

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE INTERÉS INDUSTRIAL MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CÁSCARA DE NARANJA

José Roberto Ramos Ibarra^b, Rosa Isela Corona González^a, Enrique Arriola Guevara^a, Lorena Amaya Delgado^b, Guadalupe María Guatemala Morales^{b,*}

^a Departamento de Ingeniería Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara. Blvd. Marcelino García Barragán #1421, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44430, MÉXICO.

^b Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C.). Av. Normalistas #800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, CP 44270, MÉXICO. gguatemala@ciatej.mx

Resumen

En este trabajo se evaluó la hidrólisis enzimática de cáscaras de naranja, utilizando un extracto enzimático comercial, con la finalidad de obtener compuestos aprovechables como materia prima para otros procesos industriales. Los resultados muestran que se consigue una concentración de hasta cerca de 22 g L⁻¹ de glucosa al término de la hidrólisis, así como otros monosacáridos como xilosa y fructosa en menor concentración. Además, mediante un diseño experimental se estableció que los principales factores que afectan la liberación y recuperación de compuestos como el limoneno (terpeno mayoritario de los aceites esenciales de cítricos) fueron el tiempo de hidrólisis, la cantidad de enzima y la interacción de la temperatura con los dos factores anteriores. La mayor cantidad obtenida de limoneno después de la hidrólisis fue alrededor de 28 mg por gramo de cáscara después de 6 horas de maceración con 80% de enzima y temperatura de 40° C. Esta cantidad fue considerablemente mayor a la recuperada después de una maceración únicamente con agua (entre 1.8 y 3 mg de limoneno por gramo de cáscara).

Introducción

El aprovechamiento industrial de los cítricos se ha convertido en una actividad intensiva en donde participan empresas dedicadas a toda la cadena productiva (cultivadores, procesadoras, centros de distribución y exportadores), produciendo jugos, pulpas, concentrados y frutas en fresco; sin embargo, a medida que la producción crece, se aumenta también la generación de residuos sólidos y líquidos, los cuales están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aceites esenciales y aminoácidos [1]. Los aceites esenciales (compuestos por uno o más terpenos y algunos derivados oxigenados) [2] son algunos de los productos que pueden obtenerse a partir de los residuos cítricos. Los aceites esenciales se emplean para la elaboración de bebidas, artículos de aseo y como materias primas para la elaboración de productos farmacéuticos, entre otras aplicaciones [3]. Un mayor tema de investigación actual es la hidrólisis selectiva de la celulosa en glucosa y otros azúcares fermentables con diferentes métodos, ya que este paso de degradación abre el camino para otras transformaciones catalíticas [4]. Sin embargo, el interés cada vez más creciente por sustancias de interés industrial de origen natural impone la necesidad de desarrollar métodos de extracción menos contaminantes y con el máximo rendimiento de estos compuestos, en un corto período de tiempo y con bajo costo [1].

Metodología

Se utilizaron cáscaras de naranja dulce (*citrus sinensis*) para ser sometidas a la maceración enzimática. Para la hidrólisis se utilizó el preparado enzimático comercial grado alimenticio Macerex® de Enmex S. A. de C. V., reportado con actividad celulolítica. La experimentación se realizó en dos etapas. La primera consistió en realizar una cinética para conocer el comportamiento general de la hidrólisis a través del tiempo y poder establecer las condiciones a probar bajo un diseño experimental en la segunda etapa. Para la cinética de hidrólisis, las cáscaras se colocaron en una solución al 5% de la enzima comercial y se dejaron macerando a una temperatura de 50° C durante 10 horas. Durante cada hora se

tomó una muestra la cual se prensó manualmente para separar el bagazo remanente del sobrenadante al cual se le realizó la determinación de azúcares y terpenos. Posteriormente, se realizaron hidrólisis bajo un diseño 2^k en donde las variables a probar fueron: pH, temperatura, cantidad de enzima y tiempo de hidrólisis. Las muestras se procesaron como se describió anteriormente para el análisis de azúcares y terpenos. La determinación de los azúcares liberados durante la hidrólisis de la cáscara de naranja se realizó por HPLC utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con un detector de índice de refracción, una columna Rezex™ RCM-Monosaccharide Ca+2 (300 x 7.8 mm), agua grado HPLC como fase móvil. La determinación de limoneno se realizó con un sistema Shimadzu GC-17A provisto con un FID, una columna SLB-5ms 10 m x 0.10 mm d.i. x 0.10 μm espesor de película (Supelco); programa de temperatura 50-250° C a 3 °C/min y Helio como gas acarreador.

Resultados

Durante la cinética de la hidrólisis enzimática de las cáscaras de naranja se observó que la mayor liberación de monosacáridos ocurrió a las 8 horas de haber iniciado el proceso. Los azúcares presentes fueron glucosa (21.8 g L⁻¹), xilosa (3.2 g L⁻¹) y fructosa (7.2 g L⁻¹) (Figura 1). Cabe señalar que no se detectó celobiosa presente en el hidrolizado por lo que este resultado sugiere que el preparado enzimático comercial Macerex® presenta suficiente β -glucosidasa, enzima que cataliza el último paso de la hidrólisis enzimática degradando celobiosa a glucosa. Estos azúcares obtenidos por hidrólisis de cáscara de naranja pueden ser utilizados para procesos fermentativos como la producción de etanol como ha sido reportado en investigaciones previas [5,6].

Durante el hidrolizado enzimático de las cáscaras de naranja también se observó una liberación creciente del componente volátil mayoritario del aceite esencial de cítricos (incluida la naranja), el monoterpeno oxigenado limoneno, el cual fue utilizado como referencia para determinar el tiempo en el que se consigue un mayor rendimiento de aceite esencial. De acuerdo a los resultados la mayor concentración de limoneno se liberó a las 5 horas de transcurrida la hidrólisis enzimática (Figura 2).

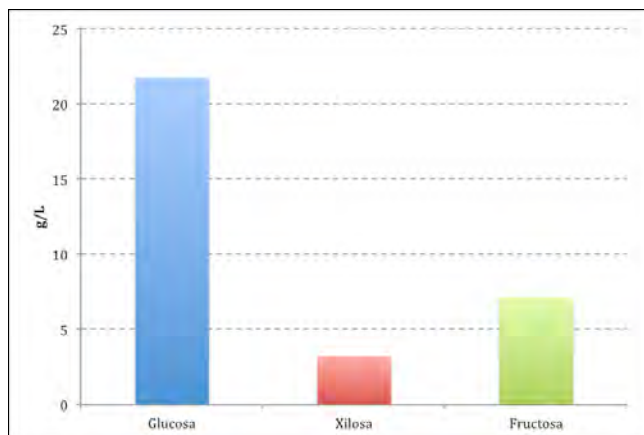


Figura 1.- Concentración de azúcares presentes en el hidrolizado de cáscaras de naranja

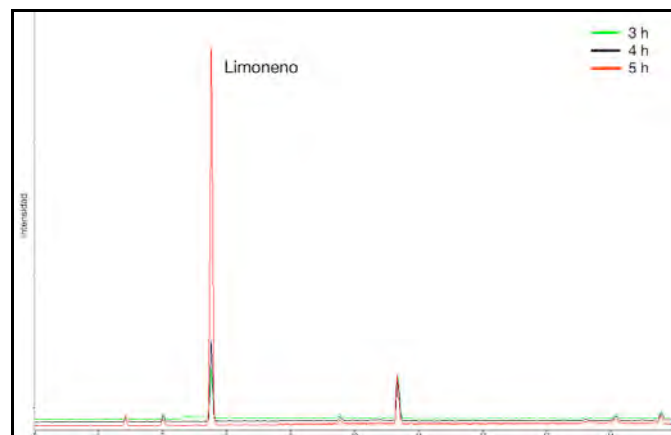


Figura 2. Identificación de limoneno por cromatografía de gases.

Con los resultados obtenidos de la cinética de hidrólisis enzimática se establecieron las condiciones para realizar las siguientes hidrólisis bajo un diseño experimental 2^4 , para el cual se establecieron niveles de 4.5 y 5.5 para pH, 40 y 60° C para temperatura, 2 y 6 horas para tiempo de hidrólisis y 60 y 80 % (v/m) para cantidad de enzima. Finalmente, se añadieron cuatro puntos centrales al diseño para corroborar su linealidad o descartar curvatura por efectos de segundo orden.

Los resultados muestran que la maceración enzimática tuvo un efecto positivo sobre la recuperación de compuestos como el limoneno, ya se que obtuvo una mayor cantidad que al no utilizar enzima. En las muestras que se maceraron únicamente en agua, solo se recuperó entre 1.8 y 3.0 mg de limoneno aproximadamente por gramo de cáscara de naranja. Por otra parte, el análisis estadístico mostró que los principales factores que tienen efecto sobre la liberación y recuperación de compuestos de interés, tomando como referencial al limoneno, son el tiempo de hidrólisis, la cantidad de enzima utilizada y la interacción de la temperatura con los dos factores anteriores. La mayor cantidad de limoneno obtenida fue cerca de 28 mg por gramo de cáscara de naranja, utilizando un pH de 5.5, temperatura de 40° C, 6 horas de hidrólisis y 80 % de enzima (Tabla 1). La Figura 3 y Figura 4 muestran las superficies de respuesta para la interacción observada entre temperatura–tiempo y temperatura–enzima respectivamente. En estas gráficas se observa que a una menor temperatura y mayor cantidad de enzima y tiempo de hidrólisis, se consigue la mayor recuperación de limoneno.

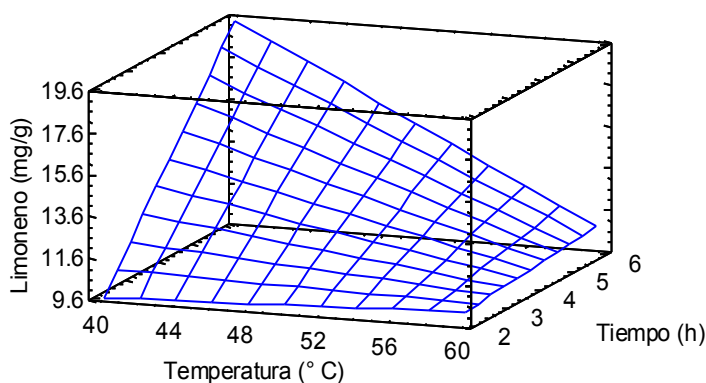


Figura 3. Superficie de respuesta para limoneno, interacción temperatura - tiempo.

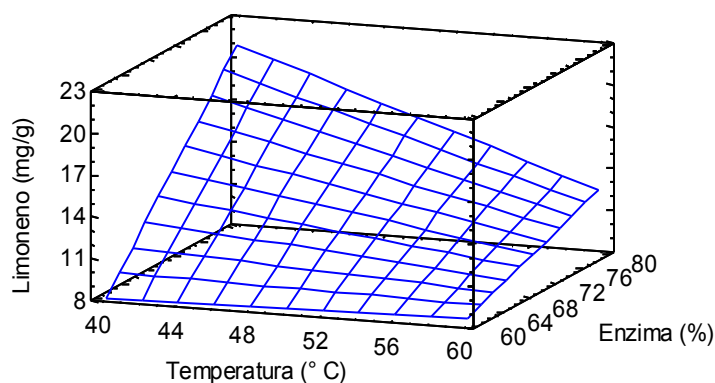


Figura 4. Superficie de respuesta para limoneno, interacción temperatura - cantidad de enzima.

Tabla 1. Resultados del diseño 2^k para la obtención de limoneno.

pH	Temperatura (° C)	Tiempo (h)	Enzima (%)	Limoneno (mg/g)
4.5	40	2	60	4.01
5.5	40	2	60	1.92
4.5	60	2	60	4.20
5.5	60	2	60	8.31
4.5	40	6	60	9.93
5.5	40	6	60	16.68
4.5	60	6	60	12.36
5.5	60	6	60	9.47
4.5	40	2	80	16.89
5.5	40	2	80	16.04
4.5	60	2	80	10.46
5.5	60	2	80	18.06
4.5	40	6	80	23.49
5.5	40	6	80	27.96
4.5	60	6	80	14.16
5.5	60	6	80	7.66
5	50	4	70	6.48
5	50	4	70	14.53
5	50	4	70	10.41
5	50	4	70	18.53

Otros autores [7] reportan recuperaciones de limoneno, usando metanol como solvente, de alrededor de 16 mg por gramo de flavedo de naranja (parte más superficial que representa el 30 % aprox. de la cáscara y en donde se concentra la mayor cantidad de limoneno), por lo que utilizando la maceración enzimática se consiguió una mayor recuperación, considerando además que en este trabajo se utilizó la totalidad de la cáscara.

Además de limoneno, fue posible identificar la presencia de otros componentes como el pineno, mirceno, linalool, careno y terpineno, los cuales se encuentran en menores cantidades en los aceites de cítricos obtenidos por prensado [8].

Conclusiones

La hidrólisis enzimática de las cáscaras de naranja permitió una mayor recuperación del limoneno (componente principal del aceite de naranja) mediante el prensado en frío. Por otra parte, también se obtuvieron monosacáridos con potencial utilidad para procesos fermentativos o para su transformación en otros productos de aplicación industrial. Lo anterior indica que los residuos de la agroindustria cítrica aun contienen sustancias con la calidad requerida para servir como materia prima en otros procesos y que además, mediante la hidrólisis enzimática, es posible la recuperación de estos compuestos, lo cual además puede minimizar los problemas presentados con las técnicas de extracción convencional, convirtiéndola en una tecnología factible para estos propósitos

Referencias

1. Londoño Londoño Julian Alberto, "Aprovechamiento de residuos de la agroindustria de cítricos: extracción y caracterización de flavonoides", *Disertaciones Administrativas Y Agropecuarias: Gestión Y Competitividad*, p. 395 - 416, 2010.
2. Arce, A., A. Pobudkowska, O. Rodríguez, y A. Soto. "Citrus essential oil terpenless by extraction using 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid: Effect of the temperature.", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 133, No. 1, p. 213-218, 2007.
3. Rojas Ll, Jennifer P., Aidé Perea, y Elena E. Stashenko. "Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos." *Vitae (Medellín)*, Vol. 16, No. 1, p. 110-115, 2009.
4. Van de Vyver, S., Geboers, J., Jacobs, P. A., y Sels, B. F. "Recent advances in the catalytic conversion of cellulose." *ChemCatChem*, Vol. 3, No. 1, p. 82-94, 2011.
5. Grohmann, K., Baldwin, E. A., y Buslig, B. S. (1994). Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and biotechnology*, 45(1), 315-327.
6. Wilkins, M. R., Widmer, W. W., & Grohmann, K. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, 42(12), 1614-1619.
7. Davidowski S. y DiMarco B. (2009). The Extraction and Quantification of Limonene from Citrus Rinds Using GC/MS. Application Note. PerkinElmer. 1-4.
8. Shaw, P. E., & Coleman, R. L. (1974). Quantitative composition of cold-pressed orange oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(5), 785-787.