LAT fue más selectiva sobre PI disminuyendo en el mismo porcentaje su concentración. Diferencias en las especificidades de las enzimas PLA1 de distinto origen sobre los distintos PLS se han informado previamente (De María et al., 2007).

En lo que respecta al PA no hidratable, ambas enzimas fueron capaces de reducir significativamente su concentración en comparación al proceso de desgomado acuoso pero requirieron un tiempo mayor (60 min) que para los otros PLS (Figura 5.4). Al final del proceso ambas enzimas redujeron el PA en la misma forma no mostrando diferencias significativas entre ellas y alcanzando porcentajes de reducción comprendidos entre 95 y 97 %.

En la Figura 5.5 se muestran las composiciones relativas porcentuales de los PLS mayoritarios. En los aceites desgomados con agua o enzimas se puede observar claramente un desplazamiento del predominio de HP observado en el aceite crudo (Figura 5.3) hacia NHP. Los NHP constituyen en promedio 87,3 % de los PLS del aceite desgomado con PLA1 y 82,8 % de los desgomados con LAT. En el aceite desgomado con agua el porcentaje de HP se redujo, pero en promedio aún representa 20,6 % de los PLS mayoritarios.



**Figura 5.5-** Composición relativa porcentual de los PLS mayoritarios de los aceites desgomados con agua y enzimas durante 90 min.

Equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Figura 5.2.

Valores medios de una réplica analizada por duplicado inyectando cada uno dos veces en el cromatógrafo  $\pm$  desviación estándar.

Clausen (2001) estudió el proceso de desgomado con una enzima PLA1 sobre aceite de colza e informó que la enzima reducía rápidamente los contenidos de PA y PE que eran los PLS mayoritarios en este aceite y que en la fase de gomas aumentaban los liso-PLS, principalmente liso-PA. Un análisis completo de las gomas obtenidas a partir del desgomado de aceites de soja y colza con Lecitase® Ultra reveló la presencia de PC, PE, PI, PA, liso-PC, glicerofosfatidil colina (GPC), liso-PE, glicerolfosfatidil etanolamina (GPE), liso-PI, glicerofosfatidil inositol (GPI), liso-PA y glicerol fosfato (GPA) (Yang et al., 2008). Estos resultados demuestran que esta enzima tiene características lipofílicas y actúa hidrolizando preferencialmente los PLS en la fase aceite.

Soe & Brown (2011) destacaron que la enzima LAT presentaba actividades similares sobre los cuatro PLS mayoritarios del aceite de soja. Después de 15 min de tratamiento con esta enzima PE y PC habían desaparecido prácticamente y se observaba menor actividad sobre PI y PA. Sin embargo después de 30 min era notable la actividad de la enzima sobre PI y PA. Esto podría explicar la mayor selectividad sobre PI, observada en este trabajo de tesis, para la enzima LAT después de 90 min de procesamiento.

### 5.3 Conclusiones

Los procesos de desgomado enzimático con las enzimas PLA1 o LAT en las condiciones optimizadas en este trabajo de tesis fueron capaces de reducir los contenidos de HP (PC y PI), medianamente hidratables (PE) y no hidratables (PA), logrando valores satisfactorios para los procesos de refinado físico más exigentes.

Si bien al final del procesamiento durante 90 min ambas enzimas no demostraron diferencias estadísticamente significativas para reducir los niveles de fósforo residual y PLS mayoritarios se observaron algunas diferencias entre las reacciones enzimáticas. La enzima fosfolipasa fue más selectiva sobre PC como sustrato, mientras que la aciltransferasa presentó mayor selectividad sobre PI entre los HP. Las enzimas no mostraron diferencias en sus reacciones con los PLS menos hidratables (PE y PA).

**CAPÍTULO VI:**  
**EFFECTO DEL DESGOMADO SOBRE EL CONTENIDO**  
**DE CERAS DEL ACEITE**

## 6.1 Introducción

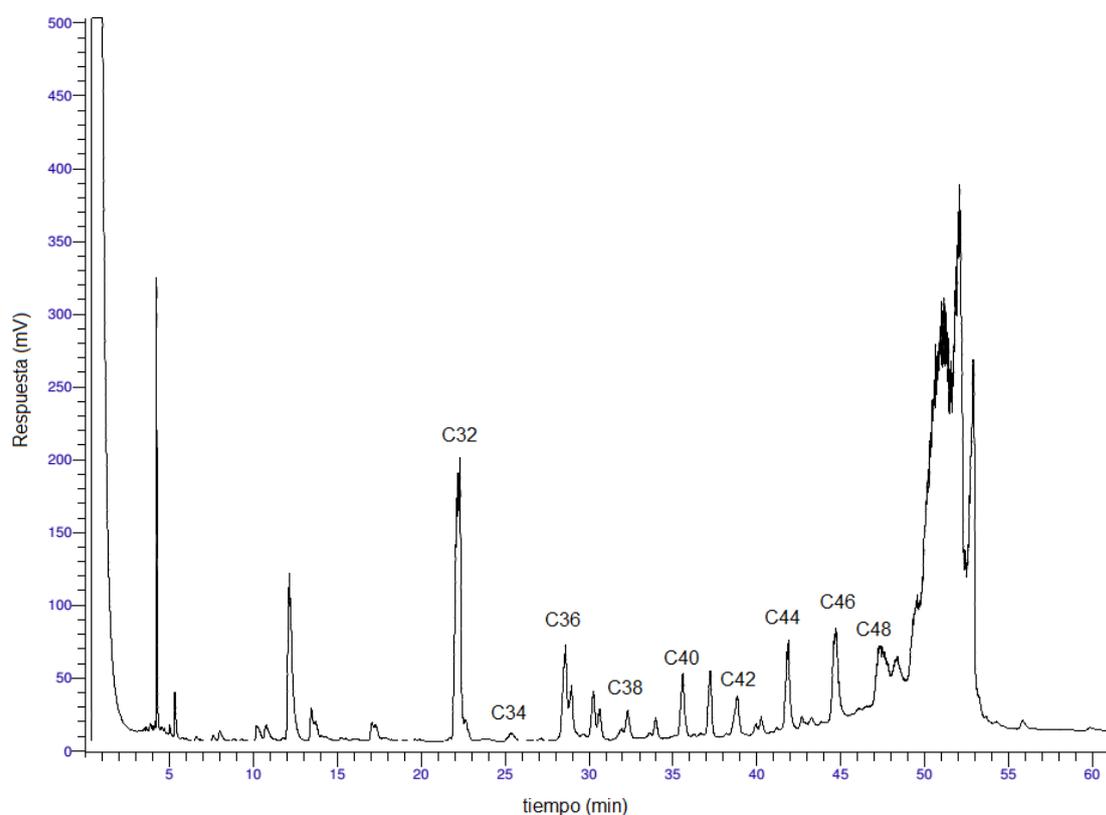
Las ceras son componentes naturales del aceite de girasol, cuya presencia influye sobre la calidad y estabilidad del mismo. Se encuentran mayoritariamente en la cáscara de las semillas y pasan al aceite durante el proceso de extracción. Químicamente son ésteres de ácidos grasos combinados con alcoholes grasos de alta masa molar. Las ceras presentes en el aceite de girasol crudo, contienen entre 36 y 58 átomos de carbono (Hénon, 1986; Carrín & Carelli, 2010; Carelli et al., 2012). Los ácidos grasos y los alcoholes que las constituyen, tienen 14-30 y 16-32 átomos de carbono respectivamente (Ramos Ayerbe & Rodríguez Berbel, 1985; Mariani & Fedeli, 1989; Liu et al., 1996; Carelli et al., 2002b; Añón, 2012). El contenido de ceras en el aceite depende del híbrido, el origen y la conservación de la semilla, el porcentaje de permanencia de la cáscara con la semilla y la temperatura y tecnología utilizada en el proceso de extracción (Carelli et al., 2002b). El descerado, se refiere a la eliminación de ceras de alto punto de fusión; que son las responsables de la turbidez de los aceites cuando se los expone a condiciones de almacenamiento. En general, las ceras con número de carbono mayor a 44 tienden a cristalizar a temperatura ambiente y de refrigeración, produciendo opacidad en el aceite, alterando la apariencia del mismo e interfiriendo en el procesamiento y comercialización (Givon & Tirtiaux, 2000; Carrín & Carelli, 2010).

Así, la fracción de ceras con átomos de carbono menor a 40, se denomina soluble, las ceras que contienen entre 40-43 átomos de carbono constituyen la fracción parcialmente soluble, y la fracción de ceras con número de carbonos mayor o igual que 44 se denomina cristalizables (Carelli et al., 2012).

En este capítulo se analiza el contenido de ceras por cromatografía en columna de silicagel hidratada seguida por cromatografía gaseosa capilar (CC-CGC) con inyección on-column, en los diferentes aceites desgomados, a fin de evaluar el efecto de los procesos de desgomado acuoso y enzimáticos sobre el contenido de ceras residuales.

## 6.2 Contenidos de ceras del aceite de girasol crudo

En la Figura 6.1 se muestra un cromatograma del aceite de girasol de extracción crudo correspondiente al Lote 2. Puede observarse que la fracción de ceras involucra la serie homóloga de número par de átomos de carbono, identificada comparando con los tiempos de retención de un patrón externo preparado con una mezcla de ceras pares C34-C44. El pico identificado como C32 (laurato de araquidilo) corresponde al estándar interno.



**Figura 6.1-** Cromatograma de la fracción de ceras del aceite de girasol de extracción crudo (Lote 2).

En el cromatograma se observan también picos no identificados que corresponderían a una serie homóloga de ceras de número impar de átomos de carbono. La metodología analítica empleada en este trabajo de tesis, no permite identificar picos correspondientes a ceras con más de 48 átomos de carbono, porque como es notable en el cromatograma de la Figura 6.1 se registran picos intensos, con fuertes interferencias que enmascaran la posible presencia de ceras.

Recientemente, se ha propuesto una modificación del método empleado en este trabajo de tesis en el paso de cromatografía en columna previo a la cromatografía gaseosa, aplicable al análisis de ceras en aceites vegetales crudos y refinados (Carelli et al., 2012). Esta modificación consiste en el uso de una doble capa de silicagel hidratada y siglicagel impregnada con nitrato de plata como soporte para la CC. La técnica permite la recuperación completa y remoción de sustancias interferentes, fundamentalmente ésteres de esteroides y alcoholes triterpénicos (Mariani & Fedeli, 1989; Giob et al., 1989). Así, es posible determinar ceras pares e impares entre C34 y C58 en el caso del aceite de girasol y en otros aceites vegetales hasta C60. En el aceite de girasol crudo analizado con esta metodología la serie homóloga de ceras impares es la que más se reduce alcanzando concentraciones desde trazas hasta 5 mg/kg.

Los resultados obtenidos para la determinación de ceras correspondientes al Lote 2 de aceite crudo mediante el método tradicional, se registran en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1-** Contenido de ceras en el aceite crudo

<b>Ceras</b>	<b>mg/kg</b>	<b>%</b>
<b>C36</b>	87,0 ± 12,1	16,7 ± 2,3
<b>C37</b>	36,9 ± 0,6	7,1 ± 0,1
<b>C38</b>	20,6 ± 1,3	4,0 ± 0,3
<b>C39</b>	11,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1
<b>C40</b>	45,2 ± 0,3	8,7 ± 0,0
<b>C41</b>	43,1 ± 2,0	8,3 ± 0,4
<b>C42</b>	27,7 ± 1,1	5,3 ± 0,2
<b>C43</b>	12,5 ± 0,5	2,4 ± 0,1
<b>C44</b>	54,0 ± 0,1	10,4 ± 0,0
<b>C45</b>	8,7 ± 2,9	1,7 ± 0,6
<b>C46</b>	73,7 ± 1,0	14,2 ± 0,2
<b>C48</b>	99,8 ± 6,9	19,2 ± 1,4
<b>Parcialmente solubles, C40-C43</b>	128,5 ± 0,67	24,7 ± 0,1
<b>Cristalizables, C44-C48</b>	236,1 ± 10,7	45,3 ± 2,1
<b>Totales</b>	520,9 ± 1	100

Aceite de girasol crudo de extracción (Lote 2).

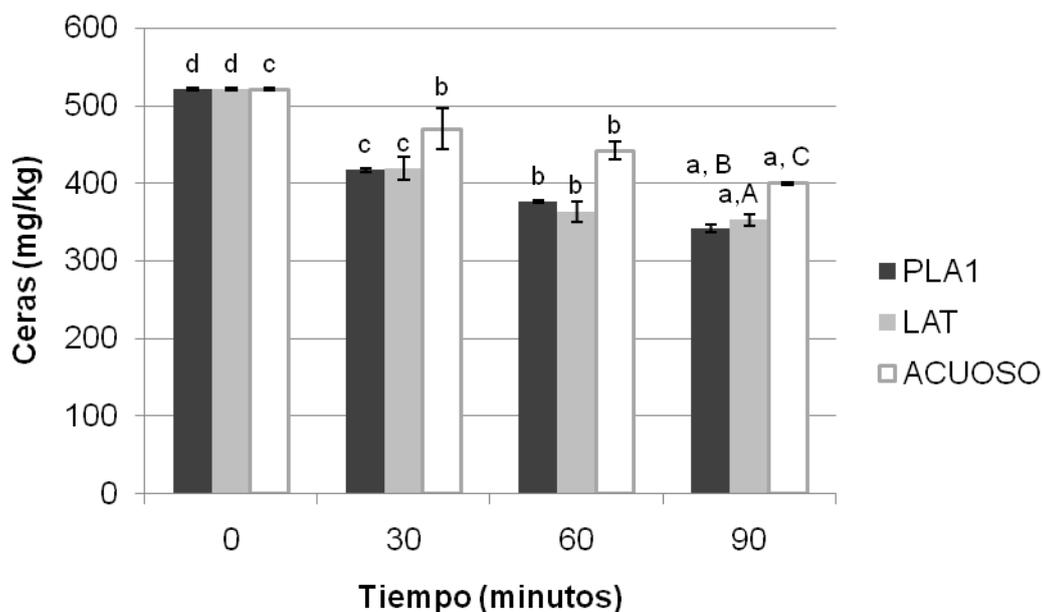
Valores medios de una réplica analizada por duplicado ± desviación estándar.

El valor de ceras totales obtenido en este estudio fue 520,9 mg/kg de aceite. En estudios previos para aceite de girasol crudo de extracción por hexano del mismo origen se observó una gran variabilidad en los contenidos de ceras, habiéndose reportado hasta 1000 mg/kg (Carelli et al., 1998, 2002, 2012). La fracción de ceras en el aceite de girasol crudo en este estudio comprendió ceras entre 36 y 48 átomos de carbono, correspondiendo aproximadamente 45 % a ceras insolubles o cristalizables y 25 % a ceras parcialmente solubles, en concordancia con datos de la literatura (Mariani & Fedeli, 1989). Cabe señalar, como ya se indicó previamente que aunque en este estudio no se informan ceras con más de 48 átomos de carbono por limitaciones de la metodología analítica usada, el aceite de girasol crudo contiene ceras por encima de C50 y hasta C58 en niveles por debajo de 20 mg/kg (Carelli et al., 2012).

### **6.3 Efectos de los procesos de desgomado acuoso y enzimáticos sobre los contenidos de ceras totales del aceite**

La Figura 6.2 muestra la evolución del contenido de ceras totales en los aceites tratados mediante el proceso de desgomado con agua y los procesos de desgomado enzimático con fosfolipasa (PLA1) y aciltransferasa (LAT) en condiciones optimizadas de pH del buffer, temperatura, dosis de enzima y relación buffer/sustrato.

Para analizar el efecto de los procesos de desgomado sobre el contenido de ceras, se realizó el ANOVA doble de los datos obtenidos para cada proceso en función del tiempo de desgomado (Tabla 6.2). Se observaron efectos estadísticamente significativos ( $p < 0,0001$ ) de los procesos y de los tiempos de desgomado y también una interacción significativa entre ambos factores ( $p = 0,0021$ ). Por ello, se procedió a particionar el ANOVA por procesos y tiempos y aplicar la prueba de Duncan a cada partición.



**Figura 6.2-** Evolución del contenido de ceras totales del aceite para los procesos de desgomado enzimáticos y acuoso.

Equipo: reactor batch (1000 mL), Desgomados Enzimáticos en condiciones optimizadas: PLA1 (200 U/kg, temperatura = 50 °C, pH del buffer = 5,0, relación buffer/sustrato = 3 % v/m), LAT (190 U/kg, temperatura = 54 °C, pH del buffer = 5,2, relación buffer/sustrato = 1 % v/m), aceite de girasol Lote 2, masa inicial de aceite 1000 g.

Valores medios de una réplica analizada por duplicado inyectando cada una dos veces en el cromatógrafo  $\pm$  desviación estándar.

Valores medios seguidos por igual letra minúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para cada proceso.

Valores medios seguidos por igual letra mayúscula no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ) para tiempos de desgomado de 90 min.

**Tabla 6.2-** ANOVA para los contenidos de ceras del aceite (mg/kg) durante los procesos de desgomado enzimáticos y acuoso

Fuente de Variación	S.C.	G.L.	C.M.	F	Valor-p
Modelo	1321359	11	12069	100	<0,0001
Tiempo (min)	109841	3	36613	304	<0,0001
Proceso	16257	2	8128	678	<0,0001
Tiempo x Proceso	6661	6	1110	9	0,0021
Error	1433	12	120		
Total	134203	23			

El proceso de desgomado acuoso redujo significativamente ( $p < 0,0001$ ) los niveles de ceras totales desde 520,9 hasta 399,9 mg/kg lo que equivale a una reducción promedio de 24 %. Se observó una reducción significativa durante el proceso de desgomado (Figura 6.2). Brevedan et al. (2000)

informaron una ligera disminución de ceras totales en el desgomado acuoso aplicado a aceites de extracción en planta industrial (de 464 a 433 mg/kg), mientras que, Carelli et al. (1998) no encontraron diferencias significativas para el desgomado con agua del mismo tipo de aceite.

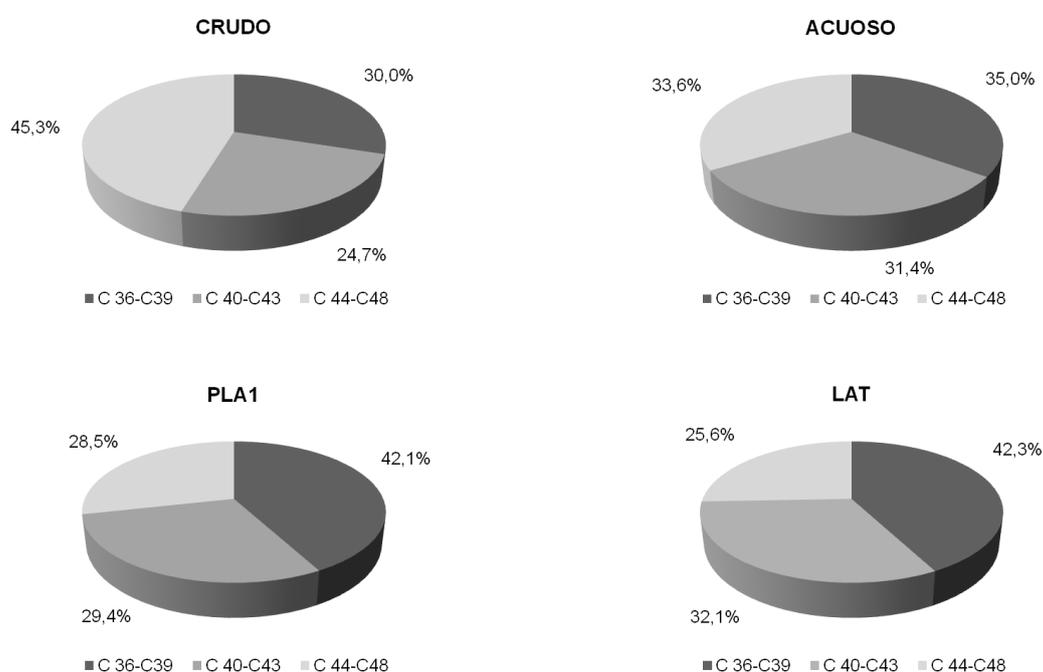
El proceso de superdesgomado (Añón, 2012) también puede reducir el contenido de ceras. El proceso consiste en mezclar el aceite con ácido cítrico a 70°C durante 10 minutos, enfriarlo a 40°C, y agitarlo durante 1 hora. La mezcla es calentada y centrifugada, seguida del agregado de soda cáustica y una segunda centrifugación. El paso que contempla dicha reducción, es la separación centrífuga de las gomas a 25°C, lo que produce una cristalización parcial de las ceras y la consecuente reducción del contenido inicial.

Como puede observarse en la Figura 6.2, a lo largo del proceso las enzimas PLA1 o LAT en condiciones optimizadas, disminuyeron los contenidos de ceras totales del aceite más significativamente que el proceso de desgomado acuoso. Al final de los procesos de desgomado enzimático se registró una disminución más significativa (38 % en promedio) usando la enzima LAT. El proceso con la enzima PLA1 redujo en promedio 34 % el contenido de ceras totales.

No hay datos en la bibliografía, sobre estudios del efecto del proceso de desgomado con diferentes enzimas, sobre el contenido de ceras. Sin embargo, en los procesos de desgomado enzimático aplicados en este trabajo de tesis se usaron los mismos reactivos que en los procesos de superdesgomado. Además, las enzimas como se ha mencionado previamente reducen la viscosidad y mejoran la separación de las fases aumentando el rendimiento de aceite. Esto podría también mejorar la separación de ceras y su recuperación en la fase acuosa de gomas.

### **6.3 Efectos de los procesos de desgomado acuoso y enzimáticos sobre los contenidos de ceras solubles, parcialmente solubles y cristalizables**

La Figura 6.3 muestra los perfiles de ceras solubles, parcialmente solubles y cristalizables del aceite crudo, desgomado con agua y con las enzimas PLA1 o LAT en condiciones optimizadas durante 90 min.



**Figura 6.3-** Perfiles de ceras solubles (C36-C39), parcialmente solubles (C40-C43) y cristalizables (C44-C48) de los aceites desgomados con agua y enzimas en condiciones optimizadas durante 90 min.

Aceite, equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Figura 6.2.

Porcentajes calculados a partir del valor medio de una réplica analizada por duplicado inyectando cada uno dos veces en el cromatógrafo.

La Tabla 6.3 muestra los contenidos de las fracciones de ceras solubles, parcialmente solubles y cristalizables en el aceite desgomado con agua y enzimas en condiciones optimizadas durante 90 min.

Las ceras correspondientes a la fracción no soluble, son las más afectadas por el proceso. Estas ceras disminuyeron en promedio 43,1 % en el proceso de desgomado acuoso mientras que, los procesos de desgomado enzimático redujeron 58,7 % y 61,9 % los contenidos de ceras cristalizables. Esto puede deberse, sumado al carácter de su falta de solubilidad, al paso de centrifugación final de los procesos de desgomado a 25°C. Dado que las ceras solubles no disminuyen en la misma proporción se observa un incremento en

sus porcentajes relativos (Figura 6.3). La enzima LAT tuvo un mayor efecto sobre las ceras cristalizables.

**Tabla 6.3-** Contenidos de ceras solubles (C36-C39), parcialmente solubles (C40-C43) y cristalizables (C44-C48) del aceite desgomado con agua y enzimas en condiciones optimizadas durante 90 min

Fracción de ceras (mg/kg)	Desgomado		
	Acuoso	PLA1	LAT
Solubles (C36-C39)	140,1	144,0	148,5
Parcialmente solubles (C40-C43)	125,5	100,6	112,9
Critalizables (C44-C48)	134,3	97,5	90,0

Aceite, equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Figura 6.2.

Valor medio de una réplica analizada por duplicado inyectando cada uno dos veces en el cromatógrafo.

Los procesos enzimáticos redujeron también más significativamente las ceras parcialmente solubles cuando se los compara con el proceso de desgomado acuoso. El desgomado acuoso produjo una disminución promedio de sólo 2,3 % en el contenido de ceras C40-C43 mientras que la enzima PLA1 redujo estos contenidos 21,7 % y la enzima LAT 12,1 %. Como se puede apreciar la enzima PLA1 fue más efectiva para reducir las ceras parcialmente solubles.

Tanto las muestras de aceite crudo, como desgomadas con agua, se aprecian visualmente opacas siendo, las tratadas con enzimas, más traslúcidas y claras. En el capítulo VII de esta tesis se pueden apreciar los resultados de los efectos de los procesos de desgomado enzimático en cuanto al aumento de luminosidad de los aceites. Esto puede explicarse por la disminución del contenido de ceras en los aceites desgomados en condiciones óptimas, principalmente por la reducción de la fracción denominada “ceras cristalizables” con contenido de átomos de carbono mayor a 44, responsables de la turbidez durante el almacenamiento de los aceites (Mariani et al., 1987; Añón, 2012).

Una posible explicación del efecto del desgomado sobre el contenido de ceras, puede estar relacionada con la concentración de fosfolípidos. La presencia de fosfolípidos en el aceite, afecta el proceso de separación de ceras

del mismo, ya que estos compuestos demoran o inhiben la cristalización de las ceras (Rivarola et al., 1985; Petrucelli y Añón, 1991).

La tecnología de desgomado enzimático mostró una mejora parcial en la remoción de ceras del aceite pero fue más efectiva que el proceso de desgomado acuoso. Sin embargo, la eficiencia del proceso demostrada en capítulos previos, fundada en la eliminación de los fosfolípidos, debe ser complementada con un proceso posterior de descerado. Este proceso de descerado será menos exigente dado que, como se ha demostrado en este capítulo, aproximadamente 60 % de las ceras cristalizables, se eliminan en el proceso de desgomado enzimático.

**CAPÍTULO VII:**  
**CALIDAD Y ESTABILIDAD OXIDATIVA**  
**DEL ACEITE DESGOMADO CON ENZIMAS**

## 7.1 Introducción

La calidad de las grasas y aceites de semillas oleaginosas está determinada por diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos que dependen de la semilla (tratamiento de la misma, origen geográfico y variables ambientales), del método de extracción del aceite y de las condiciones de procesamiento de las semillas, así como, de las condiciones de almacenamiento y transporte del aceite (Brevedan, et al., 1995; Brevedan et al., 2000; Tasan et al., 2011). Las características de los aceites vegetales que determinan su calidad y estabilidad, están relacionadas con la presencia de ciertos componentes minoritarios, y son los principales factores en la aceptación para la producción y comercialización de estos productos (Brevedan et al., 2000). Entre los componentes menores destacados se encuentran, los AGL, PLS, tocoferoles, metales y ceras, algunos de los cuales tienen propiedades pro-oxidantes o antioxidantes (Brevedan et al., 2000; Autino, 2009).

Las propiedades físicas como la densidad y la viscosidad de los aceites vegetales y en especial de los aceites de girasol se han determinado y estudiado debido a que determinan la resistencia al flujo, que ocasiona pérdidas durante los procesos de refinado y son esencialmente dependientes de la temperatura (Coupland & McClements, 1997).

El objetivo del refinado de aceites, como ya se ha desarrollado en el Capítulo I de esta tesis es eliminar las impurezas indeseables con el menor efecto posible sobre los componentes deseables presentes en los aceites vegetales crudos, con el fin de obtener un aceite vegetal refinado inodoro, suave y estable a la oxidación que sea aceptable para los consumidores (Medina-Juárez et al., 2000).

Los metales están presentes en la semilla o se originan por contaminación, ya sea por medio del equipo de procesamiento o de otra fuente, y actúan acelerando el deterioro oxidativo del aceite (De Leonardis et al., 2000; La Pera et al., 2002). La presencia de metales es un factor importante concerniente a la calidad del aceite comestible (Pehlivan et al., 2008), ya que junto con los pigmentos tienen un efecto catalítico en la reacción de oxidación

de los aceites, y promueven la formación y descomposición de hidroperóxidos (productos primarios de oxidación). Estos compuestos se descomponen en aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, alcoholes, y componentes volátiles, que se llaman productos secundarios de oxidación. Como se ha indicado en el Capítulo II de esta tesis, el *VP* es un indicador de las primeras etapas de la oxidación de lípidos, mientras que el *VA* es una medida de productos secundarios de oxidación. El *Valor TOTOX* (Capítulo II) es una combinación de ambas determinaciones y es un buen indicador de la historia de la oxidación del aceite y su grado de oxidación actual (Villa Salinas, 2009).

Existen estudios realizados sobre los cambios en la composición química que afectan a la calidad y la estabilidad de los aceites vegetales obtenidos por extracción con solvente. Estos cambios dependen principalmente de los solventes, la temperatura de extracción y del tratamiento previo de las semillas (Yoon & Min, 1986; Jung et al., 1989). Se han efectuado investigaciones sobre la influencia de los métodos de extracción de semillas oleaginosas industriales (pre-prensado, extracción con solvente, prensado completo y aceite mezcla) en la calidad y la estabilidad de aceite de girasol crudo (Tasan et al., 2011). El efecto de las condiciones de prensado en aceite de girasol no refinado ha sido evaluado por Turkulov et al. (1998). Además, hay registros bibliográficos sobre la influencia del desgomado acuoso en el contenido de fosfolípidos (Crapiste et al., 1998) y los cambios en la composición y la calidad de los aceites de girasol durante la extracción y desgomado acuoso (Brevedan et al., 2000).

Según el Capítulo VII “Alimentos Grasos”, Artículo 520 del Código Alimentario Argentino, (CAA, 2014) “se consideran aceites alimenticios o aceites comestibles, los admitidos como aptos para la alimentación por el presente y los que en el futuro sean aceptados como tales por la autoridad sanitaria nacional”. “Los aceites alimenticios se obtendrán a partir de semillas o frutos oleaginosos mediante procesos de elaboración que se ajusten a las condiciones de higiene establecidas por el presente”. “Presentarán aspecto límpido a 25 °C, sabor y olor agradables y contendrán solamente los componentes propios del aceite que integra la composición de las semillas o

frutos de que provienen y los aditivos que para el caso autoriza el presente”. El disolvente que se utilice para la extracción de aceites alimenticios deberá ser hexano, proveniente de la re-destilación de naftas de "Topping", con exclusión absoluta de naftas de "Cracking" (Artículo 526). Según el Artículo 528 se denomina aceite de girasol, el obtenido de semillas de distintas variedades de *Helianthus annuus* L. En este Artículo se detallan los valores de las principales propiedades fisicoquímicas a las que se deben ajustar los aceites de girasol refinados.

El Codex Alimentarius Internacional del cual Argentina es miembro, también posee una norma oficial para “Aceites Vegetales Especificados” entre los que incluye a los aceites de girasol y fija límites para composición (ácidos grasos, esteroides, tocoferoles) y propiedades fisicoquímicas (Codex Alimentarius, 2013).

Como se ha descrito en los capítulos previos de esta tesis, sólo se han realizado algunos estudios de índices de calidad de los aceites desgomados con enzimas, todos relacionados con las reacciones enzimáticas, tales como: contenidos de fósforo y fosfolípidos, acidez, contenidos de esteroides libres y esterificados. Sin embargo, no se encuentran datos en la bibliografía, que determinen la modificación en todas las características físicas y químicas del aceite de girasol cuando ha sido sometido al proceso de desgomado enzimático. El objetivo de este capítulo es investigar y analizar el efecto del proceso de desgomado enzimático sobre las características fisicoquímicas, la calidad y la estabilidad oxidativa del aceite crudo de girasol.

## **7.2 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre las propiedades físicas de los aceites**

Los resultados obtenidos para las propiedades físicas analizadas (densidad, viscosidad y color) en el aceite de girasol crudo (Lote 3) y desgomado en condiciones optimizadas (Capítulo V) usando las enzimas fosfolipasa (PLA1) o aciltransferasa (LAT) se presentan en la Tabla 7.1.

El aceite crudo presentó una densidad a 25 °C igual a 0,9254 g/cm<sup>3</sup>. El Codex Alimentarius Internacional (2013) fija valores de densidad para aceites

de girasol crudos que dependen de los contenidos de ácido oleico: girasol (AO = 14,0-39,4 % de los ácidos grasos totales, densidad relativa 20 °C/ 20 °C = 0,918-0,923 g/cm<sup>3</sup>), girasol medio oleico (AO = 43,1-71,8 %, densidad relativa 20 °C/ 20 °C = 0,914-0,916 g/cm<sup>3</sup>) y girasol alto oleico (AO ≥ 75 %, densidad relativa 25 °C/20 °C = 0,909-0,915 g/cm<sup>3</sup>).

**Tabla 7.1-** Propiedades físicas de los aceites crudo y desgomado con enzimas

Propiedad	Crudo <sup>1</sup>	Desgomado PLA1 <sup>2</sup>	Desgomado LAT <sup>2</sup>
<b>Densidad</b> (25 °C, g/cm <sup>3</sup> )	0,9254 <sup>b</sup> ± 0,0034	0,9098 <sup>a</sup> ± 0,0016	0,9117 <sup>a</sup> ± 0,0008
<b>Viscosidad</b> (25 °C, mPas)	48,30 <sup>c</sup> ± 0,42	40,36 <sup>a</sup> ± 0,37	42,70 <sup>b</sup> ± 0,67
<b>Color HunterLab</b>			
<i>L</i>	59,37 <sup>a</sup> ± 0,33	81,06 <sup>b</sup> ± 2,38	76,46 <sup>b</sup> ± 0,93
<i>a</i>	5,07 <sup>b</sup> ± 0,47	-2,04 <sup>a</sup> ± 0,11	-1,55 <sup>a</sup> ± 0,10
<i>b</i>	35,60 <sup>a</sup> ± 0,85	43,30 <sup>b</sup> ± 1,32	42,07 <sup>b</sup> ± 2,90
$\Delta E^3$	0,00	24,08	19,43
$\Delta C^4$	0,00	10,48	9,26

<sup>1</sup> Aceite de girasol de extracción crudo Lote 3.

<sup>2</sup> Equipo: reactor batch (1000 mL). Desgomados Enzimáticos en condiciones optimizadas: PLA1 (200 U/kg, temperatura = 50 °C, pH del buffer = 5, relación buffer/sustrato = 3 % v/m), LAT (190 U/kg, temperatura = 54 °C, pH del buffer = 5,2, relación buffer/sustrato = 1 % v/m), tiempo = 90 min, masa inicial de aceite = 1000 g.

<sup>3</sup> Cambio de color total estimado mediante la ecuación 2.10 (Capítulo II).

<sup>4</sup> Cambio de cromaticidad estimado mediante la ecuación 2.11 (Capítulo II).

Valores medios de una réplica analizada por duplicado ± desviación estándar.

Valores medios seguidos por igual letra en una misma fila no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, p > 0,05).

Los procesos de desgomado usando las enzimas PLA1 o LAT en condiciones optimizadas durante 90 min redujeron significativamente la densidad del aceite a 25 °C aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos procesos enzimáticos (Tabla 7.1). La densidad del aceite desgomado con PLA1 fue en promedio 0,9098 g/cm<sup>3</sup> y 0,9117 g/cm<sup>3</sup> cuando se desgomaba con la enzima LAT. Los valores de densidad de los aceites desgomados con enzimas se posicionan dentro de los límites fijados por el CAA (2014) que en su Artículo 528 modificado recientemente (2013) fija los siguientes valores para los aceites refinados:

girasol ( $AO \leq 54,9 \%$ , densidad absoluta a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en el vacío =  $0,9133\text{-}0,9175 \text{ g/cm}^3$ ), girasol medio oleico ( $AO = 55,0\text{-}74,9 \%$ , densidad =  $0,9106\text{-}0,9132 \text{ g/cm}^3$ ) y girasol alto oleico ( $AO \geq 75,0 \%$ , densidad  $\leq 0,9105 \text{ g/cm}^3$ ).

La viscosidad del aceite crudo a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  fue en promedio igual a  $48,30 \text{ mPaxs}$  (Tabla 7.1). Este valor de viscosidad se ajusta a lo informado por Coupland & McClements (1997) para aceites de girasol a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $47 \text{ mPaxs}$ ) siendo el aceite de girasol el que presentaba menor valor de viscosidad entre todos los aceites vegetales estudiados. La viscosidad del aceite se redujo como consecuencia de los procesos de desgomado enzimático resultando en este caso menor la viscosidad del aceite desgomado con PLA1 (Tabla 7.1). El desgomado con PLA1 redujo la viscosidad a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  en promedio  $16,4 \%$  y el desgomado con LAT  $11,6 \%$ .

Iwuoha et al. (1996) observaron que los procesos de desgomado acuoso con hidróxido de sodio, carbonato de sodio y ácido fosfórico producían disminuciones en la viscosidad dinámica a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de los aceites de palma ( $67,1\text{-}81,3 \%$ ), de semilla de palma ( $30,0\text{-}54,4 \%$ ) y de maní ( $40,9\text{-}87,0 \%$ ), cuya intensidad aumentaba cuando se incrementaba el porcentaje de agente de desgomado. Esta disminución puede estar relacionada con el contenido de PLS. Los PLS, que naturalmente producen emulsiones por sus características anfipáticas, aumentan la viscosidad del aceite, por lo tanto, la viscosidad disminuye con la reducción de sus contenidos como consecuencia de los procesos de desgomado enzimático. Las enzimas utilizadas, tienen la capacidad de eliminar aquellos fosfolípidos hidratables y no hidratables presentes en el aceite (Dijkstra, 2010). Los PLS son emulsionantes naturales que se unen a las moléculas de triglicéridos y juntos aumentan la viscosidad de los aceites vegetales (Chikoti, 1988).

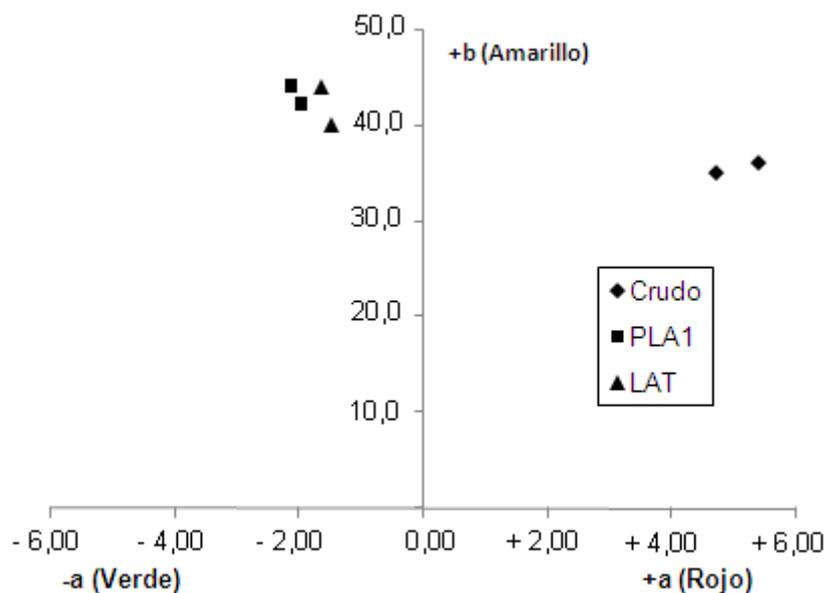
Soe & Brown (2011) en la patente de aplicación de LAT concluyen que, los procesos de desgomado con LAT o una combinación de LAT y PLC, cuando son aplicados sobre aceites preferencialmente crudos, producen una disminución de la viscosidad de las fases de aceite y gomas, en comparación con procesos de desgomado acuoso sin el uso de enzimas en las mismas condiciones. La menor viscosidad de la fase de gomas hace más fácil la

separación del aceite durante la etapa de centrifugación y aumenta el rendimiento de aceite, disminuyendo así su retención en las gomas.

El color es otra de las propiedades físicas que se modifican en los procesos de refinado de aceites vegetales y además es muy importante para la aceptación de los productos por parte de los consumidores. El aceite de girasol crudo presenta un color que puede variar entre ámbar claro y ámbar oscuro (Campbel, 1983; Carrín & Carelli, 2010). Tasan et al. (2011) dividieron el color de este aceite en cuatro categorías: rojo, amarillo, verde-azulado (clorofila) y naranja ( $\beta$ -caroteno). Además, presenta un cierto grado de oscurecimiento debido a la presencia de sustancias incoloras y pigmentos que se oxidan por sobrecalentamiento dependiendo del método de extracción (Tasan et al., 2011). El secado y tostado de las semillas antes del proceso de extracción también afecta el color del aceite si se realiza a altas temperaturas. El color de los aceites depende del método de extracción, los obtenidos mediante extracción por solventes tienen más color que los obtenidos por prensado. Por último, el color del aceite crudo resulta afectado por sus condiciones de almacenaje (tiempo, temperatura, disponibilidad de oxígeno, relación aire/aceite, etc.). La remoción de los componentes indeseables del color es uno de los aspectos críticos del refinado. Durante el refinado se reducen fundamentalmente el color rojo y la clorofila en la etapa de decoloración con tierras de blanqueo (Gupta, 2003). Los pigmentos rojos se reducen también durante la etapa de desodorizado. El aceite refinado presenta un color amarillo pálido (Carrín & Carelli, 2010).

En la Tabla 7.1 se muestran los parámetros de color HunterLab ( $L$ ,  $a$  y  $b$ ) obtenidos para el aceite crudo y degomado con las enzimas PLA1 o LAT en condiciones optimizadas. En primer lugar, se observa que los procesos enzimáticos aumentan significativamente la luminosidad del aceite ( $L$ ) alcanzando valores próximos a 80 % aunque en este aspecto, no se observan diferencias significativas entre ambos procesos enzimáticos. Por otro lado, el aceite desgomado con enzimas muestra cambios significativos en los parámetros  $a$  y  $b$  relacionados con el color, con respecto al aceite crudo (Tabla 7.1). El aceite crudo presenta un color con alta contribución de amarillo y un

rojo significativo (Figura 7.1). El desgomado con PLA1 o LAT desplaza el color del aceite al cuadrante amarillo-verdoso manteniendo una fuerte contribución del amarillo con un suave aporte del color verde.



**Figura 7.1-** Parámetros de color HunterLab *a* y *b* para aceite de girasol crudo y desgomado con enzimas.

Aceite, equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Tabla 7.1.

Valores de una réplica analizada por duplicado.

Los aceites desgomados con PLA1 o LAT presentaron cambios de color total ( $\Delta E$ ) respecto al aceite crudo iguales a 24,08 y 19,43, respectivamente. Los cambios de cromaticidad que no consideran la luminosidad fueron 10,48 para aceite desgomado con PLA1 y 9,26 para el desgomado con LAT. Estos resultados demuestran que los cambios de color involucran la luminosidad y el matiz. El ojo humano no puede percibir pequeñas variaciones de color pero  $\Delta E$  igual a 3 se considera el umbral por encima del cual los cambios de color son perfectamente detectados (Pereira et al., 2013). Dado que, los cambios de cromaticidad observados en los aceites desgomados con PLA1 o LAT, superaron ampliamente este valor umbral se puede concluir que son perfectamente percibidos por el ojo humano.

Iwuoha et al. (1996) estudiaron los cambios de color rojo y amarillo con equipo Lovibond en aceites de palma, semilla de palma y maní en el desgomado acuoso con diferentes dosis de agentes de desgomado (hidróxido y carbonato de sodio y ácido fosfórico) y midieron la reducción de color mediante ecuaciones empíricas. Se observó por ejemplo en el aceite de maní una reducción de color entre 42,6 y 76,0 % y esta reducción aumentaba cuando se incrementaba la dosis del agente de desgomado.

### 7.3 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de fósforo y fosfolípidos de los aceites

Los contenidos de fósforo, PLS totales e individuales para el aceite de girasol crudo de extracción (Lote 3) y desgomado con las enzimas PLA1 o LAT en condiciones optimizadas son presentados en la Tabla 7.2.

**Tabla 7.2-** Contenidos de fósforo, fosfolípidos e impurezas insolubles en hexano para los aceites crudo y desgomado con enzimas

Contenido	Crudo	Desgomado PLA1	Desgomado LAT
<b>Fósforo (mg/kg)</b>	476,0 <sup>b</sup> ± 12,7	2,44 <sup>a</sup> ± 0,06	2,41 <sup>a</sup> ± 0,05
<b>Fosfolípidos (mg/kg)</b>			
Totales	7903 <sup>b</sup> ± 275	47 <sup>a</sup> ± 3	41 <sup>a</sup> ± 4
PC	3310 <sup>b</sup> ± 17	4,5 <sup>a</sup> ± 0,0	3,6 <sup>a</sup> ± 0,5
PI	1787 <sup>b</sup> ± 50	4,0 <sup>a</sup> ± 0,1	3,5 <sup>a</sup> ± 0,2
PE	1455 <sup>b</sup> ± 66	11,8 <sup>a</sup> ± 1,1	10,6 <sup>a</sup> ± 0,9
PA	1350 <sup>b</sup> ± 143	27,2 <sup>a</sup> ± 1,4	23,7 <sup>a</sup> ± 2,0
<b>Fosfolípidos (% relativo)</b>			
PC	41,91 ± 1,25	9,43 ± 0,47	8,64 ± 0,41
PI	22,61 ± 0,15	8,40 ± 0,18	8,43 ± 0,22
PE	18,41 ± 0,19	24,80 ± 0,98	25,68 ± 0,10
PA	17,06 ± 1,21	57,37 ± 0,33	57,26 ± 0,13
<b>Imp. Insolubles (%)</b>	0,0717 <sup>b</sup> ± 0,0050	0,0529 <sup>a</sup> ± 0,0019	0,0517 <sup>a</sup> ± 0,0008

Aceite, equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Tabla 7.1.

Valores medios de una réplica analizada por duplicado ± desviación estándar.

Valores medios seguidos por igual letra en una misma fila no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

Cabe señalar que los resultados de los análisis del Lote 3, crudo y desgomado con las enzimas en condiciones optimizadas, confirman lo presentado y discutido ampliamente en los capítulos previos de esta tesis usando el aceite correspondiente al Lote 2. En resumen, es posible establecer en este aspecto las siguientes observaciones:

- Ajustando el tiempo de reacción en condiciones óptimas, es posible reducir el contenido de fósforo de los aceites de girasol crudos, indistintamente con cualquiera de las enzimas, a valores por debajo de 3 mg/kg requeridos por los procesos de refinado más exigentes.
- En estas condiciones los PLS totales del aceite pueden ser reducidos por ambos procesos enzimáticos a valores menores que 50 mg/kg. Al final de los procesos de desgomado enzimático es posible disminuir en una proporción mayor que 99 % los niveles de HP (PC y PI) y medianamente hidratables (PE). La reducción de PA como NHP se aproxima a 98 %. En el lote de aceite 2 (Capítulo V) se eliminó como máximo 97% de PA mediante el desgomado enzimático. Estas diferencias podrían atribuirse al distinto grado de unión de PA a iones monovalentes que lo hacen hidratable y bivalentes que lo hacen no hidratable. En el aceite del Lote 2 (Capítulo V) se observó una mayor selectividad de la enzima PLA1 por PC y de la enzima LAT por PI cuando el procesamiento enzimático se prolongaba en el tiempo. En el lote de aceite 3 estudiado en este capítulo las enzimas mostraron igual selectividad por ambos PLS. El menor contenido de PC del Lote 3 podría ser la causa de estas diferencias.
- En lo que respecta a la composición relativa de los PLS mayoritarios los procesos de desgomado enzimático modifican el perfil de PLS individuales desde el predominio de HP que presenta el aceite crudo hacia una mayor abundancia de NHP que se observa en el aceite desgomado con enzimas.

Los procesos de desgomado enzimático redujeron también significativamente los contenidos de impurezas insolubles en hexano de los aceites que involucran sustancias de naturaleza no lipídica tales como polvo,

restos de harinas de extracción y otras sustancias extrañas (Tabla 7.2). No se observaron diferencias significativas entre ambos procesos enzimáticos.

#### 7.4 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los parámetros relacionados con el deterioro hidrolítico y la oxidación de los aceites

La Tabla 7.3 presenta los resultados obtenidos para los parámetros químicos relacionados con el deterioro hidrolítico y oxidativo para el aceite de girasol crudo de extracción (Lote 3) y desgomado con las enzimas PLA1 o LAT en condiciones optimizadas.

**Tabla 7.3-** Determinaciones analíticas relacionadas con el deterioro hidrolítico y la oxidación de los aceites crudo y desgomado con enzimas

Determinación Analítica	Crudo	Desgomado PLA1	Desgomado LAT
<b>Humedad (%)</b>	0,1093 <sup>a</sup> ± 0,0063	0,1815 <sup>b</sup> ± 0,0064	0,1796 <sup>b</sup> ± 0,0065
<b>Acidez (% ác. oleico)</b>	1,02 <sup>b</sup> ± 0,01	1,98 <sup>c</sup> ± 0,06	0,81 <sup>a</sup> ± 0,01
<b>VP (mEq/kg)</b>	4,73 <sup>a</sup> ± 0,21	5,36 <sup>b</sup> ± 0,04	4,82 <sup>a</sup> ± 0,05
<b>VA</b>	3,92 <sup>b</sup> ± 0,04	3,52 <sup>a</sup> ± 0,04	3,62 <sup>a</sup> ± 0,04
<b>Valor TOTOX</b>	13,38 <sup>a,b</sup> ± 0,46	14,24 <sup>b</sup> ± 0,13	13,25 <sup>a</sup> ± 0,13
<b>OSI (h)</b>	17,0 <sup>b</sup> ± 0,4	3,4 <sup>a</sup> ± 0,5	3,4 <sup>a</sup> ± 0,1

VP = Valor de Peróxidos – VA = Valor de *p*-anisidina – Valor TOTOX = Valor de Oxidación Total – OSI = Índice de Estabilidad Oxidativa (110 °C, aire = 20 L/h).

Aceite, equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Tabla 7.1.

Valores medios de una réplica analizada por duplicado ± desviación estándar.

Valores medios seguidos por igual letra en una misma fila no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

El desgomado enzimático produce un aumento en la humedad del aceite como consecuencia del contacto con la fase acuosa que contiene la enzima. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la humedad del aceite entre ambos procesos enzimáticos, a pesar que el desgomado con PLA1 se realizó usando una relación buffer/aceite igual a 3% v/m y para el desgomado con LAT se usó 1%.

El mayor contenido de agua en los aceites podría facilitar el deterioro hidrolítico de los TGS y como consecuencia de ello, liberar AGL que son los sustratos de las reacciones de oxidación. Por ello, se establecen valores

máximos para el contenido de humedad a fin de garantizar la calidad de los aceites. La Asociación Americana de Grasas y Aceites y el Instituto Nacional de Productos de Semillas Oleaginosas de Estados Unidos (AFOA y NIOP por sus siglas en inglés) en sus especificaciones para todos los tipos de aceites de girasol crudo (alto, medio y bajo oleico) fijan un contenido máximo de humedad y volátiles igual a 0,5 % y para los aceites refinados el máximo se reduce a 0,1 % (AFOA, 2014; NIOP, 2014). Dado que el contenido de humedad de los aceites desgomados enzimáticamente se aproxima a 0,2 % podría ser reducido sin inconveniente durante las etapas posteriores de los procesos de refinado.

Los efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de AGL de los aceites se han discutido en el Capítulo III de esta tesis. Los resultados obtenidos pueden sintetizarse en los siguientes puntos:

- El proceso de desgomado con la fosfolipasa PLA1 en condiciones optimizadas aumenta significativamente el contenido de AGL del aceite que alcanza valores próximos a 2 % como ácido oleico (Tabla 7.3). Esto es consecuencia de que la reacción de hidrólisis de los PLS catalizada por esta enzima libera AGL como productos secundarios.
- El proceso de desgomado con la enzima aciltransferasa (LAT) reduce significativamente el valor de acidez libre del aceite (Tabla 7.3). Esta reducción podría deberse a la retención de AGL en la fase acuosa después de la separación centrífuga de las fases oleosa y acuosa. También podría ocurrir una reacción de transferencia de los AGL desde los PLS a los iones citrato presentes en el buffer (Capítulo III).

Dado que los AGL son los sustratos principales de las reacciones de oxidación, el aumento de su contenido podría facilitar la oxidación del aceite. Los aceites crudos deben ser convenientemente refinados, a través de procesos tecnológicamente adecuados, para reducir sus contenidos de AGL.

Con el objeto de asegurar la calidad de los aceites se fijan límites máximos para la acidez libre. La AFOA (2014) en sus especificaciones para aceites de girasol crudo con contenidos medios y bajos de ácido oleico establece una acidez libre máxima de 3,0 % como AO (1,5 mg KOH/g) y para

los mismos aceites refinados el máximo se reduce hasta 0,05 % como AO. El CAA (2014) fija para el aceite de girasol refinado un máximo de 0,2 % y el Codex Alimentarius (2013) 0,3 % como AO.

El aceite desgomado con PLA1 en este trabajo de tesis presentó una acidez libre inferior a 2 % como AO encontrándose este valor por debajo de 3,0 %, fijado por AFOA como límite máximo para aceites de girasol crudos. Los procesos completos de refinado disponibles actualmente pueden reducir sin inconvenientes estos valores de acidez libre para ajustarlos a los máximos fijados por el CAA y el Codex Alimentarius Internacional.

El aceite desgomado con PLA1 mostró un *VP* como medida de los productos primarios de oxidación significativamente más alto (Tabla 7.3). Sin embargo, todos los valores se ajustaron al valor máximo de 10 mEq/kg fijado por el CAA (2014) y el Codex Alimentarius (2013) para aceites de girasol refinados. No se observaron diferencias significativas en los índices de peróxidos entre el aceite crudo y desgomado con LAT.

El valor de p-anisidina fue levemente más bajo en los aceites desgomados enzimáticamente, lo que sugiere que durante los procesos de desgomado, podría ocurrir algo de pérdida de los compuestos secundarios volátiles (Tabla 7.3).

El *valor TOTOX* como indicador del proceso de oxidación total también resultó más alto en el aceite desgomado con la enzima PLA1. El mayor contenido de AGL del aceite desgomado con PLA1 podría explicar su mayor tendencia a la oxidación. Dado que no se observó un aumento en los productos secundarios de oxidación se puede concluir que el proceso de oxidación se encontraba en un desarrollo temprano. En un estudio realizado sobre aceites de girasol crudos obtenidos mediante diferentes procesos de extracción, Tasan et al. (2011) concluyeron también que los peróxidos mostraban la misma tendencia que los AGL y que el deterioro del aceite durante la extracción se debía a reacciones de hidrólisis y de oxidación.

Los peróxidos se producen en las etapas tempranas del proceso de oxidación de los aceites y luego disminuyen dando lugar a los productos

secundarios volátiles. Por ello, sólo la determinación del *VP* o del *VA*, no es indicador preciso del estado de oxidación del aceite. El uso del *VP* se limita sólo a los estados de oxidación tempranos.

Los peróxidos se han relacionado también con los sabores y olores a pescado o pintura que son débiles en el rango de valores de *VP* de 1-5 mEq/kg, algo más pronunciados para el rango de 5-20 mEq/kg y se perciben notas de rancio a *VP* encima de 20 mEq/kg (Miller, 1993). Los procesos de desgomado enzimático en condiciones optimizadas no aumentaron los *VP* hasta niveles que podrían producir olores y sabores defectuosos.

Durante los procesos de desgomado acuoso varios estudios han confirmado que se observa un aumento en el *VP*. Jung et al. (1989) mostraron que el *VP* del aceite de soja crudo aumentaba desde 2,4 hasta 10,5 mEq/kg cuando se desgomaba con agua. Estudios realizados sobre aceites de girasol de extracción crudos del mismo origen que los usados en este trabajo de tesis, también demostraron un incremento en el *VP* mientras que el *VA* aumentaba levemente o permanecía constante después del desgomado acuoso (Brevedan et al., 2000). En los aceites desgomados con agua en planta industrial se observó valores de peróxidos de hasta 5,01 mEq/kg y de p-anisidina de hasta 2,19. Sin embargo, los aceites crudos de maní, palma y semilla de palma procesados mediante desgomado acuoso con hidróxido de sodio, carbonato de sodio y ácido fosfórico disminuían sus niveles de peróxidos a medida que se incrementaba la concentración del agente de desgomado usado, hasta alcanzar *VP* próximos a cero (Iwuoha et al., 1996). En la etapa de blanqueado también aumenta el contenido de peróxidos del aceite de soja (Jung et al., 1989).

Los peróxidos se eliminan cuando se completa el proceso total de refinado, esencialmente durante la etapa de desodorizado donde los *VP* se pueden reducir prácticamente a cero (Jung et al., 1989).

El principal efecto de los procesos de desgomado enzimático se observó en los ensayos de oxidación acelerada (OSI) donde los tiempos de inducción a

110 °C y flujo de aire = 20 L/h se redujeron desde 17,0 h para el aceite crudo hasta 3,4 h en los aceites desgomados con cualquiera de las dos enzimas en condiciones optimizadas (Tabla 7.3).

La drástica disminución de la estabilidad oxidativa de los aceites desgomados enzimáticamente se debería fundamentalmente a la eliminación de los PLS que tienen propiedades antioxidantes. Los PLS PC y PE que poseen grupos aminos básicos en su estructura química presentan actividades antioxidantes inhibiendo el incremento de peróxidos (Saito & Ishihara, 1997). Los grupos oxhidrilos intramoleculares complementan la actividad antioxidante del grupo amino. Derivados de PA y glicerol que no poseen estos grupos aminos no muestran actividad antioxidante. Dado que, los procesos de desgomado enzimático eliminan esencialmente los PLS PC y PE siendo PA mayoritario en los aceites desgomados con enzimas, la pérdida de estos PLS con actividad antioxidante, sería la razón de la baja estabilidad oxidativa de los aceites desgomados con enzimas. Los PLS también actúan como antioxidantes mediante el barrido de metales pro-oxidantes (White & Xing, 1997).

El tiempo de inducción a la oxidación medido mediante equipos Rancimat es fuertemente dependiente de la temperatura a la que se realiza el ensayo y también de la velocidad de flujo de aire usada. En aceites de girasol de extracción crudos del mismo origen geográfico que los usados en este trabajo de tesis se han informado OSI (98 °C, flujo aire = 20 L/h) comprendidos entre 14,7 y 29,9 h (Crapiste et al., 1999; Brevedan et al., 2000). Tasan et al (2011) en aceite de girasol crudo extraído por solvente han observado un tiempo de inducción de 2,05 h (120 °C, flujo aire = 20 L/h). La estabilidad oxidativa también depende del método de extracción del aceite (Crapiste et al., 1999; Brevedan et al., 2000; Tasan et al., 2011).

El proceso de desgomado acuoso en planta industrial redujo la estabilidad oxidativa del aceite de girasol crudo de extracción por solvente de dos lotes diferentes desde 29,9 h hasta 16,3 h y desde 22,4 h hasta 12,9 h en ensayos realizados a 98 °C con 20 L/h de flujo de aire (Brevedan et al., 2000).

Actualmente se encuentra difundido ampliamente a nivel industrial el agregado de antioxidantes naturales o sintéticos y sustancias con actividad

sinérgica a los aceites refinados como aditivos para mejorar su estabilidad oxidativa. El CAA (2014) en su artículo 523 bis lista los antioxidantes y aditivos con actividad sinérgica que se pueden agregar y las concentraciones máximas permitidas. Estos antioxidantes incluyen sustancias con grupos fenólicos tales como: butil hidroxianisol (BHA), butilhidroxi tolueno (BHT) y terbutilhidroquinona (TBHQ), así como galatos de propilo, octilo y dodecilo, palmitato y estearato de ascorbilo, tocoferoles naturales y sintéticos. Los compuestos con actividad sinérgica que se pueden adicionar a los mencionados antioxidantes son: ácido cítrico, ácido fosfórico, citrato de monoisopropilo y ésteres de monoglicéridos (MG) con ácido cítrico, aislados o mezclados.

### **7.5 Efectos de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de metales de los aceites**

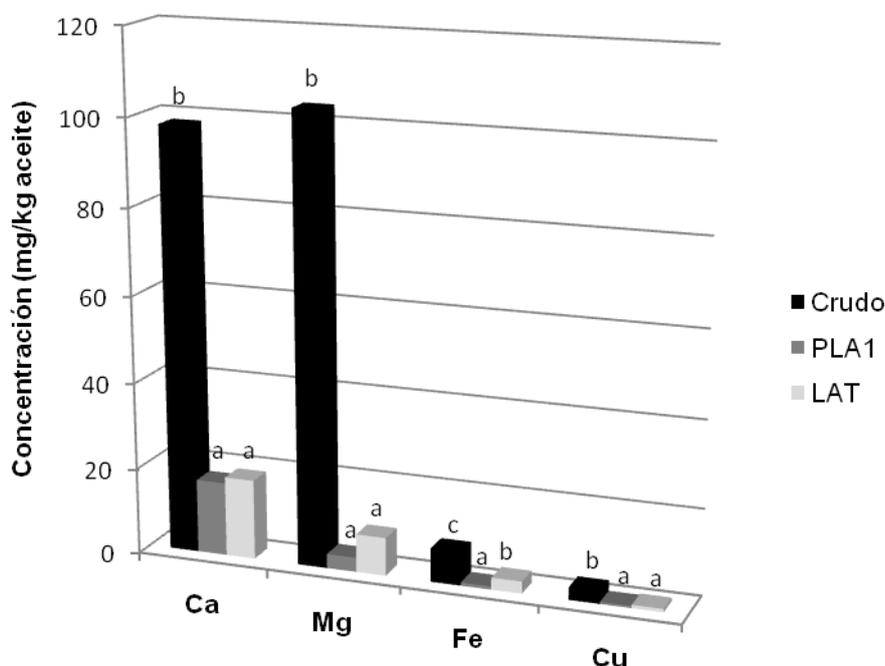
Los contenidos de Ca, Mg, Fe y Cu del aceite crudo y desgomado en condiciones optimizadas con las enzimas PLA1 o LAT durante 90 min se presentan en la Figura 7.2.

Los procesos de desgomado enzimático redujeron significativamente los contenidos de los cuatro metales estudiados. No se observaron diferencias significativas entre ambos procesos enzimáticos para Ca, Mg y Cu.

Los aceites crudos contenían 7,9 y 3,0 mg/kg de Fe y Cu respectivamente. En un estudio previo se determinaron contenidos de Fe de 7,7 y 15,1 mg/kg en dos lotes de aceite de girasol crudo de extracción del mismo origen geográfico y obtenido en la misma planta industrial (Brevedan et al., 2000). El contenido de Cu fue más bajo y menos variable siendo 1,5 mg/kg en ambos lotes.

El contenido de Fe fue significativamente más bajo usando la enzima fosfolipasa en comparación con la enzima aciltransferasa (Figura 7.2). En el aceite desgomado con la enzima PLA1, el contenido de Fe disminuyó por debajo de 1 mg/kg, mientras que, con la enzima LAT disminuyó en promedio por debajo de 3 mg/kg. El contenido de Cu de los aceites desgomados disminuyó por debajo de 1 mg/kg con cualquiera de estas enzimas. Algunos metales, particularmente Fe y Cu, son conocidos como efectivos pro-oxidantes

en la oxidación de lípidos y resultan indeseables desde el punto de vista de la estabilidad oxidativa del aceite.



**Figura 7.2-** Contenidos de metales para aceite de girasol crudo y desgomado con enzimas en condiciones optimizadas.

Aceite, equipo y condiciones de desgomado indicados al pié de la Tabla 7.1.

Valores medios de una réplica analizada por duplicado.

Valores medios con igual letra para cada metal no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan,  $p > 0,05$ ).

En los aceites crudos el Fe se encuentra principalmente unido a proteínas, PLS y otros compuestos minoritarios y también proviene de la contaminación a través de equipos metálicos que se utilizan en el procesamiento industrial, formando en este caso jabones de AGS con actividad pro-oxidante (List et al., 1978; Karaali, 1985). El Fe es uno de los metales capaces de formar complejos no hidratables con PE y PA y la eliminación de estos PLS durante los procesos de desgomado implica también una remoción del Fe que contienen los aceites (Jung et al., 1989).

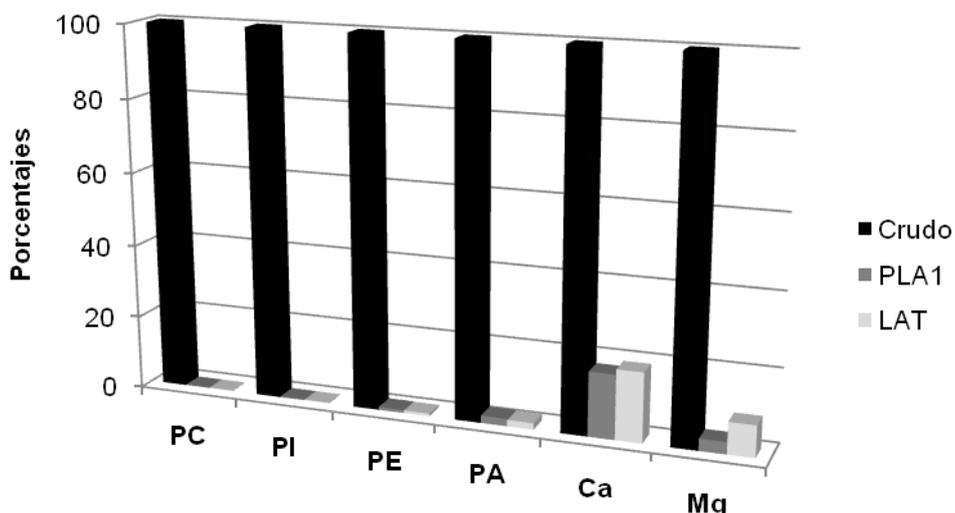
El aceite crudo presentaba altos contenidos de Ca y Mg como puede observarse en la Figura 7.2 (98,2 y 103,6 mg/kg, respectivamente). Resultados comparables fueron obtenidos por Zufarov et al. (2008) que informaron contenidos de Ca de 74,9 mg/kg y de Mg de 80,6 mg/kg para aceites de girasol crudos de extracción con solvente.

En los aceites desgomados usando las enzimas PLA1 o LAT, estos contenidos se redujeron a valores por debajo de 20 y 10 mg/kg, respectivamente. En este aspecto, los procesos enzimáticos redujeron en la misma forma los contenidos de estos metales, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos procesos. La disminución de los contenidos de Ca y Mg como consecuencia de los procesos de desgomado enzimático, acompañó a los descensos de los contenidos de PE y PA que superaron 99 y 98 %, respectivamente (Tabla 7.3). Como se ha mencionado previamente, el Ca y el Mg como iones bivalentes en los aceites vegetales se encuentran formando complejos no hidratables con los PLS PE y PA (Buchold, 1995). Los resultados obtenidos muestran que las enzimas son capaces de eliminar los NHP de la fase oleosa transfiriendo los iones Ca y Mg mayoritariamente a la fase acuosa. Los LPL producidos en las reacciones enzimáticas pasan esencialmente a la fase acuosa después de la separación centrífuga. Los AGL y los ésteres de esteroides producidos en estas reacciones enzimáticas quedan esencialmente en la fase oleosa.

Las disminuciones porcentuales de los PLS individuales y de los contenidos de Ca y Mg respecto al aceite crudo producidas por ambos procesos de desgomado enzimático se observan en la Figura 7.3.

Se nota claramente que fundamentalmente los contenidos de Ca y también los de Mg disminuyen conjuntamente con los contenidos de PLS individuales, sin embargo, estos metales permanecen en cierta proporción en el aceite desgomado enzimáticamente. Dijkstra (2010) explicó esto teniendo en cuenta la manera en que actuarían las fosfolipasas y aciltransferasa sobre las sales de Ca del PA. Estas enzimas convierten la sal de Ca del PA a una sal de Ca hidratable del LPA. Sin embargo, no todas las sales de Ca del LPA pasan a la fase acuosa, probablemente debido a diferencias en la capacidad de

hidratarse de los diferentes isómeros ( $\alpha$ -LPA y  $\beta$ -LPA). Esto se encuentra avalado por informes que los NHP de los aceites desgomados con fosfolipasas contienen LPA no hidratable (Clausen, 2001). Además, probablemente no sea la sal de Ca del LPA la que pasa directamente a la fase acuosa, sino que debe primero convertirse mediante migración de acilos y posterior hidrólisis enzimática en sal de Ca de un glicerofosfato hidratable. Experimentos de laboratorio demostraron que las sales no hidratables de PA se hidratan totalmente cuando se tratan con la enzima fosfolipasa por varias horas para permitir que estas posibles reacciones secundarias tengan lugar (Dijkstra, 2010). Así, en los aceites desgomados con enzimas las sales de Ca y Mg no hidratables podrían corresponder a LPL y no a PLS. Esto explicaría la disminución prácticamente a cero del PA en la Figura 7.3 y la permanencia de algo de Ca y Mg en los aceites desgomados probablemente ligados a LPL.



**Figura 7.3-** Disminución porcentual de los contenidos de PLS individuales, Ca y Mg en el aceite desgomado con enzimas respecto al aceite crudo.

Aceite, equipo y condiciones de desgomado indicados al pie de la Tabla 7.1.

Valores medios de una réplica analizada por duplicado.

Se ha estudiado el comportamiento de algunos metales durante las diferentes etapas de los procesos de refinado particularmente en aceites de soja (Jung et al., 1989). Se ha observado que durante el refinado total se

elimina el 90,7 % del Fe del aceite de soja crudo, siendo la etapa de desgomado la que más reduce el contenido de Fe, aunque en las restantes etapas del proceso (refinado, blanqueado y desodorizado) se registran remociones de Fe de menor valía. En lo que respecta a aceites de girasol, el proceso de desgomado acuoso en planta industrial, redujo el contenido de Fe en un porcentaje muy variable de hasta 70,9 % y el contenido de Cu bajó desde 1,5 mg/kg en el aceite crudo a sólo trazas en los aceites desgomados (Brevedan et al., 2000). El Ca y el Mg del aceite de girasol crudo de extracción también fueron removidos en porcentajes iguales a 54,1 y 64,0 %, respectivamente, en los procesos de desgomado acuoso (Zufarov et al., 2008). El CAA (2014) en su Artículo 525 establece que para que un aceite vegetal refinado sea apto para el consumo debe tener como máximo 1,5 mg/kg de Fe y 0,1 mg/kg de Cu. Los mismos valores límites son fijados por el Codex Alimentarius (2013).

Actualmente, se encuentra un sólo trabajo disponible en la bibliografía con datos sobre el efecto de los procesos de desgomado enzimático sobre los contenidos de metales de los aceites vegetales. Este estudio fue presentado en el Congreso y Exposición Latinoamericanos sobre Procesamiento de Grasas y Aceites (Buchold, 1995). El autor mostró que el proceso EnzyMax® usando la enzima PLA2 de origen pancreático porcino, cuando era aplicado en una planta piloto de procesamiento continuo, a un aceite de soja previamente desgomado con agua, reducía los contenidos de Fe desde 1,4 hasta 0,3 mg/kg. Una mezcla de aceites crudos de colza, obtenidos por prensado y extracción por solventes, tratada con la misma enzima, presentaba una disminución drástica de los contenidos de Fe desde 1,5 hasta 0,03 mg/kg.

## **7.6 Conclusiones**

Este capítulo añade nueva información a la caracterización de los aceites tratados con enzimas. La calidad y la estabilidad oxidativa del aceite de girasol crudo resultaron fuertemente afectados por los procesos de desgomado enzimático. En general, ambas enzimas produjeron efectos similares en los parámetros analizados.

Las propiedades físicas evaluadas resultaron mejoradas por los procesos de desgomado enzimático. La reducción de viscosidad y densidad contribuyen a disminuir las pérdidas durante el procesamiento y almacenaje. Además los procesos de desgomado enzimático reducen significativamente las sustancias que imparten colores rojos y oscuros indeseables para la comercialización de los aceites. Así, la tecnología de desgomado enzimático puede reducir la cantidad de tierras de blanqueo necesarias en el paso de clarificación, constituyendo una ventaja que puede representar un beneficio económico.

Los contenidos de fósforo y PLS hidratables y no hidratables, indeseables por la turbidez, se reducen mediante los procesos de desgomado enzimático logrando niveles de fósforo residual que se encuentran por debajo de 5 mg/kg. Como se ha demostrado en los capítulos previos, en este aspecto los procesos de desgomado con enzimas resultan más eficientes que los de desgomado acuoso sin enzimas. Los procesos de desgomado enzimático reducen también notablemente el contenido de los metales que se encuentran en concentraciones altas en los aceites crudos y son catalizadores de posibles reacciones de auto-oxidación de los TGS, además de contribuir a las características no hidratables de algunos PLS.

En lo que respecta a la estabilidad oxidativa, los aceites desgomados con enzimas, no aumentaron apreciablemente los índices que miden los productos de oxidación primarios (*VP*) y secundarios (*VA*). El aceite desgomado con la enzima fosfolipasa Lecitase® Ultra mostró incrementos en la acidez libre y en el contenido de peróxidos. Los AGL se generan como producto de la reacción de esta enzima y actúan como sustrato en las reacciones de oxidación que a su vez, tienen a los hidroperóxidos como productos. Estos parámetros no se incrementaron con el uso de la enzima aciltransferasa LysoMax® Oil que transfiere los AGS de los PLS a los esteroides formando ésteres de esteroides que quedan en la fase oleosa y no produce AGL. Sin embargo, en los ensayos Rancimat de oxidación acelerada los aceites desgomados con enzimas mostraron una estabilidad oxidativa reducida en forma muy significativa. Esto ocurre también en los procesos de desgomado acuoso que no utilizan enzimas y se debe a la remoción de los PLS PC y PE

que por sus grupos amino básicos poseen propiedades antioxidantes naturales en el aceite. La disminución de la estabilidad oxidativa de los aceites en las diferentes etapas de los procesos de refinado es conocida y ha sido estudiada ampliamente. A consecuencia de esto se han estudiado y aprobado un grupo muy importante de antioxidantes y compuestos con actividad sinérgica, sintéticos y naturales, para proteger a estos aceites durante su almacenaje hasta su consumo. En este aspecto se continúa trabajando para desarrollar nuevos antioxidantes y dilucidar los mecanismos por los que actúan estos compuestos a fin de mejorar sus actividades.

**CAPÍTULO VIII:**  
**CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJOS**  
**PROPUESTOS A FUTURO**

## 8.1 Conclusiones generales

En los últimos años se han introducido soluciones biotecnológicas con el propósito de reemplazar numerosos procesos químicos. La aplicación de biocatalizadores de naturaleza proteica reemplaza reacciones que requerirían altas temperaturas, exceso de sustratos o presencia de solventes complejos; por procesos a temperaturas cercanas a la ambiental, en medios acuosos, normalmente no tóxicos y de un modo sumamente específico y selectivo. Además, su actividad es inmediata, son fáciles de inactivar y se emplean en cantidades tan pequeñas que no es estrictamente necesaria su eliminación. Por todo ello, las enzimas suponen una auténtica revolución para ciertas aplicaciones, y su incorporación al desgomado de aceites vegetales ha sido un proceso de vertiginoso crecimiento.

A continuación se presentan las conclusiones generales de cada uno de los aspectos abordados en la presente Tesis:

Los **diseños de ensayos** fueron el umbral crítico para el desarrollo del trabajo integral. Para adquirir y evaluar resultados fidedignos, el propósito primordial se centró en lograr una mezcla íntima entre las enzimas, disueltas en el medio acuoso, y los fosfolípidos en el aceite a procesar. El contacto íntimo enzimas/aceite debió ser rápido y así fue posible lograr que todos los fosfolípidos presentes reaccionen para maximizar la ganancia de rendimiento a partir del uso de las enzimas.

Es notable destacar que para conseguir mejores resultados, el proceso fue perfeccionado utilizando la metodología de superficie de respuesta combinada con el análisis de varianza y el diseño experimental. El uso de los enfoques estadísticos implicados permitió la **optimización del proceso** de desgomado enzimático y la comprensión de las interacciones entre las variables, usando un número objetivo mínimo de experimentos. De este modo, se logró optimizar las condiciones ambientales de trabajo en lo que se refiere a temperatura, pH del buffer, dosis de enzima, relación buffer/sustrato y tiempo de reacción usando dos tipos de enzimas. Estas enzimas fueron una fosfolipasa A1 (Lecitase® Ultra) que hidroliza los ácidos grasos de la posición *sn*-1 de los fosfolípidos y una aciltransferasa (LysoMax® Oil) que transfiere los

ácidos grasos de los fosfolípidos desde la posición *sn*-2, a esteroides libres presentes en la fracción insaponificable del aceite, formando ésteres de esteroides.

Ambas enzimas en forma independiente y en condiciones así optimizadas, fueron capaces de reducir los niveles de **fósforo residual** a aproximadamente 3 mg/kg de aceite, valores requeridos para los procesos de refinado físico más exigentes. Los experimentos se ajustaron perfectamente a estas premisas, y a través de las determinaciones de **fósforo residual**, se demostró que las enzimas pueden ser utilizadas, con una mayor eficiencia, sustituyendo procesos de desgomado acuoso. En general, el contenido de fósforo residual resultó menor que los reportados en literatura para las mismas enzimas con otro tipo de aceite (de soja y de colza). Esto puede deberse al reducido volumen de aceite tratado en esta tesis y al diferente perfil y concentraciones de los fosfolípidos presentes en el aceite de girasol.

La determinación por HPLC del contenido y la composición relativa de **fosfolípidos** en los aceites crudos y desgomados mostró grandes ventajas sobre el factor de conversión fósforo/fosfolípidos comúnmente usado. El método cromatográfico permitió la identificación y cuantificación de los fosfolípidos principales por separado. El seguimiento de las concentraciones de estos fosfolípidos, permitió completar un estudio integral de los procesos de desgomado enzimático.

El contenido de fosfolípidos hidratables y no hidratables se redujo notablemente con el desgomado enzimático en comparación con el desgomado acuoso. Se destacó la fosfatidilcolina que permaneció en el aceite desgomado sólo a niveles de trazas y el ácido fosfatídico no hidratable que se redujo 95-97 % en ambos procesos enzimáticos. El ácido fosfatídico resultó el constituyente más abundante entre los fosfolípidos al final de los procesos enzimáticos. El decrecimiento de fosfolípidos totales contabilizó porcentajes superiores al 99% con esta tecnología enzimática, no mostrando diferencias significativas entre ambas enzimas.

El valor agregado de los procesos enzimáticos en el refinado de aceites se manifiesta por el aumento en el **rendimiento de aceite**. El uso de enzimas

permite alcanzar valores de mermas de aceites de hasta 1 % cuando se trabaja en condiciones optimizadas a escala laboratorio.

Este incremento en el rendimiento se pudo demostrar de manera fehaciente, durante los experimentos llevados a cabo a escala laboratorio en el presente trabajo de tesis, a través de las estimaciones realizadas de pérdida de aceite (aproximadamente 2 %) y reducción del volumen de gomas obtenidas. Se observó también una disminución en la materia grasa total ocluida en las gomas obtenidas por desgomado enzimático. En este aspecto no se observaron diferencias entre ambas enzimas y todos los parámetros ensayados fueron beneficiosos si se comparan con un proceso de desgomado acuoso.

La **reacción enzimática** constituye la explicación del aumento del rendimiento de aceite en el desgomado. La conversión de fosfolípidos en productos hidratables no es el único mecanismo para aumentar el rendimiento de aceite. La reducción de la retención de aceite por parte de los fosfolípidos residuales es otro mecanismo muy importante. Cuando se eliminan todos los ácidos grasos de los fosfolípidos, los ésteres de glicerofosfato resultantes no retienen nada de aceite. Las fosfolipasas de tipo A1 tienen una preferencia por los ácidos grasos de la posición 1 de los fosfolípidos. Así, los fosfolípidos que son atacados por la fosfolipasa A1 quedan con un ácido graso en la posición 2, que migra a la posición 1 (migración de acilos) y puede ser hidrolizado nuevamente para formar ésteres de glicerofosfato. En el caso de la enzima aciltransferasa, la esterificación de esteroides o estanoles libres en el aceite catalizada por esta enzima y la retención de los ésteres formados en la fase oleosa son los responsables del aumento del rendimiento de aceite.

Con las enzimas PLA1 y LAT se pueden desarrollar procesos de desgomado enzimático de aceites de girasol, reduciendo los contenidos de fósforo residual, sin requerir el uso de procesos previos de desgomado ácido o acuoso. Este proceso se puede aplicar usando cualquiera de las enzimas (PLA1 o LAT) o una mezcla de ambas en el caso que se requiera una menor concentración de AGL para los procesos de refinado. No son necesarias modificaciones importantes en equipos ni insumos. La combinación de

enzimas, aumenta sólo ligeramente la proporción de ácidos grasos y manifiesta la combinación de la capacidad fosfolipolítica de la fosfolipasa A1 y la función transferasa de la enzima LysoMax® Oil.

En lo que respecta al **rendimiento de las reacciones enzimáticas** que mide la eficiencia de estos procesos se logró que más de 99 % de los fosfolípidos del aceite crudo reaccionaran y se eliminaran. Estos porcentajes se lograron con cualquiera de las dos enzimas utilizadas en condiciones óptimas. Además, se comprobó que los rendimientos de los procesos enzimáticos fueron superiores a los observados para los desgomados acuoso y sin enzima.

Por lo expuesto, es importante destacar que todas las enzimas, usadas en esta tesis, de forma aislada o de manera conjunta, proporcionaron un aceite desgomado eficientemente pare ser refinado físicamente. Entre las ventajas de los procesos enzimáticos se destacó la menor cantidad de agua requerida fundamentalmente para los desgomados con aciltransferasa, el uso de pequeñas cantidades de ácidos y relativamente bajo valor de pH, el uso de catalizadores específicos y biodegradables, y el cumplimiento del objetivo perseguido por el proceso en cuanto a la reducción de fósforo y fosfolípidos.

El contenido de **ceras cristalizables y parcialmente solubles** fue reducido más eficientemente durante los procesos de desgomado enzimáticos en comparación con los de desgomado acuoso. No se observaron diferencias en cuanto a la reducción del contenido de ceras totales entre los procesos enzimáticos. Las ceras cristalizables se redujeron alrededor de 60 % en los aceites desgomados con cualquiera de las enzimas en condiciones optimizadas. Estas ceras son las que generan mayor turbidez de carácter indeseable en los aceites. La disminución de las ceras en los procesos enzimáticos facilita las etapas posteriores de descerado o “winterizado”.

La **calidad y estabilidad oxidativa** del aceite crudo resultaron modificadas por los procesos de desgomado enzimático aplicados. En general, se observaron efectos favorables de los procesos de desgomado enzimático sobre las propiedades físicas y químicas de los aceites. Entre los parámetros físicos evaluados se destacó una disminución de la viscosidad del aceite cuando era desgomado con enzimas lo que reduce las pérdidas durante su

procesamiento y almacenaje. El color de los aceites desgomados enzimáticamente mejoró sustancialmente, desapareciendo los pigmentos rojos y oscuros indeseables, y adquiriendo así una mayor luminosidad. El contenido de impurezas insolubles constituidas esencialmente por polvo, restos de harina de extracción y otras sustancias extrañas, también se redujo en los aceites desgomados con enzimas.

Otros parámetros químicos relacionados con el **deterioro hidrolítico y oxidativo** fueron influenciados negativamente por los procesos de desgomado enzimático. Así, los aceites desgomados con enzimas en un medio acuoso presentaban un contenido de humedad más elevado, lo que favoreció al deterioro hidrolítico, como paso inicial para un posterior proceso de oxidación. El mayor contenido de ácidos grasos libres en los aceites desgomados con fosfolipasa podría acelerar también el proceso de auto-oxidación. El mayor efecto de los desgomados enzimáticos sobre los procesos de oxidación se observó en el ensayo de oxidación acelerada “Rancimat”. Los procesos de desgomado enzimático redujeron notoriamente la estabilidad oxidativa de los aceites, debido probablemente a la drástica reducción de fosfolípidos con propiedades antioxidantes naturales (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina que tienen en su estructura bases nitrogenadas con grupos amino y oxhidrilo).

En general, todos los procesos de desgomado y otras etapas del refinado, como la operación de blanqueado generan en algún grado efectos indeseables. Estos efectos pueden ser enmendados en las etapas posteriores de refinado total. Así por ejemplo, es recomendable el uso de procesos tecnológicamente adecuados, para reducir los ácidos grasos libres, o el agregado de antioxidantes naturales o sintéticos, para mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites.

Finalmente, tanto la enzima fosfolipasa como aciltransferasa, provocan que los **metales** abandonen la fase oleosa, dejándolos, junto a los fosfolípidos y algunos pigmentos, retenidos en las gomas. Este hecho, además de evitar la oxidación, dado que algunos metales como hierro y cobre actúan como catalizadores en las reacciones de oxidación, puede acarrear una ventaja adicional para los pasos posteriores del refinado, principalmente para la

clarificación ya que reduce la cantidad necesaria de tierras de blanqueo o carbón activado que se utilizan para la extracción de metales y pigmentos. Por otro lado, la reducción observada en los metales bivalentes, tales como calcio y magnesio, sería consecuencia de la retención parcial de estos metales en la fase de gomas. Dichos metales constituirían sales hidratables de ácido lisofosfatídico o de glicerofosfatos.

## 8.2 Trabajos propuestos a futuro

El **escalado de los procesos enzimáticos** aquí estudiados para su aplicación a nivel de planta piloto o industrial podría ser un tema a abordar en el futuro, como así también la implementación de **estudios costo/beneficio** para estos procesos tendientes a avalar su aplicación definitiva.

En los últimos años se han estado realizando varios ensayos de **inmovilización de enzimas**, con la intención de reutilizar la capacidad catalítica de las mismas. En ese sentido, el beneficio económico resultante en el desgomado enzimático, se vería acrecentado, debido al costo reducido que puede generar el uso múltiple del catalizador.

El modo de acción de las enzimas estudiadas, ha quedado demostrado fehacientemente en este estudio. Dada su capacidad de generar compuestos como los **lisofosfolípidos** merece ser estudiada en cuanto a su aplicación directa. Además, se podría estudiar las **gomas obtenidas** en los procesos convencionales, a fin de extraer el aceite residual que queda ocluido y acoplarlo al proceso productivo.

Las patentes e investigaciones que obtuvieron mejores resultados, corresponden a las concernientes a trabajos desarrollados a través de estudios con combinaciones enzimáticas. Generalmente, las ventajas se adjudican al tiempo de reacción que se ve considerablemente disminuido cuando las enzimas trabajan en conjunto. Para continuar con los estudios expuestos en esta tesis es interesante proyectar un estudio exhaustivo del **rendimiento** y la **eficiencia** de la **combinación de las enzimas**, a escala industrial; a fin de comprobar los beneficios de esta asociación.

Al considerar la última temática abordada en esta tesis se pudo evaluar el efecto de las enzimas sobre metales y pigmentos. En esta línea resulta

interesante estudiar y evaluar el efecto sobre tocoferoles, esteroides y pigmentos abriendo la posibilidad a sistemas de procesos combinado de **desgomado-clarificación**.

En la actualidad, la **ingeniería genética**, está en pleno desarrollo de biocatalizadores para ser aplicados a nivel industrial. Esta técnica moderna permite diseñar enzimas, siendo capaz de aislar los genes de interés de una enzima determinada, combinarlos con la de otra enzima de utilidad; e insertarlos en un microorganismo recombinante con capacidad de reproducción inmediata. La tendencia futura, utilizando esta herramienta podría intentar **lograr el efecto de la combinación de dos o más enzimas en una sola cepa**. Con esta mirada, la biotecnología sería capaz de estudiar los catalizadores biológicos idóneos para remover todos los componentes indeseables, y unificarlos en una sola célula enzimática, a fin de refinar aceites comestibles en pasos mínimos con tecnologías limpias. De este modo, es de esperar que en años venideros el uso de biocatalizadores sea aún más importante de lo que lo es hoy.

## **DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

***“Desgomado y descerado enzimático de aceites”***

Lamas, D.L., D.T. Constenla. G.H. Crapiste.

Jornadas de Exposición de becarios y tesistas de la Planta Piloto de Ingeniería Química, Marzo 2010. Planta Piloto de Ingeniería Química, Bahía Blanca, Buenos Aires.

***“Enzymatic degumming of sunflower oil”***

Lamas, D.L., L.N. Ceci, D.T. Constenla, G.H. Crapiste.

101stAOCS Annual meeting & Expo May 16–19, 2010. Phoenix, Convention Center, Arizona, USA.

***“Desgomado y descerado enzimático de aceite de girasol”***

Lamas, D.L., L.N. Ceci, D.T. Constenla. G.H. Crapiste.

RI TeQ II Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos; Octubre 2010, IDTQ Investigación y desarrollo en Tecnología Química, Universidad Nacional de Córdoba, Huerta Grande, Córdoba.

***“Análisis y diseño de experimentos aplicados al estudio del desgomado enzimático”***

Lamas, D.L., L.N. Ceci, D.T. Constenla, G.H. Crapiste.

XIII Congreso CYTAL Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios, Octubre 2011, Buenos Aires, Argentina.

***“Estudio comparativo de enzimas fosfolipasas y aciltransferasas aplicadas al proceso de desgomado de aceites de girasol”***

Lamas, D.L., L.N. Ceci, G.H. Crapiste, D.T. Constenla.

CLICAP, Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria Marzo 2012, San Rafael, Mendoza.

***“Desgomado y descerado enzimático de aceites”***

Lamas, D.L., G.H. Crapiste, D.T. Constenla.

Jornadas de Exposición de becarios y tesistas de la Planta Piloto de Ingeniería Química, Febrero 2013. Planta Piloto de Ingeniería Química, Bahía Blanca, Buenos Aires.

***“Physicochemical characterization of crude and enzymatic degumming sunflower oil”***

Daniela L. Lamas, Guillermo H. Crapiste, and Diana T. Constenla,  
AOCS & CORCHIGA XV Congreso Latinoamericano y Exhibición de Grasas y Aceites, Chile y un Mundo de Aceites, Agosto 2013. Santiago de Chile, Chile.

***“Estudio cinético del desgomado enzimático”.***

D. Raab; D. Constenla; D. Lamas.

Primeras Jornadas de Exposición de Trabajos del programa de Iniciación a la Investigación y Cooperación Grado-Posgrado, Noviembre 2013.  
Departamento de Ingeniería Química- Universidad Nacional del Sur.  
Bahía Blanca, Bs As., Argentina.

***“Changes in quality and composition of sunflower oil during enzymatic degumming process”***

Daniela L. Lamas, Guillermo H. Crapiste, Diana T. Constenla

LWT Food Science & Technology. Elsevier.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.024>  
58, (1): 71-76. ISSN: 0023-6438

***“Optimization of Enzymatic Degumming Process for Sunflower Oil using Response Surface Methodology”***

Daniela L. Lamas, Guillermo H. Crapiste, Diana T. Constenla, Liliana N. Ceci,

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

$\Delta C$	Diferencia de cromaticidad
$\Delta E$	Diferencia total de color
a	Parámetro a del sistema de determinación de color
AG	Ácidos Grasos
AGL	Ácidos Grasos Libres
ANOVA	Oneway Analysis of Variance
AO	Aceite Ocluido
AO	Ácido Oleico
AOCS	American Oil Chemist's Society
AOM	Active Oxygen Method
b	Parámetro b del sistema de determinación de color
BHA	Butil Hidroxianisol
BHT	Butilhidroxi Tolueno
CAA	Código Alimentario Argentino
CC	Cromatografía en Columna
CGC	Cromatografía Gaseosa Capilar
COI	Consejo Oleícola Internacional
CPU	Unidad Cromogénica de Fosfolipasa
DAG	Diacilgliceroles
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Administración de drogas y medicamentos de los Estados Unidos
GPA	Glicerol Fosfato
GPC	Glicerolfosfatidil Colina
GPE	Glicerolfosfatidil Etanolamina
GPI	Glicerofosfatidil Inositol
H	Humedad
HP	Fosfolípidos Hidratables
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Performance
IA	Insolubles en Acetona
ICP-AES	Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma con Acoplamiento Inductivo
IH	Insolubles en Hexano
IUPAC	Standard Methods for the Analysis of Oils, International Union of Pure and Applied Chemistry
L	Parámetro L del sistema de determinación de color
LAT	Aciltransferasa
LPL	Lisofosfolipasa
LPS	Lisofosfolípidos
MG	Monoglicéridos
NHP	Fosfolípidos No Hidratables
OGM	Organismo Modificado Genéticamente
OH	Hidroxilo
OSI	Índice de estabilidad oxidativa
O/W	Aceite/Agua
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosftatidil Colina
PDA	Photodiode Detector Array

PE	Fosfatidil Etanolamina
PI	Fosfatidilinositol o Inositol Fosfato
PL	Fosfolípido
PLA1	Fosfolipasa A1
PLA2	Fosfolipasa A2
PLB	Fosfolipasa B
PLC	Fosfolipasa C
PLS	Fosfolípidos
PS	Fosfatidil Serina
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta
SPE	Solid Phase Extraction
TBHQ	Terbutilhidroquinona
TGS	Triglicéridos
TLC	Cromatografía en Capa Fina
TOTOX	Índice Total de Oxidación
VA	Valor de Anisidina
VP	Valor Peróxido
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultra Violeta

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Aalrust, E., Beyer, W., Ottofrickenstein, H., Penk, G., Plainer, H., & Reiner, R. (1993). Enzymatic treatment of edible oils. US Patent 5,264,367, Röhm GmbH & Metallgesellschaft AG (in English).
2. Abe, A., Kelly, R., Kollmeyer, J., Hiraoka, M., Lu, Y., & Shayman, J. A. (2008). The secretion and uptake of lysosomal phospholipase A<sub>2</sub> by alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, 181, 7873-7881.
3. AFOA, American Fats and Oils Association (2014). Standard Trade Rules – Specifications for Linoleic Sunflower Oil Crude (Rule 14), Mid-Oleic Sunflower Oil (Nusun) Crude (Rule 14B), Linoleic Sunflower Oil Fully Refined, Bleached and Deodorized (Rule 15), and Mid-Oleic Sunflower Oil (Nusun) Fully Refined, Bleached and Deodorized (Rule 15B).
4. Allen R.R., Formo M.W., Krishnamurthy R .G., McDermott G.N., Norris F.A., Sonntag N.O. (1982). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Swern D (Ed). John Wiley & Sons. Fourth Edition, New York
5. AOCS (2009). *Official Methods and Recommended Practices of American Oil Chemist's Society*, edited by D. Firestone, 6th Edn., AOCS Press, Champaign, USA.
6. Autino, H. C. (2009). Desgomado. En: *Temas Selectos en Aceites y Grasas*, Vol. 1-Procesamiento. J. M. Block y D. B. Arellano (Eds.), pp. 97-142, Editorial Blucher, San Pablo, Brasil.
7. Añón, M. C. (2012). Ceras de Girasol. En: *Temas Selectos en Aceites y Grasas*, Vol. 2- Química. J. M. Block y D. B. Arellano (Eds.), pp. 309-329, Editorial Blucher, San Pablo, Brasil.
8. Bockisch, M. (1998). Animal Fats and Oils. En: *Fats and Oils Handbook*, pp. 121-173, AOCS Press Champaign, IL, USA.
9. Bolsa de Cereales. Informe de pre campaña N° 4. Girasol 2013/2014, <http://www.bolcereales.com.ar/ver-informes-precampana-112>
10. Brevedan, M.I.V., Carelli, A.A. y Crapiste, G.H. (1995). Efecto del procesamiento sobre la calidad del aceite de girasol. *Aceites y Grasas*, 21, 401-404.
11. Brevedan, M. I. V., Carelli, A. A., & Crapiste, G. H. (2000). Changes in composition and quality of sunflower oils during extraction and degumming. *Grasas y Aceites*, 51, 417-423.

12. Buchold, H. (1995). Enzymax® – A state of the art degumming process and its application in the oil industry. *Memorias 6° Congreso y Exposición Latinoamericanos sobre Procesamiento de Grasas y Aceites*, 29-39, setiembre, Campinas, Brasil pp25-28.
13. CAA. Código Alimentario Argentino (2014). Capítulo VII: Alimentos Grasos. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar>.
14. Campbell, E. J. (1983). Sunflower oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 60, 387-392.
15. Canella, M., Gastriotta, G., Mignini, V., & Sodini, G. (1976). Composition and biological value of the kernels of Italian sunflower cultivars. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 53, 156-160.
16. Carelli, A. A., Bäumlér, E. R., & Ceci, L. N. (2012). Improved method for the determination of wax esters in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1312-1319.
17. Carelli, A. A., Bredan, M. I. V., & Crapiste, G. H. (1997). Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 74, 511-514.
18. Carelli, A. A., Ceci, L. N., & Crapiste, G. H. (2002a). Phosphorus-to-phospholipid conversion factors for crude and degummed sunflower oils. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 79, 1177-1180.
19. Carelli, A., A., Forbito, P. R., Bodnariuk P., & Crapiste, G. H. (1998). Análisis cuantitativo de ceras en aceite de girasol. *Aceites y Grasas*, 30, 103-111.
20. Carelli, A. A., Frizzera, L. M., Forbito, P. R., & Crapiste, G.H. (2002b). Wax composition of sunflower seed oils. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 79, 763-768.
21. Carlson, K. (1993). Acid and alkali refining of canola oil. *INFORM*, 4, 272-281.
22. Carrín, M. E., & Carelli, A. A. (2010). Changes in Quality and Composition of Sunflower Oils during Processing and Storage. En: *Advances in Fat and Oils Research*. M. Tomas (Ed.), pp. 27-48, Editorial Research Signpost, Kerala, India.

23. Ceci, L. N., Constenla, D. T., & Crapiste, G. H. (2008). Oil recovery and lecithin producing using water degumming sludge of crude soybean oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2460-2466.
24. Chakrabarti, P. P., Rao, B. V. S. K., Roy, S. K., Bethala, L. A. P. D., et al., US Patent Application Publication 2004/0005399 A1, 2004.
25. Chakrabarti, P. P., Rao, B. V. S. K., Roy, S. K., Bethala, L. A. P. D., et al., US Patent 7,494,676, 2009.
26. Chapman, G.W. (1980). A conversion factor to determine phospholipid content in soybean and sunflower crude oils. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 57, 299–302.
27. Chikoti, G. (1988). Commercial production of cooking oil at premium oil industries, Lusaka, Zambia. En: *Proceedings Zambia Workshop on Oilseed Expression, Kafue, Zambia, 27-30 October 1987*, pp. 50-54.
28. Clausen, K. (2001). Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 113, 333-340.
29. Codex Alimentarius (2013). Norma del Codex para Aceites Vegetales especificados. Codex STAN 210-1999, Rev. 2001, 2003, 2009, Enmiendas 2005, 2011, 2013, <http://www.codexalimentarius.org>.
30. COI, Consejo Oleícola Internacional (2001). Determinación de la composición y del contenido en esteroides mediante Cromatografía de Gases con Columna Capilar. COI/T.20/Doc. N° 10/Rev. 1.
31. COI, Consejo Oleícola Internacional (2003). Determinación del contenido en ceras mediante Cromatografía de Gases con Columna Capilar. COI/T.20/Doc. N° 18/Rev. 2.
32. Coupland, J. N., & Mc Clements, D. J. (1997). Physical properties of liquid edible oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1559-1564.
33. Cowan, D., Oxenboll, K. M. y Holm, H. C. (2008). El bioprocesamiento enzimático de aceites y grasas. *Aceites y Grasas*, 73, 654-657.
34. Crapiste, G. H., Brevedan, M. I. V., & Carelli, A. A. (1998). Water degumming of sunflower oils In: *Advances in Oils and Fats, Antioxidants, Byproducts and Oilseeds. Proceedings of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing*, S. Koseoglu, K. C Rhee, & R. F. Wilson (Eds.), AOCS Press, Champaign, IL, USA pp 32-35.

35. Crapiste, G. H., Brededan, M. I. V., & Carelli, A. A. (1999). Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 76, 1437–1443.
36. Dahlke, K. (1997). The enzymatic degumming - EnzyMax®. *Oléagineux Corps Gras Lipides/OCL*, 4, 55-57.
37. Dahlke, K., & Eichelsbacher, M. (1998). EnzyMax® and Alcon – Lurgi's route to physical refining. *World Conference on Oilseed and Edible Oil Processing*, Vol. II. *Advances in Oils and Fats*, S.S. Koseaglu, K.C. Rhee, & R.F. Wilson (Eds.), AOCS Press, 53-59.
38. Danisco LysoMax® Oil (2009). Nueva enzima para un mayor rendimiento del aceite en el desgomado acuoso de aceites vegetales Technical Memorandum TM 1535-2s.
39. De Leonardis, A., Macciola, V., & De Felice, M. (2000). Copper and iron determination in edible vegetable oils by graphite furnace atomic absorption spectrometry after extraction with diluted nitric acid. *International Journal of Food Science & Technology*, 35, 371-375.
40. De María, L., Vind, J., Oxenboll, K. M., Svendsen, A., & Patkar, S. (2007). Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 290-300.
41. Denise, J. (1996). Fats Refining. En: *Oils and Fats Manual: A Comprehensive Treatise. Properties, Production, Application*, Vol 2.A. Karleskind & J. -P. Wolff (Eds.), pp. 807-895, Lavoisier Publishing, París, Francia.
42. Dijkstra, A. J. (1994). Desgomado, refinación, lavado y secado de aceites y grasas. *Aceites y Grasas*, 52-71.
43. Dijkstra, A. J. (1998). Degumming revisited. *Oléagineux Corps Gras Lipides/OCL* 5, 367–370.
44. Dijkstra, A. J. (2010). Enzymatic degumming. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 112, 1178-1189.
45. Dijkstra, A. J. (2011). Enzymatic degumming. *Lipid Technology*, 23, 1-3.
46. Dijkstra, A. J. (2013). Degumming. *Edible Oil Processing from a Patent Perspective*. E-Book, XV, 275 Seiten, pp. 121-155. Springer, PA, US.

47. Dirección de Mercados Agrícolas (2014). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina, <http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/programas/dma/index.php>
48. Dorrel, D.G., & Vick, B.A. (1997). Properties and Processing of Oilseed Sunflower. En: Sunflower Technology and Production, A. A. Schneider (ed.), pp. 709-746, Crop Science Society of America, Madison, WI, USA.
49. EPA, US Environmental Protection Agency (2007). Inductively Coupled Plasma -Atomic Emission Spectrometry. Method 6010C, Revision 3.
50. Galhardo, F., Dayton, C., Autino, H., Odone, M., Imoda, V. y Lascano, A. (2010). Desgomado enzimático de Aceites Vegetales. Comparación de diferentes alternativas de procesos. *Aceites y Grasas*, 79, 204-212.
51. Ganendren, R., Widmer, F., Singhal, V., Wilson, C., Sorrell, T., & Wright, L. (2004). In vitro antifungal activities of inhibitors of phospholipases from the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1561-1569.
52. Givon, V. y Tirtiaux, A. (2000). Revisión de los distintos métodos para la eliminación de gomas y ceras. *Aceites y Grasas*, 40, 381-390.
53. Giob, K., Lanfranchi. M., & Mariani, C. (1989). Determination of free and esterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography - gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 471,397-405.
54. Gramatikova, S., Hazlewood, G., Lam, D., Barton, N. R., Sturgis, B. G., Robertson, D. E., Li, J., Kreps, J., Fielding, R., Brown, R. C., Vasavada, A., Tan, X., Badillo, A., Van Hoek, W. P., Janssen, G., Isaac, C., & Burk, M. J. (2011). Phospholipases, nucleic acids encoding them and methods for making and using them. US Patent 7,977,080, Verenium Corporation (in English).
55. Gupta, M. K. (2003). Fundamental quality control in vegetable oil refining. *Oil Mill Gazetteer*, 108, 6-9.
56. Haraldson, G. (1983). Degumming, dewaxing and refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 251-256.
57. Hénon, G. (1986). Dosage des tires dans les huiles de tournesol par chromatographie. *Revue Francaise des Corps Gras*, 33, 475-482.

58. IUPAC (1992). Standard Methods for the Analysis of Oils, International Union of Pure and Applied Chemistry, Fats and Derivates, edited by C. Paquotand A. Hautfenne, 7th edn., Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford, UK.
59. Iwuoha, C. I., Ubbaonu, C. N., Ugwo, R. C., & Okereke, N. U. (1996). Chemical and physical characteristics of palm, palm kernel and groundnut oils as affected by degumming. *Food Chemistry*, 55, 29-34.
60. Jahani, M., Alizadeh, M., Pirozifard, M., & Qudsevall A. (2008). Optimization of enzymatic degumming process for rice brain oil using response surface methodology. *LTW Food Science & Technology* 41, 1892-1898.
61. Jiang, F., Wang, J., Ju, L., Kaleem, I., Dai, D., & Li, C. (2011). Optimization of degumming process for soybean oil by phospholipase B. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86, 1081-1087.
62. Jung, M. Y., Yoon, S. H., Min, D. B. (1989). Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66, 118-120.
63. Karaali, A. (1985). The effects of refining on the chemical composition of Turkish sunflower seed oil. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 87, 112-117.
64. Klaus, P. (2008). Actualización de tecnologías de desgomado y neutralización. *Aceites y Grasas* 71, 266-275.
65. Köhler, G. A., Brenot, A., Haas-Stapleton, E., Agabian, N., Deva, R., & Nigam, S. (2006). *Biochimica et Biophysica Acta* 1761, 1391-1399.
66. La Pera, L., Lo Coco, F., Mavrogeni, E., Giuffrida, D., & Dugo, G. (2002). Determination of cooper (II) lead (II) cadmium (II) and zinc (II) in virgin olive oils produced in Sicily and Apulia by derivative potentiometric stripping analysis. *Italian Journal of Food Science*, 14, 389-399.
67. Leibovitz, Z., & Ruckenstein, C. (1984). Winterization of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 870-872.
68. List, G. R., Avellaneda, J. M., & Mounts, T. L. (1981). Effect of degumming conditions on removal and quality of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 892-898.

69. List, G. R., Avellaneda, J. M. y Mounts, T. L. (2001). Efectos de las condiciones de desgomado en la extracción y la calidad de la lecitina de soja. *Aceites y Grasas*, 43, 207-218.
70. List, G. R., Mounts, T. L., & Heakin, A. J. (1978). Steam-refined soybean oil: II Effect of degumming methods on removal of prooxidants and phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 280-284.
71. Liu, H., Przybylski, R., Dawson, K., Erkin, N. M. A., Biliaders, C. G. (1996). Comparison of the composition and properties of canola and sunflower oil sediments with canola seed hull lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 493-498.
72. Locatelli J., Picardi M. y Pezzutti A. (2013). Complejo oleaginoso argentino, biocombustibles vs. aceite, VIII Jornadas Interdisciplinarias de Estudios Agrarios y Agroindustriales, 29 octubre - 1 noviembre 2013, Buenos Aires, Argentina.
73. Mariani, C., Lanzani, A., Fedeli, E. (1987). La presentia di cere nell'olio di girasole in funzione di alcuni trattamenti tecnologici. *Riv. It. Sost. Grasse LXIV*, 13-16.
74. Mariani, C., & Fedeli, E. (1989). Minor components of vegetable oils: non-glyceridic esters. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 66, 397-401.
75. Medina-Juárez, L. A., Gámez-Meza, N., Ortega-García, J., Noriega-Rodriguez, J. A., & Angulo-Guerrero, O. (2000). Trans fatty acid composition and tocopherol content in vegetable oils produced in Mexico. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 721-724.
76. Miller, K. L. (1993). High stability oils. *Cereal Foods World*, 38, 478-482.
77. Montgomery, DC. (2005). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons, New York, USA.
78. Münch, E. W. (2005) Enzymatic degumming processes for oils from soybeans, rapeseed and sunflower. *Lipid Technology*, 17, 155-159.
79. Narayana T, Kaimal B, Vail SR, Surya BV, Rao K, Chakrabarti PP, Vijayalakshmi P, Kale V, Narayana K, Rani P, Rajamma O, Bhaskar PS, Rao TC (2002) Origin of problems encountered in rice bran oil processing. *European Journal of Lipid Science & Technology*, 104, 203–211.

80. NIOP, National Institute of Oilseed Products (2014). Trading Rules – Specifications for High Oleic Sunflower Oil Crude: Rule 6.13.
81. Padley, F. B., Gunstone, F. D., & Harwood, J. L. (1994). Occurrence and Characteristics of Oils and Fats. En: *The Lipid Handbook*, 2<sup>nd</sup>Edn., F. D. Gunstone, J. L. Harwood, & F. B. Padley (eds.), pp. 47-223, Chapman & Hall, London, UK.
82. Palou Oliver, A., Picó Segura, C., Bonet Piña, M. L., Oliver Vara, P., Serra Vich, F., Rodríguez Guerrero, A. M, & Ribot Riutort, J. (2005). *El Libro Blanco de los Esteroles Vegetales*, segunda edición, Unilever Foods S. A., España.
83. Pehlivan, E., Arslan, G., Gode, F., Altun, T., & Özcan, M. M. (2008). Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Grasas y Aceites*, 59, 239-244.
84. Pereira, A. L. F., Almeida, F. D. L., de Jesus, A. L. T., da Costa, J. M. C., & Rodrigues, S. (2013). Storage stability and acceptance of probiotic beverage from cashew apple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3155-3165.
85. Petrucelli, S. & Añón, M. C. (1991). Crystallization of waxes in sunflower seed oil: Effects on an inhibitor, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 68, 684-686.
86. Prabhakaran, M., & Rakshit, S. K. (2009). Optimize the condition for enzymatic degumming of crude soybean oil. *Tropical Agricultural Research & Extension*, 12, 85-88.
87. Ramos Ayerbe, F., & Rodríguez Berbel, F. (1985). A study on the recovery of byproducts from the dewaxing of sunflower oil on national production. *Grasas y Aceites*, 36, 1-4.
88. Rivarola, G., Añón, M. C., Calvelo A., (1985) Crystallization of waxes during sunflower seed oil refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 1508-1513.
89. Saito, H., & Ishihara, K. (1997). Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 74, 1531-1536.

90. Salunkhe D. K., Desai, B. B. Postharvest biotechnology of oilseeds. Boca Raton. CRC Press, FA, 1984. 264p.
91. Segers, J. C. (1985). Possibilities and limitations for decreasing the environmental load for the refining of edible oils and fats. *Feeter Seifen Anstrichmittel* 87, 541.
92. Seguine, E. S. (1980). Method for dewaxing refined vegetable oils for refrigerator clarity stability. US Patent 4,200,509 (in English).
93. Soe, J.B., & Brown, A. V. (2011). Process. US Patent Application 0,136,187 (in English).
94. Tasan, M., Gecgel, U., & Demirci, M. (2011). Effects of storage and industrial oilseed extraction methods on the quality and stability characteristics of crude sunflower oil (*Helianthus annuus L.*). *Grasas y Aceites*, 62, 389-398.
95. Turkulov, J., Dimic, E., Karlovic, D., & Vuksa, V. (1998). Effect of hydrothermal treatment on the quality of nonrefined edible sunflower oil. *World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing Vol. 1*, pp. 185-187, S.S. Koseoglu, K. C Rhee and R. F. Wilson (Eds.), AOCS Press, Champaign, IL, USA.
96. USDA, United States Department of Agriculture (2013). USDA Commodity Requirements Document. BOT2 Bulk Oil and Tallow.
97. Vandamme E, Soetaert W. (2004) Industrial Biotechnology and Sustainable Chemistry. Royal Belgian Academy Council of Applied Science, BACAS-report.
98. Veldstra J., & Klere, H. (1993). Aceite de girasol. *Aceites y Grasas*, 12, 32-38.
99. Villa Salinas, V. M. (2009). Clarificación de Aceites y Grasas. En: *Temas Selectos en Aceites y Grasas. Vol. 1-Procesamiento*. J. M. Block, y D. B. Arellano (Eds.), pp. 161-210, Editorial Blucher, San Pablo, Brasil.
100. White, P. J., & Xing, Y. (1997). Antioxidants from Cereals and Legumes. En: *Natural Antioxidants- Chemistry, Health Effects and Applications*. F. Shahidi (Ed.), pp. 25-63, AOCS Press, Champaign, USA.
101. Winter, B. H., Titze, K., & Marschner, V. (1998). Application of phospholipases in the edible oil industry. *Lipid/Fett (European Journal of Lipid Science and Technology)*, 100, 152-156.

102. Yang, B., Wang, Y. H., & Yang, J. G. (2006). Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 83, 653-658.
103. Yang, B., Zhou, R., Yang, J. G., Wang, Y. H., & Wang, W. F. (2008). Insight into the enzymatic degumming process of soybean oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 85, 421-425.
104. Yang, J. G., Wang, Y. H., Yang, B., Mainda, G., & Guo, Y. (2006). Degumming of vegetal oil by a new microbial lipase. *Food Technology & Biotechnology*, 44, 101-104.
105. Yoon, S. H., & Min, D. B. (1986). Effect of thermally oxidized compounds on the flavor stability of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, 425.
106. Zufarov, O., Smichdt, Š., & Sekretár, S. (2008). Degumming of rapeseed and sunflower oils. *Acta Chimica Slovaca*, 1, 321-328.