

Título de la Tesis: “Estudios básicos sobre la clarificación de jugos de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Benitez, Elisa Inés

Directores: Dr. Jorge Lozano - Dr. Diego Genovese

Resumen

Un jugo Cloudy de manzana es una suspensión coloidal formada por partículas provenientes del procesamiento de la fruta suspendidas en un medio acuoso compuesto por azúcares, pectina, iones minerales y ácidos orgánicos. Dichas partículas están compuestas principalmente por carbohidratos y proteínas insolubles al pH del jugo. Estas últimas poseen grupos ácidos y básicos cuyo grado de ionización depende del pH y de la fuerza iónica del medio líquido. Las partículas pueden estar recubiertas por una capa protectora de pectina que al pH del jugo se encuentra negativamente cargada. Para la elaboración de jugos clarificados es necesario eliminar la pectina nativa ya que la misma complica el proceso de clarificación. Luego de la eliminación de las mismas por tratamiento enzimático permanecen en suspensión partículas con un tamaño menor a $0.5 \mu\text{m}$, ya que el resto sedimenta por gravedad. Como las partículas presentan una carga superficial negativa, se especula que se debe a restos de pectina no degradada que permanece adherida a la superficie de las mismas.

El procesamiento de este tipo de suspensiones coloidales para producir su clarificación por precipitación y/o filtrado, constituye en sí un grupo de operaciones muy complejas y poco fundamentadas. Un conocimiento cabal del fenómeno de floculación y precipitación de partículas, las características de su comportamiento físico-químico y la influencia de los agentes clarificantes permitirá modelar, predecir y optimizar este proceso.

A manera de introducción, en el **Capítulo 1**, se presentan las dos tecnologías más ampliamente utilizadas para la obtención de un jugo clarificado de manzana, el tratamiento convencional mediante el uso de agentes clarificantes y la utilización de membranas de ultrafiltración. Luego se debate acerca de la composición de las partículas coloidales. Finalmente se presenta la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) clásica, que explica la tendencia de las partículas coloidales a aglomerarse o permanecer separadas al combinar las fuerzas de atracción de Van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostática en función de la distancia entre las partículas: la curva combinada es llamada la energía neta de interacción. El punto de máxima energía de repulsión se conoce como la barrera de energía. Para aglomerar dos partículas que van a chocar éstas deben tener la energía cinética suficiente como para superar dicha barrera. Por lo tanto, el grado de floculación dependerá de la frecuencia de colisión de las partículas y de su energía respecto de la barrera de energía. En general, en suspensiones donde actúan únicamente estos dos tipos de fuerzas, se necesitan potenciales superficiales mayores a $\pm 30 \text{ mV}$ para contrarrestar las fuerzas de Van der Waals y prevenir de esta manera la agregación de las mismas.

En el **Capítulo 2**, se describe el método de separación de las partículas coloidales mediante la diafiltración, para obtenerlas libres de los sólidos solubles que modifican las propiedades del medio. Una vez aisladas se incorporaron por separado azúcares, sales minerales y ácidos orgánicos, para estudiar su efecto sobre la carga superficial. En el proceso de separación se encontró que las partículas aisladas presentaban una carga superficial alta (mayor a -35 mV) y que a pesar de reducirse la misma por agregados de ácidos y bases fuertes, no se logró invertirla. Los agregados de azúcares (glucosa y fructosa), no modificaron significativamente su carga. Por el contrario el agregado de sales minerales (NaCl , CaCl_2 y KCl) redujeron notablemente el potencial superficial aunque no lograron restituirlo al valor original en el jugo cloudy de manzana. Finalmente, con el agregado simultáneo de ácido málico y sales minerales hasta los niveles iniciales en el jugo

Título de la Tesis: “Estudios básicos sobre la clarificación de jugos de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Benitez, Elisa Inés

Directores: Dr. Jorge Lozano - Dr. Diego Genovese

se logró restituir la carga superficial original; permitiendo concluir que además de una compresión de la capa iónica alrededor de las partículas, lo que disminuye la repulsión entre las mismas, hay un efecto de neutralización del ácido orgánico utilizado (ácido málico). Sin embargo, a pesar de la reducción del potencial superficial aún a niveles cercanos a cero, no se observó precipitación de partículas. Por lo tanto no es suficiente con los dos tipos de fuerzas planteadas en la teoría DLVO clásica para explicar la estabilidad de las mismas y otros tipos de interacciones deben ser consideradas.

En el **capítulo 3**, se postula a la fuerza de hidratación como responsable de la estabilidad coloidal. Ello se debe a la particular estructura de las partículas, ya que al poseer sobre su superficie pectina degradada y que la misma proviene de polímeros de galactosa y otros azúcares neutros (arabinosa y glucosa entre otros) tiene la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del medio y de esa manera estabilizarlas. Existen otros tipos de fuerzas no-DLVO, principalmente fuerzas estéricas, que impiden el contacto entre partículas por la presencia de pectina de alto peso molecular sobre la superficie de la partícula. Dicha fuerza no fue sin embargo tenida en cuenta en los jugos estudiados, ya que al partir de un sistema que fue tratado enzimáticamente (pectinasa) dicha influencia sería despreciable. La teoría DLVO extendida permitió explicar correctamente la estabilidad de las partículas coloidales de jugo de manzana. A partir de datos de turbiedad y viscosidad se pudo predecir la contribución individual de las fuerzas de repulsión electrostática e hidrostática, respectivamente, sobre la turbiedad del jugo. Se estudió el efecto de la reducción del pH y el aumento de la fuerza iónica del medio líquido sobre la estabilidad coloidal. Se observó una disminución de la barrera de energía entre las partículas del jugo de manzana, atribuible a la reducción tanto de la constante de hidratación como de la carga superficial. La disminución de la barrera de energía produjo una disminución lineal de la turbiedad de la suspensión coloidal. Sin embargo la turbiedad se mantuvo en un valor elevado aún en ausencia de barrera de energía, indicando que las partículas coloidales del jugo son inherentemente estables, fenómeno atribuible a una primera capa de hidratación. La reducción de la constante de hidratación fue interpretada como la distorsión de las capas de hidratación externas causada por los iones $[H_3O^+]$ y $[K^+]$ hidratados, atraídos por las cargas negativas de las partículas.

La existencia de interacción hidrofóbica se plantea en el **Capítulo 4**, debido a la posible presencia de grupos metilos (que normalmente se encuentran presentes en las cadenas de pectina) y que podrían permanecer restos de los mismos sobre la superficie de la partícula. Dicho estudio fue llevado a cabo mediante agregados de distintos tipos de azúcares con diferentes capacidades de hidratación (glucosa, sacarosa y maltosa) al medio acuoso que contenía a las partículas, comparando las viscosidades específicas a igual actividad acuosa. Si bien se observó un cambio significativo con los distintos tipos de azúcares utilizados, dicho cambio no pudo atribuirse a hidrofobicidad, ya que la existencia de la misma debería conducir a un aumento de tamaño de las partículas y una reducción de la barrera de energía ya que es una fuerza atractiva. Por el contrario el diámetro de partícula se redujo cerca de un 40% y la barrera de energía aumentó aproximadamente 3.6 veces. Se especula que la reducción del tamaño se debió principalmente a una reducción de la hidratación, por competencia del azúcar por el agua, y a un cambio conformacional debido a la reducción de la energía libre del sistema, de una conformación más extendida a una más compacta. El aumento de la barrera de energía podría deberse a que en lugar de interaccionar partículas coloidales hidratadas unas con otras como sucedía en el capítulo 3,

Título de la Tesis: “Estudios básicos sobre la clarificación de jugos de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Benitez, Elisa Inés

Directores: Dr. Jorge Lozano - Dr. Diego Genovese

ahora interaccionan también con moléculas de azúcares que a su vez se encuentran hidratadas.

En el **Capítulo 5** se realiza un análisis de la forma y tamaño de las partículas coloidales a partir de imágenes obtenidas por SEM. Se concluyó que las mismas estaban formadas por agregados coloidales que pueden haberse formado luego del tratamiento enzimático y que debido a un equilibrio termodinámico no continúan agregándose, alcanzando un diámetro promedio de 1050 nm. Se utilizó la dimensión fractal (Df) como indicadora de la rugosidad de las partículas, encontrándose un valor de $Df = 2.3 \pm 0.1$. Este valor indica que los agregados se van formando por incorporación de partículas individuales y no por interacción agregado-agregado. Esta última observación está acorde a los resultados obtenidos en los capítulos anteriores y puede deberse a la fuerte hidratación que presentan, que no permite que los agregados se unan. Asimismo se determinó el tamaño, con suficiente peso estadístico, de la menor partícula que forma el agregado coloidal (79.5 nm) y se determinó el número de partículas totales que componen el mismo, resultando $N = 2271$ partículas por agregado.

En el **Capítulo 6** se estudia el efecto de la gelatina como agente clarificante. Debido a la elevada hidratación que tienen las partículas se hace necesario el uso de agentes clarificantes para eliminarlas del medio acuoso. El mayor problema del uso de gelatina radica en que si quedan restos de la misma sin unirse a las partículas ocasionarían velos luego del almacenamiento del jugo clarificado. Se estudia principalmente el efecto de la gelatina, ya que al poseer carga opuesta a las partículas coloidales interaccionaría con ellas hasta anular su carga. Se encontró que, además de dicho efecto, la gelatina forma un complejo con las partículas coloidales por medio de interacciones hidrofílicas y/o hidrofóbicas, necesitándose una concentración 10 veces mayor a la necesaria para neutralizar su carga y encontrar gelatina no unida en solución. Asimismo se encontró que los sólidos solubles, los restos de pectina degradada que permanecen en suspensión, y la acidez del jugo no modifican el consumo mínimo de gelatina. Si bien los polifenoles presentes interaccionan con la gelatina, dicho efecto no generó un mayor consumo de gelatina. Esto fue atribuido a la elevada hidrofiliidad de las partículas lo que hace que las mismas permanezcan en suspensión, permitiendo de ese modo que la gelatina interactúe tanto con las partículas como con los polifenoles. Se especula que se agotarían los sitios activos de los polifenoles, mientras que la gelatina continuaría interaccionando con las partículas. Finalmente se concluyó que únicamente el contenido de partículas coloidales es importante para determinar el consumo mínimo de agente clarificante.

En el **Capítulo 7** se estudia el efecto en la turbiedad de los distintos componentes del jugo con el objeto de obtener una correlación que permita, a partir de los datos de turbiedad, determinar la cantidad de partículas presentes. Esta información puede ser utilizada, como se describió en el capítulo anterior, para evaluar la cantidad de agente clarificante (gelatina) a utilizar. Se observó que los azúcares son los que mayormente contribuyen a modificar la turbiedad. Por lo tanto se estudió el efecto de agregados de glucosa (que modifica la viscosidad, la densidad y el índice de refracción del medio) a soluciones con distintas concentraciones y tamaños de partícula. Asimismo, a partir de las medidas realizadas se pudo determinar indirectamente el índice de refracción de las partículas coloidales, resultando ser $n_p = 1.487$.

Título de la Tesis: “Estudios básicos sobre la clarificación de jugos de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Benitez, Elisa Inés

Directores: Dr. Jorge Lozano - Dr. Diego Genovese

Por último, en el **Capítulo 8**, se describe el inicio de un estudio basado en la Mecánica y Dinámica molecular, utilizando un campo de fuerzas parametrizado para sacáridos, como herramientas complementarias para corroborar el fenómeno de hidratación de las partículas. Se eligió un fragmento representativo de las partículas coloidales, formado por un Arabinogalactano tipo II (AGII). Los AGII, están unidos a proteínas y forman una estructura exterior constituida por un esqueleto polisacárido formado por moléculas de β -D-Galp unidos por enlaces 1-3. Este presenta pequeñas ramificaciones de α -L-Araf(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)]_n (siendo n =1,2 o 3). Los resultados mostraron que los polisacáridos que envuelven a las partículas se encuentran potencialmente muy hidratados, en concordancia con las experiencias empíricas descritas en los capítulos anteriores.

Título de la Tesis: “Estudios básicos sobre la clarificación de jugos de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Benitez, Elisa Inés

Directores: Dr. Jorge Lozano - Dr. Diego Genovese

Abstract

Cloudy apple juice is a colloidal suspension of solid particles in a liquid medium. The particles come from the apple cellular tissue comminuted during fruit processing. The continuous medium is a solution of sugars, pectin, minerals and malic acid. The dispersed matter is mainly composed of carbohydrates and proteins, which are insoluble at the juice pH. The proteins have acid and basic groups whose degree of ionization depends on the pH and ionic strength of the liquid medium. Fruit juice particles have been suggested to be covered by a protective pectin layer, negatively charged at the juice pH. To elaborate clarified juices the native pectin must be degraded and removed since it complicates the clarification process. After juice depectinization, only negatively charged colloidal particles smaller than 0.5 μm remain in suspension, since bigger particulate material precipitates by gravity. Particles negative charge is attributed to degraded pectin molecules that remain bonded to the surface.

Clarification of The colloidal suspension by precipitation or filtration is a very complex and scarcely established operation. Understanding of the flocculation and precipitation of particles, the characteristics of their physicochemical behavior and the influence of clarifying agents would allow to model, predict and optimize this process.

As introduction, in **chapter 1** the two most extended technologies to obtain the clarified apple juice are presented: the conventional process with clarifying agents and the ultrafiltration method. Then the colloidal particles composition is debated. Finally, the classic DLVO theory (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) that would be valid to explain the tendency of these colloids to agglomerate or remain free is presented. This theory combines the Van der Waals attraction forces and the electrostatic repulsion forces as a function of the distance between pairs of particles: the combined curve is called the net interaction energy. The point of maximum repulsive energy is known as the energy barrier. To agglomerate two encountering particles, they must have enough kinetic energy to overcome that barrier. Then, the flocculation degree will depend on the particles collision frequency and their energy respect to the energy barrier. Generally, in suspensions where only act this kind of forces, surface potentials greater than ± 30 mV are needed to overcome the Van der Waals force and prevent particles aggregation.

Chapter 2 describes particles separation by diafiltration, a method to isolate particles from the soluble solids that modify the properties of the liquid medium. Then the necessary amounts of sugars, minerals and organic acids were incorporated separately to modify the particles surface charge. At the end of the diafiltration process particles presented a high surface charge (more than -35 mV). However, the reduction of this charge by adding strong acid and basis to the diafiltered juice was not enough to invert it (revert this charge). The restitution of sugars (glucose and fructose) to the initial values, practically did not modify the charge. The zeta potential of diafiltered juice becomes less negative as the NaCl, or KCl concentrations in solution increases, matching to conventional electric double layer theories. However, the initial zeta potential values of the cloudy apple juice were not recovered by the single addition of mineral ions to the diafiltered juice. Finally, the addition of malic acid and minerals up to levels present in regular cloudy apple juice, recovered the original zeta potential. This allowed to conclude that the minerals contributed to reduce the electrical double layer surrounding the particles, reducing their repulsion, while the malic acid contributed to neutralize the particles charge. Although the zeta potential was reduced even close to zero, precipitation of particles was not observed. This indicated that, in addition to the classical DLVO inter- particle forces, other repulsive energies must be considered.

Título de la Tesis: “Estudios básicos sobre la clarificación de jugos de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Benitez, Elisa Inés

Directores: Dr. Jorge Lozano - Dr. Diego Genovese

In **chapter 3** the hydration force is postulated as responsible of the colloidal stability. It seems that the polysaccharides (mainly galactose and arabinose) coming from pectin degradation and also integrating the colloidal particles, form hydrogen bonds with water molecules, hydrating the particles and giving them high stability. Other types of forces were postulated, like steric repulsion. This force would prevent the interparticle contact by means of the high molecular pectins on the particle surface. Since the suspension was depectinized this force would be negligible. The extended DLVO theory appropriately explained the stability of colloidal apple juice particles. It was possible to predict the individual contribution of repulsive electrostatic and hydration forces to sol turbidity. Reducing the pH and increasing the ionic strength (I) of the liquid medium reduced the energy barrier between apple juice particles, due to the reduction of both their hydration constant and their zeta potential magnitudes. The decrease of the energy barrier produced a linear decrease in the sol turbidity. However, the turbidity remained high even with no energy barrier indicating that apple juice particles are inherently stable, phenomena attributed to the primary hydration shell coating them. The reduction of the hydration constant was attributed to the distortion of the outer hydration shells by H_3O^+ and hydrated K^+ cations, attracted by negative charged particles.

The hydrophobic interaction is studied in **chapter 4**. It is possible that after the enzymatic treatment some methyl groups (that are commonly present in the pectin chains) remain on the particle surface and would produce a hydrophobic interaction. This effect was studied by addition of different sugars. The specific viscosity at equal water activity was evaluated. Even though a significant change was observed, this change was not attributable to hydrophobicity. This kind of force is attractive in nature and would produce a reduction of the energy barrier and a particles size increase. On the contrary, the particle size was reduced approximately 40% and de energy barrier was increased 3.6 times. It was speculated that the particle size reduction was due to a reduction of the particle hydration by water competition with the sugars, and a conformational change due to the reduction of the free energy of the system, from a more extended to a more compact conformation. The energy barrier increase would be attributable to a major number of particle interactions (hydrated particle vs. hydrated sugars) and not hydrated particle vs. hydrated particle interactions, like described in chapter 3.

A morphological analysis of particles by SEM images is carried out in **chapter 5**. It was concluded that the observed particles were aggregates that could be formed after the enzymatic treatment, and due a thermodynamic equilibrium the aggregation process was not continued or was very low. The fractal dimension (D_f) was used to characterize the aggregates. It was found a value of $D_f = 2.3 \pm 0.1$. This value indicates that the aggregate was formed by adding one particle at a time and not by aggregate-aggregate interaction. This is in correspondence with the results of previous chapters and could be due to the high hydration of particles that prevent the interparticle approach. Furthermore, the minimum particle size, with enough statistical weight (79.5 nm), and the mean number of particles that compose each colloidal aggregate ($N = 2271$) were determined.

The effect of gelatin as clarifying agent is studied in **chapter 6**. Due to the high hydration of particles, the use of clarifying agents is necessary to eliminate them from the liquid medium. The major problem with the use of gelatin is that if an excess of protein remains after the fining, it may result in the introduction of potential haze precursors in the juice. The gelatin has a positive charge and it will interact with the particles until their charge is cancelled. Moreover, it was found that the gelatin form a complex with the colloidal particles due to hydrophilic and/or hydrophobic interactions, needing a concentration 10 times higher

Título de la Tesis: “Estudios básicos sobre la clarificación de jugos de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Benitez, Elisa Inés

Directores: Dr. Jorge Lozano - Dr. Diego Genovese

than the necessary to cancel their charge. Furthermore, it was found that the minimum consume of gelatin was not modified by the present of soluble solids, rest of degraded pectins and organic acids in the juice. Although the natural polyphenols present in the juice interact with gelatin, this did not generate a greater consume of it. This effect was attributed to the high hydrophobicity of the particles. The particles remain in suspension allowing the gelatin to interact with both particles and polyphenols. It was speculated that the active polyphenols sites were exhausted, while the gelatin would keep interacting with the particles. Finally it was found that only the amount of colloidal particles is important to determinate the minimum consume of clarifying agent.

The effect of particles and serum characteristics on the turbidity of cloudy apple juice is studied in **chapter 7**. The objective was to find a correlation to determine the amount of particles present in the juice. This information would be useful to evaluate the amount of clarifying agent (gelatin) to use. Since the sugars present in the juice are the major contributors to the turbidity, the addition of glucose (that modify the viscosity and the refractive index of the liquid medium) to solutions with different concentrations and sizes of particles was investigated. Moreover, the particles refractive index was determined through the turbidity data, resulting $n_p = 1.487$. Finally, the **chapter 8** describes the beginning of a study based in the molecular mechanical and molecular dynamic, with the use of a force field parameterized to saccharides, as complementary tool to corroborate the hydration phenomenon of the particles. A representative fragment of colloidal particles was selected, an arabinogalactan II (AG II). The AG II, is associated with protein, which consist of a polysaccharide formed by a (1-3) β -D-galactan core branched at position 6 by 6-linked β -D-galactan outer chain heavily substituted by terminal α -L-Arabinofuranosyl units. The results showed that the polysaccharides that envelope the particles are potentially hydrated, according with the empirical experiences described in the previous chapters.