

Título de la Tesis: “Utilización de membranas en el procesamiento de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Carrín, María Elena

Directores: Dr. Jorge E. Lozano / Dra. Liliana Ceci

Resumen

La aplicación de la Ultrafiltración como una alternativa al proceso convencional de clarificación de jugos ha sido de interés para la industria alimenticia en los últimos años. La Ultrafiltración es un proceso de separación con membrana en el cual la diferencia de presión hidrostática es usada como fuerza de empuje y la membrana actúa como barrera para separar la alimentación en dos corrientes: la de permeado, conteniendo las partículas que logran pasar a través de los poros de dicha membrana, y la de retenido, donde se concentran las macromoléculas, tales como pectinas, almidones y proteínas (con diámetros mayores que 0.001-0.02 μm).

Durante el proceso de Ultrafiltración de jugos de fruta se forma una capa de gel sobre la superficie interna de la membrana, producto de la acumulación de pectinas. Si se procesan frutas no completamente maduras, el almidón presente, gelificado durante tratamientos térmicos previos, también se depositaría sobre la membrana, constituyendo una resistencia adicional al caudal de permeado.

Se ha demostrado en varios trabajos que el camino más efectivo económicamente para facilitar las operaciones de clarificación y concentración en el procesamiento industrial de jugos es la degradación de la pectina y el almidón con el uso de enzimas pectinolíticas y amilolíticas, respectivamente.

Aunque los jugos de manzana son brillantes y claros luego de ser ultrafiltrados, cambios de color y desarrollo de compuestos indeseados son reacciones laterales comunes que seriamente comprometen su aceptación comercial. El pardeamiento no enzimático debido a las reacciones entre azúcares reductores y grupos amino libres (reacción de Maillard), es quizá el mayor perjuicio a la calidad de los jugos clarificados de fruta. Estas reacciones conducen a la formación de melanoidinas, bio-polímeros con un peso molecular estimado mayor a 1 000 Daltons.

El objetivo de esta tesis fue mejorar la aplicación de membranas durante el procesamiento de jugo de manzana. Esto incluye: (i) el estudio de técnicas de inmovilización de enzimas sobre membranas de ultrafiltración, para optimizar la etapa de clarificación del jugo de manzana, y (ii) el uso de membranas de nanofiltración para recuperar el color original de jugos de manzana pardeados luego de su clarificación.

El Capítulo I contiene una descripción de los procesos de separación con membrana y en particular, de la Ultrafiltración y de su aplicación en la clarificación de jugo de manzana. Por ser la pectina y el almidón los componentes de este jugo que más influirían en la disminución del flujo de permeado durante la Ultrafiltración, y particularmente, por existir escasa o casi nula información en la literatura sobre el almidón de manzana, en este capítulo se realizó un estudio de estos compuestos. Se determinaron: (1) el contenido de material urónico de un jugo de manzana de la variedad Granny Smith, (2) el contenido de almidón soluble e insoluble en jugos de manzana de la misma variedad (con distintos grados de maduración) y (3), a través de un análisis microscópico de los gránulos de almidón de manzana, se determinaron (3a) el tamaño de las partículas, (3b) la distribución de tamaños y (3c) la forma de los gránulos.

Título de la Tesis: “Utilización de membranas en el procesamiento de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Carrín, María Elena

Directores: Dr. Jorge E. Lozano / Dra. Liliana Ceci

En otra sección de este capítulo se presentan las generalidades de las enzimas y de su utilización a nivel industrial, particularmente en el procesamiento de jugos de fruta; una descripción detallada de las enzimas pécticas y amilolíticas; una introducción a la cinética enzimática y las generalidades de la inmovilización de enzimas, las técnicas que se utilizan para tal fin y los efectos que pueden presentarse en la actividad enzimática a causa de la inmovilización.

Finalmente, el Capítulo I termina con la descripción de los equipos de UF y de los métodos y técnicas analíticas empleados en el desarrollo de esta tesis.

En el Capítulo II se analizó el comportamiento de las enzimas pécticas y amilolíticas en solución para determinar la influencia de las variables sobre la actividad de las enzimas, a 50 °C (temperatura óptima de acción de estas enzimas y utilizada en el proceso industrial de elaboración de jugo clarificado de manzana). Las pectinasas (Poligalacturonasas: PG, y Pectinilinasas: PL) se estudiaron en un valor fijo de pH (4.6), y las variables analizadas fueron: (1) agregado de NaCl (compuesto reportado como estimulador de la acción de estas enzimas), (2) concentración de enzima, (3) concentración de pectina y (4) tiempo de reacción. Las variables en el estudio de la acción de las amilasas fueron: (1) agregado de CaCl₂ (los iones Ca²⁺ pueden activar la catálisis), (2) pH, (3) concentración de enzima, (4) concentración de almidón y (5) tiempo de reacción. La acción enzimática de PG resultó más favorecida por la presencia de NaCl en el medio de reacción que la de PL. La actividad amilolítica máxima se obtuvo trabajando a pH=4.6, sin CaCl₂ en el medio de reacción. En ambos preparados enzimáticos se encontraron comportamientos de acuerdo a Michaelis-Menten en la etapa inicial de reacción y se determinaron los parámetros cinéticos aparentes. PG mostró una inhibición por sustrato y PL, una inhibición por producto. Se modeló el comportamiento de las enzimas en solución con el tiempo de reacción y las concentraciones de enzima y sustrato.

El Capítulo III se inicia con el estudio micrográfico de: (1) la formación de la capa de gel sobre la superficie interna de la membrana cuando se ultrafiltraron soluciones de pectina, y (2) de las técnicas de lavado analizadas. Se encontró que con soluciones de pectina de muy baja concentración (1.2 mg/L) se formó una capa de gel estable sobre la fibra, aún trabajando en régimen de flujo en estado de transición. Se estimó que la concentración de pectina en la capa de gel se encuentra en el rango entre 0.02 a 0.2 g/mL. Se determinó que el lavado en flujo inverso con una solución de NaOH 0.1 N restablece el flujo de permeado hasta su estado inicial, dejando la superficie y los poros de la membrana libres de restos macromoleculares. En cambio, el lavado con pectinasas en flujo normal no fue capaz de restablecerlo.

Luego se estudió el comportamiento de las enzimas pécticas inmovilizadas sobre la membrana de ultrafiltración cuando se ponen en contacto con flujos de soluciones de pectina a tres niveles de concentración: bajo (1.2-2.4 y 10. mg/L), moderado (20.-80. mg/L) y concentrado (1.-4. mg/mL). Las variables analizadas cuando se ultrafiltraron soluciones de concentraciones bajas de pectina (en presencia de azúcares) fueron: (1) pH de la solución de enzima a inmovilizar, (2) pH de la solución de lavado de la enzima inmovilizada, (3) pH de la solución de pectina a ultrafiltrar, (4) concentración de enzima en la solución a inmovilizar, (5) tipo y (6) concentración de pectina en la solución a ultrafiltrar y (7) caudal de retenido. Como herramientas de análisis de los resultados se evaluaron: (1) un modelo para el flujo de permeado, tipo resistencias en serie, y (2) la comparación de los flujos de permeado obtenidos experimentalmente. La enzima fue efectivamente inmovilizada sobre la membrana de ultrafiltración por adsorción física, aún cuando había sido previamente

Título de la Tesis: “Utilización de membranas en el procesamiento de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Carrín, María Elena

Directores: Dr. Jorge E. Lozano / Dra. Liliana Ceci

inactivada. Con la etapa de inmovilización se agregaron al proceso convencional de ultrafiltración dos efectos solapados: (I) una resistencia al flujo de permeado propia de la presencia de una capa de moléculas retenida sobre la superficie interna de la membrana, y (ii) la hidrólisis de la capa de gel, que favoreció al flujo. La operación en régimen laminar aumentó la posibilidad de interacción entre la enzima inmovilizada y la pectina. La hidrólisis enzimática fue más efectiva sobre la pectina de mayor grado de esterificación.

Durante la ultrafiltración de soluciones de concentración moderada de pectinas (en ausencia de azúcares) se analizaron las influencias: (1) de la concentración de enzima a inmovilizar; y (2) de la concentración de pectina a ultrafiltrar. También, (3) se analizó el efecto de la incorporación de glutaraldehído, como agente espaciador, a la solución de enzima a inmovilizar. Las herramientas de análisis en estos casos fueron las comparaciones de los flujos de permeado y de las concentraciones de ácido galacturónico (producto final de la reacción enzimática). Se determinaron las condiciones operativas necesarias para que la reacción de hidrólisis se lleve a cabo. La técnica de inmovilización por adsorción física, sin el agregado de glutaraldehído, resultó ser más simple y efectiva. La resistencia a la transferencia de materia provocada por la capa de enzima inmovilizada fue la etapa limitante de la reacción de hidrólisis de la pectina.

En el rango de concentraciones de pectina más concentradas se estudió el efecto: (1) de la presencia de NaCl durante la inmovilización de enzimas; (2) del pH del buffer con que se inmoviliza y enjuaga la enzima; (3) del caudal de retenido; (4) del pH inicial de la solución de pectina; (5) de la concentración de enzima a inmovilizar; y (6) de la concentración de pectina a ultrafiltrar. Analizando las variaciones obtenidas en la concentración de ácido galacturónico en el reservorio se encontró que las variables analizadas influyen en la degradación enzimática de soluciones de pectina con elevadas concentraciones, excepto la adición de NaCl a la solución de enzima a inmovilizar que no afectó dicha reacción. El sistema membrana de ultrafiltración-pectinasa inmovilizada estuvo sujeto a limitaciones difusionales severas.

Finalmente, este capítulo contiene la validación de los resultados con experiencias desarrolladas a escala piloto, con soluciones modelo (conteniendo pectina) y con jugo natural de manzana. Los resultados de estas últimas experiencias fueron más beneficiosos que los hallados a escala laboratorio o con soluciones modelo, ya que se encontró una zona donde el flujo de permeado de jugo supera al obtenido sin enzimas inmovilizadas.

En el Capítulo IV se encuentra el análisis de los efectos que provoca cada capa formada sobre la membrana de ultrafiltración en el transporte de materia hacia la corriente de permeado, incorporando incluso algunas variantes durante la inmovilización (inmovilización de la enzima con burbujeo de gas He) y tratamiento de lavado de la enzima (lavado en flujo inverso de la pectinasa inmovilizada). Se realizó un estudio de:

(1) las resistencias al flujo, a través del seguimiento de las concentraciones de ácido galacturónico a ambos lados de la membrana (corrientes de permeado y retenido); y (2) la hidrodinámica del sistema, a través de la distribución de tiempos de residencia con experiencias de estímulo-respuesta. Se encontró que la capa de pectina depositada sobre la membrana (o sobre la enzima inmovilizada) fue la principal generadora del efecto particional en la concentración de ácido galacturónico y que la enzima (pectinasa) inmovilizada contribuyó generando una resistencia al flujo total de permeado. La inmovilización de la enzima por adsorción física, sin burbujeo de gas y sin el lavado en flujo inverso, fue la mejor opción. En cuanto a la dispersión axial, ninguna de estas capas modificó notablemente los tiempos de retención.

Título de la Tesis: “Utilización de membranas en el procesamiento de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Carrín, María Elena

Directores: Dr. Jorge E. Lozano / Dra. Liliana Ceci

Las enzimas amilolíticas inmovilizadas sobre la membrana de ultrafiltración se analizaron en el Capítulo V, estudiando su comportamiento cuando se varían las concentraciones de enzima a inmovilizar y de almidón a ultrafiltrar, y el tiempo de reacción. Se encontró que los gránulos de almidón pueden comportarse como promotores de turbulencia dentro de la fibra. Las amilasas inmovilizadas sobre la membrana no afectaron el pasaje de maltosa al permeado. La acción enzimática no mostró inhibición por sustrato. En cierta combinación de las variables analizadas se lograron obtener flujos de permeado superiores a los casos sin enzima inmovilizada. Los efectos difusionales se incrementaron con la inmovilización de la enzima, respecto de su accionar en estado libre.

La acción conjunta de las enzimas pectinolíticas y amilolíticas coinmovilizadas sobre la membrana de UF se estudió en el Capítulo VI. Se encontró un nivel de concentraciones de enzimas a coinmovilizar que permite obtener flujos de permeado superiores a los obtenidos sin enzima inmovilizada. La concentración de pectina en la solución de sustrato influyó notablemente sobre la cinética de las enzimas coinmovilizadas. Un aumento en la concentración de almidón prácticamente no afectó el comportamiento de las enzimas coinmovilizadas, pero sí su presencia. Similares resultados se obtuvieron cuando el equipo de ultrafiltración se operó en modo batch, disminuyendo la diferencia entre ambos flujos a medida que se aumentó el tiempo de operación.

En el Capítulo VII la investigación se dirigió hacia la decoloración del jugo pardo de manzana utilizando la separación física de las melanoidinas con membranas de ultra- y nanofiltración. Se midieron los parámetros que caracterizan a un jugo, como pH, °Brix, parámetros Hunter de color, absorbancia a 420 nm y concentración de azúcares mayoritarios. Por comparación con un jugo de manzana sin pardear se encontró que las membranas de nanofiltración (tamaño de poro por debajo de 2 kDa) permiten obtener jugos de características aceptables. Sin embargo, se observó una disminución en los

°Brix por lo cual se requeriría un proceso de concentración, posterior a la decoloración, más intenso.

Título de la Tesis: “Utilización de membranas en el procesamiento de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Carrín, María Elena

Directores: Dr. Jorge E. Lozano / Dra. Liliana Ceci

Abstract

The application of ultrafiltration as an alternative to conventional processes for clarification of apple juice has focused the interest of the industry during last years. Ultrafiltration is a separation process with membrane in which hydrostatic pressure difference is used like driving force and membrane acts like barrier to separate feed in two fluid streams: the ultrafiltered solids-free juice (permeate), and the retentate, with variable content of insoluble solids, dissolved macromolecules and colloidal particles, like pectin, starch and proteins (with diameters bigger than 0.001-0.02 μm). During ultrafiltration of fruit juice, macromolecules accumulation (particularly pectin) causes gel layer formation on the inlet surface of membranes. When immature apples are processed, present starch jellified during previous thermal treatment could also settle on membrane, developing an additional resistance to permeate flow. It was demonstrated that the economically most effective way to facilitate clarification and concentration operation during clarified apple juice processing, is by pectin and starch degradation with pectinolytic and amylolytic enzymes, respectively. Although clarified apple juices are generally bright and clear, changes in color and development of undesirable haze and turbidity after concentration are common quality degrading side-reactions which seriously compromise acceptability of commercial juices. Non-enzymatic browning due to reaction between reducing sugars and free amino groups (Maillard reaction) is perhaps the most significant quality degrading phenomenon during apple juice processing and storage. These reactions lead to melanoidins formation, biopolymers with an estimated molecular weight upper 1 000 Daltons.

The objective of this thesis was to improve the application of membranes during apple juice processing. That includes (i) the study of enzymes immobilization techniques on ultrafiltration membranes, in order to optimize the clarification step during concentrated apple juice processing; and (ii) the use of nano-filtration membranes to recover the original color of unacceptable browned clarified apple juices. In **Chapter I** membrane separation processes, particularly ultrafiltration and its application in apple juice clarification, are described. In this chapter main characteristics of apple pectin and starch are also considered, including determination of (1) uronic material contents of apple juice (Granny Smith variety), (2) soluble and insoluble starch contents in juice from apples with different degree of maturity and, (3a) particles size, (3b) size distribution and (3c) granules shape of apple starch granules. In another section of Chapter I, a broad scope of enzymes technologies are presented, with special attention on enzymes application in the fruit juice industry, enzymatic kinetic and enzymes immobilization techniques. Finally, Chapter I concludes with a description of the ultrafiltration equipment and the analytical methods and techniques used during the development of this thesis.

Chapter II was mainly devoted to the study of the behavior of pectic and amylolytic enzymes in solution. Variables influencing enzymes activity at processing temperature (50°C) were carefully analyzed. Pectinases (Polygalacturonase: PG, and Pectinlyase: PL) were studied at stationary pH value (4.6), and analyzed variables were: (1) effect of adding NaCl (which was reported to increase enzyme activity); (2) enzyme concentration; (3) pectin concentration; and (4) reaction time. Variables studied in the case of amylase treatment were: (1) incorporation of CaCl_2 (Ca^{2+} ions can active the catalysis), (2) pH, (3) enzyme concentration, (4) starch concentration, and (5) reaction time. PG enzymatic action was more favored by NaCl incorporation to reaction media than PL. Maximal amylolytic activity was obtained working at pH=4.6, without CaCl_2 in the reaction media. Both enzymatic

Título de la Tesis: “Utilización de membranas en el procesamiento de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Carrín, María Elena

Directores: Dr. Jorge E. Lozano / Dra. Liliana Ceci

preparations showed to follow the Michaelis-Menten model during the initial period of reaction. Apparent kinetic parameters were determined. PG and PL showed substrate and product inhibition, respectively. Behavior of enzymes in solution with reaction time and enzyme and substrate concentrations as parameters was modeled. A micrographic study of the gel layer formation on membrane inlet surface when a solution of pectin was ultrafiltered, is presented in **Chapter III**. It was found that working with flux regimen in the transition state, a stable gel layer was built on the fiber when pectin solutions of low concentration (1.2 mg/L) were ultrafiltered. Pectin concentration in gel layer was estimated in the range 0.02 to 0.2 g/mL. Initial permeate flux level was recovered only by cleaning in inverse flux with NaOH 0.1 N solution. Immobilization of pectic enzymes was obtained by flowing enzyme solutions through hollow fiber ultrafiltration membrane. Three levels of pectin content in solution were used: low (1.2-2.4 y 10. mg/L), moderate (20.-80. mg/L) and elevated (1.-4. mg/mL) concentration. Variables of interest during ultrafiltration of low concentration pectin solutions (with sugars) were: (1) pH of enzyme solution to immobilize, (2) pH of rinsing solution, (3) pH of pectin solution to ultrafilter, (4) enzyme concentration in the solution to immobilize, (5) type and (6) pectin concentration in the solution to ultrafilter and (7) retentate flow. The series resistance model (applied to permeate flux) and a comparison of experimental permeate fluxes were also evaluated. The enzyme was effectively immobilized on ultrafiltration membrane by physical adsorption, even in the case they were previously inactivated. Two facing effects were incorporated to the conventional ultrafiltration process with enzyme immobilization: (i) a resistance to permeate flux, inherent to the presence of an additional molecules layer on the membrane, and (ii) the gel layer hydrolysis by enzymatic action, favoring permeate flux. Laminar regimen operation increased the possibility of interaction between immobilized enzyme and pectin. Enzymatic hydrolysis was more effective on pectin of higher esterification degree.

During ultrafiltration of solutions of pectin with moderate concentration (without sugars) the influence of concentration of the solution of enzyme to immobilize and pectin concentration to ultrafilter, were analyzed. The effect of glutaraldehyde incorporation (like spacer agent) to the enzyme solution to immobilize was also studied. Analysis was focused on permeate fluxes and galacturonic acid (enzymatic reaction final product) concentrations. The required operating conditions for the hydrolysis reaction to proceed were also determined. Immobilization technique by physical adsorption resulted simpler and effective without the adding of glutaraldehyde. The controlling step of pectin hydrolysis was the resistance to mass transfer caused by the immobilized enzyme layer. In the range of more concentrated pectin solutions the effect of: (1) NaCl present during enzyme immobilization; (2) pH of buffer used to immobilize and rinse enzyme; (3) retentate flow; (4) initial pH of pectin solution; (5) enzyme concentration to immobilize; and (6) pectin concentration to ultrafilter were studied. It was found that with the only exception of the addition of NaCl, all the analyzed variables influenced the enzymatic degradation of pectin solutions with elevated concentration. Moreover, the ultrafiltration membrane-immobilized pectinase system was subjected to severe diffusional limitations. Finally, this chapter includes validation of results through experiences run at pilot scale, with both model solutions and apple juice. Although more difficult to model, results obtained with actual apple juice were more useful from a practical point of view: A zone where permeate flux was improved due to enzyme immobilization was clearly identified.

In **Chapter IV** the effect on mass transport of the different layer deposited on the membrane surface was analyzed. In this case, working only with pectic enzymes and introducing some changes both during immobilization (bubbling He gas in the enzyme

Título de la Tesis: “Utilización de membranas en el procesamiento de frutas”

Doctorado en Ingeniería Química

Autor: Carrín, María Elena

Directores: Dr. Jorge E. Lozano / Dra. Liliana Ceci

solution during immobilization) and enzyme rinsing treatment (inverse flux). The flux resistance by following galacturonic acid concentration at both sides of membrane (permeate and retentate); and the hydrodynamic system characteristics (residence time distribution with stimulus-response experiences) were studied. It was found that pectin layer deposited either on the clean membrane or on the immobilized enzyme, was the principal responsible of the partition effect in galacturonic acid concentration. Immobilized pectinase was found to generate a resistance to total permeate flux. Enzyme immobilization by physical adsorption, without gas or inverse flux rinsing, was the best alternative. Retention time was not modified by the presence of any of these layers. Amylolytic enzymes immobilized on ultrafiltration membrane were studied in **Chapter V**. The effect of enzyme concentration in solution, starch concentration to ultrafilter and reaction time were analyzed. It was found that starch granules could behave like turbulence promoters into the hollow fiber membrane. Immobilized amylases did not affect maltose permeation. Enzymatic action did not show in this case inhibition by substrate. Permeate flux higher than those without immobilized enzymes were obtained when an appropriate combination of studied variables were selected. Diffusional effects were increased with immobilized enzyme in comparison with free enzyme solution. Combined action of pectinolytic and amylolytic enzymes, coimmobilized on hollow fiber UF membrane was studied in **Chapter VI**. It was found an appropriate level of co-immobilized enzymes with which permeate flux was higher than those without immobilized enzymes. It was also found that coimmobilized enzymes kinetic was remarkable influenced by pectin concentration. However, starch concentration had not a notable influence on that kinetic, being the effect of starch on resistance mainly mechanical. Decoloration of browned apple juice was investigated In **Chapter VII** using physical separation of melanoidins with ultra- and nanofiltration membranes. Juice characteristic parameters like pH, °Brix, color Hunter parameters, absorbance at 420 nm and major sugars concentration, were determined. Apple juices with acceptable color characteristics were obtained by filtering through nanofiltration membranes (pore size under 2 kDa). However, it must be indicated that from a practical point of view, soluble solids content may be reduced due to interactions sugars-membrane, and a more intense concentration process after decoloration could be required.