

DESARROLLO Y REMOCION DE COLOR DURANTE LA ULTRAFILTRACION DE RNA EN CARTUCHOS DE FIBRA HUECA

MIGUEL A. OTERO*, VICTOR FERNANDEZ* y NAYDA MARTIN**

* INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZUCAR (ICIDCA)

** INSTITUTO SUPERIOR POLITECNICO JOSE A. ECHEVARRIA

Resumen

Se investigó el proceso de formación de color durante la ultrafiltración de efluentes alcalinos de extracción de ARN en levaduras. El desarrollo de color a 30, 40 y 50°C es comparado en corridas clásicas de ultrafiltración en batch con reciclaje de permeado.

El oscurecimiento presenta una fuerte dependencia con respecto a la temperatura, siendo de tipo exponencial de acuerdo al modelo cinético de Arrhenius.

La energía de activación es significativamente inferior a la encontrada en otros sistemas clásicos. El uso de peróxido de hidrógeno como agente de atenuación de color depende de la concentración de éste empleada, viéndose favorecido a bajas temperaturas. El tiempo de tratamiento no resultó significativo en el intervalo estudiado.

Abstract

The process of colour formation during ultrafiltration of Alkali effluents for the removal of yeast RNA was investigated. Colour development at 30, 40 and 50°C is compared in classical batch ultrafiltration runs with permeate recycling. The darkening presents a strong dependence respect to temperature, following an exponential behaviour according to Arrhenius kinetic model.

Activation energy is significantly lower to those found in other classic systems. The hydrogen peroxide used as a colour attenuation agent depend on the concentration used, being favoured its action at low temperatures. Treatment time was not significant in the studied interval.

Introducción

Durante la operación en batch de la filtración por membranas, el medio concentrado pierde líquido constantemente producto de la extracción de solvente. La formación de la capa de gel introduce una nueva membrana de tamaño de poro no controlado, incrementándose la retención de los sólidos en solución, tanto macro como microsólido^{1,2}. Entre los sólidos en suspensión o disueltos, existen proteínas contaminantes extraídas por medio alcalino, así como carbohidratos simples, presentes en el citoplasma celular.

Las condiciones de temperatura y pH favorecen las reacciones entre estas especies dando lugar a compuestos inten-

samente coloreados³. En la industria alimenticia muchos de los cambios de composición química, producto de estas reacciones, son deseables pues brindan aroma al producto final^{4,7}. Sin embargo reacciones del mismo tipo pueden producir cambios perjudiciales de color, textura, composición e incluso llegar a la destrucción del material.

Las reacciones químicas de las proteínas involucran principalmente las cadenas laterales de los aminoácidos polares. Las reactividades relativas de estas cadenas varían mucho con las condiciones del medio reaccionante.

Muchas de estas reacciones son con agentes electrofílicos tales como los de los grupos aminos con los carbonilos⁷, dentro de ellas se encuentra la reacción de Maillard⁸. Otras, sin embargo, son con agentes oxidantes: oxígeno del aire, luz, ácidos o álcalis.

El objetivo del presente trabajo es estudiar la influencia de la temperatura en la aparición de color en la ultrafiltración de RNA, así como tratar de atenuar el mismo por la acción de agentes químicos.

Materiales y Métodos

Tratamiento de la crema: La crema de levadura de *Kluyveromyces fragilis* fue tratada con agua amoniacal según Otero⁹.

Ultrafiltración: el sistema de UF empleado fue una planta UF-1 (Alfa Laval Tumba) provista de cartucho de fibra hueca. Romicon (Rohm & Hass) con un *cut-off* nominal de 30 mil, la planta fue operada con una diferencia de presión transmembrana (ΔP_{TM}) de $2,1 \times 10^5 \text{ Nm}^{-2}$ y una velocidad de alimentación de $0,15 \text{ m s}^{-1}$. La temperatura fue variada entre 30 y 50°C . Las corridas se llevaron a cabo con modalidad batch.

Color: El desarrollo del color fue determinado por lectura de la muestra extraída a intervalos regulares por duplicado a 420 nm contra un blanco de agua destilada. Se seleccionó esta longitud de onda por corresponder al máximo de absorbancia de la solución.

Diseño experimental: Para las experiencias de remoción de color, se utilizó peróxido de hidrógeno a través de un diseño cuadrático central rotatorio con base 2^3 , considerándose como variables independientes la concentración de H_2O_2 , temperatura y tiempo de tratamiento. El proceso de remoción se llevó a cabo sobre una muestra concentrada por UF hasta un volumen de 1/10 del original.

Resultados y Discusión

La figura 1 muestra los cambios en la absorbancia a 420 nm para las corridas de ultrafiltración a diferentes temperaturas en función del tiempo.

El efecto de la concentración por la extracción continua de permeado, el cual arrastra cantidades significativas de color, enmascara la identificación de la cinética del proceso. En todos los casos, las figu-

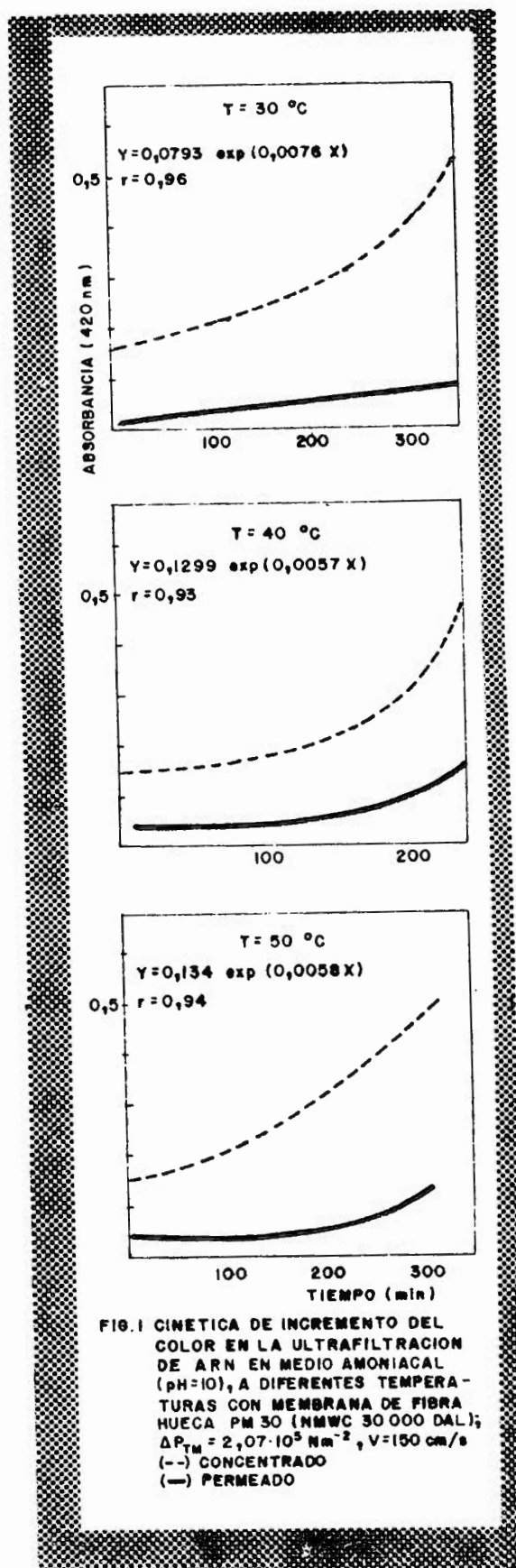


FIG. 1 CINÉTICA DE INCREMENTO DEL COLOR EN LA ULTRAFILTRACION DE ARN EN MEDIO AMONICAL ($\text{pH}=10$), A DIFERENTES TEMPERATURAS CON MEMBRANA DE FIBRA HUECA PM 30 (NMWC 30 000 DAL); $\Delta P_{TM} = 2,07 \cdot 10^5 \text{ Nm}^{-2}$, $V = 150 \text{ cm}^3/\text{s}$
(- -) CONCENTRADO
(—) PERMEADO

ras se ajustan a una curva potencial normal del tipo:

$$Y = A \exp.^{Bx}$$

Donde: A y B son parámetros de ajuste del modelo

A partir de los resultados observados en la figura, no es posible arribar a conclusiones en cuanto al comportamiento del color en función de la temperatura. Todo parece indicar que el efecto del tiempo predomina sobre la temperatura de este sistema, donde la concentración varía constantemente a los efectos del incremento del color. Obsérvese cómo los valores de los exponentes responden proporcionalmente al tiempo y no a la temperatura. Para eliminar esta interferencia el sistema fue operado a volumen constante, reincor-

porando el permeado al tanque de alimentación en forma continua.

El resto de los parámetros de ultrafiltración fueron mantenidos a niveles idénticos a las corridas anteriores. Los resultados se muestran en la figura 2.

El comportamiento observado es exponencial, tal como podría esperarse, de producirse color sistemáticamente durante la corrida de ultrafiltración. Labuza y Riboh¹⁰ encontraron que la mayoría de las reacciones relacionadas con el deterioro de la calidad de mezclas de alimentos complejos, ya sea por oxidación, eliminación o degradación de componentes, siguen un comportamiento cinético de orden cero o primer orden.

Las diferencias estadísticas entre ambos comportamientos son pequeñas a los efectos prácticos según fue demostrado por Toribio y Lozano¹¹. La data experimental fue

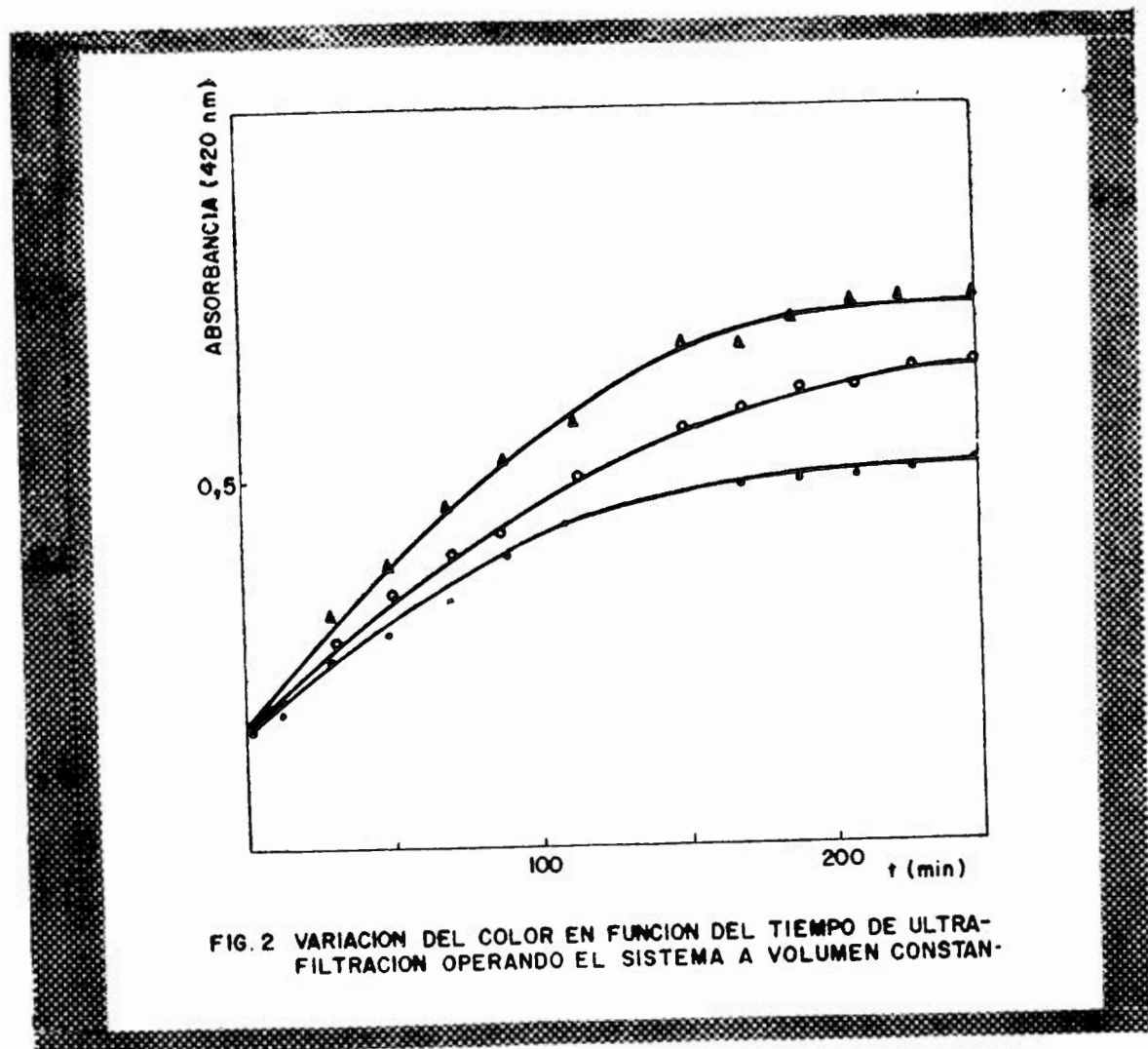


FIG. 2 VARIACION DEL COLOR EN FUNCION DEL TIEMPO DE ULTRAFILTRACION OPERANDO EL SISTEMA A VOLUMEN CONSTANTE.

ajustada usando un algoritmo de parámetros no lineales mínimos cuadrados, dando lugar al modelo siguiente:

$$C = A \cdot \exp(-kt) \quad (3)$$

Donde C es el color a un tiempo dado, A es un parámetro de ajuste, K constante de reacción y t el tiempo en minutos.

La tabla 1 ofrece los resultados obtenidos a las diferentes temperaturas. En ella se evidencia la dependencia con esta variable de la constante de velocidad de reacción.

Tabla 1. Resultados del ajuste del modelo cinético para el desarrollo de color en las corridas de ultrafiltración

Temperatura (°C)	k (min ⁻¹)	A	r ²
30	1,81 × 10 ⁻³	1,200	0,993
40	2,74 × 10 ⁻³	1,202	0,997
50	2,65 × 10 ⁻³	1,208	0,997

A partir de estos valores puede establecerse la relación de Arrhenius para calcular la energía de activación de la reacción formadora de colores.

$$k = k_0 \exp(-E_a/RT)$$

Donde k₀ es el factor de frecuencia de colisión, E_a la energía de activación aparente de los gases y T la temperatura en grados absolutos.

Los valores obtenidos para esta recta fueron:

$$k_0 = 147,81, E_a = 6,798 \text{ kcal/mol}^{-1} \\ \text{y } r = -0,996$$

Toribio y Lozano¹¹ encontraron un oscurecimiento mucho más lento en variedades de jugo de manzana concentrado, en el cual coexisten componentes presentes en nuestros efluentes como los azúcares y aminoácidos. Reyes¹² encontró un comportamiento similar en mieles de caña almacenadas a diferentes temperaturas, ambos del orden de los días⁻¹ (1 440 veces menor si se expresan en las mismas unidades). En ambos casos, los experimentos fueron estáticos y a valores de actividad del agua (a_w), muy inferiores al caso nuestro. Si

bien, valores intermedios de a_w entre 0,2 y 0,7 favorecen las reacciones de este tipo, a los efectos cinéticos la alta velocidad de recirculación del equipo de ultrafiltración (2 000 litros/h) debe compensar la acción desfavorable de una elevada a_w (0,97, en nuestro caso) por incremento de la frecuencia de colisión entre los reaccionantes, de ahí su más rápida formación. Esto se confirma con el pequeño valor obtenido para la energía de activación en comparación con los sistemas clásicos para el deterioro por Maillard.

Las temperaturas medias favorecen el proceso de ultrafiltración, por aumento del flujo por unidad de área y el consecuente ahorro de membrana necesario para alcanzar un nivel de concentración deseado^{13,14}. En consonancia con esto si el compuesto a purificar es resistente a temperaturas comprendidas en el entorno de 40-60°C, el incremento puede ser 50 % superior al obtenido a 30°C.

Por otra parte, el incremento de la temperatura de trabajo trae por consecuencia la aceleración del oscurecimiento del concentrado, lo cual obscurece la purificación posterior del producto a causa de la coprecipitación del ARN con parte de las impurezas de alto peso molecular responsables del mismo.

Remoción del color

En la tabla 2 se muestran los resultados del diseño experimental. Estos fueron evaluados y se obtuvo finalmente el polinomio siguiente con las variables ya descodificadas para la remoción del color.

$$Y = 53,9824 - 1,8665 T - 2,4907 C + \\ + 0,0209 T^2 + 0,2883 C^2 \quad (4)$$

Bajo estas condiciones el tiempo resultó no significativo.

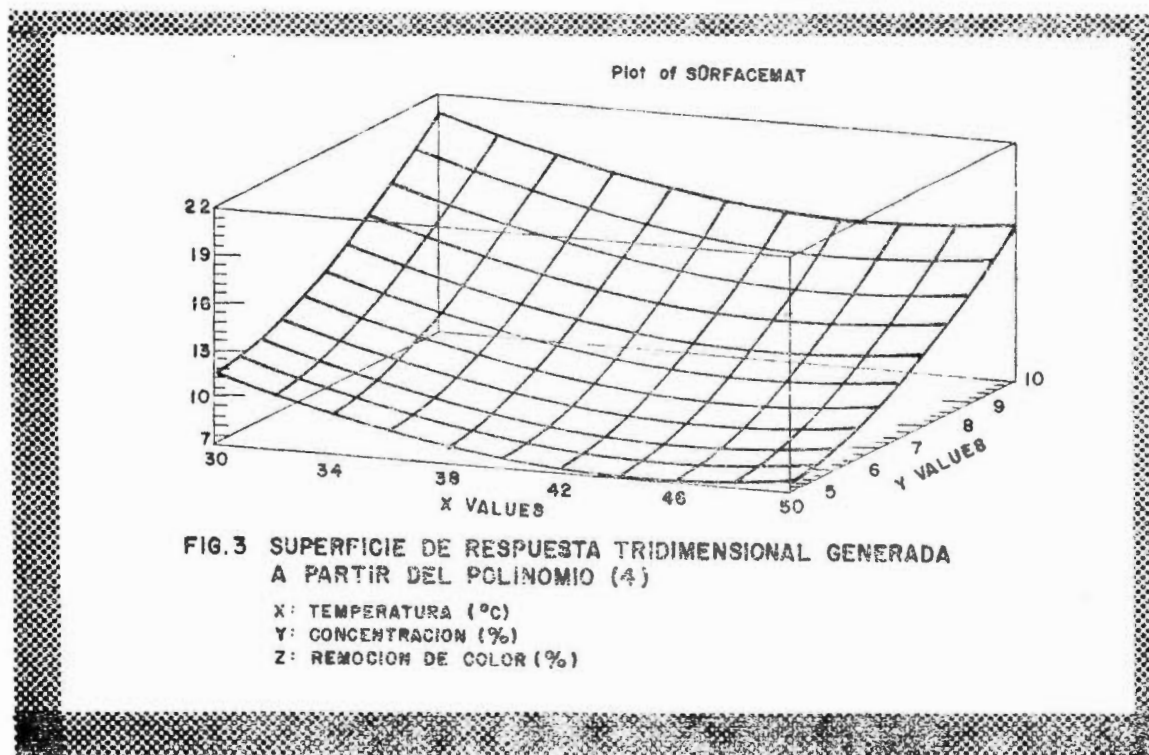
La ecuación (4) permite, dentro de los límites del espacio muestral fijados, calcular el nivel de remoción de color en función de la temperatura y la concentración de peróxido.

La no significación del tiempo puede deberse a que el intervalo establecido no fue lo suficientemente amplio para que se evidenciara la influencia de esta variable.

La evaluación de la ecuación (4) ofrece la superficie de respuesta que se ilustra en la figura 3. El análisis de comportamien-

Tabla 2. Niveles de las variables para el ensayo de remoción de color según diseño cuadrático central

Variables	Alto	Medio	Bajo	+ Alfa	- Alfa
Temperatura (x_1) °C	50	40	30	36,8	23,2
Tiempo (x_2) h	2,0	1,25	0,5	2,5	0,00
Concentración (x_3) %	10,0	7,5	5,0	12,7	3,3



to de las variables brinda algunos resultados de interés:

- Las altas temperaturas desfavorecen el proceso de reducción de cromóforos, debido probablemente a la descomposición del peróxido antes de la reacción con éstos.
- El nivel inferior de concentración de peróxido seleccionado (5%) es insuficiente para alcanzar una remoción significativa de color; aún cuando el proceso sea conducido a temperatura ambiente (condiciones más favorables) obteniéndose como máximo 12% de remoción.
- El incremento de la concentración de peróxido conduce a un aumento continuo de la remoción, alcanzando un máximo de 21%, para el nivel superior de esta variable (10%).

De ahí que el proceso no puede ser optimizado, al menos a partir de las variables controladas.

Es importante señalar, por otra parte, que de estar presentes compuestos derivados de otras reacciones comprendidas en Maillard, de origen no reductivo, éstos no responderán a la acción de agentes oxidantes y por tanto la remoción de la fracción del color que aportan permanecerá en solución.

Conclusiones

- Durante el proceso de ultrafiltración de los efluentes de extracción básica del ARN de levaduras, se produce un incremento de coloración de los mismos, detectándose que al menos el 20% se produce por reducción.
- La formación de color, presenta un comportamiento exponencial con una

fuerte dependencia de la constante de velocidad de reacción con la temperatura.

- La energía de activación de la reacción de oscurecimiento presenta niveles muy inferiores a los reportados para los sistemas clásicos susceptibles a sufrir deterioro por Maillard.
- La remoción de color con peróxido de hidrógeno depende en gran medida de la concentración del reactivo, viéndose favorecido a temperatura ambiente más que a 50°C.

Bibliografía

1. D. Webster: Seminario sobre ultrafiltración, La Habana, 1986.
2. M. A. Otero y V. Fernández: Informe Interno ICIDCA, 1986.
3. C. Erickson: Maillard Reactions in Food and Nutrition Science. Ed. Pergamon Press, New York, 1981, vol. 5.
4. O. Fenema: Abstracts of the IFT-IUFOST. Basic Symposium, Food Technology, 1984.
5. J. R. Whitaker: Abstracts of the IFT-IUFOST. Basic Symposium, Food Technology, 1984.
6. M. S. Feather: Abstracts of the IFT-IUFOST. Basic Symposium, Food Technology, 1984.
7. R. E. Feeney, J. R. Whitaker, D. T. Osuga, et. al: Abstract of the IFT-IUFOST. Basic Symposium, Food Technology, 1984.
8. L. C. Maillard. *Compt. Rend.* 15, 1912, 66.
9. M. A. Otero: Tesis de C. Dr. CNIC, La Habana, 1988.
10. J. L. Toribio and J. E. Lozano: *J. Food Sci.* 49, 1984.
11. T. P. Labuza and D. Riboh: *Food Technology*. 36 (10):, 1982.
12. A. Reyes: Tesis de Diploma, Universidad de la Habana, La Habana, 1987.
13. M. S. Le: *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, Toronto, 1985, vol. 2.
14. H. C. Chem and R. R. Zall: *Process Biochem.* 20 (2): 1985, 46.