



**Cinética de extracción de aceite de piñón (*Jatropha curcas* L), cacaté (*Oecopetalum mexicanum*) y pistache (*Pistacia vera* L), empleando enzimas comerciales.**

TESIS PROFESIONAL  
PARA OBTENER TITULO DE:  
**INGENIERA BIOQUÍMICA**

PRESENTA:

**BRENDA YESENIA NOLASCO ARROYO**

DIRECTOR DE TESIS

**DRA.SANDY LUZ OVANDO CHACÓN**

**TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS**

*"he llegado al final de este camino y en mi han quedado marcado huellas profundas de éste recorrido. Son madre tu mirada y aliento. Son padre tu trabajo y esfuerzo. Son maestros tus palabras y sabios consejos, mi trofeo es también vuestro"*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, sabes lo esencial que has sido en mi posición firme de alcanzar esta meta, sin tu paciencia y tu amor nosotros nos reducimos a un nada, gracias a ti todo esto fue posible y atravez de esta meta podre alcanzar otras más, sin ti no podríamos dar un respiro y un solo paso y a pesar que no te sirvo como debe ser siempre has estado conmigo, me has ayudado aun cuando ya he perdido la esperanza.

Papá, gracias por tu apoyo incondicional, la orientación que me has dado, por ser la luz en el camino, agradezco tus consejos que en el momento exacto has sabido darme para no dejarme caer y enfrentar los momentos dificiles, sobre todo gracias por el amor tan grande que me has dado, te quiero mucho.

Mamá, tu eres la persona que siempre me ha levantado los ánimos tanto en los momentos dificiles de mi vida personal como también estudiantil. Gracias por tu paciencia y las buenas palabras que tienes siempre para mis enojos, tu eres muy importante para mí, si bien no soy la mejor hija pero si he llegado hasta aquí es por ti, quiero que seas la mama más feliz del mundo, tu siempre estás en mis tristezas, mis momentos felices, gracias por ser mi madre y mi amiga, te quiero mucho.

A mis hermanos, por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos, por sus comentarios, opiniones y sugerencias. Además de ser unos buenos amigos, son la mejor compañía para compartir el mismo techo, por todos los juegos, conversaciones, momentos vividos y sobre todo por su apoyo incondicional, aun en la distancia. Me siento muy orgullosa de ustedes.

Un agradecimiento especial a la doctora Sandy Luz Ovando Chacón por su gran apoyo y por darme la confianza de que siempre podía contar con ella en cualquier duda y muchas gracias por compartir de sus conocimientos para poder terminar este trabajo fue un gran placer tenerla de asesora.

Muchas gracias a mis revisores por el tiempo que dedicaron a la revisión del trabajo y por sus buenas sugerencias y consejos para que pudiera salir mejor.

A mis amigos, a Jane y Chema por estar conmigo hoy y siempre y por ser mis compañeros de clases y cómplices de todas las aventuras que vivimos juntos, gracias por todas esas veces donde la pasamos bien, por los malos momentos en los que siempre estuvieron cerca y por estudiar mucho todos juntos para los exámenes, los quiero mucho a los dos, siempre juntos.

# ÍNDICE

## Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>ii</b>
<b>CAPITULO 1 MARCO TEORICO</b> .....	<b>1</b>
1.1 FUENTES VEGETALES DE ACEITE.....	2
1.1.1 Estructura de las oleaginosas.....	3
1.2 PROCESO DE EXTRACCION.....	6
1.2.1 Procesos convencionales.....	6
1.2.2 Extracción por solvente versus proceso de extracción acuosa.....	9
1.2.2.1 Aspectos ambientales.....	9
1.2.2.2 Aspectos económicos.....	9
1.2.2.3 Calidad del aceite y proteína.....	10
1.2.3 Pretratamiento de las semillas oleaginosas.....	11
1.2.4 Uso de enzimas en procesos de extracción por solvente y por prensado.....	13
1.2.5 Extracción acuosa enzimática.....	17
1.2.6 Uso de enzimas en proceso de extracción acuosa.....	18
1.3 TRANSFERENCIA DE MASA EN LA EXTRACCIÓN.....	23
<b>CAPITULO 2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>26</b>
2.1 GENERALIDADES DEL FRUTO DE CACATÉ ( <i>Oecopetalum mexicanum</i> ) ...	27
2.2 GENERALIDADES DE LA PLANTADE PIÑÓN ( <i>Jatropha curcas</i> L).....	29
2.2.1 Taxonomía y morfología vegetal.....	29
2.2.2 Fisiología vegetal.....	31

2.2.3 Hábitat.....	31
2.2.4 Distribución geográfica de la <i>Jatropha curcas</i> L.....	32
2.2.5 Usos de la <i>Jatropha curcas</i> L.....	32
2.3 GENERALIDADES DE LA PLANTA DE PISTACHO ( <i>Pistacia vera</i> L.).....	33
2.3.1 Clasificación botánica.....	33
2.3.2 Antecedentes generales del árbol.....	33
2.3.2.1 Vegetativos.....	33
2.3.3 Características de la nuez.....	35
2.3.4 Mercado.....	36
2.4 COMPOSICION BROMATOLOGICA DE LA SEMILLA DE CACATÉ.....	36
( <i>Oecopetalum mexicanum</i> )	
2.4.1 Características generales.....	36
2.4.2 Composición bromatológica de la semilla de cacaté.....	37
2.5 COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LA SEMILLA DE PIÑÓN ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	39
2.5.1 Determinación bromatológicas.....	39
2.6 COMPOSICION BROMATOLOGICA DE LA SEMILLA DE PISTACHO ( <i>Pistacia vera</i> L.).....	39
2.6.1 Valor nutritivo del fruto.....	39
2.7 ENZIMAS.....	41
2.8 INVESTIGACIONES REALIZADAS APLICANDO EL METODO DE EXTRACCION ACUOSO ENZIMATICO.....	43
<b>CAPITULO 3 HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	49
3.2 OBJETIVO ESPECIFICO.....	49
<b>CAPITULO 4 MATERIALES Y METODOS GENERALES.....</b>	<b>50</b>

4.1 MATERIALES.....	51
4.1.1 Cacaté ( <i>Oecopetalum mexicanum</i> ).....	51
4.1.2 Localización geográfica del cultivo de cacaté .....	51
4.1.3 Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	51
4.1.4 Localización geográfica del piñón.....	52
4.1.5 Pistacho ( <i>Pistacia vera</i> L.).....	52
4.1.6 Localización geográfica de la semilla de pistacho.....	52
4.1.7 Enzimas.....	53
4.2 METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION ACUOSA ENZIMATICA DEL ACEITE DE CACATÉ, PIÑÓN Y PISTACHO.....	54
4.2.1 Determinación del contenido de aceite.....	55
4.2.2 Extracción acuosa enzimática.....	56
4.3 DISEÑO ESTADISTICO.....	58
4.3.1 Identificación y exposición del problema.....	58
4.3.2 Etapa 1 (selección de la variable de respuesta).....	59
4.3.3 Etapa 2 (selección de la variable de respuesta.....	60
4.4 RECUPERACION DEL ACEITE.....	60
<b>CAPITULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>61</b>
5.1 RECUPERACION DEL ACEITE DESPUES DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA, PARALA EVALUACION DE LA INFLUENCIA DE LA RELACION SOLIDO: LIQUIDO.....	62
5.2 RECUPERACION DEL ACEITE DESPUES DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA EVALUANDO LA INFLUENCIA DEL TIEMPO.....	65
5.2.1 Cinética de extracción de aceite de piñón.....	65
5.2.2 Cinética de extracción de aceite de cacaté.....	66
5.2.3 Cinética de extracción de aceite de pistacho.....	67

5.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ACEITE, METODO SOXHLET.....	71
<b>CAPITULO 6 CONCLUSION.....</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>89</b>



## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Estructura microscópica del cotiledón y endospermo de granos de soja (Rosenthal <i>et al.</i> , 1996).....	5
FIGURA 1.2 Extracción convencional de semillas oleaginosas combinando prensado y extracción con solvente (Rosenthal <i>et al.</i> , 1996).....	8
FIGURA 1.3 Efecto de la molienda y del tratamiento enzimático sobre la estructura de las semillas oleaginosas (Christensen, 1991).....	16
FIGURA 1.4 Estructura de la pared celular primaria de semillas oleaginosas.....	17
FIGURA 1.5 Mecanismos de extracción por solvente de aceite a partir de sólidos de soja.....	23
FIGURA 2.1 Hojas del genero Icacinaceae.....	27
FIGURA 2.2 Semilla de cacaté.....	28
FIGURA 2.3 Plantas y frutos verdes de <i>Jatropha curcas</i> L. (Bernal-Astorga, 2011).....	30
FIGURA 2.4 Frutos y semillas de <i>Jatropha curcas</i> L. (Bernal-Astorga, 2011).....	31
FIGURA 2.5 Hojas de la planta de pistacho con cinco foliolos y una yema axial.....	34
FIGURA 2.6 Segundo flujo de crecimiento tardío en plantas nuevas.....	35
FIGURA 2.7 Nuez de la planta de <i>Pistacia vera</i> L.....	36
FIGURA 4.1 Metodología para la extracción acuosa enzimática de aceite de piñón, cacaté y pistacho.....	54
FIGURA 4.2 Esquema del equipo empleado para determinar materia grasa(Soxxhlet).....	55
FIGURA 5.1 Influencia del tiempo en la extracción de aceite de piñón empleando enzima Viscozyme L.....	66
FIGURA 5.2 Influencia del tiempo en la extracción de aceite de cacaté empleando la enzima Viscozyme L.....	67

FIGURA 5.3 Influencia del tiempo en la extracción de aceite de pistacho empleando la enzima Viscozyme L.....68

FIGURA 5.4 Influencia del tiempo en la extracción de aceite de pistacho empleando la enzima Pectinasa de aspergillus oculeatus.....69

FIGURA 5.5 Influencia del tiempo en la extracción de aceite de pistacho empleando la enzima Celulasa.....70

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 Contenidos típicos de aceite y proteínas de algunos materiales oleaginosos.....	6
TABLA 1.2 Extracción acuosa enzimática para diferentes oleaginosas en comparación con el control (Rosenthal y col., 1996).....	19
TABLA 2.1 Clasificación taxonómica de <i>Oecopetalum mexicanum</i> .....	27
TABLA 2.2 Taxonomía de <i>Jatropha curcas</i> L.....	29
TABLA 2.3 Rendimiento de las fracciones de la semilla de cacaté.....	37
TABLA 2.4 Composición bromatológica de la semilla de cacaté.....	38
TABLA 2.5 Participación porcentual de los ácidos grasos en semillas de pistacho.....	40
TABLA 2.6 Composición química de pistachos (C.C. RED. Aleppo (%) pesos secos).....	41
TABLA 2.7 Clases de enzima según la Internacional Enzyme Commission.....	42
TABLA 4.1 Descripción de los complejos enzimáticos comerciales.....	53
TABLA 4.2 Etapa 1 Evaluación de las condiciones en relación sólido:líquido.....	57
TABLA 4.3 Descripción de las etapas realizadas en el trabajo.....	58
TABLA 4.3 Referencia de los ensayos para la evaluación de la influencia de la relación sólido:líquido.....	59
TABLA 5.1 Influencia de la relación solido: liquido sobre el rendimiento de aceite extraído de la semilla de piñón.....	62
TABLA 5.2 Influencia de la relación solido: liquido sobre el rendimiento de aceite extraído de la semilla de cacaté.....	63
TABLA 5.3 Influencia de la relación solido: liquido sobre el rendimiento de aceite extraído de la semilla de pistacho.....	64
TABLA 5.4 Contenido de aceite obtenido mediante el método soxhlet usando hexano como solvente.....	71

TABLA 5.5 Comparación del contenido de aceite extraído mediante el método soxhlet con los obtenidos mediante la hidrolisis acuosa enzimática.....72

## RESUMEN

El presente trabajo consistió en la determinación de las condiciones de proceso de extracción acuoso enzimático de tres semillas con características oleaginosas *Jatropha curcas* L, *Oecopetalum mexicanum* y *Pistacia vera* L, con el fin de mejorar el rendimiento en aceite durante la extracción.

En la primera etapa se emplearon las semillas de *Jatropha curcas* L, *Oecopetalum mexicanum* y *Pistacia vera* L. Se seleccionaron las condiciones óptimas de la relación de carga sólido: líquido, y combinación de actividades enzimáticas, para maximizar el rendimiento. En la segunda etapa del trabajo se realizó la cinética de extracción de aceite de las semillas evaluando el tiempo en donde se tiene mayor cantidad de aceite. Como punto de comparación de los resultados obtenidos en la cinética en la última etapa del proyecto se realizó la extracción de aceite con soxhlet de las tres semillas empleando hexano como solvente. Para las primeras dos etapas las semillas fueron sometidas a las mismas condiciones de preparación, primeramente fueron trituradas y luego se llevó a reposo con agua y se mantuvo en refrigeración por 24 h para que la superficie de las semillas estuviera blanda al momento de realizar la hidrolisis enzimática. Para la extracción con soxhlet las semillas fueron trituradas y luego se llevó a peso constante.

Para la evaluación de las condiciones óptimas de la relación sólido: líquido de la primera etapa se emplearon enzimas comerciales, para las semillas de *Jatropha curcas* L. y *Oecopetalum mexicanum* solamente se empleó la enzima *Viscozyme* L, para la semilla de *Pistacia vera* L. se emplearon tres enzimas comerciales, *Viscozyme* L, *Pectinasa de aspergillus oculeatus* y *Celulasa*, para cada semilla se evaluaron cuatro relaciones de carga sólido: líquido, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6, las cuatro relaciones fueron evaluadas por cada enzima.

Para la cinética de extracción de aceite de las semillas de la segunda etapa, se emplearon los resultados de las condiciones óptimas de la relación de carga sólido: líquido, empleando las mismas enzimas antes ya mencionadas con las respectivas semillas, en esta etapa se evalúa el tiempo en donde se obtiene mayor cantidad de aceite. Después de las dos etapas se realizó la extracción de aceite con soxhlet para las tres semillas, los resultados fueron el punto de comparación con los obtenidos en la cinética para obtener los rendimientos totales en porcentaje.

En conclusión, el método acuoso enzimático podría emplearse como una forma alternativa de extracción de aceite para evitar emplear mayores cantidades de solvente, evitar la contaminación y sus riesgos al hacer usos de ellas y los cambios en la composición del aceite y además aumentar el rendimiento de aceite.

# INTRODUCCIÓN

La extracción del aceite de las semillas oleaginosas es un paso clave para su comercialización. En la actualidad existen los métodos de extracción de aceite mediante solventes y por prensado lo cual afecta directamente la cantidad y la calidad del aceite obtenido (Sant'Anna *et al.*, 2003) y la calidad de la harina residual (Taha y Hassanein, 2007), pero aun con estos inconvenientes siguen siendo los más utilizados en la industria (Guerra y Zúñiga, 2003; Sant'Anna *et al.*, 2003; Taha y Hassanein, 2007; De Moura *et al.*, 2008; Latif y Anwar, 2008), el problema no sólo se resume en las características del aceite, sino en el daño que los solventes causan al medio ambiente (Taha y Hassanein, 2007), y los problemas de seguridad industrial por el uso de solventes (Latif y Anwar, 2008).

El hexano en la mayoría de los casos ha sido el solvente con mayor uso en la industria de extracción del aceite de semillas oleaginosas, sin embargo debido a las cuestiones ambientales de seguridad y salud se han buscado nuevas alternativas ecológicas de extracción (Latif y Anwar, 2008), que no ponen en peligro la integridad humana, que no contaminen al ambiente y que además tengan mejor rendimiento en la extracción de aceite, y no afectar la calidad de este.

Existe una nueva tendencia para evitar el uso de solventes tóxicos que ha renovado el interés en procesos de extracción alternativos (Taha y Hassanein, 2007; De Moura *et al.*, 2008; Latif y Anwar, 2008) como la extracción con fluidos supercritico y el uso del agua como solvente económico de extracción de aceite (Johnson y Lucas, 1983). La extracción acuosa del aceite ha emergido como una técnica competente para la extracción de aceite de ciertos materiales oleaginosos (Shi *et al.*, 1998).

En los últimos años, se han descrito diversas investigaciones referentes a la extracción acuosa de aceites vegetales asistida por enzimas, ofreciendo diversas ventajas comparadas con la extracción convencional. El objetivo principal del uso de las enzimas durante la extracción acuosa del aceite es hidrolizar la estructura de los polisacáridos que conforman la pared celular de las semillas oleaginosas o las proteínas que forman la membrana celular y los cuerpos lipídicos (Taha y Hassanein, 2007; Latif y Anwar, 2008).

En la actualidad existen preparados enzimáticos comerciales de grado alimenticio con actividad múltiple como celulasa, hemicelulasa y pectinasa; que se aplican a las semillas oleaginosas con la finalidad de hidrolizar los componentes de la pared celular de los tejidos (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

Cada semilla oleaginosa tiene una composición estructural específica por lo que la elección del sistema enzimático es crítico para la eficiencia en la extracción de aceite. Por otro lado, las condiciones de reacción tales, como pH, temperatura, concentración de enzima y tiempo de reacción, influyen sobre el grado de hidrólisis y efectividad del proceso (Taha y Hassanein, 2007). Este tipo de preparados enzimáticos marcan la diferencia en cuanto a la estabilidad, la calidad y el grado nutricional del producto extraído (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

CAPITULO 1

MARCO TEORICO



## 1.1 FUENTES VEGETALES DE ACEITES

Las principales fuentes vegetales de aceite son las semillas y los frutos oleaginosos. La diferente composición y estructura de ambas condiciona el procesado al que se someten con el fin de extraer el aceite.

El proceso estándar de extracción a partir de frutos tales como la aceituna y la palta, consiste en un batido con agua caliente y posterior separación de las fases líquida, acuosa/oleosa, y sólida por distintos procesos como prensado o centrifugación.

El proceso de extracción a partir de semillas depende del tipo y estructura de las mismas. Con las de alto contenido en aceite (>20 % base seca) tales como el maní, el proceso clásico usado es la aplicación de una fuerza mecánica a fin de romper las paredes celulares del material vegetal de partida. El aceite es extraído por prensado, obteniéndose el aceite crudo y la torta del prensado, la cual retiene cantidades significativas de aceite residual. En muchos casos, esta torta es tratada posteriormente con solventes orgánicos para extraer este aceite remanente. Con las de bajo contenido graso (< 20 % base seca) tales como la soja, se emplea la extracción con disolventes orgánicos (hexano). Estos procesos tienen la ventaja de ser operaciones simples con costos de operación relativamente bajos. Sin embargo, presentan algunas desventajas. El capital inicial de instalación para el procesamiento es alto y los productos son crudos, de relativamente bajo valor, y requieren refinación antes de ser usados (Christensen, 1991). Por otro lado, este tipo de procesos involucran manipulación de grandes cantidades de solventes orgánicos, lo cual plantea problemas de seguridad y contaminación ambiental (Tano- Debra y Ohta, 1995a y 1995b; Sosulski y Sosulski, 1993).

Antes de la extracción, las semillas deben ser limpiadas, molidas, laminadas y expandidas a fin de mejorar la eficiencia de la extracción por solventes, las células deben romperse para aumentar la transferencia de masa (García, 1981).

Una alternativa de pretratamiento para facilitar la liberación del aceite desde la semilla podría realizarse por degradación enzimática de sus estructuras celulares. Esta liberación de aceite podría traducirse en términos de mayores rendimientos de extracción y/o disminución de las cantidades de solventes orgánicos empleados.

Para entender el proceso y el posible rol de las enzimas, es esencial conocer la estructura del material oleaginoso de partida.

### 1.1.1 Estructura de las oleaginosas

El principal rasgo característico de las células de las semillas oleaginosas es la existencia de organelos celulares llamadas cuerpos lipídicos y proteínicos, las cuales contienen, respectivamente, la mayoría del aceite y de las proteínas del grano (Figura 1.1).

Los cuerpos proteicos varían de tamaño dependiendo de la semilla oleaginosa y también varían de tamaños en un amplio rango dentro de cada tipo de oleaginosa. En el caso de la soja, el cual es similar al maní, el tamaño promedio de los cuerpos proteicos es entre 8 a 10  $\mu\text{m}$ , pero también se reportan variaciones entre 2 y 20  $\mu\text{m}$  (Rosenthal *et al.*, 1996). Estos cuerpos proteicos contienen aproximadamente entre el 60 y el 70 % de la proteína total presente en las semillas oleaginosas.

Los cuerpos lipídicos (también conocidos como oleosomas o esferosomas) son el sitio principal de reserva de lípidos, no sólo en semillas oleaginosas sino también en frutos oleaginosos. Su tamaño frecuente oscila entre 1 a 2  $\mu\text{m}$ , aunque varía desde 0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$  en el caso de la soja hasta tamaños tan grandes como 4  $\mu\text{m}$  en el caso del algodón. En el caso de frutos oleaginosos como oliva, palta, y palma, los cuerpos lipídicos de almacenamiento son mayores a 20  $\mu\text{m}$ . En este caso, el tejido que acumula la mayor parte de los lípidos de reserva es, normalmente, el mesocarpio (Zweytick *et al.*, 2000).

A diferencia del citoplasma que se caracteriza por la presencia de lípidos y proteínas, las paredes celulares que rodean la célula son compuestas de celulosa, hemicelulosa y lignina, además de pectina. En la extracción tradicional por solvente, el grano es laminado, lo cual causa ruptura de las paredes celulares; esto expone al aceite localizado en el interior de la célula y también facilita la percolación del solvente, dentro del cual el aceite puede difundirse. Entonces durante la extracción con solvente, el aceite difunde hacia el solvente, mientras que la proteína se retiene en la harina junto con las fibras y los carbohidratos.

Los procesos acuosos también involucran la utilización de material molido, a fin de exponer y liberar más fácilmente el aceite y la proteína desde el material de partida. En este caso, sin embargo, mientras los componentes solubles difunden dentro del agua, el aceite liberado forma una fase líquida separada o parcialmente emulsificada con el agua.

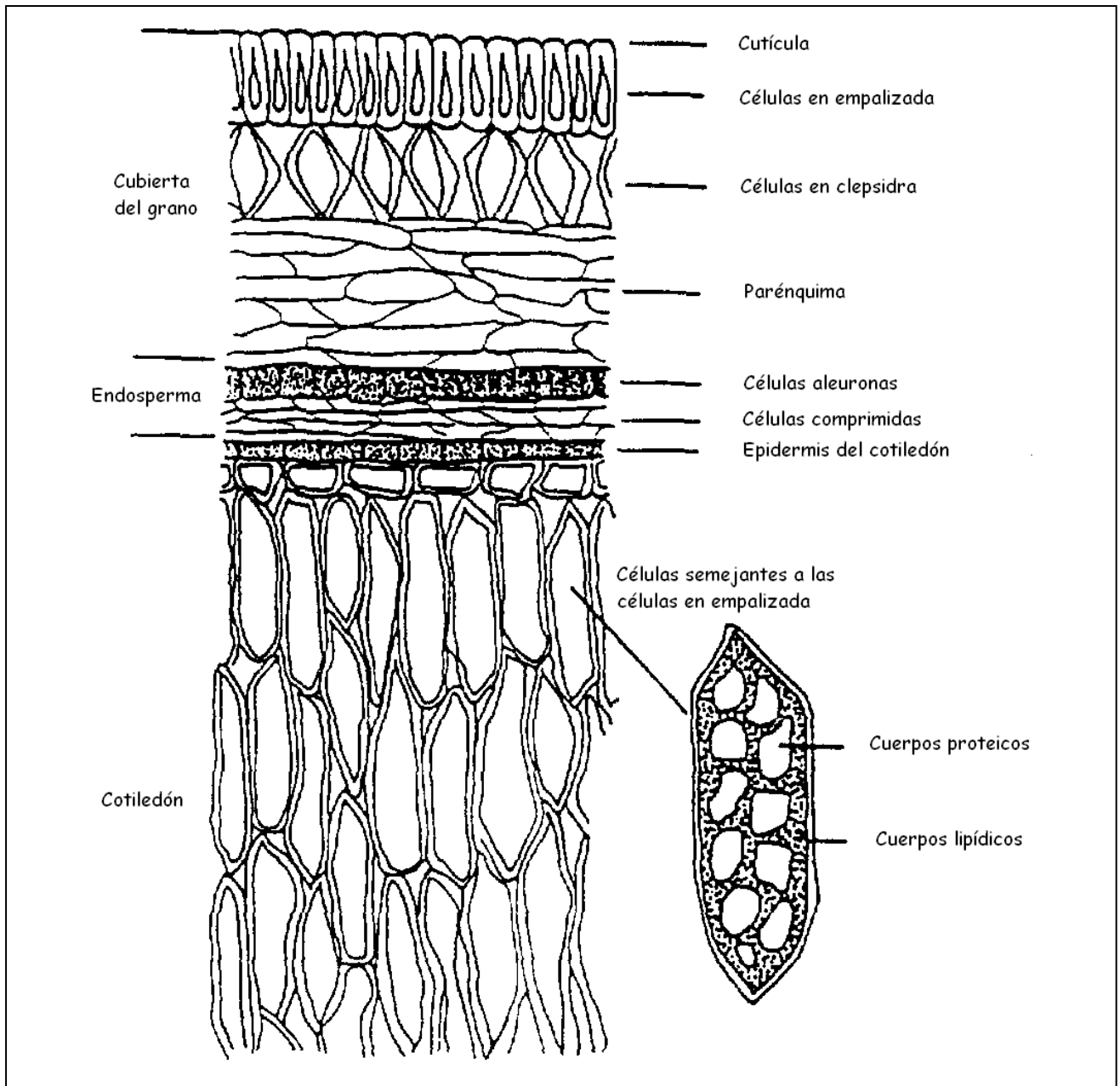
Los cuerpos lipídicos de semillas oleaginosas contienen abundante cantidad de proteína llamadas oleosinas, las cuales cumplen, como función principal, el rol de estabilizar estos cuerpos lipídicos. La estructura de la oleosina es generalmente la misma en todas las semillas; consiste en proteínas de bajo peso molecular, en el

rango de 15.000 a 26.000 kD. La estructura puede ser dividida en tres dominios principales: un dominio anfipático cercano al amino terminal, el cual está probablemente asociado a la superficie del cuerpo lipídico, un dominio central hidrofóbico el cual contiene alrededor de 70 residuos de aminoácidos no polares en sucesión que podrían interactuar fuertemente con la matriz de triacilglicéridos y un dominio anfipático cercano al carboxilo terminal que interactúa con la superficie de la monocapa de fosfolípidos que rodea la matriz de los triglicéridos.

Debido a su estructura particular, la oleosina juega un papel fundamental para mantener la integridad de los cuerpos lipídicos durante la desecación que acompaña a la maduración de las semillas previniendo la interacción y la posible coalescencia (Zweytick *et al.*, 2000).

A diferencia de las semillas, los cuerpos lipídicos de los frutos oleaginosos poseen cantidades insignificantes de oleosina. Esto se debe al hecho de que el mesocarpio no sufre desecación ni germinación y por lo tanto no requiere de pequeños cuerpos lipídicos estables (Zweytick *et al.*, 2000). Las enzimas proteolíticas, por lo tanto, no serían útiles para extraer aceite a partir de frutos oleaginosos. Por ello, la emulsión aceite-agua resultante tiende a ser menos estable en el caso de frutos que aquellas que provienen de semillas, lo que permite una separación más fácil del aceite (Rosenthal *et al.*, 1996).

Las diferencias en composición de las diferentes semillas oleaginosas determina la elección de las enzimas a usarse para cada semilla o fruto oleaginoso. Particularmente, en el caso de la soja, el alto contenido de proteína y el bajo contenido en aceite requiere el uso de enzimas proteolíticas para obtener altos rendimientos (Rosenthal *et al.*, 1996).



**FIGURA 1.1** Estructura microscópica del cotiledón y endospermo de granos de soja (Rosenthal *et al.*,1996)

## 1.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN

### 1.2.1 Procesos convencionales

Históricamente, los tres procesos más comunes para recuperar el aceite a partir de semillas oleaginosas son el prensado hidráulico, el prensado expeller y la extracción con solventes.

El prensado hidráulico, es el proceso más antiguo, se originó en Europa en 1795. Debido a la producción intensiva de aceites su uso ha declinado con el paso de los años y actualmente no es muy utilizado.

Las prensas de tornillo como los expellers han reemplazado a los originales equipos hidráulicos y son usadas para una amplia variedad de materiales oleaginosos. Para materiales que contienen relativamente altos contenidos de aceite se llevan a cabo dos procesos, los cuales consisten en una etapa continua de pre-prensado seguida de extracción por solvente. La principal ventaja del pre-prensado es que permite realizar extracción por solvente a materiales que son muy difícil de procesar por métodos de extracción directa. Además, los requerimientos de solvente disminuyen en forma considerable. Estos procesos combinados son usados, generalmente, con oleaginosas de alto contenido en aceite (alrededor de 35 %) como girasol, tung, algodón y germen de maíz. Para soja, se emplea una extracción simple debido al relativamente bajo contenido en aceite, como es evidente de la tabla 1.1.

**TABLA 1.1 Contenidos típicos de aceite y proteína de algunos materiales oleaginosos**

<b>Material Oleaginoso</b>	<b>Aceite (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>
Soja <sup>(1)</sup>	20	40
Colza <sup>(2)</sup>	40	20
Coco desecado <sup>(2)</sup>	70	6,5
Germen de maíz <sup>(2)</sup>	35	20
Lino <sup>(2)</sup>	45	25

(1: Mustakas, 1980; 2: Olsen, 1988)

La extracción por solvente se originó como un proceso en batch en Europa en 1870. Los avances tecnológicos más rápidos se dieron luego de la 2da Guerra Mundial con el desarrollo de sistemas de extracción continua los cuales proveen un buen coagulable. Se adiciona la base, en concentración y cantidad calculada, y se agita en

una mezcladora de altos esfuerzos cortantes para asegurar el contacto íntimo entre las fases. La mezcla de aceite y jabón se centrifuga en caliente, a 80°C aproximadamente, para separar fases. La fase liviana, que contiene el aceite, se lava con agua y se vuelve a centrifugar para eliminar los residuos de jabón.

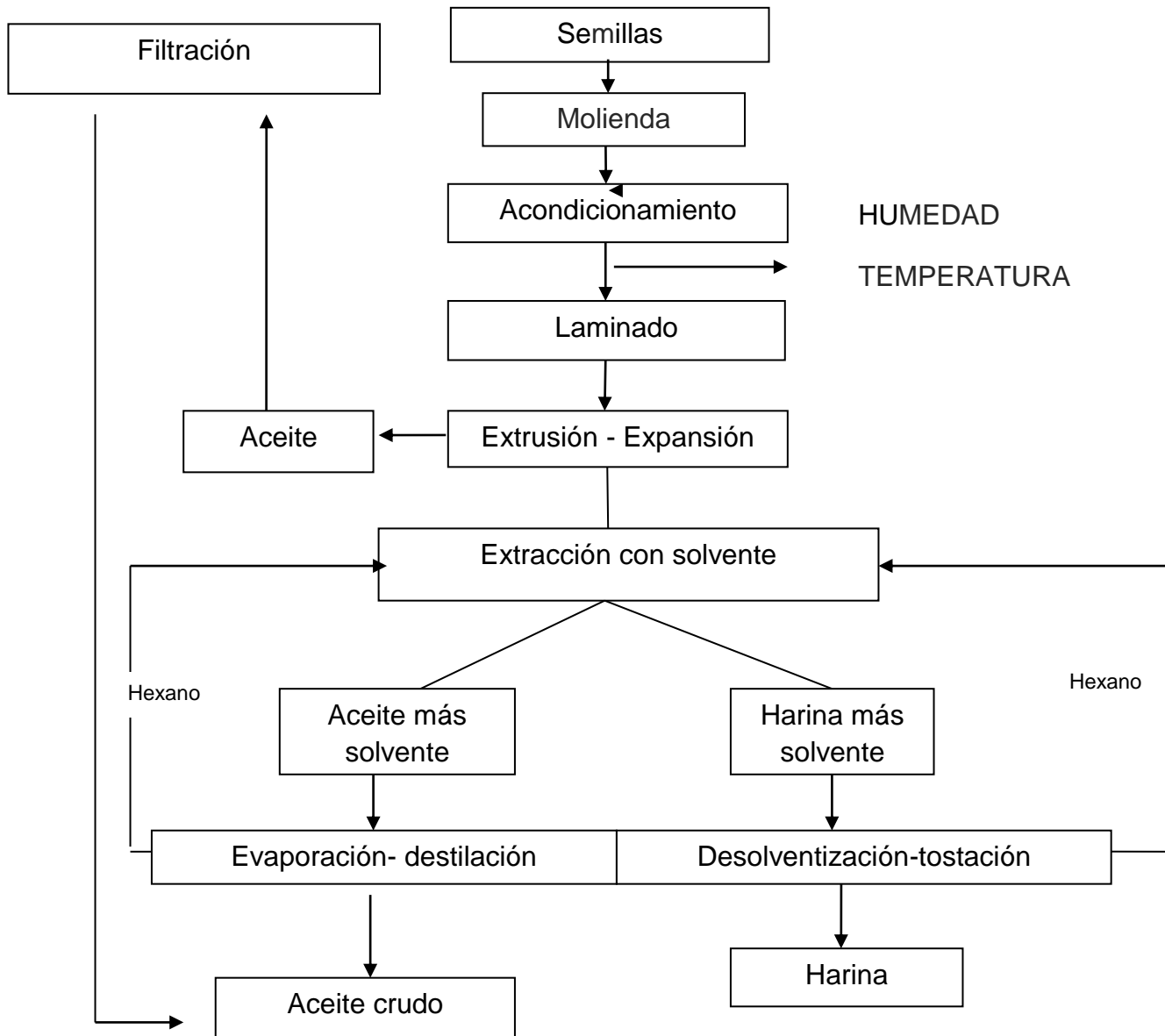
El aceite aún contiene cuerpos de color, olores y diferentes impurezas que deben removerse para que posea sabor y color aceptables para el consumidor. Algunas de estas impurezas se reducen por medio de un proceso llamado blanqueado. Industrialmente, se lleva a cabo mezclando el aceite con un agente adsorbente a 110 °C, aproximadamente. Luego se rocía la mezcla en una torre de blanqueo que opera a vacío y por último, el aceite se filtra para eliminar la tierra adsorbente que retiene las impurezas.

La desodorización es la última etapa de los procesos de refinación que elimina fundamentalmente sustancias volátiles y convierte al aceite en un líquido brillante, transparente y de sabor suave. Los procesos basados en extracción por solvente consisten, usualmente, en extracciones sucesivas del material oleaginoso previamente quebrado, laminado, molido o prensado, mediante lavados en contracorriente con hexano. Luego, la harina desengrasada es llevada a un tostador-desolventizador para recuperar el solvente. El hexano es removido del aceite en evaporadores de película y finalmente destilado a vacío.

Un diagrama de flujo básico del proceso combinado de extracción y prensado se muestra en la figura 1.2.

El aceite crudo obtenido a partir de extracción por solventes contiene cantidades variables y relativamente reducidas de impurezas que no son glicéridos. Algunas de las impurezas afectan la calidad del aceite para su uso comestible y por lo tanto es necesario eliminarlas. Las impurezas son de dos tipos generales: insolubles y solubles en aceite. Las impurezas insolubles consisten en fragmentos de semillas, excedente de humedad y una fracción cerosa que hace que el aceite refrigerado se vea turbio. Las impurezas solubles en aceite son más difíciles de extraer. Incluyen ácidos grasos libres, fosfátidos, sustancias gomosas o mucilaginosas, cuerpos pigmentados, fracciones de proteínas, tocoferoles, esteroides, carbohidratos, cetonas y aldehídos. Estas impurezas pueden estar en una solución real o en suspensión coloidal. Algunas se encuentran en cantidades mínimas.

**FIGURA 1.2 Extracción convencional de semillas oleaginosas combinando prensado y extracción por solvente ( Ronsenthal *et al.*, 1996)**



## **1.2.2 Comparación entre la extracción por solvente y la extracción acuosa enzimática**

Los principales aspectos de la comparación y contrastación entre la extracción acuosa y la extracción por solvente pueden discutirse en términos ambientales, económicos y de calidad.

### **1.2.2.1 Aspectos ambientales**

El principal aspecto ambiental relacionado con la extracción convencional basada en solventes es la pérdida de hexano y los problemas de polución asociados a esta pérdida. El hexano, como otros VOCs (compuestos orgánicos volátiles), pueden reaccionar con sustancias tóxicas, principalmente óxidos de nitrógeno en presencia de luz solar, para producir ozono (O<sub>3</sub>) y otras especies conocidas colectivamente como oxidantes fotoquímicos. Si bien el ozono es esencial en las capas altas de la atmósfera para filtrar la radiación UV del sol, su exceso es indeseable (Finlayson-Pitts y Pitts, 1993).

Dentro de la industria de los alimentos, el sector aceitero es el principal sector de los altos niveles de emisión de VOCs. Se ha estimado que se emiten, en promedio, 1,5 L de hexano por tonelada de semilla procesada para el caso de plantas industriales modernas y en óptimas condiciones de operación (Mustakas, 1980). Esto indica que es necesario encontrar una alternativa para la extracción de aceites vegetales la cual elimine o reduzca drásticamente el uso de solventes orgánicos volátiles o reduzca significativamente el nivel de su emisión. Sería apropiado que el sector considere el desarrollo de nuevos procesos limpios desde el punto de vista ambiental. Los procesos basados en la extracción acuosa podrían lograr este objetivo (Rosenthal *et al.*, 1996),

Además de los problemas ambientales, el uso de hexano es también peligroso desde el punto de vista de la seguridad. El hexano es altamente inflamable y se deben tomar precauciones que eviten los riesgos de explosión y fuego y el peligro de accidentes severos. Los procesos acuosos eliminan el problema de seguridad del solvente, resultando en bajos riesgos de incendio y menores peligros operacionales (Mustakas, 1980).

### **1.2.2.2 Aspectos económicos**

Los procesos acuosos pueden ser potencialmente más eficientes en el costo considerando los costos relacionados de recuperación de solvente, seguridad de los



procesos y sistema de control de pérdidas de solvente. Además, estos procesos permiten el uso de instalaciones más pequeñas, lo cual ofrece ventajas económicas significativas (Lanzani *et al.*, 1975; Cater *et al.*, 1974; Lusas y Jividen, 1987 y Rosenthal *et al.*, 1996).

Los procesos acuosos actuales son procesos de extracción menos eficientes que la extracción por solvente para la mayoría de las oleaginosas. Esto tiene que ver con los costos de demulsificación, remoción de agua de los productos finales, requerimientos de higiene de este tipo de procesos húmedos y producción elevada de efluentes (Rosenthal *et al.*, 1996).

### **1.2.2.3 Calidad de aceite y proteína**

Los procesos de extracción empleados corrientemente son optimizados para producir aceites comestibles. Como resultado de esto, se ha dado muy poca atención a la calidad de los residuos de proteínas en el contexto de consumo humano. El residuo generado en los procesos de extracción por solvente deben ser calentados para remover los residuos de solvente, lo cual requiere un elevado consumo de energía térmica no sólo debido a la extracción del aceite desde la miscela sino también para mejorar la extractabilidad antes de la extracción. En contraste, se sabe bien que los tratamientos térmicos drásticos de semillas oleaginosas reducen la calidad del aceite extraído y de la proteína.

El principal efecto nutricional resultante del calentamiento excesivo en los procesos convencionales es la disminución de la disponibilidad nutricional de algunos aminoácidos esenciales (principalmente lisina), lo cual resulta de la reacción de Maillard entre los grupos aminos de las proteínas y los grupos carbonilos de los azúcares reductores. La calidad global de las proteínas es determinada por la disponibilidad biológica de cada uno de los aminoácidos esenciales que forman la proteína. La reacción de Maillard causa, no sólo un efecto nutricional negativo sobre los aminoácidos esenciales involucrados en la reacción, sino también sobre el valor biológico de la proteína. Un efecto similar ocurre a las altas temperaturas generadas en los expellers durante el prensado (Rosenthal *et al.*, 1996).

En contraste, los procesos acuosos evitan daños severos sobre las proteínas de las oleaginosas, lo cual permite la producción de proteínas grado alimentario en lugar de productos grado alimentación animal (Dominguez *et al.*, 1995a). Los procesos acuosos permiten además la inactivación o remoción de factores antinutricionales y otras sustancias indeseables que están presentes en algunas oleaginosas y que pueden reducir la calidad global de los productos o el valor nutricional de sus

proteínas y que pueden ser tóxicos para el ser humano (Cater *et al.*, 1974 y Lawhon *et al.*, 1981 a y b). En general, no se han reportado diferencias significativas entre los aceites obtenidos a partir de semillas tratadas enzimáticamente, tanto en procesos acuosos como en procesos por extracción por solvente (Rosenthal *et al.*, 1996).

### **1.2.3 Pretratamiento de las semillas oleaginosas**

El procedimiento convencional para preparar la semilla para su extracción requiere de diversos pasos que se explican a continuación.

#### **a) Limpieza**

El primer paso en la manipulación de las semillas oleaginosas es su limpieza, para separar los productos extraños. Por medio de cribas planas o tambores rotatorios, se separan las estacas, tallos, hojas y demás desechos, al igual que la tierra y suciedad, las partículas de hierro se eliminan por imanes electromagnéticos, instalados en cintas transportadoras. La limpieza de las semillas se debe llevar a cabo antes de su almacenamiento.

#### **b) Descascarillado y separación de la cascarilla**

Antes de la extracción del aceite, las semillas deben descascarillarse, si es posible. La cascarilla no suele contener aceite; generalmente no tiene más del 1% y sólo las semillas de linaza contienen un 22%. Sin embargo, parece ser que este elevado porcentaje de aceite no procede de la cascarilla, sino del endospermo graso de la semilla, que queda adherido a ella. Si las cascarillas no se separan de las semillas antes de la extracción, el rendimiento en aceite disminuye, por absorción en la torta, aparte de restar capacidad a la instalación.

#### **c) Trituración de las semillas oleaginosas**

La transformación de las semillas oleaginosas en partículas pequeñas facilita la extracción del aceite, ya sea por prensado mecánico o por la acción de solventes.

Existen diversas opiniones acerca de que la trituración de las semillas oleaginosas rompe en realidad grandes cantidades de células oleaginosas, estas opiniones se basan en que cuando las semillas son trituradas se logra un mayor rendimiento de aceite extraído por tratamiento con disolvente, mientras que si la extracción se realiza por prensado se obtiene menores rendimientos de aceite, ya que se ha demostrado recientemente que las semillas más bien rotas que trituradas y con un mínimo de aplastamiento, rinden una gran fracción de aceite. En

cualquier caso (rotas o trituradas) parece ser que muchas células oleaginosas permanecen intactas a pesar de que las semillas sean sometidas a reducción de tamaños en molinos de rodillos que proporcionan los tamaños de partículas más pequeños, además de que las paredes de las células oleaginosas se hacen permeables al aceite sólo por acción del calor y de la humedad, durante la operación de “cocción”. Sin embargo, las paredes de las células reaccionan más rápidamente frente a dichos elementos si el tamaño de partícula es más bien pequeño.

Evidentemente las semillas trituradas o sus partículas convertidas en trozos muy finos, facilitan la extracción con disolvente, tanto por el efecto de ruptura ejercido por la trituración como por la disminución de las distancias que recorre el aceite y el disolvente, dentro y fuera de la semilla. Se ha demostrado que el factor que regula la velocidad de la extracción es, con toda seguridad, la resistencia interna de las partículas, a la difusión molecular del aceite y el disolvente.

En la práctica se debe tener en cuenta otros factores, tales como la resistencia mecánica de las partículas y la que opone la masa de ellas al paso del disolvente. Por el cual, no se suelen triturar las semillas destinadas a la extracción con disolventes, hasta grosor mínimo.

Los molinos de martillos, o de otro tipo, se utilizan, a veces, para la primera reducción de semillas de gran tamaño, mientras que para la desintegración fina se emplean casi siempre los molinos de rodillos por considerarse de mayor economía de operación que los otros tipos (Bailey, 1984).

#### d) Tratamiento térmico de los productos oleaginosos

El tratamiento térmico de los productos oleaginosos se puede dividir en dos categorías, según sea para producir directamente el aceite (fusión seca o, fusión húmeda) o solamente para facilitar la subsiguiente expresión por métodos mecánicos.

El proceso para la extracción directa de aceite se conoce como fusión que se divide en fusión seca y fusión húmeda, el primero consiste en exponer a fuego directo la materia prima, deshidratando los tejidos y permitiendo el escurrimiento del aceite fundido, mientras que en el segundo se expone la materia prima a vapor de agua con una presión de 2,8 a 4,2 Kg por centímetro cuadrado a temperaturas de entre 110 a 130 °C separando el aceite extraído por decantación.

El tratamiento térmico aplicado a las semillas oleaginosas y productos parecidos, el cual se lleva a cabo a temperaturas de entre 105 y 110°C se suele denominar “cocción” combinándose en algunos procesos las operaciones conocidas como fusión. En cualquiera de estas operaciones, la finalidad es la misma: coagular

las proteínas de las paredes de las células oleaginosas y hacerlas permeables al paso del aceite. El paso de éste a través de la materia sólida ayuda también a la disminución de la viscosidad por la temperatura.

Está universalmente comprobado que el prensado mecánico de las semillas oleaginosas permite un mayor rendimiento de aceite, cuando las semillas han sido sometidas previamente a “cocción”, aunque no existe, hasta ahora, una explicación de este fenómeno. Los cambios producidos por la cocción sobre las semillas, son muy complejos y su naturaleza es, tanto química, como físico- química.

Las gotas de aceite de una semilla, son casi de tamaño ultramicroscópico y están distribuidas por toda la semilla. Uno de los efectos de la cocción es favorecer la unión de estas gotas de aceite para formar gotas mayores, que pueden fluir más fácilmente de las semillas. Un factor importante de esta fase de “cocción”, es la desnaturalización de las proteínas y sustancias afines por el calor; antes de la desnaturalización de las proteínas de las semillas, el aceite se encuentra emulsionado, emulsión que rompe su coalescencia, después de la cual, el problema se centra en la separación del aceite, de las sustancias sólidas de la semilla. Como las partículas de éstas presentan una gran superficie, la actividad superficial es un fenómeno que predomina grandemente en el desplazamiento del aceite y está muy influenciado por el tratamiento térmico (Bailey, 1984).

#### **1.2.4 Uso de enzimas en procesos de extracción por solvente y por prensado**

Se puede mejorar la permeabilidad de las paredes celulares de semillas y frutos oleaginosos mediante los tratamientos mecánico y térmico, los cuales constituyen las operaciones de preparación convencionales.

La permeabilidad de semillas y frutos podría aumentarse también por hidrólisis parcial de las paredes celulares de los vegetales oleaginosos mediante el empleo de enzimas apropiadas.

El rol de la mayoría de las enzimas hidrolíticas como las celulasas, hemicelulasas y pectinasas en estos procesos es romper la estructura de las membranas celulares del cotiledón. La figura 1.3 muestra el efecto del tratamiento enzimático sobre semillas previamente molidas. Puede verse a partir de la figura 1.3 que la acción enzimática sobre la semilla hace que la estructura sea más permeable; la extensión de este efecto depende del tamaño de partícula. Las enzimas proteolíticas principalmente hidrolizan las proteínas de las membranas celulares así como también las del citoplasma (Rosenthal *et al.*, 1996).

Las enzimas proteolíticas pueden potencialmente hidrolizar las membranas de los cuerpos lipídicos. Bair y Snyder (1980) y Tzen y Haung (1992) aislaron, respectivamente, cuerpos lipídicos de soja y maíz y llevaron a cabo hidrólisis típicas. Como resultado, ocurrió ruptura de las membranas de cuerpos lipídicos y fue evidente la coalescencia entre los cuerpos lipídicos, en ambos casos. Se puede concluir que el aceite liberado puede separarse más fácilmente a través de un medio acuoso o por un solvente orgánico luego de la acción proteolítica. Las enzimas proteolíticas pueden afectar también la red citoplasmática, la cual está compuesta por proteínas, en el caso de la soja y otras semillas oleaginosas, lo cual resulta en una estructura más suave y menos compacta que facilita la remoción de la proteína y el aceite desde la célula.

Considerando la especificidad de las carbohidratasas, una elección razonable de enzimas para una semilla o un fruto dado sólo puede hacerse luego de comprender el arreglo complejo de los polisacáridos en las paredes celulares. Las paredes celulares primarias de la mayoría de las plantas superiores poseen una estructura común que consiste en fibras de celulosa enlazadas a cadenas de hemicelulosa.

Estas fibras están embebidas en una matriz de sustancias pécticas enlazadas a proteínas estructurales como muestra la figura 1.3. Esto sugiere que las preparaciones enzimáticas capaces de atacar las paredes celulares deben contener una mezcla de celulasas, hemicelulasas, pectinasas y proteasas. Sin embargo, las preparaciones comerciales que contienen estas enzimas frecuentemente no son capaces de hidrolizar estos componentes específicos y puede requerirse un futuro desarrollo para degradar los polisacáridos complejos encontrados en las paredes celulares de materiales vegetales no lignificados (Christensen, 1989).

La posibilidad de liberar parcialmente el aceite desde una harina cruda de soja tratada térmicamente, por el uso de enzimas hidrolíticas fue investigada inicialmente por Sherba y col (1972), como reporta Adler-Nissen (1986). El aceite fue más fácilmente recuperado en una extracción con éter de petróleo. Este desarrollo fue seguido por Fullbrook (1983), quién investigó la hidrólisis acuosa de oleaginosas seguida de extracciones por solvente y luego también llevó a cabo hidrólisis en presencia de solvente para extraer simultáneamente el aceite liberado. Se observó que los rendimientos podían ser mejorados considerablemente si la hidrólisis de harina fina de soja y colza se llevaban a cabo en presencia de solvente. En el caso de colza, se obtuvo 50 % más aceite. Para soja, el incremento en aceite fue alto, resultando en una extracción neta de cerca del 90 % del aceite total extraíble; se utilizó 3 % de una mezcla enzimática obtenida de *Aspergillus niger*. Olsen (1988) también describió la extracción de semillas de colza descascaradas seguida de extracción del aceite residual con éter de petróleo. La mezcla de hidrólisis incluyó

tres enzimas que degradan las paredes celulares: pectinasa, celulasa y hemicelulasa. Esta hidrólisis parcial incrementó la permeabilidad de las paredes celular, lo cual permitió una percolación del solvente y una extracción más eficientes. Sosulsky y col. (1988) evaluaron el efecto de diferentes carbohidrolasas sobre el tiempo y el rendimiento de extracción de aceite de canola. La reacción enzimática fue llevada a cabo sobre láminas de canola previamente autoclavadas y ajustadas en humedad, seguido de un secado y una extracción con hexano. La eficiencia enzimática, basada en el aumento del rendimiento en aceite fue: actividades enzimáticas mezcladas >  $\beta$ -glucanasa > pectinasa > hemicelulasa > celulasa. El tratamiento enzimático antes de la extracción por Soxhlet para un tiempo dado dio rendimientos 45 % más altos. Por lo tanto, el tiempo para extraer el aceite total extraíble disminuyó comparativamente, indicando un incremento en la velocidad de extracción. El máximo rendimiento obtenido para el control en un aparato Goldfish fue aproximadamente 5 % menor, comparado con el obtenido con acción enzimática. En forma similar, Domínguez y col. (1995b) reportaron incrementos en la extractabilidad de soja entre el 8 al 10 % de aceite extraíble y más del 4 % en el caso de aceite de girasol luego del tratamiento enzimático con diferentes enzimas comerciales. Las altas velocidades de extracción resultantes permiten operaciones más cortas para obtener un porcentaje dado del aceite total extraíble.

Bhatnagar y Johari (1987) también verificaron que el tratamiento con enzimas obtenidas de mohos termófilos incrementa la cantidad de aceite extraíble por Soxhlet en el caso de algunas oleaginosas. La recuperación de aceite de algodón se incrementó más del 5 % con acción enzimática previa mientras que para aceite de girasol el rendimiento se incrementó en un 4,2 % luego de otro tratamiento con las enzimas obtenidas de mohos. En el mismo estudio, el rendimiento de aceite fue mayor cuando el tratamiento enzimático fue llevado a cabo en presencia de solvente en lugar de medio acuoso; esto puede atribuirse a la mayor solubilización de tejidos vegetales y proteínas en solventes orgánicos, a las cuales el aceite permanece enlazado en los procesos de extracción convencionales. Tano-Debrah y Ohta (1994 y 1995a) obtuvieron un incremento de alrededor de 20 % en el rendimiento de la extracción por solvente para un pretratamiento de semillas de *Butyrospermum paradoxum* subespecie parkii con una mezcla de proteasas y carbohidrolasas.

En relación al proceso de prensado, Cheah y col. (1990) extrajeron 97,7 % del aceite a partir de mesocarpio de palma tratado con pectinasa usando una prensa hidráulica en comparación con el 91,1 % obtenido a partir de material no tratado. Bouvier y Entressangles (1992) usaron una preparación de celulasa que redujo en 3 y 18 %, respectivamente las pérdidas de aceite de palma de las fibras prensadas y de jugo crudo durante la clarificación, comparados con los procesos tradicionales sin enzimas.



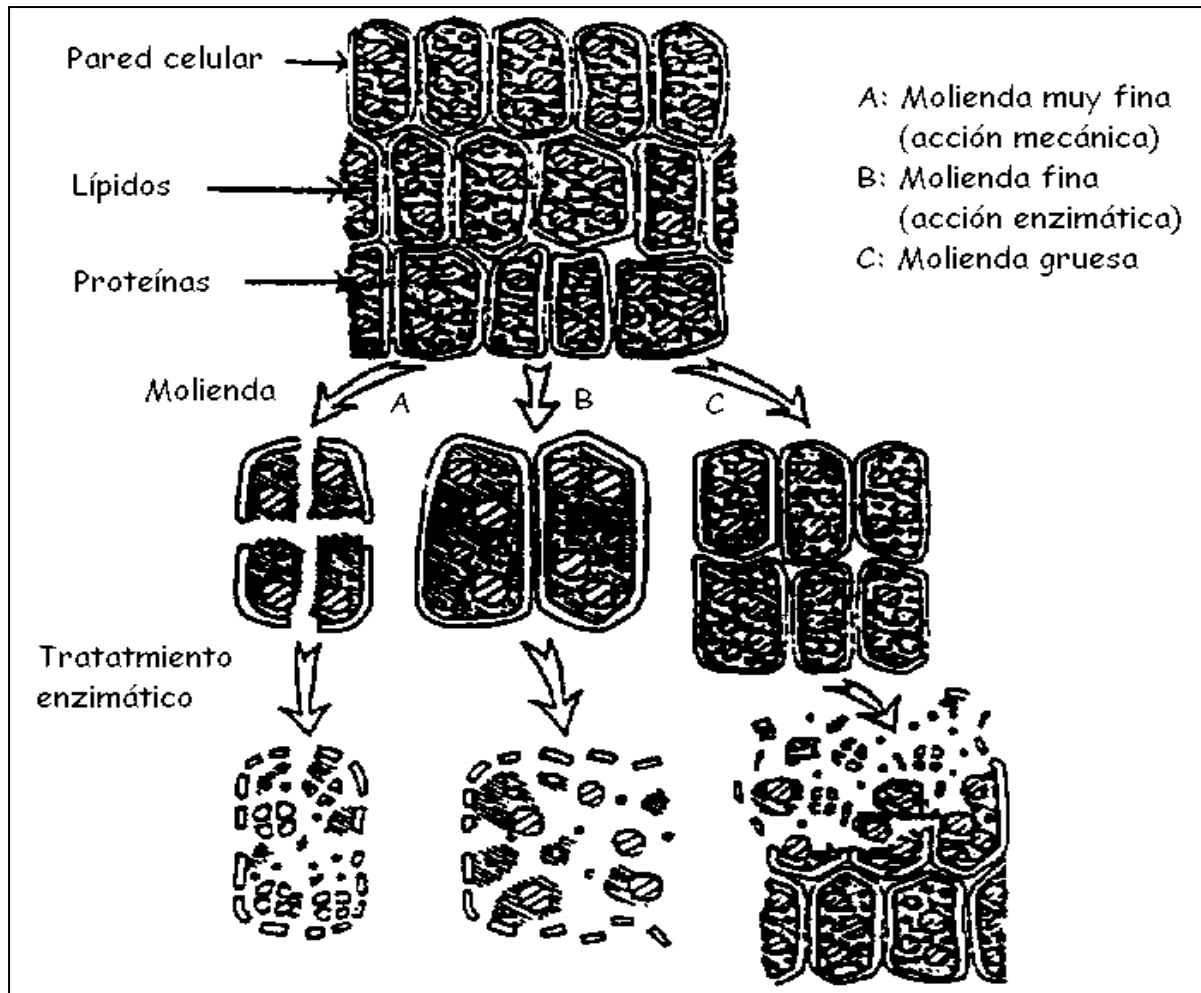
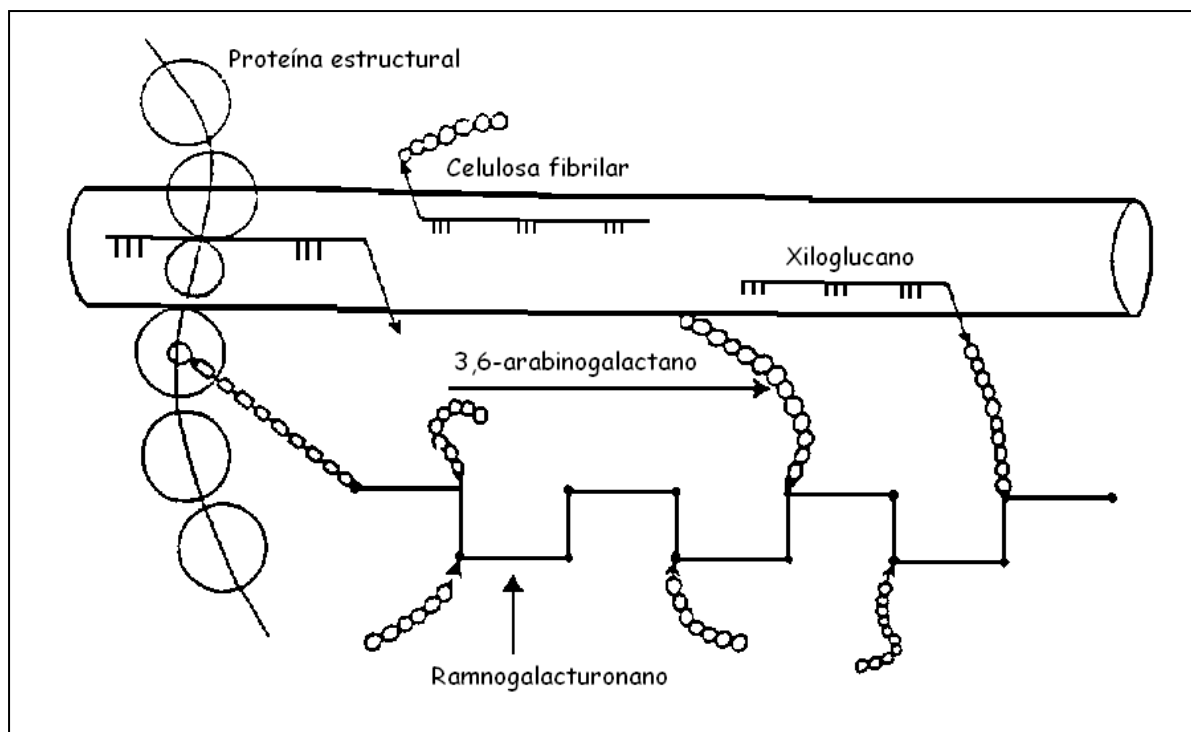


Figura 1.3: Efecto de la molienda y del tratamiento enzimático sobre la estructura de las semillas oleaginosas (reproducido de Christensen, 1991).

Otro aspecto importante a considerar es la diferencia en el rol de las carbohidrolasas (pectinasas, celulasas y hemicelulasas) y las enzimas proteolíticas. La acción de las carbohidrolasas es hidrolizar específicamente las paredes celulares, lo cual permite una alta liberación del aceite hacia el medio acuoso. Por otro lado, la acción de las enzimas proteolíticas está relacionada a la hidrólisis de las membranas que rodean los cuerpos lipídicos y las proteínas del citoplasma (Rosenthal *et al.*, 1996).



**Figura 1.4: Estructura de la pared celular primaria de semillas oleaginosas**

### 1.2.5 Extracción acuosa enzimática

La aplicación de enzimas en el proceso de extracción de aceite ha surgido como una propuesta biotecnológica para minimizar las desventajas de los métodos convencionales (extracción con prensado y/o con solventes) (Guerra y Zúñiga, 2003; Taha y Hassanein, 2007). La naturaleza química compleja de las semillas implica que estas sean tratadas antes del proceso de extracción o puede implicar un proceso simultáneo que permita solubilizar la pared celular para facilitar la extracción del aceite.

Dentro de las semillas oleaginosas el aceite se encuentra envuelto en los cuerpos lipídicos asociados con proteínas y una amplia variedad de carbohidratos dentro de la célula (Fawzy y Thomas, 2009). Dado que la composición estructural de la pared celular es específica para cada semilla oleaginosa, la selección de un adecuado sistema enzimático es crítico para la extracción eficiente del aceite (Levente y Bih-King, 2003; Taha y Hassanein, 2007).

A pesar del hecho de que un tipo de enzima con actividad catalítica específica, logra una recuperación significativa del aceite extraído, en algunos casos, las mezclas de varias enzimas a menudo es necesaria para degradar una amplia gama de la



composición estructural de la matriz celular, como todo el aceite contenido en las semillas no se encuentran en forma libre sino un porcentaje alto está asociado a biomoléculas complejas (Taha y Hassanein, 2007).

El éxito de la extracción de aceite con enzimas se debe a que las enzimas rompen la estructura de la pared celular del cotiledón haciéndola una estructura más permeable (Guerra y Zúñiga, 2003; Zúñiga *et al.*, 2003).

En la extracción acuosa enzimática se utilizan principalmente proteasas y carbohidrasas (Guerra y Zúñiga, 2003; Fawzy y Thomas, 2009). La aplicación de enzimas en los procesos de extracción de semillas oleaginosas en general se combina de manera simultánea con el método de extracción acuosa del aceite, o bien se aplica como un tratamiento previo a la semilla seguido por alguno de los procedimientos de extracción con hexano o prensado (Zúñiga *et al.*, 2003).

#### **1.2.6 Uso de enzimas en procesos de extracción acuosa**

Las enzimas que degradan las paredes celulares también pueden usarse para extraer aceite por solubilización, en un medio acuoso, de los componentes estructurales de las paredes celulares de las semillas oleaginosas. Esta solubilización requiere un grado de hidrólisis enzimática más completa que en el caso del proceso convencional.

Este concepto se hizo comercial para la producción de aceite de oliva y también ha sido investigado para otros materiales oleaginosos. La tabla 1.2a ,1.2b y 1.2c muestra los rendimientos de la extracción de aceite obtenidos para diferentes materiales usando distintos tipos de enzimas. Como es evidente a partir de esta tabla, las mezclas de enzimas con actividades combinadas, en general, dan rendimientos mayores que las enzimas individuales.

Además, las carbohidrolasas y las enzimas proteolíticas mejoran el rendimiento de proteínas y aceite por hidrólisis de las proteínas fibrosas estructurales en las que están embebidos los glóbulos grasos. Yoon y col (1991) reportaron una mejora en la extracción de lípidos a partir de soja usando sólo enzimas proteolíticas, las cuales resultaron en un rendimiento final de 86 % comparado con el 62 % del proceso llevado a cabo sin enzimas. En el mismo estudio, la extracción de proteínas se incrementó desde 62 a 89 %. En el mismo sentido, Olsen (1988), acordando con Adler-Nissen (1986), llevó a cabo una hidrólisis proteolítica sobre harina de soja lavada con ácido. El lavado inicial con ácido permitió la recuperación de un tercio del aceite originalmente presente en la harina. La hidrólisis de la harina lavada (aproximadamente al 10%) seguida de centrifugación resultó en un rendimiento del 60 % en aceite.

**Tabla 1.2a: Extracción acuosa enzimática para diferentes oleaginosas en comparación con el control (Rosenthal *et al.*, 1996).**

Semilla	Enzima	Concentración o actividad	Rendimiento en aceite o %
<b>Colza</b>	Control(Sin enzima)		53.9
	Pectinasa(Pectinex ultra-sp)	2%	71.4
	Celulasa	300 unidades	55.4
	Multi-carbohidrasas(ViscoZyme 120L)	2.5%	71.3
	Pectinasa (NovoZyme 249)		
	Celulasa(NovoZyme 465)		
	Pectinasa(NovoZyme 249)+Celulasa(NovoZyme 465)	0.2%	70.0
		0.9%	54.2
	0.4:0.1%	80.2	

**Tabla 1.2b: Extracción acuosa enzimática para diferentes oleaginosas en comparación con el control (Rosenthal *et al.*, 1996).**

Semilla	Enzima	Concentración o actividad	Rendimiento en aceite o %
<b>Coco</b>	Control(Sin enzima)		12.0
	Pectinasa(Clarex)+ $\alpha$ -amilasa(Tanasa)+Proteasa(HT-Proteolytic)	0.1:0.1:0.1%	80.0
	Pectinasa(Irgasyme)+ $\alpha$ -amilasa(Tanasa)+Proteasa(HT-Proteolytic)	0.1:0.1:0.1%	89.3
	Pectinasa(Pectimex)+Pectinasa(Clarex)+ $\alpha$ -amilasa(Tanasa)+Proteasa(HT-Proteolytic)	0.1:0.1:0.1:0.1%	87.6
	Pectinasa(Clearzyme)+Pectinasa(Clarex)+ $\alpha$ -amilasa(Tanasa)+Proteasa(HT-Proteolytic)	0.1:0.1:0.1:0.1%	89.4
	Pectinasa(Rohapec)+ $\alpha$ -amilasa(Tanasa)+Proteasa(HT-Proteolytic)	0.1:0.1:0.1%	83.5
	$\beta$ -Glucanasa(Brew-n-zyme)	0.1:0.1:0.1%	83.5
	$\beta$ -Glucanasa(Brew-n-zyme)+Pectinasa(Clarex)+ $\alpha$ -amilasa(Tanasa)+Proteasa(HT-Proteolytic)	0.3%	14.4
	0.1:0.1:0.1:0.1%	93.8	

		%	
<b>Girasol</b>	Control(sin enzima)		30.0
	Celulasa(CGA)	3%	44.0
	$\alpha$ -1,4-glicanogalacturónido-hidrolasa(Ultrasym)	3%	44.0
	Celulasa(CGA)+ $\alpha$ -1,4-glicanogalacturónido-hidrolasa(Ultrasym)	1.5:1.5%	52.0

La pasta originada en la centrífuga fue hidrolizada una vez más en forma similar, librando cerca del 99 % del aceite en la fase líquida, el cual estaba parcialmente emulsificador con el hidrolizado de proteína.

**Tabla 1.2c: Extracción acuosa enzimática para diferentes oleaginosas en comparación con el control (Rosenthal *et al.*, 1996).**

Semilla	Enzima	Concentración o actividad	Rendimiento en aceite o %
<b>Maní</b>	Control(Sin enzima)		72.0
	Proteasa(Pepsin-Merck)	3%	78.0
	Celulasa(CGA)	3%	75.0
	$\alpha$ -1,4-glicanogalacturónido-hidrolasa(Ultrasym)	3%	74.0
	Proteasa(Pepsin-Merck)+Celulasa(CGA)	1.5:1.5%	78.0
	Proteasa(Pepsin-Merck)+ $\alpha$ -1,4-glicanogalacturónido-hidrolasa(Ultrasym)	1.5:1.5%	76.0
	Celulasa(CGA)+ $\alpha$ -1,4-glicanogalacturónido-hidrolasa(Ultrasym)	1.5:1.5%	74.0
	Proteasa(Pepsin-Merck)+Celulasa(CGA)+ $\alpha$ -1,4-glicanogalacturónido-hidrolasa(Ultrasym)	1.0:1.0:1.0%	78.0
<b>Soja</b>	Control(Sin enzima)		62.0
	Proteasa(Alcalase)	0.2%	84.0
	Proteasa(Sigma)	0.2%	86.0

Como se observa en la tabla 1.2a, 1.2b y 1.2c, diferentes estudios sugieren diferentes combinaciones de enzimas para mejorar la extracción de aceite. Puede notarse que la mayoría de estos estudios emplean diferentes condiciones de extracción como pH, agitación, tamaño de partícula y temperatura de reacción, todo lo cual define resultados altamente específicos para esas condiciones experimentales (Rosenthal *et al.*, 1996).

En el caso de coco, McGlone y col. (1986) y Barrios y col. (1990) incrementaron el rendimiento de extracción de aceite de coco por combinación de tratamiento de poligalacturonasa,  $\alpha$ -amilasa y proteasa en un sistema acuoso, obteniendo rendimientos finales cercanos al 80 %; sin embargo, Christensen (1989) reportó rendimientos de extracción de aceite cercanos al 90 % usando galactomanasa combinada con un complejo de enzimas que degradan polisacáridos. Todos los estudios concuerdan que se requieren diferentes enzimas para degradar los componentes de la estructura de la pared celular.

En el caso de palta, Buenrostro y Lopez-Munguía Canales (1986) obtuvieron rendimientos de extracción del 75 % del contenido inicial de aceite empleando sólo  $\alpha$ -amilasa y del 65 % del contenido inicial de aceite empleando una mezcla enzimática de poligalacturonasa, proteasa y  $\alpha$ -amilasa. Cheah y col. (1990) extrajeron el 57 % del aceite de palma en un proceso acuoso luego del tratamiento del mesocarpio de la palma con una preparación enzimática de celulasa. El material no tratado y uno tratado con pectinasa resultaron en rendimientos similares del 28 %.

Domínguez y col (1995b) obtuvieron un aumento en el rendimiento de aceite de girasol mayor al 30 % usando mezclas de celulasas y pectinasas.

Bocevaska y col (1993) evaluaron un grupo de enzimas comerciales para extracción acuosa de germen de maíz y concluyeron que un complejo de carbohidrolasas (principalmente celulasa) de *Trichoderma reesei* fue más efectivo liberándose 84,7% del aceite total, 76,3% del cual aparece libre luego de la centrifugación.

En el caso de colza, se obtuvo un rendimiento de 78% con enzimas proteasas y  $\alpha$ -1,4-galacturónicoglicano hidrolasa (Lanzani *et al.*, 1975). Un resultado comparable se obtuvo en el mismo estudio con el uso de proteasas solamente. Olsen (1988) describió un proceso de extracción acuoso en el cual enzimas que degradan las paredes celulares (combinaciones de pectinasas, celulasas y hemicelulasas) son usadas para degradar las semillas de colza.

Además del tipo y dosis de las enzimas empleadas, el grado de molienda también afecta el rendimiento del aceite extraído. Se han reportado que los principales parámetros que afectan la extracción acuosa enzimática de colza son el grado de

molienda, pH de la dispersión, temperatura y tiempo de incubación y condiciones de centrifugación. Estas conclusiones confirman que los diferentes resultados de rendimiento en aceite obtenidos con diferentes enzimas para el mismo tipo de semilla oleaginosa no sólo reflejan las diferencias en la eficiencia enzimática con respecto a la liberación de aceite sino también el efecto de otros parámetros sobre la eficiencia del proceso global. Esto significa que los principales parámetros que afectan el proceso de extracción acuosa coinciden con los que afectan el proceso enzimático. Algunos de ellos están relacionados con la extracción en sí misma y otros relacionados con las condiciones óptimas para la actividad enzimática. Entonces, el punto principal en el desarrollo de un proceso consistente es considerar simultáneamente los parámetros que satisfacen ambos pasos, la reacción enzimática y la extracción, en lugar de llevarlo a cabo separadamente (Rosenthal *et al.*, 1996). La extracción acuosa de aceites vegetales requiere el reemplazo total de procesos e instalaciones existentes y un ajuste del proceso para aumentar los rendimientos a valores comparables con los obtenidos hoy por la industria convencional de extracción por solvente. Finalmente, los procesos acuosos enzimáticos requieren de etapas de secado, tratamiento de un mayor volumen de efluentes líquidos y consideraciones de seguridad alimentaria debido al alto contenido de humedad durante el desarrollo de los procesos.

Para finalizar, el tratamiento enzimático puede realizarse, entonces, eliminando totalmente el uso de disolventes orgánicos, en presencia de hexano o añadiendo hexano para facilitar la recuperación del aceite. La incorporación durante el procesado convencional (prensado y/o disolvente) podría incrementar la productividad, reducir el tiempo de operación y/o reducir la cantidad de solvente empleado con mínimas alteraciones en el proceso en curso (Sineiro *et al.*, 1998).

Por ello, el empleo de enzimas como auxiliares tecnológicos en la extracción convencional de aceites vegetales podría representar una nueva perspectiva de desarrollo para las industrias del sector. La degradación enzimática como pretratamiento debería incorporarse a las líneas de proceso que se emplean en la industria con la menor alteración posible de los procesos existentes. Para ello deben estudiarse diversos aspectos del problema.

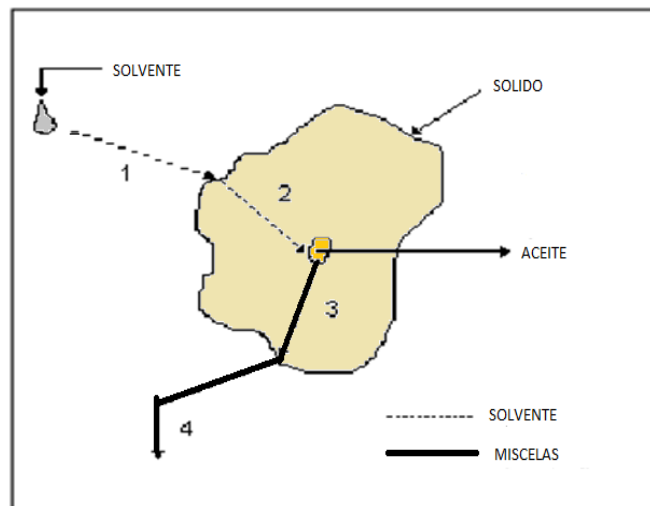
Primero es necesario definir, tanto las enzimas a emplear, como los parámetros de proceso de la incubación enzimática que maximicen el rendimiento en aceite.

Una vez optimizadas estas variables y determinadas las enzimas a emplear, se deben evaluar los rendimientos en aceite obtenidos a partir de laminado y expandido de soja (sólidos empleados como alimentación de los extractores industriales) hidrolizados. Esto permitirá determinar en qué etapa del procesamiento actual sería más conveniente emplear la incubación enzimática como pretratamiento adicional.

### 1.3 TRANSFERENCIA DE MASA EN LA EXTRACCIÓN

La mayoría de los procesos de separación involucran la transferencia de material de una fase a otra. Algunos procesos incluyen la transferencia entre fluido y sólido, como por ejemplo el secado, la lixiviación y la cristalización.

La lixiviación es la disolución preferente de uno o más componentes de una mezcla sólida por contacto con un disolvente líquido. Esta operación unitaria, una de las más antiguas en la industria química, ha recibido muchos nombres, según la técnica más o menos compleja utilizada para llevarla a cabo. La colada se refería originalmente a la percolación del líquido a través de un lecho fijo del sólido, pero en la actualidad se utiliza para describir la operación en forma general, sin importar la forma en que se realice. Lixiviación se utiliza con menos frecuencia como sinónimo de colada, aunque al principio se refería específicamente a la colada de álcali a partir de cenizas de madera. El término extracción también se emplea por lo común para describir esta operación particular, aunque también se aplica a todas las operaciones de separación, que utilicen métodos de transferencia de masa o mecánicos. La decocción se refiere específicamente al uso del disolvente a su temperatura de ebullición. Cuando el material soluble está sobre la superficie de un sólido insoluble y simplemente se lava con el disolvente, la operación algunas veces recibe el nombre de elusión (Treybal, 1980).



**Figura 1.5: Mecanismo de extracción por solvente de aceite a partir de sólidos de soja**

Muchos compuestos orgánicos naturales se separan de sus estructuras originales mediante lixiviación. Por ejemplo, el azúcar se separa por lixiviación de la remolacha con agua caliente; los aceites vegetales se recuperan a partir de semillas, como las de soja y de algodón, mediante lixiviación con disolventes orgánicos; en forma similar muchos productos farmacéuticos se recuperan a partir de raíces y hojas de plantas (Treybal, 1980).

La extracción continua de aceite a partir de semillas fue practicada primero en Europa en el comienzo de 1920 y en Estados Unidos alrededor de 1936. Estos métodos pueden clasificarse como inmersión, donde las partículas son movidas a través del solvente por un transportador a tornillo o por percolación, donde el solvente drena por gravedad a través de lechos móviles de partículas. La superioridad de la percolación se estableció pronto cuando, a fines de la década del treinta, Central Soja, Archer Daniel Midland y Procter & Gamble estudiaron en conjunto la práctica de extracción de semillas oleaginosas y eligieron para sus primeras plantas el extractor vertical de canasta Hansemuhle (Karnofsky, 2001). Desde el punto de vista de la extracción, los aceites vegetales pueden ser referidos como un componente simple, debido a que todos los glicéridos son fuertemente solubles en hexano. Los otros componentes que son extraídos con alguna dificultad son los fosfátidos, ya que poseen solubilidad limitada (Karnofsky, 2001). Para extraer el aceite de las semillas, deben producirse cuatro pasos bien definidos (figura 1.5)

- 1) El solvente debe estar en contacto con la superficie del sólido;
- 2) El solvente debe difundir dentro del sólido y disolver el aceite;
- 3) La mezcla de aceite y solvente debe luego difundir nuevamente hacia la superficie y finalmente,
- 4) La mezcla debe drenar a través de la capa de sólidos.

El objetivo del proceso de extracción es el de reducir el contenido de aceite en el sólido al mínimo nivel posible con el mínimo uso de solvente. Existen dos fuentes para el "aceite residual" que queda en el sólido luego de completarse el proceso de extracción. La primera es el "aceite no extraído" o aquel aceite que no ha sido extraído al experimentar los pasos 1 y 2 y la segunda es el "aceite superficial" o aquel aceite que ha completado los pasos 1, 2 y 3, pero no el 4, debido a las características de escaso drenaje de la capa de sólidos en el extractor (Figura 1.4). Para reducir al mínimo el "aceite no extraído", el sólido debe prepararse para romper todas las células oleíferas y proporcionar la mayor área de contacto entre el solvente y el aceite; mientras que para reducir al mínimo el "aceite superficial" el sólido debe

prepararse para proporcionar una capa que permita drenaje eficiente. Preparar el sólido para minimizar el "aceite no extraído" dará lugar a un alto porcentaje de "aceite superficial" y viceversa. Para proporcionar la máxima ruptura de células y área de contacto entre el solvente y el aceite sería aconsejable moler el sólido al menor tamaño posible, pero esto resultaría en una capa compacta que no permitiría un buen drenaje. De manera similar, para dar máximo drenaje y, en consecuencia, mínimo "aceite superficial", un sólido grueso sería mejor, pero esto reduciría la ruptura de células y el área de contacto del solvente y el aceite. Las plantas de extracción están diseñadas para calcular el equilibrio adecuado entre el tamaño de partícula deseado del sólido para una más rápida extracción y el requerido para un buen drenaje (Milligan, 1976 y Kulkarni *et al.*, 1955).



CAPITULO 2

ANTECEDENTES

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 GENERALIDADES DEL FRUTO DE CACATÉ (*Oecopetalum mexicanum*)

El cacaté es un árbol que pertenece a la familia *icacinacea miers* (figura 2.1). Esta familia la integran alrededor de 60 géneros y 400 especies cuya principal distribución geográfica es en regiones tropicales, aunque también algunas crecen en regiones templadas. En América se distribuyen 12 géneros. Otras zonas donde se distribuye este cultivo son la república de Guatemala, Costa Rica, África, nueva Zelanda y Asia (Gutiérrez, 1994; Quintas, 2005). En la tabla 2.1 se presenta la clasificación taxonómica de la planta *Oecopetalum mexicanum*.

**Tabla 2.1** Clasificación taxonómica de *Oecopetalum mexicanum*

Clasificación	Taxonómica
<b>Clase</b>	Rosopsida
<b>Orden</b>	Aquifoliales
<b>Familia</b>	Icacinaceae
<b>Genero</b>	Oecopetalum
<b>Especie</b>	Mexicanum

En el sureste de México el cacaté se cultiva en los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas.



**Figura 2.1** Hojas del genero *Icacinaceae*

En Chiapas crece principalmente en zonas como la selva lacandona, Ocoszocoautla de Espinosa, San Fernando y Pichucalco (INEGI, 2005), es muy conocido como árbol de sombra de cafetales (Lascurain *et al.*, 2007); la floración se presenta entre los meses de julio a septiembre (Gutiérrez, 1994).

Dependiendo de la región donde se cultive, se conoce con diferentes nombres comunes tales como cacaté (Chiapas y Tabasco), cacaté de septiembre (Simojovel, Chiapas) o cachichin (Misantla, Veracruz) (Martínez, 1987).

Entre las características del cacaté, destaca que es un árbol de hasta 20 metros de altura, generalmente de 8 a 15 hojas alternas, medianas o grandes, elípticas u ovaladas, con margen entero u ocasionalmente dentado. La flor es blanca, de 8 mm de largo; son abundantes y vistosas. Es una planta silvestre cuyo fruto es comestible. El fruto es una drupa leñosa de color verde en su etapa inmadura y café al madurar, en la madurez es globoso ovoideo de 2-3 cm de largo y de 1-2 cm de ancho de color café (figura 2.2) (Gutiérrez, 1994).



**Figura 2.2 Semilla de cacaté**

Los frutos en su interior tienen una semilla blanca, grande de 7-9 mm de largo y de 7 mm de ancho; la cual se encuentra cubierta por una cáscara dura (Gutiérrez, 1994). Según Cruz (2004), esta tiene un alto contenido en grasa, proteína y fibra alrededor del 33, 13 y 10% respectivamente. La semilla de esta especie es comestible, los pobladores de la región centro del Chiapas (Zoques, Tzotziles y Mestizos) lo consumen crudos o cosidos en forma de guisos, asados o hervidos (Chávez *et al.*, 2009). La semilla se caracteriza por su sabor amargo. En algunas entidades las hojas de esta especie se usan para teñir (Medina, 2000).

## 2.2 GENERALIDADES DE LA PLANTA DE PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.)

*Jatropha curcas* L., pertenece a la familia Euphorbiaceae, es un árbol de crecimiento lento, nativo de Sudamérica, pero también se cultiva ampliamente en toda América Central, África y Asia. La *Jatropha*, es una planta vigorosa, resistente a la sequía y a las plagas, en los países tropicales donde se cultiva se usa principalmente como protección de los cultivos de ganado, ovejas y cabras que andan libremente (Francis, 2005).

La planta *Jatropha curcas* recibe diferentes nombres según el lugar de producción, es conocida como Higo de infierno, Piñón, Wassasupay (Bolivia); Chagsis, Vocudyes (Bolivia: Masetén, La Paz; Chimane, Beni); Piäobranco (Brasil); Purga, Piñón de purga, Piñón (Colombia); Piñón (Ecuador); Piñol, Piñon (Perú); Piñón de purga, Piñón de fraile, Túa-túa (Venezuela), Piñoncillo (México) (Heller, 1996).

La planta es cultivada principalmente para producir aceite, la producción de semilla es de aproximadamente 5 ton/año. De una plantación de una hectárea, se extraen dos toneladas de aceite y una tonelada de harina de la semilla, esta última es rica en proteínas. El contenido de proteína cruda, lípidos y cenizas de las semillas de *Jatropha curcas* oscila entre 27-30%, 55-62% y 3,7-5,2%, respectivamente (Makkar *et al.* 1998).

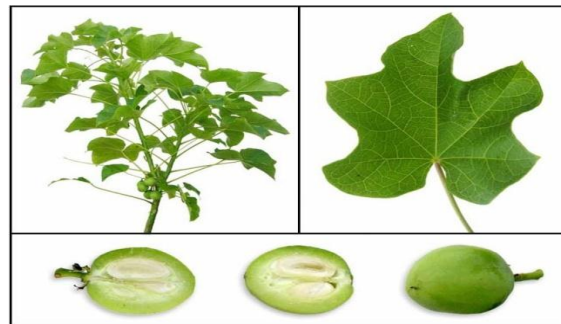
### 2.2.1 Taxonomía y morfología vegetal

El género *Jatropha* pertenece a la tribu Joannesieae de Crotonoideae de la familia Euphorbiceae que contiene aproximadamente 170 especies conocidas. Una de ellas es *Jatropha curcas* (tabla 2.2) (Heller, 1996).

**Tabla 2.2 Taxonomía de *Jatropha curcas* L.**

<b>Clasificación taxonómica de planta de <i>Jatropha curcas</i> L.</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo/división</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida(Dic.)
<b>Orden:</b>	Euphorbiales
<b>Familia</b>	Euphorbiaceae
<b>Nombre científico</b>	<i>Jatropha curcas</i> L.

La *Jatropha curcas* L. es un arbusto o árbol pequeño de 2 a 6 m de altura con corteza blanco-grisácea, que exuda un látex translúcido. Los tallos crecen con una discontinuidad morfológica en cada incremento, es un cilindro verde robusto que produce ramas con savia láctea o rojiza viscosa, normalmente se forman 5 raíces de los árboles, 1 central y 4 periféricas, las hojas se forman normalmente con 5 a 7 lóbulos acuminados pocos profundos y grandes, tienen pecíolos largos con una longitud de 10 a 15 centímetros y anchura de 9 a 15 centímetros, las hojas ovadas se colocan de forma alterna a subalterna opuesto con una filotaxis espiral y se caen durante la época seca. Son hojas anchamente ovadas, levemente 3 a 5 lobadas, abiertamente cordadas en la base con 5 nervaduras y pubescentes en las nervaduras del envés. Las inflorescencias se forman terminalmente en el axial de las hojas en las ramas. Se colocan diez estambres en dos espirales distintas de 5 cada uno en una sola columna en el androceo y en la proximidad íntima (figura 2.3)



**Figura 2.3 Plantas y frutos verdes de *Jatropha curcas* L. (Bernal-Astorga, 2011).**

Los frutos (figura 2.4) son cápsulas drupáceas y ovoides, después de la polinización, se forma una fruta trilocular de forma elipsoidal. Las frutas son cápsulas inicialmente verde pero volviéndose a café oscuro o negro en el transcurso de la maduración. Las cápsulas de los frutos son de 2.5 a 4 cm de largo por 2 cm de ancho, elipsoidales y lisas que cuando maduran van cambiando a amarillas. Al inicio son carnosas pero dehiscentes cuando son secas. Los frutos se cosechan en invierno cuando el arbusto tira sus hojas, sin embargo, puede producir varias cosechas durante el año si la humedad de la tierra es buena y las temperaturas son suficientemente altas. Cada inflorescencia rinde un manojo de aproximadamente 10 frutos ovoides o más. El desarrollo del fruto necesita 90 días desde la floración hasta que madura la semilla.

El fruto produce tres almendras negras, cada una de aproximadamente 2 cm de largo y 1 cm de diámetro. La semilla es cosechada cuando la cápsula está madura, ocurre después de dos a cuatro meses de la fertilización. Las semillas

descascaradas negruzcas, delgadas se parecen a las semillas del ricino pequeño. El volumen de aceite es de 35-40% en las semillas y de 50-60% en el grano.



**Figura 2.4 Frutos y semillas de *Jatropha curcas* L.  
(Bernal-Astorga 2011)**

### **2.2.2 Fisiología vegetal**

Con una buena humedad la germinación toma 10 días. Se abre la cáscara de la semilla, sale la radícula y se forman 4 raíces periféricas pequeñas. Poco después la primera hoja desarrolla los cotiledones, se marchitan y se caen, luego crece el simpodial. Dependiendo de las condiciones de propagación y lluvia, el primer rendimiento de la semilla es en el primer año y un árbol puede llegar a producir durante 50 años.

### **2.2.3 Hábitat**

La *Jatropha curcas* L., crece casi en cualquier parte, incluso en las tierras cascajosas, arenosas y salinas, puede crecer en la tierra pedregosa más pobre, inclusive puede crecer en las hendeduras de piedras. La materia orgánica de las hojas del cobertizo refuerza la actividad del gusano de tierra alrededor de la zona de la raíz de las plantas que mejoran la fertilidad de la tierra. Climáticamente, la *Jatropha curcas* L. se encuentra en los trópicos y subtrópicos, le gusta el calor aunque también las más bajas temperaturas y puede resistir una escarcha ligera. Su requisito de agua es sumamente bajo y puede resistir períodos largos de sequedad por el derramamiento de la mayoría de sus hojas para reducir la pérdida durante la transpiración (Octagón, 2006).

#### **2.2.4 Distribución geográfica**

La distribución actual de *Jatropha curcas* muestra que ha sido muy satisfactoria la introducción de este cultivo en las regiones más secas de los trópicos. Varios científicos han tratado de definir el origen y la fuente de donde proviene la planta de *Jatropha curcas*. Esta especie probablemente fue distribuida por los portugueses en las Islas de Cabo verde y en otros países de África y Asia.

Según otras fuentes, el piñón parece ser nativo de Centro América, así como de México, donde se produce naturalmente en los bosques de las regiones costeras. Sin embargo, Dehgan al visitar el Laboratorio Sistemático Horticultural, encontró que centenares de especímenes habían sido recolectados principalmente de México y América central como: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá. Existen muchos registros también para el Caribe: Bahamas, Cuba, República Dominicana, Haití, Puerto Rico, Santa Lucía, Santo Domingo, Santa Cruz, Trinidad y otros países del oeste de India. En los siguientes países de América del Sur, el piñón se produce en menor medida, de acuerdo a su representación en los herbarios mencionados anteriormente: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y las Islas Galápagos, Paraguay, Perú y Venezuela. Posteriormente fue introducido a la Florida. (Makkar *et al.*, 1998).

Los especímenes de herbario de las Américas se recogieron por lo general a lo largo de carreteras, caminos y postes de cercas vivas. Sin embargo, la información proporcionada por muchos coleccionistas parece apoyar el argumento de que la especie fue obtenida de vegetación "natural" en las Américas. Es muy probable que el centro de origen de la *Jatropha* sea en México y América Central, ya que no se encuentra estas formas de vegetación en África y Asia, sin embargo el "verdadero" centro de origen, no se ha encontrado aún. Para dilucidar esto, en los sitios originales de recolección en México y América Central la diversidad existente tendría que ser revisada y evaluada, de preferencia por técnicas moleculares (Héller, 1996).

#### **2.2.5 Usos de la *Jatropha curcas* L.**

Los registros históricos muestran que la *Jatropha* fue utilizada por los indios nativos de Centroamérica y quizás de América del Sur en la medicina herbaria. En el año de 1836 las semillas de *Jatropha* se producían comercialmente en las islas de Cabo Verde. Las semillas fueron exportadas a Portugal y Francia y el aceite se utilizaba para el alumbrado de la calle y la producción de jabón. Debido a la toxicidad de las hojas y su rápido crecimiento y resistencia, la *Jatropha* se ha empleado



frecuentemente como protección o cerca viva, ya que no era afectada por el ganado. Actualmente, la *Jatropha* tiene muchos otros usos (Van der Putten *et al.*, 2009).

## **2.3 GENERALIDADES DE LA PLANTA DE PISTACHO (*Pistacia vera* L)**

### **2.3.1 Clasificación botánica**

Pertenece a la familia Anacardiaceae y al género *Pistacia*. El número de cromosomas es 30 según el Atlas of Flowering Plant (Ed. 1955 de Darlington y Wylie). La familia Anacardiaceae engloba a varios géneros dentro de los cuales están *Mangifera* spp. (Mango), *Schinus* spp. (Molle o el Falso Pimiento) y el *Lithraea* spp. (Litre) (Hoffmann, 1998; Couceiro *et al.*, 2000).

Se ha denominado como pistacho a la fruta de varias especies de este género, sin embargo, el nombre se aplica a sólo una de las 11 especies del género *Pistacia* y es la proveniente de *Pistacia vera* L., la única cuyo fruto se comercializa como tal para el consumo directo. Otras especies como *P. atlántica* Desf., *P. mutica* Fisch y Mey, y *P. terebinthus* L. producen frutos comestibles, pero estos son pequeños, indehiscentes y son utilizados más bien como fuente de aceite vegetal. (Firuzeh y Ludders, 1978; Ferguson *et al.*, 2005a).

### **2.3.2 antecedentes generales del árbol**

#### **2.3.2.1 Vegetativos**

El pistachero (*P. vera* L.), denominado también en España como alfónsigo o alfóncigo y en México denominado también pistacho ó pistache, es un árbol de hoja caduca, que tiene un olor resinoso característico de la familia. A este respecto la palabra latina *Pistacia* proviene según Dioskurides de “pissa” = resina y “aklomai” = sanar, significando así una planta con resina curativa. Por otro lado, según Davatchi la palabra proviene del vocablo persa “Peste” (Firuzeh y Ludders, 1978).

El árbol, que puede alcanzar 5 a 7 m de altura, suele estar formado por dos o tres troncos de poco grosor al estado silvestre. El crecimiento en grosor es muy lento, como lo demuestran árboles de 300 años de edad que tenían sólo 60 cm de diámetro en el tronco a 60 cm del suelo (Beede y Ferguson, 2005).

Las hojas son caducas, imparipinadas compuestas de 1 a 5 folíolos, generalmente trifoliadas, coriáceas, verde oscuras por el haz y verde pálido por el envés más tarde. Cada hoja sustenta sólo una yema axilar (figura 2.5).





**Figura 2.5. Hojas de la planta de Pistacho con cinco foliolos y una yema axial**

En la zona central de Chile, el crecimiento comienza entre fines de septiembre y comienzos de octubre, simultáneamente o dos días después de la floración en algunas variedades, y termina entre fines de octubre y mediados de noviembre. A veces se produce un segundo ciclo de crecimiento a fines de diciembre o después. Los flujos tardíos están sujetos a mayores riesgos de daños por heladas de otoño y ataques de Botrytis (Figura 2.6). Aun cuando el crecimiento durante el período juvenil se considera rápido, a los diez años disminuye una yema axilar bruscamente y a partir de los treinta años aproximadamente, éste continúa a razón de unos cuatro centímetros por año.



**Figura 2.6. Segundo flujo de crecimiento tardío en plantas nuevas**

Cuando el árbol entra en su fase productiva, el crecimiento de los brotes proveniente de las yemas inmediatamente vecinas al ápice de los brotes que permanecen en estado vegetativo y que pueden dar origen a ramas laterales al año siguiente, o bien permanecer en estado latente, contrariamente a lo esperado es mayor en los años con alta producción de fruta que en aquellos improductivos siendo la causa del añerismo de esta especie. La vida de este árbol es extremadamente longeva. En Turquestán, Siria y Persia se encuentran frecuentemente árboles con trescientos años (Reinoso, 1972; Woodroof, 1979).

### 2.3.3 Características de la nuez

El fruto es seco, pero botánicamente se le considera una drupa, de un peso que oscila entre 1,4 a 1,8g, el cual crece en racimos parecidos a los de la uva y cuyas capas externas (epicarpio y mesocarpio externo) conforman el pelón seco y duro que encierra la semilla protegida por el endocarpio, en cuyo interior se encuentra la parte comestible, el embrión, encerrado en los tegumentos seminales que corresponde aproximadamente al 54% del fruto seco.

Pocos días después de la polinización, los frutos comienzan a crecer alcanzando su tamaño final pocas semanas después. El embrión comienza a expandirse y llenar las cáscaras vacías hasta ese momento, tanto que en la mayoría de los casos su expansión hace que la cáscara quede semiabierta al momento de la cosecha.

La fructificación tiene lugar sólo sobre madera de un año. La maduración de los frutos está caracterizada por una acentuada variabilidad (figura 2.7), por lo cual, la cosecha es gradual, y ocurre entre los meses de febrero y marzo, ocasionalmente hasta abril. El momento de la madurez fisiológica está dado cuando se separa fácilmente el pelón del fruto.



Figura 2.7. Nuez de la planta de *Pistacia vera* L.

### 2.3.4 Mercado

Los principales países productores de pistachos por orden de importancia son la República Islámica de Irán, Estados Unidos (California), Siria, Turquía, China, Grecia e Italia. Su producción ha aumentado de forma sostenida en los últimos años y se prevé el aumento del consumo, debido a una mayor aceptación por parte de los consumidores de Estados Unidos, de la Unión Europea y de los países latinoamericanos, con la expansión del cultivar Kerman de alta calidad.

Alemania es el mayor importador mundial; le siguen España y Francia y los países de Medio Oriente. Estados Unidos se autoabastece con la producción californiana. Otros países que cultivan la especie son: Líbano, Israel, India, España, Francia, Chipre, Ex URSS (Turquestán) y Australia.

## 2.4 COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LA SEMILLA DE CACATÉ (*Oecopetalum mexicanum*).

### 2.4.1 Características Generales

En la tabla 2.3 se presentan los rendimientos equivalentes a las fracciones que conforman la semilla de cacaté, en donde cabe destacar que la fracción mayoritaria corresponde al endospermo, representando el 54.91% del peso total de la semilla, mientras que la masa del exocarpio representa un rendimiento del 45.09% del peso total de la semilla. Por lo que en base al porcentaje, la fracción que es considerada de interés como materia oleaginosa, es la porción mayoritaria de la semilla.

**Tabla 2.3. Rendimientos de las fracciones de la semilla de cacaté**

FRACCIÓN	PROPORCIÓN (% W/W)
SEMILLA	
ENTERA	100
ENDOCARPIO	54.91
EXOCARPIO	45.09

### 2.4.2 Composición de la semilla de cacaté

Para caracterizar la materia prima, en un trabajo inicial realizado por Borraz, (2011) se reportó la composición bromatológica de la harina de este fruto, determinando el contenido de los compuestos que se indican en la tabla 2.4 mediante metodologías de la AOAC (1990) (Guerra y Zúñiga, 2003; Mejía-Giraldo *et al.*, 2007). Los análisis fueron realizados por triplicado.

La composición bromatológica se presenta en la tabla 2.4 (Borraz, 2011). La semilla de cacaté se caracteriza por un contenido de humedad del  $64.70 \pm 0.20\%$ , este valor es relativamente alto comparado al obtenido por Cruz (2004) para semillas recolectadas en el municipio de Ocoszocuatla (47.26%) y por Ballinas *et al.* (2009) (52.6%) para semillas recolectadas en el municipio de Tapilula, esta diferencia en el contenido de humedad puede deberse a la ubicación geográfica de los cultivos, la temporada de cosecha, las condiciones climáticas, entre otros factores (Belén *et al.*, 2001).

La semilla de cacaté se destacó por su contenido atractivo en grasa, proteína y fibra, con 39.25, 12.59 y 4.25% respectivamente; estos resultados son consistentes con los obtenidos por Ballinas *et al.*, (2009) para semillas recolectadas durante el año 2009, en el municipio de Tapilula, Chiapas reportando un contenido de grasa de 35%, proteína 13.24% y fibra de 4.15%. Centurión *et al.*, (2000) reportaron un contenido de grasa de 30.7 % y proteína de 8.0% en semillas de cacaté cosechada en el municipio de Tlacotalpa, Tabasco, la variación pudo estar influenciada por las condiciones de extracción del aceite (Solís-Fuentes *et al.*, 2001), la localización geográfica de la zona de recolección (Tecpatán, Chiapas), la época de cosecha (septiembre) y los cambios climáticos (Belén *et al.*, 2001; Matos y Acuña, 2010).

El contenido de proteína del cacaté es comparable con el del amaranto (15%) y superior al promedio reportado para el trigo (10.6%), maíz (11%) y arroz (7.4%) (Belén *et al.*, 2001). El contenido de fibra encontrado para la semilla de cacaté (4.25%) es similar al reportado para el girasol (3.7%) (Badr y Sitohy, 1992) y *moringa oleífera* (4.2%) (Compaoré *et al.*, 2011), pero inferior para el reportado para el ajonjolí (11.2%) y la canola (7%) (Belén- Camacho *et al.*, 2005), aunque el método aplicado no revela la naturaleza de las fibras de la semilla de cacaté, la presencia de fibra dietética es importante dada la relación con la prevención y control de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer intestinal (Belén *et al.*, 2001).

Por otro lado, el contenido de grasa fue mayor al promedio de los cereales (5%) (Belén *et al.*, 2001).

**Tabla 2.4. Composición bromatológica de la semilla de cacaté**

<b>COMPUESTO</b>	<b>CONTENIDO(g/100g)</b>
CENIZA	2.30±0.13
GRASA	39.25±0.33
PROTEINA	12.59±0.10
FIBRA CRUDA	4.25±0.16
CARBOHIDRATOS	41.61±0.16
<b>ANÁLISIS</b>	<b>REFERENCIA</b>
HUMEDAD	AOAC 925.10
CENIZAS	AOAC 923.03
PROTEINAS.METODO KJELDAHL	AOAC 920.87
GRASAS Y ACEITES.METODO SOXHLET	AOAC 920.39
FIBRA TOTAL.DIGESTIÓN ÁCIDA Y ALCALINA	AOAC 985.29
CARBOHIDRATOS	POR DIFERENCIA

Los resultados presentados corresponden a la media ± DS (n=3). Datos reportados en base seca

Al comparado con semillas oleaginosas convencionales, este supera al ajonjolí (30%), algodón (22%) y soya (18%) (Belén-Camacho *et al.*, 2005) y es inferior para el reportado para la canola (43%), *Moringa oleífera* (43.5%) (Compaore *et al.*, 2011), girasol (45%) (Badr y Sitohy, 1992), por su atractivo contenido de grasa, la semilla de cacaté podría considerarse una fuente importante no convencional para el aprovechamiento del aceite.

El contenido de proteína y de fibra de la semilla de cacaté permite derivar que el subproducto resultante de la extracción del aceite podría ser útil para la formulación de alimentos destinados ya sea para el consumo humano o para el consumo animal, considerando los efectos benéficos para la salud que conllevan al consumir estos compuestos (Borraz, 2011).

## **2.5 COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LA SEMILLA DE *Jatropha curcas* L.**

Las determinaciones bromatológicas de la semilla de piñón que se utilizaron para la extracción del aceite fueron realizadas en un estudio previo y los valores que aquí se presentan fueron reportados por Alfaro (2012).

### **2.5.1 Determinaciones bromatológicas**

La composición bromatológica de *Jatropha curcas* un alto contenido de fibra cruda del  $40.8745 \pm 0.3365\%$  y de fibra detergente neutra (FDN) de  $22.6716 \pm 0.7843\%$ , esto se debe a que la semilla incluía la testa. El contenido de humedad fue de  $9.8793 \pm 0.1992\%$ , este resultado fue similar al reportado por Martínez (2007), que va de 6.4 a 9,8%. El contenido de cenizas fue de  $5.1799 \pm 0.0165\%$  parecido al reportado por Makkar *et al.* (1998) de 3,7 a 5,2%.

El contenido de grasa reportado por Makkar *et al.*, (1998) fue de 55-62% y el que se obtuvo en esta determinación fue de  $24.2387 \pm 0.4214\%$ , este porcentaje bajo de grasa pudo deberse a que la semilla incluye la testa y Bailey (1984) sugiere que antes de una molienda es necesario retirar la testa ya que en la extracción con solventes la grasa puede quedar adherida en la cascarilla, obteniéndose bajos rendimientos.

## **2.6 COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA DE LA SEMILLA DE PISTACHO (*Pistacia vera* L.)**

### **2.6.1 Valor nutritivo del fruto**

Los pistachos son ricos en aceites (48,3-60,5%) y proteínas (15-28,8%). Su contenido en hidratos de carbono es de 14,9 a 19%, donde el azúcar predominante es glucosa, seguido de galactosa y manosa con trazas de fucosa, arabinosa y xilosa. Las cenizas están en un 2,2-3% y las fibras constituyen el 1,6 a 2,2%.

La composición de la fracción grasa de semillas en latencia está dada por un 12,2% de ácidos grasos saturados, y un 87,8% de ácidos grasos no saturados. (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5 Participación porcentual de los ácidos grasos en semillas de pistacho**

	<b>Según Neubeller y Buchloh (1971)</b>	<b>Según Wissebach (1969)</b>
<b>Acido palmitico</b>	10.5	8.2
<b>Acido palmitoleinico</b>	0.9	-
<b>Acido estearico</b>	1.9	1.6
<b>Acido oleico</b>	72.2	69.6
<b>Acido linoleico</b>	-	20
<b>Acido miristinico</b>	14.7	0.6
<b>Acidos grasos no saturados</b>	12.2	10.4
<b>Acidos grasos no saturados</b>	87.8	89.6

Según Thies, se considera como un buen aceite, en la industria aceitera y en fisiología de la nutrición, a aquel que contenga 20-60% de ácido linoleico, 5-15% de ácidos grasos saturados y el resto como ácido oleico. Como la relación entre los ácidos esteáricos, oleico y linoleico para el pistacho es de 1:72:14, a pesar del contenido relativamente bajo de ácido linoleico, puede considerársele desde el punto de vista fisiológico de la nutrición como un buen aceite (Neubeller y Buchloh, 1971). Sin embargo, a pesar del alto contenido de aceite, éste no se produce comercialmente debido al alto costo del fruto.

El contenido de proteínas está inversamente relacionado con el de aceite con un coeficiente de correlación de 0,96. La composición mineral expresada en porcentaje x 10 es la siguiente: Na: 4-7; K: 860-1180; Ca: 100-180; P: 494-640; Fe: 5,8-11,4; Cu: 1-1,4; Mg: 150-180. La composición química para las diferentes partes del fruto se presentan en la Tabla 2.6 (Woodroof, 1979).

**Tabla 2.6. Composición química de pistachos cv. Red. Aleppo (% peso seco)**

	<b>Almendra*</b>	<b>Cascara *</b>	<b>Pelón*</b>
<b>Proteína(Nx6.25)</b>	19.41-19.58	0.42-1.06	7.66-9.35
<b>Aceite(extr.éter)</b>	54.70-58.30	0.56-0.58	7.82-8.27
<b>Fibra cruda</b>	1.74-2.19	54.0-53.4	14.1-17.4
<b>Ceniza</b>	2.95-3.55	0.42-1.06	15.56-13.3
<b>Calcio</b>	0.13-0.13	0.06-0.06	0.7-0.25
<b>Potasio</b>	1.04-1.22	0.22-0.49	6.71-5.88
<b>Fósforo</b>	0.54-0.64	0.02-0.04	0.12-0.24



\* la primera columna indica valores de frutos partidos, la segunda de frutos no partidos.

## 2.7 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y su poder catalítico, que es mucho mayor que los catalizadores inorgánicos. Una de las propiedades más sobresalientes de las enzimas es su especificidad de acción, de tal forma que sólo actúan sobre un sustrato y únicamente tiene lugar un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales o subproductos. Aunque las enzimas son proteínas y por lo tanto moléculas relativamente lábiles, desarrollan sus extraordinarios efectos catalíticos en disoluciones acuosas diluidas, en un pH biológico y a temperatura moderada (Lenhinger, 2003).

**Tabla 2.7. Clases de enzimas según la *Internacional EnzymeCommision***

CLASE	TIPO DE REACCIÓN CATALIZADA
<b>Oxidorreductasas</b>	Reacciones de oxidorreducción de todo tipo
<b>Transferasas</b>	Transferencia de un grupo de átomos intacto de una molécula donadora a una receptora
<b>Hidrolasas</b>	Rompimiento hidrolítico (con participación de agua) de enlaces
<b>Liasas</b>	Rompimiento de C-C, C-O, C-N y otros enlaces por medios distintos a la hidrólisis y la oxidación; se incluyen reacciones en las que se elimina agua para dejar enlaces dobles o en las que se agrega agua a dichos enlaces.
<b>Isomerasas</b>	Interconversión de diversos isómeros, por ejemplo cis↔trans, L↔D, aldehído↔cetona.
<b>Ligasas</b>	Formación de enlaces debido a la condensación de dos sustancias diferentes; la energía se toma del ATP



Las enzimas no sólo intervienen en la síntesis de compuestos biológicos, catalizan también reacciones que abastecen a la célula de energía, destoxifican compuestos, producen luz, etc. Las enzimas son responsables de virtualmente todas las reacciones químicas de la célula, en las cuales se forman o rompen enlaces covalentes. Puesto que son mediadores de las reacciones biológicas, las enzimas entran entre las maquinarias biológicas más sencillas pero más elaboradas y entre las más fáciles de obtener en una forma pura y funcional (Bohinski, 1998).

En 1965 surgió por primera vez un sistema de nomenclatura más sistemático, el cual se revisó en 1972. En este sistema se agrupan las enzimas en seis clases principales con base en el tipo general de transformación química que catalizan (Tabla 2.7 ) (Bohinski, 1998).

El comercio de enzimas para uso industrial y doméstico asciende a centenares de millones de dólares anualmente en todo el mundo. Las enzimas industrialmente se utilizan en la producción de productos químicos y farmacéuticos cuyo costo es de millones de dólares. Es razonable esperar que los usos industriales de las enzimas aumenten debido a las técnicas modernas de manipulación genética, las cuales hacen que la producción sea más eficiente y menos costosa (Conn, 1996).

Las enzimas se han convertido en herramientas insustituibles para la obtención industrial de productos de índole muy diversa. Enzimas de distinta naturaleza y actividad son utilizadas por muchas industrias de alimentos, químicas o farmacéuticas. Determinadas especies de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Mucor*, se cuentan entre los principales microorganismos productores de enzimas industriales, aunque también se obtienen enzimas a partir de bacterias, plantas y animales.

Las carbohidrasas constituyen un grupo muy amplio y variado de enzimas cuya característica común es la capacidad de hidrolizar el enlace glucosídico que forma el eslabón entre enlace de los azúcares. Con mayor propiedad bioquímica se denominan glucosil hidrolasas. La extensa investigación bioquímica desarrollada con carbohidrasas ha proporcionado excelentes sistemas modelo para el estudio de problemas relacionados con la estructura tridimensional de las proteínas y su función. Las carbohidrasas generalmente son muy apropiadas para ser empleadas como enzimas modelo en investigaciones bioquímicas, debido a que su actividad suele ser fácilmente medible y a que son susceptibles de ser estudiadas con una metodología relativamente sencilla (Flores *et al.*, 2004).

## 2.8 INVESTIGACIONES REALIZADAS APLICANDO EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN ACUOSO ENZIMÁTICO.

Debido a la alta especificidad y bajas temperaturas de operación, los procesos enzimáticos resultan ser viables para las industrias (Ghodsvali *et al.*, 2009).

Diversos trabajos proponen la aplicación de un tratamiento enzimático en procesos acuosos de semillas vegetales oleaginosas a fin de aumentar la eficacia de recuperación del aceite vegetal mediante la desintegración parcial del material celular. Entre los trabajos citados se encuentra la extracción de aceite de soya, colza, melón y aguacate, en donde la separación del aceite y la torta rica en proteína se logra mediante filtración o centrifugación (Guerra y Zúñiga, 2003).

Ghodsvali *et al.* (2009) investigaron el efecto de una enzima y de un preparado enzimático: la pectinasa producida por *Aspergillus niger* y Pectinex Ultra SP-L, un complejo de actividad pectolítica y hemicelulolítica producido a partir de *Aspergillus aculeatus* proporcionado por Novo Nordisk; sobre la extracción y la calidad del aceite de oliva de tres variedades (Kroneiki, Oleaginosa nativa iraní y Misión). Los tratamientos acuosos enzimáticos, dependiendo de las condiciones evaluadas incrementaron el rendimiento del aceite de oliva en el rango de 0.9 a 2.4% sobre lo obtenido en el tratamiento control, encontrando que al aumentar la concentración de la enzima aumenta considerablemente el rendimiento del aceite extraído. En comparación con el aceite empleado, Pectinex Ultra SP-L y pectinasa (en proporción 0.02%, v/w) no presentaron un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) entre los tratamientos; obteniendo un rendimiento de aceite de 72.13 y 71.23% respectivamente.

Kapchie *et al.* (2008) estudiaron el efecto de enzimas comerciales sobre la hidrólisis de los componentes de la pared celular de la soya, con la finalidad de mejorar la liberación de los oleosomas, comparando los resultados obtenidos con el método convencional de extracción. Los preparados enzimáticos fueron: Multifectpectinasa FE de *Aspergillus niger* con actividad pectinasa, celulasa, hemicelulasa; Multifect CX que es un complejo  $\beta$ -glucanasa de *Trichoderma reesei* y *Penicillium funiculosum* y celulasa A de las especies de *Aspergillus* con actividad celulasa,  $\beta$ -glucanasa, hemicelulasa y xilanas. Los autores emplearon enzimas en proporciones iguales (1% de cada una quedando un total de 3% v/w), encontrando un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la recuperación del aceite de los oleosomas con un rendimiento de 36.42%, 44.68% y 63.61% homogenizados durante 45, 90, 180 s; respectivamente. Comparado con el método convencional, los autores logran recuperar alrededor de 34.28 y 28.65% del aceite de oleosomas procesadas durante 45 y 180 s

respectivamente. Posteriormente, realizaron tres extracciones acuosas enzimáticas sucesivas a los residuos sólidos obteniendo un aumento en el rendimiento de aceite de 84.65%. Los autores mencionan que los resultados obtenidos podrían ser útiles para la extracción de aceite de soya a gran escala.

En un estudio realizado por Latif y Anwar (2008) se compara el resultado del porcentaje de aceite extraído en la semilla de *Moringa concanensis*, usando tres enzimas comerciales (Natzyme, Kenzyme y Feedzyme), con un control extraído de enzimas y con otro control empleando como solvente hexano. El contenido de aceite de las semillas extraídas con enzimas osciló entre 23.54 a 27.46% siendo este significativamente más alto que el obtenido por el tratamiento control sin enzimas que fue de 15.41%; sin embargo, fue bajo en comparación con el obtenido con el solvente el cual fue de 38.40%. El rendimiento de aceite fue mayor (27.46%) en las semillas tratadas con Kenzyme, mientras que de las semillas tratadas con Feedzyme obtuvieron un rendimiento de aceite menor (23.54%). A pesar de los menores rendimientos obtenidos en la extracción, el aceite obtenido a través de la extracción acuosa enzimática presenta mayor estabilidad a la oxidación con respecto al aceite obtenido en la extracción con solvente.

De Moura *et al.* (2008) analizaron dos endoproteasas comerciales: Protex 6L (proteasa bacteriana alcalina derivada de una cepa de *Bacilluslicheniformis*) y Protex 7L (proteasa bacteriana neutra con actividad endopeptidasa derivada de *Bacillus amilo liquefaciens*) sobre el rendimiento del aceite y proteína extraída de las ojuelas de soya durante la extracción acuosa asistida por enzimas, encontrando que Protex 6L fue más efectivo que Protex 7L con rendimientos de extracción de aceite y de proteína de 96 y 85%, respectivamente, ambas analizadas a una concentración enzimática de 0.5%.

Taha y Hassanein (2007) estudiaron el efecto del pretratamiento con enzimas sobre la extracción del aceite de las hojuelas de la semilla de algodón. Los preparados enzimáticos que investigaron fueron proteasa bacteriana, papaína, savinasa, termamil, pectinasa y celulasa. Las variables estudiadas durante los experimentos de hidrólisis enzimática fueron concentración de enzima (1, 2 y 3%, v/v), relación sólido:líquido (5.5:1, 7:1 y 10.5:1 w/w) y el tiempo de hidrólisis (3 y 6h). Los autores evaluaron el efecto individual y combinado de los preparados enzimáticos, comparando los resultados frente a un tratamiento control, el cual consistió en la extracción del aceite por soxhlet, ellos encontraron que todos los tratamientos tratados con los preparados enzimáticos incrementaron el porcentaje de aceite extraído con respecto al tratamiento control. El porcentaje de aceite extraído que obtuvieron aplicando los diferentes tratamientos enzimáticos (a una concentración enzimática de 3%) fue proteasa bacteriana 25.9%, papaína 25.0% , savinasa 23.9%,

termamil 23.94% y para el tratamiento control fue de 20.5%, esto puede estar relacionado con que las proteasas actúan sobre las moléculas de las lipoproteínas degradándolas a moléculas simples, liberando el aceite extra. En el caso del efecto combinado, los autores encuentran un incremento en el rendimiento de la extracción de aceite al emplear en combinación los preparados enzimáticos frente a los preparados enzimáticos que se emplearon individualmente. El análisis estadístico mostro diferencias significativas ( $p < 0.05\%$ ) entre el control y las distintas mezclas de los preparados enzimáticos. El porcentaje de aceite extraído con la combinación de las enzimas fue: savinasa-pectinasa-proteasa bacteriana 44.9%, savinasa-pectinasa 39.7%, savinasa celulosa-pectinasa 38.9%, savinasa-proteasa bacteriana 37.1%, savinasa-termamil 34.9%, savinasa-celulosa 30.1% y savinas-papaína 28.9%. Estos resultados indican que es necesaria la combinación de las actividades enzimáticas de los preparados, debido a que la pared celular de las semillas oleaginosas está compuesta por celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina y proteínas, por lo que, el tratamiento de las células de las semillas oleaginosas con el consorcio de varias enzimas específicas es necesario para hidrolizar estos compuestos y liberar más aceite.

En 2006, Grasso *et al.* Investigaron el efecto del pre-tratamiento enzimático de hojuelas de soya sobre el rendimiento del aceite extraído. Para determinar las condiciones óptimas que permitan un máximo rendimiento del aceite aplicaron una metodología de superficie de respuesta, las variables evaluadas fueron PH, temperatura y tiempo de hidrolisis enzimática cada una de ellas evaluadas a tres niveles. Los resultados mostraron un máximo rendimiento de 26.64% del aceite extraído en base seca bajo las condiciones óptimas de temperatura 43°C, pH 5.4 y tiempo de incubación de 5.8 h.

Un estudio realizado por Sant'Anna *et al.* (2003) permitió la selección de enzimas con actividad hidrolítica así como de los parámetros de extracción que proporcionen el mejor rendimiento de extracción del aceite de coco en un proceso acuoso. Las enzimas hidrolíticas empleadas fueron Celluclast 1.5L, Termamyl 120L, Viscozyme L, Neutrassa 1.5MG, Pectinex 3XL y Alcalase. Los resultados indicaron que la combinación entre Viscozyme L y Neutrassa 1.5MG incrementan el porcentaje de aceite alrededor de un 60 % con respecto al tratamiento control, empleando concentraciones de Viscozyme L y Neutrassa 1.5MG de 0.6% (w/w) y 0.3% (w/w), respectivamente, con un tiempo de incubación de 30 min, una relación sustrato: agua de 1.6 y utilizando el pH de la muestra (alrededor de 7, sin ajustar). En base a estos resultados, los autores concluyen que el método de extracción acuoso asistido por enzimas ha demostrado ser una técnica eficaz para obtener un mayor rendimiento de aceite.

Taha *et al.* (2002) Llevaron a cabo un pretratamiento enzimático en el proceso de extracción de aceite de las hojuelas de algodón comparando el uso de enzimas crudas (celulasa, hemicelulasa y pectinasa) frente al uso de mezcla de enzimas, resultando que cuando se trabajan en forma individual las enzimas, los niveles de rendimiento de aceite aumentan en comparación con las semillas de algodón sin tratar; sin embargo, el rendimiento del aceite extraído aumento con la mezcla de enzima.

Los procesos industriales para la extracción de aceite comestible a partir de semillas oleaginosas generalmente implican una etapa de extracción de disolvente que puede o no estar precedida por prensado. En el pasado, la principal preocupación de este proceso ha sido las implicaciones de seguridad. Esto provocó intentos para desarrollar procesos basados en el uso de medios de extracción acuosas que no tuvieron éxito debido principalmente a rendimientos bajos de aceite. El escenario en la actualidad parece estar cambiando. El interés en los procesos de extracción acuosa ha sido revivido por la creciente preocupación medioambiental. Un proceso acuoso es visto como una tecnología alternativa ambientalmente más limpia para la extracción de aceite (Rosenthal, 1999).

Se han realizado diversas investigaciones donde se aplican tratamientos enzimáticos en procesos acuosos con el objetivo de mejorar el rendimiento de extracción de aceites de semillas oleaginosas. En 1995 Domínguez *et al.*, realizaron una investigación sobre el proceso acuoso de soja con tecnología enzimática para la extracción de aceite y producción de aislados de proteínas, donde la degradación de la estructura de la pared vegetal, causada por el ataque enzimático, aumentó la extractabilidad del aceite en un 10%, respecto al aceite total extraíble además de que la enzima empleada es reutilizable en etapas posteriores, lo que supone un ahorro económico en el proceso. Por otra parte, Schwartz *et al.* (2007), estudiaron el mejoramiento del rendimiento de la extracción de aceite de aguacate con dos preparados enzimáticos: Pectinex Ultra SL-P y Olivex, así como la mezcla de ellos, obteniendo rendimientos de 80% con el preparado enzimático Pectinex Ultra SL-P, 71% con el preparado enzimático Olivex y 82% con la mezcla de los preparados enzimáticos.

Sandoval-Aldana *et al.* (2009), estudiaron el rendimiento en la extracción del aceite de frutos de aguacate cv Has, utilizando dos preparados enzimáticos: Maxolive y Rapidase con los que obtuvieron rendimientos de 48,36% y 48,25% respectivamente, concluyendo que sin el tratamiento previo con enzimas no es posible la extracción de aceite utilizando prensa hidráulica, ya que las actividades pectolítica y hemicelulolítica de las enzimas permiten la degradación de la pared celular y de esta forma se logra la extracción del aceite.

El uso de algunos preparados celulolíticos en el proceso de extracción ha tenido un efecto positivo sobre el rendimiento de la extractibilidad del aceite, la degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular de los vegetales juega un papel importante en la extracción de los compuestos presentes en vegetales y frutas, porque los preparados enzimáticos incrementan la formación de poros, el tamaño de poro y la porosidad total del sustrato, lo que permite mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

Analizando las consideraciones anteriores particularmente el alto contenido graso de las semillas de cacaté, las fracciones que conforman la fibra de los frutos, los escasos estudios sobre la extracción de aceite y su composición, en este trabajo de investigación se propone evaluar las relaciones adecuadas en las cuales se obtienen mejor rendimiento de aceite y optimizarlas ya que por los reportes disponibles, el cacaté podría ser una excelente alternativa no convencional de semillas oleaginosas para la obtención de aceite comestible y en su caso el piñón es una nueva fuente energética que actualmente ya se emplean y también se pretende optimizar la relación adecuada para su mejor rendimiento.

CAPITULO 3

HIPOTESIS Y

OBJETIVOS

### **3 HIPÓTESIS GENERAL**

Es posible obtener un alto rendimiento en la extracción de aceites de semillas no convencionales mediante el uso de complejo enzimáticos hidrolíticas *Viscozyme L*, *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* y *Celulasa* se logra facilitar la liberación de una mayor cantidad de aceite y su consecuente separación de la matriz sólida original.

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el comportamiento cinético del proceso de extracción del aceite de piñón, cacaté y pistache empleando complejo enzimáticos hidrolíticos, *Viscozyme L*, *Pectinasa de Aspergillus Acuelatus* y *Celulasa*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

.Evaluar la influencia de la relación sólido: líquido sobre el rendimiento de extracción de aceite en medio acuoso mediante la adición de enzimas.

.Optimizar en qué condiciones del proceso se maximizan los rendimientos en la extracción de aceite.



CAPITULO 4  
MATERIALES Y  
MÉTODOS  
GENERALES

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 Cacaté (*Oecopetalum mexicanum*)

Las semillas de cacaté (*Oecopetalum mexicanum*) fueron recolectados en el municipio de Tecpatán, Chiapas; correspondiente a la primer cosecha del mes de septiembre del 2010 aproximadamente a los 8 años de floración. Se empleó un lote de 30 kg de semilla de cacaté, seleccionando visualmente aquellos que no presentaran daños físicos aparentes (Sant'Anna *et al.* 2003). Las semillas fueron colocadas en bolsas negras de polietileno y almacenadas a 4°C en el refrigerador marca Torrey, hasta el momento de su uso.

La semilla de cacaté que fue utilizada para este proyecto ya estaba molida y almacenada en refrigeración para el momento de su uso.

#### 4.1.2 Localización geográfica del cultivo de cacaté

Tecpatán es una localidad del estado de Chiapas, sus coordenadas geográficas son 17°08'10"N y 93°18'40"O, a una altitud de 320 msnm. El clima de este municipio es cálido húmedo. Limita al norte con el estado de Tabasco y el municipio de Ostuacan, al este con los municipios Francisco león, Copainala y Ocoatepec; al sur, con los municipios de Berriozábal, Ocozocuatla y Cintalapa y al oeste con el estado de Veracruz (INEGI, 2005).

#### 4.1.3 Piñón (*Jatropha curcas* L.)

Las semillas de *Jatropha* fueron seleccionadas por inspección eliminando las que presentaban daño físico aparente, las semillas seleccionadas fueron colocadas en bolsas negras de polietileno y almacenadas a 4°C en el refrigerador marca Torrey hasta el momento de su uso.

Se descongeló 2,0 Kg de semillas de *Jatropha curcas* a temperatura ambiente durante 12 h en una campana de extracción.

Las semillas de *Jatropha* con endospermo y testa fueron molidas en un molino de discos marca Engineering Industrial. Posteriormente se separó por tamaños a través de una serie de tamices marca Mont-Inox con número progresivo 6, 8,10, 16, 20, 30 y 50 utilizando una tamizadora marca LuhengInstrument Co durante 20 min con una carga de 100 g, obteniéndose una harina granulométricamente variada y se calculó el rendimiento de molienda. Se almacenó hasta su uso en frascos ámbar de 1 L de capacidad en el refrigerador marca Torrey a 4 °C.

De igual manera como el cacaté el piñón ya se encontraba molido y almacenado en refrigeración hasta el momento en que se le dio el uso.

#### **4.1.4 Localización geográfica del piñón**

Se utilizó un lote de 3,7 Kg de semillas de *Jatropha curcas* que fueron recolectadas en el municipio de Chiapa de Corzo ubicado entre los paralelos 16°17' y 16°55' de latitud norte; los meridianos 92°48' y 93°06' de longitud oeste; altitud entre 200 y 1 800 m, colinda al norte con los municipios de Osumacinta, Soyaló e Ixtapa; al este con los municipios de Ixtapa, Zinacantán, Acala, y Venustiano Carranza; al sur con los municipios de Venustiano Carranza y Villa Corzo; al oeste con los municipios de Villa Corzo, Villaflores, Suchiapa, Tuxtla Gutiérrez y Osumacinta (INEGI, 2005).

#### **4.1.5 Pistacho (*Pistacia vera* L)**

Las semillas fueron seleccionadas por inspección, eliminando las que tenían algún daño físico aparente, se les elimino la capa exterior a cada semilla separando la nuez, se usó molino de engrane que se manipulo manualmente para la molienda de la semilla, la harina de la semilla granulométricamente variada fueron colocadas en frasco ámbar almacenadas a 4°C en el refrigerador marca Torrey hasta el momento de su uso.

#### **4.1.6 Localización geográfica de la semilla de pistacho (*Pistacia vera* L)**

Se utilizó un lote de 4 kg de semilla de pistacho que fue conseguido mediante un proveedor de San Cristóbal de las Casas.

#### 4.1.7 Enzimas

A continuación en la tabla 4.1 se describe los complejos enzimáticos empleados para cada etapa del trabajo. (Anexo A-1)

**Tabla 4.1 descripción de los complejos enzimáticos comerciales**

<b>PREPARADO ENZIMÁTICO</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>FUENTE</b>	<b>TEMPERATURA ÓPTIMA</b>
<b><i>Viscozyme L.</i></b>	hemicelulasa, celulasa	<i>Aspergillus sp</i>	40-50°C
<b><i>Pectinasa de Aspergillus Aculeatus.</i></b>	hemicelulasa, celulasa, pectinasa.	<i>Aspergillus oculeatus</i>	40-60°C
<b><i>Celulasa</i></b>	celulasa	<i>Trichoderma longibrachatum</i>	55°C

## 4.2 METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN ACUOSA ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE CACATÉ, PIÑÓN y PISTACHO.

En la figura 4.1 se muestra el diagrama de flujo del procedimiento empleado para la extracción de los aceites de cacaté, piñón y pistache.

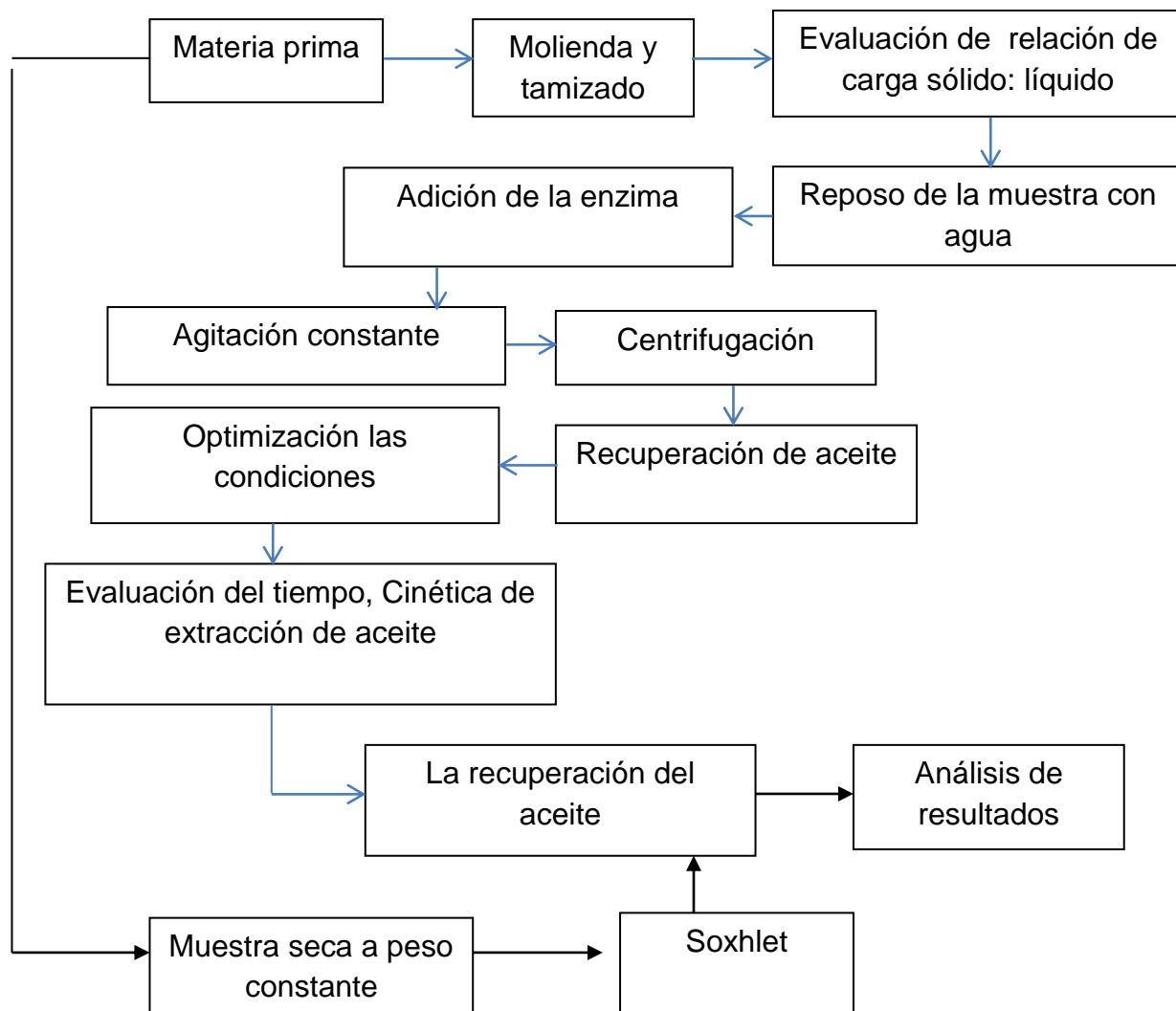


Figura 4.1 Metodología para la extracción acuosa enzimática de aceite de piñón y cacaté

#### 4.2.1 Determinación del contenido de aceite (soxhlet)

El contenido de aceite se determina como “grasa cruda” y se incluyen en la determinación los triglicéridos, que constituyen cerca del 99%, y el 1% restante constituido por diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, pigmentos liposolubles, vitaminas liposolubles, esteroides, alcoholes de alto peso molecular, etc. El contenido de grasa cruda se determina por extracción directa con un disolvente orgánico, tal como éter de petróleo y hexano. El éter de petróleo (fracción 40-60 °C) es el mejor agente de extracción directa de la grasa a partir de materiales secos, es más eficiente pero extrae también sustancias no grasas. Los métodos de referencia implican la determinación por pesada de la materia grasa. El método se realiza de la manera más conveniente utilizando extractores del tipo Butt o del tipo Soxhlet (figura 4.2) (Pearson, 1981 y Horwitz, AOAC, 1998).

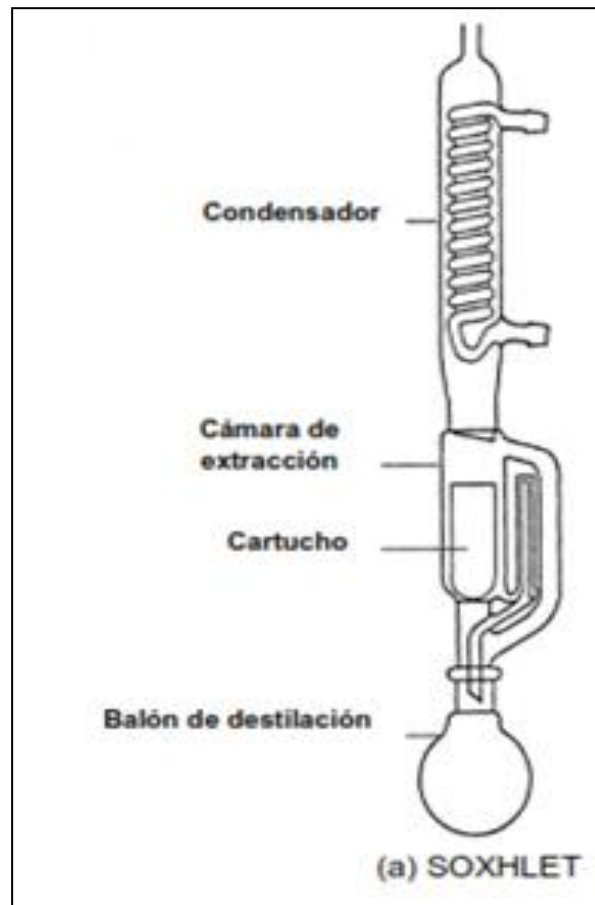


Figura 4.2 Esquema de los equipos empleados para determinar materia grasa.

**Procedimiento:** se coloca la muestra sólida seca en el cartucho de papel de filtro y se pesa. Colocar un segundo cartucho de papel de filtro para prevenir pérdidas de muestra, dejando abierta la parte superior del cartucho. Colocar una pieza de algodón adsorbente en la boca abierta del cartucho, a fin de distribuir el goteo del solvente. Colocar un volumen de hexano en el balón de destilación previamente tarado. Asegurarse que el volumen empleado es suficiente como para evitar que el balón se seque y/o el material extraído se sobrecaliente. Armar el equipo y calentar el hexano sobre una placa eléctrica. Mantener el goteo de solvente a una velocidad  $\geq 150$  gotas por minuto durante 6 h. Desarmar el equipo y destilar el hexano contenido en el balón. Completar la eliminación del solvente en estufa a  $102\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante (1 a 2 h). Enfriar en desecador y pesar. El contenido graso se

Calcula según:

$$\% \text{contenido graso} = \frac{(P_2 - P_1) \cdot 100}{P_3}$$

Donde  $P_1$  = peso en g del balón de destilación empleado,  $P_2$  = peso del balón en g conteniendo el extracto y  $P_3$  = peso en g de la muestra (Horwitz, AOAC, 1998).

#### 4.2.2 Extracción acuosa enzimática

En la primera etapa del proceso de extracción de aceite se determinaron los mejores rendimientos de aceite, evaluando cuatro relaciones S:L(1:3, 1:4, 1:5 y 1:6)(tabla 4.2) a cada semilla, realizando cada relación por triplicado, en el proceso se usaron tres enzimas diferentes, usando solo la enzima Viscozyme L para la semilla de cacaté y piñón y en el pistache se evaluaron las tres enzimas de manera separada, para cada enzima se evaluaron las cuatro relaciones obteniendo de esa manera la mejor condición S:L, la variable de respuesta fue la cantidad de aceite obtenido en cada una de esas condiciones.

**Tabla 4.2 Etapa 1 evaluación de las condiciones en relación solido: líquido**

<b>PISTACHE</b>	VISCOZYME L.	1:3,1:4,1:5,1:6 (CADA RELACIÓN POR TRIPLICADO)
	<i>PECTINASA DE ASPERGILLUS ACUELATUS.</i>	1:3,1:4,1:5,1:6 (CADA RELACIÓN POR TRIPLICADO)
	CELULASA.	1:3,1:4,1:5,1:6 (CADA RELACIÓN POR TRIPLICADO)
<b>PIÑÓN</b>	VISCOZYME L.	1:3,1:4,1:5,1:6 (CADA RELACIÓN POR TRIPLICADO)
<b>CACATÉ</b>	VISCOZYME L.	1:3,1:4,1:5,1:6 (CADA RELACIÓN POR TRIPLICADO)

Para evaluar cada relación en la primera etapa del proceso y optimizar la cantidad de agua apropiada para la extracción de aceite de cada semilla, se pesaron las cantidades de molidas respectivas (mismo procedimiento para cada semilla), cada relación se realizó por triplicado, a la harina se le adicionó agua destilada (cantidad de agua de acuerdo a la relación S:L que se siguió en cada tratamiento) dejándolo en reposo y refrigeración por 24 horas, una vez hidratada la harina se adiciona el preparado enzimático a una concentración de 2%. En cada lote se utilizó el preparado enzimático, a temperatura ambiente con una velocidad de agitación de 200 rpm por un periodo de 4 h en una agitadora marca New Brunswick Scientific. Transcurrido el tiempo de hidrólisis cada matraz fue sometido a un baño de agua con calentamiento a 100°C durante 5 min, seguido de un baño frío por 5 min para inactivar la enzima.

El contenido de cada matraz fue trasladado a tubos Falcón de 50 mL, los cuales fueron centrifugados a 20,000 rpm durante 25 min a una temperatura de 4°C en una centrifuga marca Eppendorf. También se incluyó un tratamiento testigo, el cual se sometió al mismo tratamiento descrito sólo que no contenía enzima.

A continuación se implementó la técnica para la separación de la fracción de aceite extraído y la cuantificación para la optimización de las condiciones adecuadas, el



aceite obtenido se pesó y los resultados se registraron en gramos, usando las relaciones de mayor rendimiento para el desarrollo experimental de la cinética. (tabla 4.3)

**Tabla 4.3 Descripción de las etapas realizadas en el trabajo**

SEMILLA	COMPLEJO ENZIMATICO	ETAPA 1	ETAPA 2
<b>CACATÉ</b>	<i>VISCOZYME L.</i>	EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES EN RELACIÓN A CANTIDAD SÓLIDO: LÍQUIDO	EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA BAJO LAS CONDICIONES DE LA ETAPA 1.
<b>PIÑÓN</b>	<i>VISCOZYME L</i>		
<b>PISTACHE</b>	<i>VISCOZYME L.</i> <i>PECTINASA DE ASPERGILLUS ACULEATUS.</i> <i>CELULASA.</i>		

Para la cinética se realizó el mismo procedimiento, por triplicado, se evaluó el tiempo en el que el rendimiento de aceite es mayor, se realizó la evaluación cada 30 min, durante varias horas, tomando el primer tratamiento en el tiempo 0, y cada 30 min respectivamente. Los tratamientos fueron enumerados de la siguiente manera para cada cinética 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8 etc., por triplicado. Para determinar el tiempo en el cual se obtuvo mejor respuesta se realizó una curva con los resultados obtenidos de la cantidad de aceite.

En la tercera parte del proyecto se realizó la extracción de aceite de 5g de muestra seca de cada semilla a peso constante, usando el equipo soxhlet y realizando la extracción con hexano como solvente, la operación duro 6h, para cada semilla.

## 4.3 DISEÑO ESTADÍSTICO

### 4.3.1 Identificación y exposición del problema

La hidrolisis enzimática de *Jatropha Curcas L* ,*Oecopetalum mexicanum* y *Pistacia vera L.* se realizó por triplicado, en la primera etapa se realizó la prueba de cuatro relaciones S:L, en la segunda etapa se desarrolló la cinética de extracción de en las condiciones adecuadas del proceso cada 30 min durante varias horas.

Elección de los factores, niveles y rangos

El experimento fue ejecutado con un solo factor con:

a= cantidad de agua (1:3; 1:4; 1:5, 1:6)

n= 3 repeticiones

### 4.3.2 Etapa 1

#### Selección de la variable de respuesta

Está definida por el resultado de la influencia de la relación S:L sobre el rendimiento del aceite. Esta etapa se realizó con el fin de optimizar las condiciones de la hidrolisis acuosa enzimática de cada semilla.

El diseño consistió en evaluar cuatro relaciones S:L, cada una por triplicado, la cual sumaron doce unidades experimentales, todas las relaciones evaluadas fueron sometidas a las mismas condiciones de temperatura, 200 rpm durante 4h. El mismo diseño fue usado para el piñón, cacaté y pistache tabla 4.4. En el caso del piñón y cacaté donde solo se usó una enzima la relación S:L fue evaluada solo para esa enzima, en el pistache la relación S:L fue evaluada para cada una de las tres enzimas utilizadas.

**Tabla 4.4 Tratamientos con cada relación de carga sólido: líquido**

Número de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tratamientos												
Relación	1:3	1:3	1:3	1:4	1:4	1:4	1:5	1:5	1:5	1:6	1:6	1:6
Sólido: líquido												

En esta etapa se realiza la comparación de las cantidades de aceite obtenido en cada una de las relaciones S.L de las tres semillas en cada enzima empleada, una vez optimizadas las condiciones en esta primera etapa se realiza la cinética de extracción de aceite para evaluar el tiempo de hidrolisis en la que se obtiene mayor cantidad de aceite.

### **4.3.3 Etapa 2**

#### **Selección de la variable de respuesta**

La etapa consiste en evaluar la influencia del tiempo en el resultado del aceite obtenido, por la cual se lleva a cabo la cinética de extracción de aceite de las tres semillas con las enzimas respectivas con la cual se trabajó cada una de ellas en la etapa anterior, el objetivo de esta etapa fue obtener los rendimientos de aceite en la cinética cada 30 min empezando por el tiempo cero, el ensayo del tiempo cero no contenía enzima pero fue sometido a 5 min en agua hirviendo y luego 5 min de agua fría, como el procedimiento que se llevó a cabo para inactivar la enzima de los demás ensayos.

La cinética se realizó evaluando cada media hora la cantidad de aceite obtenida después de la hidrólisis para cada semilla con cada una de las enzimas empleadas, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación de la etapa 1 y tomando en cuenta el resultado de la evaluación de la relación S:L. La cinética se realizó en 4h la primera vez, para realizar un pre-análisis de la curva que se realizó con los resultados obtenidos hasta las 4h, después de observar los resultados en algunas semillas se requirió evaluar el tiempo en más de 4h hasta que el resultado se mantuviera constante o en el menor de los caso decayera.

Esta etapa obtiene como resultado el tiempo en el que se alcanza la cantidad máxima de aceite extraído con la hidrólisis enzimática.

### **4.4 RECUPERACIÓN DEL ACEITE**

La fracción de aceite se recuperó extrayendo con una jeringa y se almacenó en tubos Ependorf de 20 ml a 4°C. La fase acuosa y sólida fue almacenada en tubos Falcón bajo las mismas condiciones que el aceite. Los resultados de las dos etapas del proceso son aproximados debido al método de separación del aceite de la fase acuosa.

CAPITULO 5  
RESULTADOS  
Y  
DISCUSIONES

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1 RECUPERACIÓN DEL ACEITE DESPUÉS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, PARA LA EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA RELACIÓN SÓLIDO: LÍQUIDO

En la tabla 5.1 se presentan los resultados de la hidrólisis enzimática para la evaluación del efecto de las relaciones S:L para la semilla de piñón, empleando la enzima *Viscozyme L*.

**Tabla 5.1 Influencia de la relación de carga sólido: líquido sobre el rendimiento de aceite extraído de la semilla de piñón**

Relación sólido: líquido	Recuperación del aceite en gr.	Promedio	% de aceite extraído
1:3	5.86	1.95±0.0215	39.09 <sup>b</sup>
1:4	3.80	1.27±0.08	25.34 <sup>c</sup>
1:5	6.84	2.28±0.18	45.58 <sup>a</sup>
1:6	6.86	2.29±0.01	45.73 <sup>a</sup>

En la tabla 5.1 muestran los resultados de las tres repeticiones en el ensayo experimental. La relación con mejor rendimiento de aceite extraído fue de 1:6. Estadísticamente la relación 1:3 y 1:6 son diferentes, mientras que los resultados de la relación 1:5 y 1:6 no muestran una diferencia significativa entonces es decir son iguales. Los resultados sugieren que para el caso del piñón no se le atribuye a que en suspensiones muy diluidas, la posibilidad de la interacción enzima-sustrato es baja (Li *et al.*, 2001), por lo tanto puede favorecerse el resultado del aceite obtenido. La desventaja de este tipo de suspensiones es la separación del aceite de la fase acuosa, esto pudo deberse a que en suspensiones muy diluidas se favorece la formación de una emulsión estable que dificulta mantener el aceite en suspensión (De Moura *et al.*, 2008).

La tabla 5.2 muestra los resultados de la hidrólisis enzimática para la evaluación S: L de la semilla de cacatú empleando la enzima *Viscozyme L*.

La relación S: L 1:5 es donde se obtuvo la mayor cantidad de aceite, entre la relación 1:5 y 1:6 no hubo diferencia estadística significativa, por lo tanto tomando en cuenta las ventajas de una suspensión con menos contenido de agua, la relación S:L 1:5 es la más adecuada para la extracción de aceite de cacat  empleando la enzima *Viscozyme L*. resultados similares han sido reportados por Moura y Johnson (2009) encontrando el máximo rendimiento en una relación 1:5.

**Tabla 5.2 Influencia de la relación de carga sólido: líquido sobre el rendimiento de aceite extraído de la semilla de cacat **

Relación sólido: líquido	Recuperación del aceite en gr.	Promedio	% de aceite extraído
1:3	0.9	0.3±0.01	6 <sup>c</sup>
1:4	2.4	0.8±0.01	16 <sup>b</sup>
1:5	8.3	2.77±0.015	55.3 <sup>a</sup>
1:6	7.8	2.6±0.02	52 <sup>a</sup>

Picuric-Jovanovic *et al.*, (1997) mencionan que una adecuada relación sólido: líquido permitirá el acceso de la enzima a la pared celular de la semilla oleaginosa ya que permite la difusión de la enzima hacia el sustrato.

Los resultados que se muestran en la tabla 5.3 corresponden a la hidrolisis enzimática de la semilla de pistacho de la evaluación S: L con tres enzimas diferentes, *Viscozyme L*, *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* y *Celulasa*.

El resultado de la tabla 5.3 para la evaluación de la relación sólido: líquido de la semilla de pistacho se utilizaron tres complejos enzimáticos a diferencia de las otras dos semillas, por lo tanto la evaluación se realizó para las tres enzimas.

Los resultados muestran que para la enzima *Viscozyme L*, la relación con mayor aceite extraído (12%) después de las 4 h de hidrolisis enzimática fue la relación de carga 1:5.

Los resultados obtenidos de la relación 1:5 y 1:6 no presentaron una diferencia estadística significativa. Resultados similares han sido reportados por Moura y Johnson (2009) encontrando el máximo rendimiento en una relación 1:5.

Para la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus*, el mayor porcentaje de aceite extraído se obtuvo con la relación S: L 1:6, analizando la tabla 5.3 podemos ver que los resultados de las relación de carga 1:3 y 1:5 tampoco son muy variables, por lo

tanto si solo tomamos en cuenta el % de las tres repeticiones de la relación 1:6 podemos decir que la condición óptima para la semilla de pistacho empleando la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* es la relación S: L 1:6. Los resultados fueron similares para la semilla de piñón con el empleo de la enzima *Viscozyme L*.

**Tabla 5.3 Influencia de la relación de carga sólido: líquido sobre el rendimiento de aceite extraído de la semilla de pistacho**

<b>a) <i>Viscozyme L</i></b>			
<b>Relación sólido: líquido</b>	<b>Recuperación del aceite en gr.</b>	<b>Promedio</b>	<b>% de aceite extraído</b>
<b>1:3</b>	0.9	0.3±0.001	6
<b>1:4</b>	1	0.33±0.001	6.67
<b>1:5</b>	1.8	0.6±0.011	12
<b>1:6</b>	1.7	0.57±0.0025	11.33
<b>b) <i>Pectinasa de Aspergillus Aculeatus</i></b>			
<b>Relación sólido: líquido</b>	<b>Recuperación del aceite en gr.</b>	<b>Promedio</b>	<b>% de aceite extraído</b>
<b>1:3</b>	3.5	1.17±0.004	23.33
<b>1:4</b>	2.6	0.87±0.0023	17.33
<b>1:5</b>	3.4	1.13±0.0012	22.67
<b>1:6</b>	3.9	1.3±0.002	26
<b>c) <i>Celulasa</i></b>			
<b>Relación sólido: líquido</b>	<b>Recuperación del aceite en gr.</b>	<b>Promedio</b>	<b>% de aceite extraído</b>
<b>1:3</b>	3.1	1.33±0.0011	20.67
<b>1:4</b>	2.1	0.7±0.0015	14
<b>1:5</b>	2.6	0.87±0.001	17.33
<b>1:6</b>	2.8	0.93±0.001	18.67

La tabla 5.3 parte c muestra los resultados de la prueba de la relación de carga S: L de la semilla de pistacho empleando la enzima *Celulasa*, obteniéndose el mayor porcentaje de aceite extraído empleando la relación 1:3, los resultados de la relación

1:3 y 1:6 no tiene una diferencia estadística significativa, lo mismo sucede con la relación 1:5 y 1:6. Por las ventajas que tiene el uso de poca agua al momento de la separación del aceite de la fase acuosa, la relación 1:3 es la óptima para realizar la hidrólisis enzimática con el empleo de la enzima *Celulasa*.

Los resultados de la prueba de relación se realizó con el fin de saber en qué concentraciones de agua había un mayor rendimiento de aceite para cada semilla con cada complejo enzimático empleado. Para la siguiente etapa se evaluó el comportamiento cinético de la hidrólisis enzimática de las tres semillas empleando las mismas enzimas y las mejores condiciones de la relación sólido: líquido.

## **5.2 RECUPERACION DEL ACEITE DESPUES DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA EVALUANDO LA INFLUENCIA DEL TIEMPO**

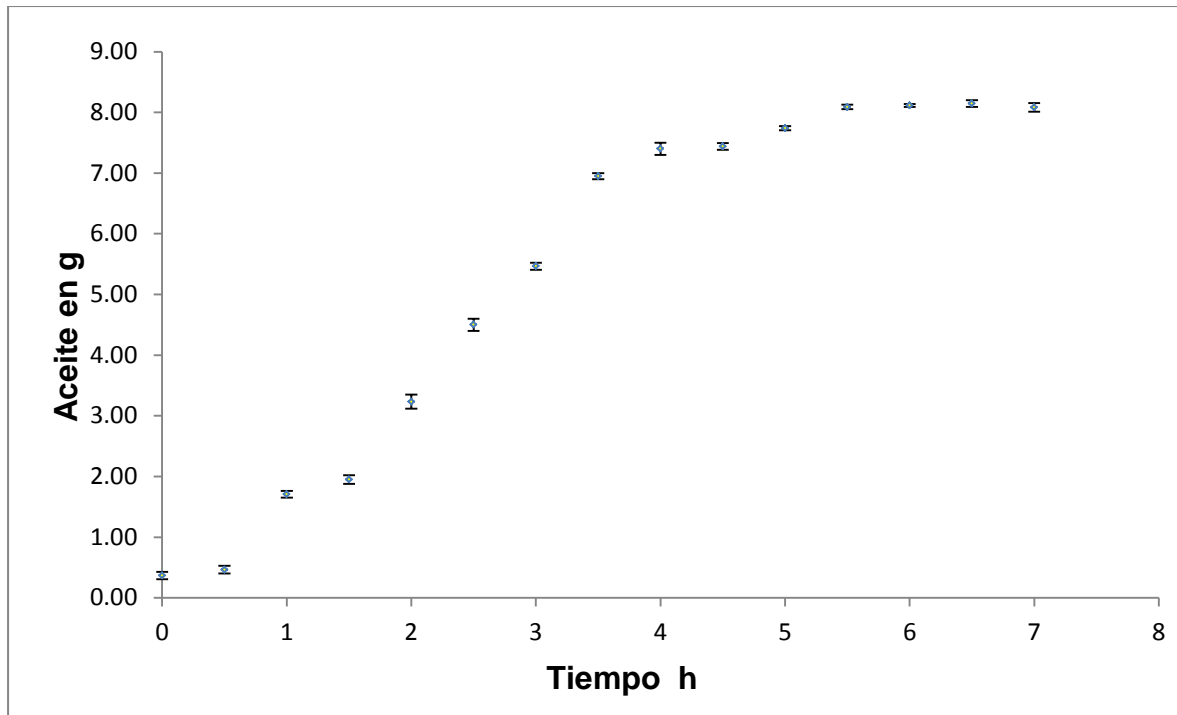
Los siguientes datos muestran los resultados de la cinética de extracción de aceite de las tres semillas, se evalúa el tiempo en el que los rendimientos de aceite son mucho mayor, las gráficas muestran el tiempo en que las cantidades de aceite se mantienen constantes.

### **5.2.1 Cinética de extracción de aceite de piñón**

La grafica (figura 5.1) muestra los resultados de la cinética de extracción de aceite de la semilla de piñón. Para la hidrólisis enzimática se empleó 15 g de muestra de harina, se utilizó la relación optima S:L 1:6 obtenida en la primera parte del proyecto, empleando *Viscozyme L*. La concentración de enzima empleada en ambas etapas del experimento fue de 0.2 %.

La grafica (figura 5.1) muestra que a un tiempo de incubación de 6.5 h se alcanzó el máximo contenido de aceite extraído de la hidrólisis acuosa enzimática ( $8.15 \pm 0.06$ ) de la semilla de piñón empleando la enzima *Viscozyme L*. El resultado de las 6 y 6.5 h deja ver que no hay una diferencia significativa en cuanto a la cantidad de aceite, en un tiempo mayor (7 h) no se observó diferencia significativa con respecto a 6.5 h.

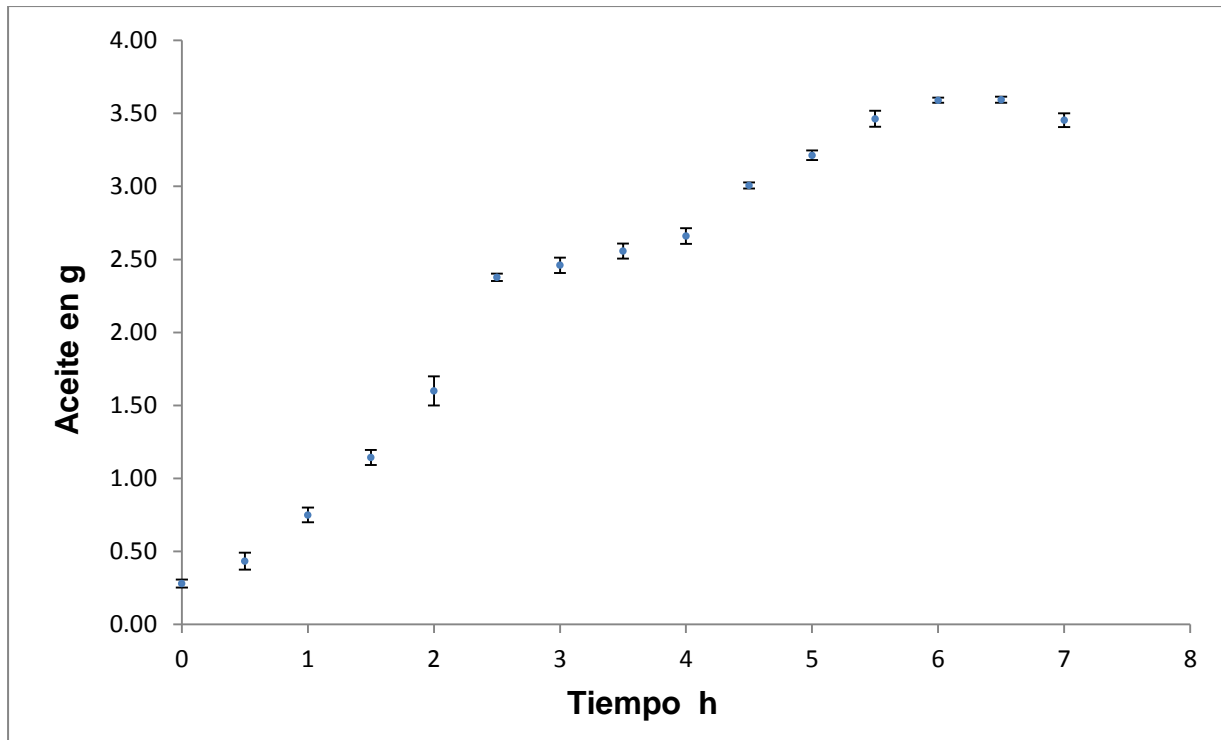




**Figura 5.1 influencia del tiempo en la extracción de aceite de piñón empleando la enzima *Viscozyme L*.**

### 5.2.2 Cinética de extracción de aceite de cacatú

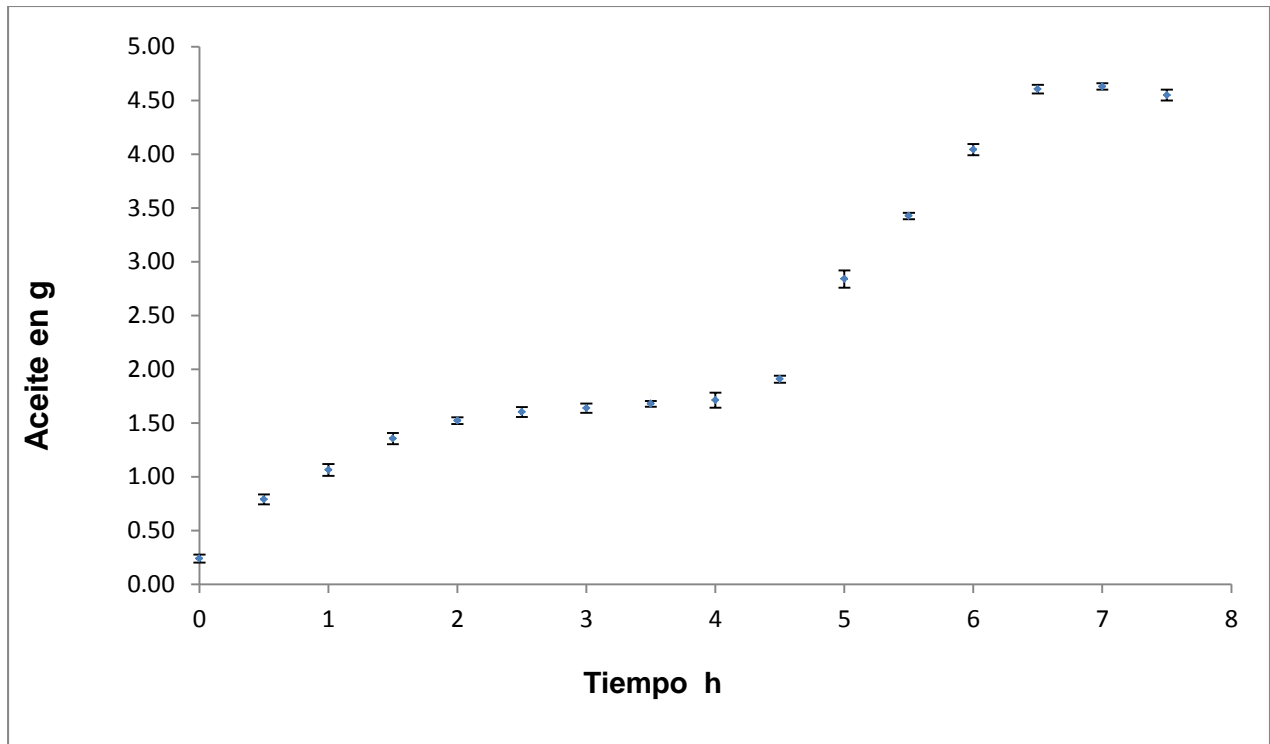
Para la cinética de extracción del aceite de cacatú los resultados muestran que, a las 6 h de la hidrólisis se obtuvo la máxima cantidad de aceite extraído ( $3.59 \pm 0.02$ ), a las 6.5 h el resultado se mantuvo y a las 7h los resultados empiezan a disminuir de manera moderada, eso puede deberse a que con el tiempo de agitación constante se pueden formar emulsiones eso depende también de la cantidad de agua esa es otra de las desventajas de emplear mucha agua y la influencia de tiempo de agitación, los valores de los resultados de aceite extraído son aproximados por el tipo de método empleado para la separación del aceite de la fase acuosa.



**Figura 5.2 influencia del tiempo en la extracción de aceite de cacatú empleando enzima *Viscozyme L*.**

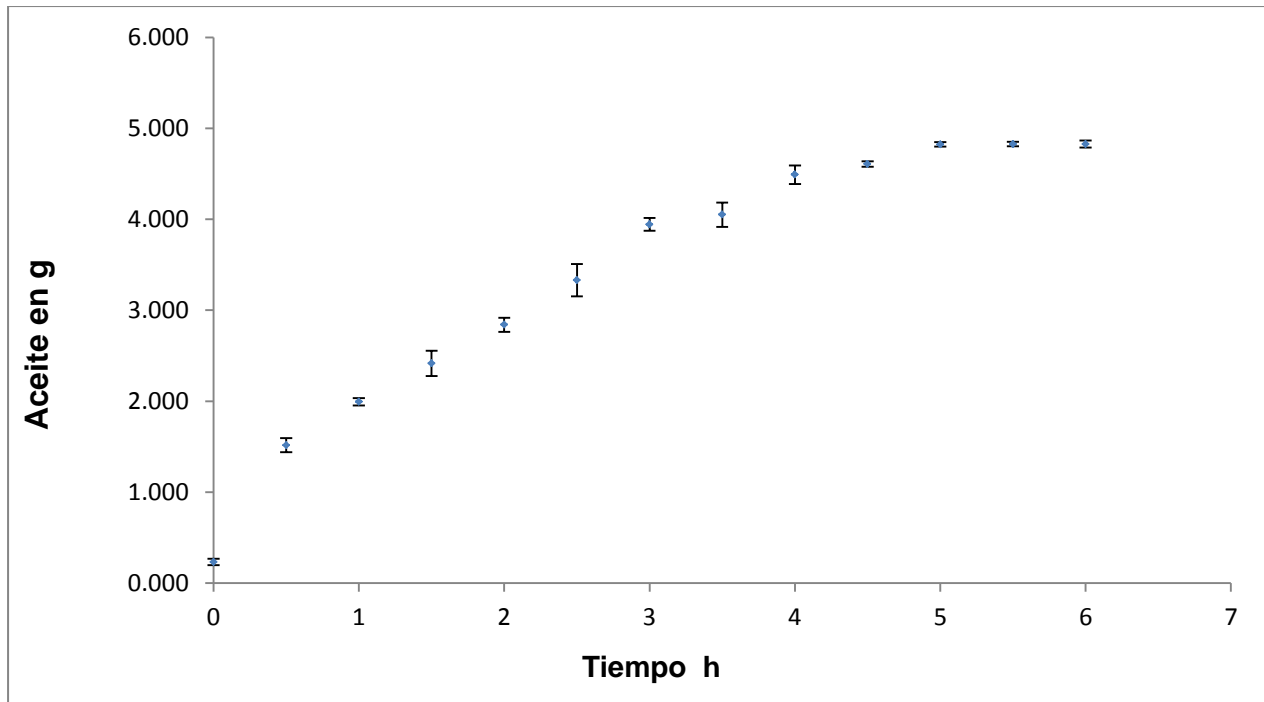
### 5.2.3 cinética de extracción de aceite de pistacho

Los siguientes resultados muestran el tiempo en que se obtuvo mayor cantidad de aceite en la semilla de pistacho, la cinética se realizó para las tres enzimas empleadas en esta semilla por separadas. Los resultados de las cantidades de aceite que se muestran en cada grafica son de tratamientos de 10 g de muestra de harina. Las enzimas empleadas fueron *Viscozyme L*, *Pectinasa de Aspergillus Oculeatus* y *Celulasa*.



**Figura 5.3 influencia del tiempo en la extracción de aceite de pistacho empleando *Viscozyme L*.**

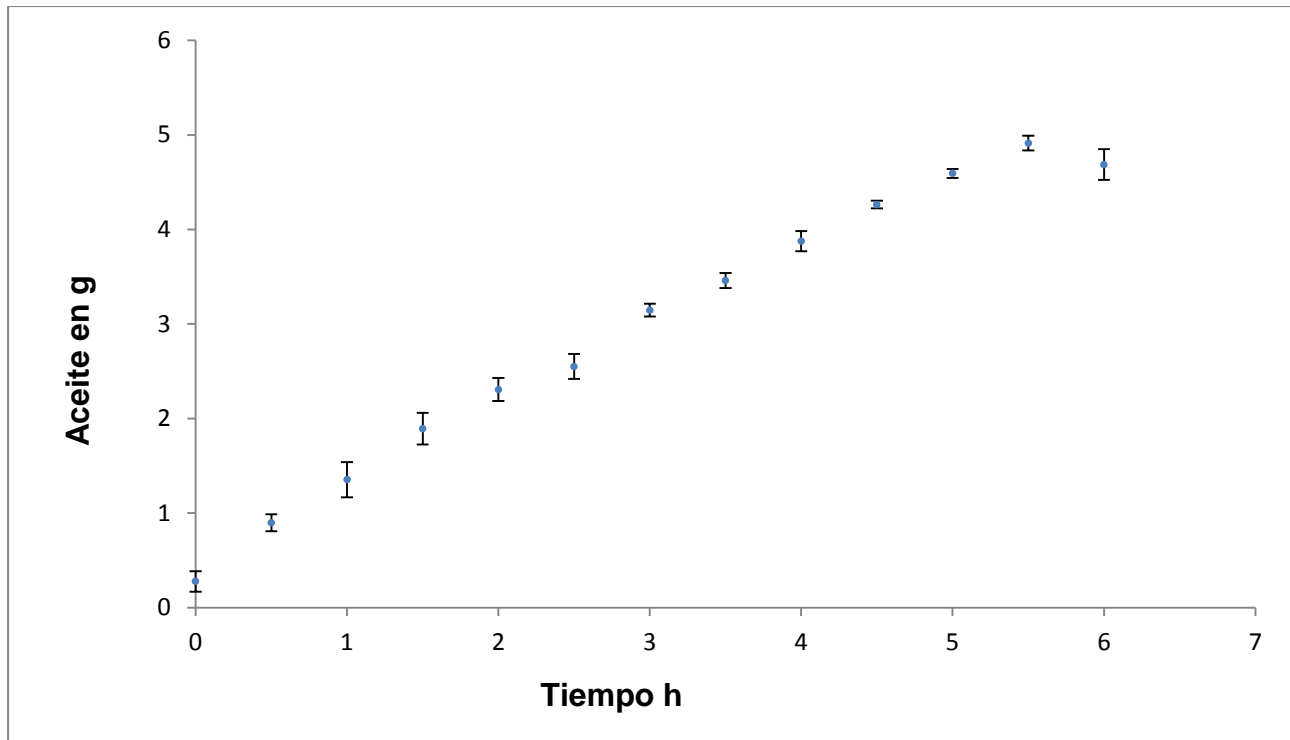
Como podemos observar en la gráfica (figura 5.3) los resultados de la cinética de la semilla de pistacho con la enzima *Viscozyme L*, el comportamiento de la gráfica indica que a las 7h se alcanza obtener con la hidrólisis enzimática la mayor cantidad de aceite ( $4.63 \pm 0.03$ ), la gráfica muestra los resultados de forma ascendente desde el tiempo 0 hasta las 7h, es a las 7.5h que los resultados empiezan a descender de manera moderada.



**Figura 5.4 influencia del tiempo en la extracción de aceite de pistacho empleando enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus*.**

Los resultados de la gráfica (figura 5.4) muestra la cinética de extracción del aceite de pistacho empleando la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus*. Los resultados indican que a las 5 h de la hidrolisis enzimática se alcanzó la máxima recuperación de aceite de la semilla ( $4.823 \pm 0.03$ ), a partir de este tiempo el contenido de aceite extraído se mantuvo constante.

Los resultados que se muestran en la gráfica (figura 5.5) corresponden a la cinética de extracción del aceite de pistacho empleando la enzima *Celulasa*, el comportamiento de la gráfica muestra un aumento lineal gradual en el contenido de aceite extraído conforme transcurrió el tiempo de incubación enzimática obteniéndose la máxima cantidad de aceite a las 5,5h de la hidrolisis enzimática ( $4.913 \pm 0.07$ ).



**Figura 5.5 influencia del tiempo en la extracción de aceite de pistacho empleando enzima *Celulasa*.**

Comparando el comportamiento de la cinética del aceite extraído con la enzima *Viscozyme L* (figura 5.3), el obtenido con la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* (figura 5.4) y la cinética con la enzima *Celulasa* se observa que con *Pectinasa* es posible obtener la mayor cantidad del aceite extraído en un menor tiempo obteniéndose el máximo contenido ( $4.63 \pm 0.03$ g aceite) a las 5 h mientras que con *Viscozyme L* la extracción fue más lenta obteniéndose hasta las 6.5 h un máximo de ( $4.823 \pm 0.03$ g de aceite). Mientras que con *Celulasa* se obtuvo ( $4.913 \pm 0.07$ g aceite) pero en un tiempo de 5.5 h. Independientemente del tipo de enzima empleada con las tres se alcanzó la misma cantidad máxima de aceite pero en diferentes tiempos.

El resultado de la comparación de las gráficas de las tres enzimas empleadas en la cinética de extracción de aceite de pistacho y la evaluación de la influencia del tiempo, como se ve no tienen el mismo comportamiento una enzima requiere más tiempo que las otras dos, lo único que tienen en común es la cantidad de aceite máxima extraída mediante este método porque no tiene una diferencia significativa, por lo tanto podemos decir que la capacidad hidrolíticas de una enzima es mucho

más eficiente que otra por el tiempo que requiere para sacar de la semilla la máxima cantidad de aceite posible, en la hidrólisis influye la concentración de agua por eso las relaciones sólido:líquido utilizada para la evaluación de la influencia del tiempo fue de la primera etapa.

### 5.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACEITE, MÉTODO SOXHLET

En la tercera etapa del proyecto se determinaron las cantidades de aceite de las tres semillas con el método soxhlet con el fin de tener el porcentaje correspondiente de cada semilla y un punto de comparación con los rendimientos del método que se empleó para la cinética de extracción de aceite de las semillas en cada enzima. Para saber el porcentaje de aceite que contiene 5g de muestra seca a peso constante de cada semilla se utilizó la fórmula que se menciona anteriormente donde se explica en qué consiste el método soxhlet.

La tabla 5.4 muestra el contenido de aceite, que se determinaron mediante el método soxhlet, utilizando hexano como solvente.

**Tabla 5.4 Contenido de aceite obtenido mediante el método soxhlet usando hexano como solvente.**

Semilla	Contenido de aceite (Soxhlet)
<i>Jatropha curcas</i> L	58%
<i>Oecopetalum mexicanum</i>	40%
<i>Pistacia vera</i> L.	50%

El contenido de grasa reportado por Makkar et al., (1998) fue de 55-62% para el piñón empleando el método soxhlet. Centurión et al., (2000) reportaron un contenido de grasa de 30.7 % y proteína de 8.0% de una semilla de cacaté cosechada en el municipio de Tlacotalpa, Tabasco. Woodroof (1979) reporta 54.70-58.30% extraído de aceite con éter para la semilla de pistacho.

La variación pudo estar influenciada por las condiciones de extracción del aceite (Solís-Fuentes et al., 2001), la localización geográfica de la zona de recolección, la época de cosecha y los cambios climáticos (Belén et al., 2001; Matos y Acuña, 2010).

Comparando los resultados con las máximas cantidades de aceite obtenido en la hidrólisis enzimática en la etapa donde se realizó la cinética donde se evaluó la influencia del tiempo podemos concluir si el método de extracción que se utilizó para este proyecto resulta conveniente en cuanto a rendimientos, se realiza la comparación del contenido de aceite en la semillas determinado por soxhlet con los de la cinética de extracción de aceite de las semillas.

**Tabla 5.5 Comparación del contenido de aceite extraído mediante el método soxhlet con los obtenidos mediante la hidrólisis acuosa enzimática.**

Semilla	Porcentaje de aceite extraído	
	(Sohxlet) %	Hidrolisis acuosa enzimática %
<i>Jatropha curcas</i> L	58	54.33 <i>Viscozyme</i> L
<i>Oecopetalum mexicanum</i>	40	36 <i>Viscozyme</i> L
<i>Pistacia vera</i> L	50	46.60 <i>Viscozyme</i> L 48 <i>Pectinasa</i> de <i>Aspergillus Aculeatus</i> . 48.9 <i>Celulasa</i>

Los porcentajes que muestra la tabla 5.5 en la hidrólisis enzimática corresponden a las cantidades más altas obtenidas de aceite en gramos en la evaluación de la influencia del tiempo.

La tabla 5.5 hace la comparación de los rendimientos con el método acuoso enzimático con los resultados obtenidos de contenido de aceite de las semillas mediante el método soxhlet, la tabla 5.5 dice que en 15gr de harina de piñón se puede extraer 54.33% de aceite empleando el método de hidrólisis enzimática con la enzima *Viscozyme* L durante 6.5h empleando una relación S:L 1:6, además que en 10gr de harina de cacaté se puede extraer 36% de aceite mediante hidrólisis enzimática empleando la enzima *Viscozyme* L en un tiempo de 6h, con una relación S:L 1:5.

Para la semilla de pistacho la tabla 5.5 nos dice que utilizando el método de la hidrólisis enzimática y empleando la enzima *Viscozyme L*, con una relación S:L 1:5 se puede obtener un 46.60% de aceite en un tiempo de 7h. Empleando la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* con una relación S:L 1:6 se puede obtener 48% de aceite en un tiempo de 5 h. Empleando la enzima *Celulasa* con una relación S:L 1:3 y con un tiempo de hidrólisis de 5.5 h se puede obtener hasta un 48.9% de aceite extraído mediante este método, siendo la enzima *Celulasa* la que tuvo el mayor rendimiento de aceite en la semilla de pistacho.



CAPITULO 6

CONCLUSIÓN

## 6 CONCLUSIÓN

### Relación sólido: líquido

La mayor cantidad de aceite acorde a la relación sólido: líquido para la semilla de piñón fue 1:6, a 200rpm durante 4h de hidrolisis enzimática empleando la enzima *Viscozyme L* aunque analíticamente los resultados no mostraron diferencia significativa, la semilla de cacaté obtuvo mayor cantidad de aceite con la relación de carga sólido: líquido 1:5 empleando la enzima *Viscozyme L* a las mismas condiciones de agitación y tiempo que la semilla de piñón y para el pistache se evaluó tres enzimas comerciales diferentes, para cada enzima se evaluaron las mismas cuatro relaciones de carga sólido: líquido los cuales para la enzima *Viscozyme L* se observó mayor cantidad de aceite con la relación 1:5 al igual que el cacaté, para la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* la relación sólido: líquido que favoreció el resultado fue 1:6 al igual que el piñón, y para la *Celulasa* el mejor resultado fue con la relación 1:3 las condiciones fueron las mismas en todas las semillas en cuanto a tiempo solo para esta etapa, mismas condiciones de agitación y la misma concentración de enzima a 0.2%. Por lo tanto la relación de carga si influye en el resultado de la cantidad de aceite extraído por lo que para optimizar el proceso de extracción es importante tomar en cuenta que para cada semilla y empleando diferentes preparados enzimáticos se requiere diferentes relaciones de carga sólido:líquido.

### Cinética de extracción de aceite

Para el piñón el máximo rendimiento de aceite lo obtuvo a las 6.5h de la hidrolisis, empleando la enzima *Viscozyme L*, una relación sólido: líquido 1:6, a 200rpm con una concentración de enzima de 0.2%, obteniendo un rendimiento total de 54.33%.

El cacaté obtuvo su máximo rendimiento a las 6h de la hidrolisis enzimática, empleando la enzima comercial *Viscozyme L* a una concentración de 0.2%, una relación sólido: líquido 1:5 a 200rpm, el porcentaje total de aceite en estas condiciones fue de 36%.

Para el pistache la hidrolisis enzimática se llevó a cabo a 200rpm, con una concentración de enzima de 0.2%, para la enzima *Viscozyme L* se realizó a una relación de carga sólido: líquido de 1:5 y los resultados fueron favorecedores a las

7h de la hidrolisis obteniendo un rendimiento total de 46.40% de aceite extraído. Para la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* se realizó con las mismas condiciones que la anterior excepto la relación de carga solido: líquido 1:6 y el tiempo donde se observa el mayor resultado de aceite es a las 5h obteniendo un porcentaje total de 48%. De igual manera para la enzima *celulasa*, la hidrolisis se realiza a 200rpm, con una concentración de enzima de 0.2%, una relación solido: líquido de 1:3 y su mayor rendimiento de aceite resulta a las 5.5h de la hidrolisis obteniendo un porcentaje total de 48.9%. por lo tanto en todas las condiciones descritas anteriormente podemos concluir que para cada tipo de enzima en las diferentes semillas aplicadas, el tiempo donde se obtiene la mayor cantidad de aceite tienen diferencias de una semilla a otra empleando diferentes complejos enzimáticos, sin embargo, los porcentajes máximos obtenidos a esos tiempos indican que el método acuoso enzimático es una buena alternativa de obtención de aceite tomando en cuenta las ventajas que tiene el uso de este método y tomando en cuenta que los resultados son valores aproximados del aceite debido al tipo de estrategia empleada para la separación del aceite de la fase acuosa.

El comportamiento de las gráficas indica que en todos los casos se presenta un comportamiento sigmoide que se debe a la presencia de dos mecanismos: la transferencia de masa intraparticular y posteriormente la reacción enzimática.

## Determinación del contenido de aceite, método soxhlet

Para tener un punto de comparación con los resultados de la hidrolisis enzimática de las semillas, se determinaron las cantidades de aceite total por el método soxhlet empleando hexano como solvente y se obtuvo, piñón con un 58% de contenido de aceite total, cacaté 40% de aceite total y pistacho 50% de aceite total.

Los resultados obtenidos mediante hidrolisis enzimática comparados con los obtenidos con soxhlet no tiene una diferencia significativa lo cual significa que el método acuoso enzimático es realmente una buena alternativa de extracción de aceite considerando que los métodos convencionales son muy contaminantes y peligrosos por el uso de solventes y otros tienden a perder mucho aceite en el proceso, la ventaja del uso de enzimas es que en los procesos de extracción las condiciones son menos severas.

## REFERENCIAS

Adler-Nissen, J.A. (1986) – A review of food protein hydrolysis-specific areas. In: Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins (Adler-Nissen, J. Eds). Elsevier Applied Publishers, London and New York, 78.

Badr F.H., Sitohy M.Z. 1992. Optimizing conditions for enzymatic extraction of sunflower oil. *Grasas y aceites*. 43(5):281-283

Bailey, E.A. 1984. Industrial oil and fat products, Segunda edición. España. Editorial reverté, S.A. p. 398-473.

Bair, C.W. y H.E. Snyder (1980) – Electron microscopy of a soybean lipid bodies. *JAOCS*, V, 279.

Ballinas E.J., Selvas M.A., García A., Aguilar O.A., Caballero A. 2009. Valor nutricional del aceite de cacaté *Oecopetalum mexicanum*. Datos no publicados. Tesis de Licenciatura de Nutrición. UNICACH. p. 15-17,30-34.

Barrios, V.A.; D.A. Olmos, R.A. Noyola y C.A. Lopez-Munguia (1990) – “Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction”. *Oleagineaux*, 45, 35.

Beede, H. R. y Ferguson, L. 2005. Pruning mature bearing trees. En Pistachio Production Manual. 4ª Ed. Ferguson L. University of California, Davis

Belén C.D.R., Álvarez F.J., Alemán R. 2001. Caracterización fisicoquímica de una harina obtenida del mesocarpio del fruto de la pala coroba (*Jessenia polycarpa karst*). *Revista de la facultad de agronomía*. 18:290-297.

Belén-Camacho D.R., López I., García D., González M., Moreno-Álvarez M.J., Medina C. 2005. Evaluación fisicoquímica de la semilla y del aceite de corozo (*Acrocomia aculeata Jacq*). *Grasas y Aceites*. 56(4):311-316.

Bhatnagar, S. y B.N. Johari (1987) – Microbial enzymes in the processing of oil seeds. *Current Science*, 56, 775.

Bohinski, R.C. 1998. *Bioquímica*. Quinta edición. México. Editorial Pearson. p.175-176.

Bocevaska, M; D. Karlovic, J. Turkulov and D. Pericin (1993) – Quality of corn germ oil obtained by aqueous extraction. *JAOCS*, 70, 1273.

Bouvier, F. y B. Entressangles (1992) – Utilization of cellulases and pectinases in the extraction of palm oil. *Revue Francaise des Corps Gras*, 39, 245.

Buenrostro M., Lopez A. 1986. Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnology Letters*. 8(7):505-506.

Cater, C.M.; K.C. Rhee; R.D. Hagenmaier and K.F. Mattil (1974) – Aqueous extraction an alternative oilseed milling. *JAOCS*, 51, 137.

Chávez Q.E., Roldán T.J., Sotelo O.B.E., Ballinas D.J., Lopez Z.E.J. 2009. Plantas comestibles no convencionales en Chiapas, México. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. 10(2):1-10.

Cheah, S.C.; M.A. Augustin y L.C.L. Ooi (1990) – “Enzymatic extraction of palm oil”. *Palm Oil Res. Bull. Malaysia*, 20, 30.

Christensen, F.M. (1989) – Enzyme technology versus engineering technology in the food industry. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 11, 249.

Christensen, F.M. (1991) – Extraction by aqueous enzymatic process. *INFORM*, 2,984.

Compaoré W.R., Nikiéma P.A., Bassolé H.I.N., Savadogo A., Mouecoucou J., Hounhouigan D.J., Traoré S.A. 2011. Chemical composition and antioxidative properties of sedes of *Moringa oleifera* and pulps of *Parkia biglobosa* and *Andansonia digitata* commonly used in food fortification in Burkina Faso. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 3(1):64-72.

Conn, E., Stumpf, P.K. 1996. *Bioquímica Fundamental*. Cuarta edición. México. Editorial Limusa S.A.de C.V. p.131-134

Couceiro J.F., Coronado, J.M., Menchén,M.T., y Mendiola M.A. 2000. El cultivo del pistachero.Ed. Agro Latino S.L., Barcelona.112 p.

Cruz V.C.A. 2004. Valor nutritivo de alientos no convencionales del municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas. Tesis de Licenciatura de Nutrición. UNICAH.p. 28,54,60,68-69.

De Moura J.M.L.N., Campbell K., Mahfuz A., Jung S., Glatz C.E., Jhonson L. 2008. Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein Fromm soybeans and cream de-emulsification. *Journal of American oil Chemists' Society*. 85:985-995

Domínguez, H., Nuñez, M. J., Lema, J.M. 1995. Procesado acuoso de soja con tecnología enzimática: extracción de aceite y producción de aislados. *Grasas y Aceites*, *International Journal of Fats and Oils*. 46(1):11-20.

Dominguez, H; M.J. Núñez y J.M. Lema (1995a) – Procesado acuoso de soja con tecnología enzimática: extracción de aceite y producción de aislados" - Grasas y Aceites, 46, 11.

Dominguez, H.; M.J. Nuñez and J.M. Lema (1995b) - Enzyme-assisted hexane extraction of soja bean oil. Food Chem., 54, 223.

Eubeller, J. y Buchloh, G. 1971. Untersuchungen über Fettsäuremuster in Samen verschiedene-ner Pflanzen, insbesondere Obstarten II, Mitt. Klosterneuburg 21 (6):469-583.

Fawzy R.M., Thomas M.J. 2009. Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) pomace: range of operational variables. International Journal of Food Science and Technology. 44:435-444.

Ferguson, L., Polito,V., y Kallsen C. 2005a.The pistachio tree: botany and physiology and factors that affect yield. En Pistachio Production Manual. 4ª Ed. Ferguson L. University of California, Davis

Finlayson-Pitts, B.J. y J.N. Jr Pitts (1993) – “Volatile organic compounds: Ozone formation, alternative fuels and toxics”. Chem. Ind., 20, 796.

Firuzeh, P. y Ludders, P. 1978. Pistazienanbau im Irán. Erwerbsobstbau 20 (12):254-258.

Flores H.,O, Riveros R.,H., Sosa P.,A., Vázquez C.,E. 2004. Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México,DF, México. 28:61-64.

Francis G., Edinger R., Becker K. 2005. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Natural Resources Forum*. 29:12-24.

Fullbrook, P.D. (1983) – The use of enzymes in the processing of oilseeds. *JAOCS*, 60, 476.

García-Serrato, A. (1981) – Extraction of oil from soybeans. *JAOCS*, 58, 157.  
Geankoplis, C.J. (1998) – *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. 3ra Edición. México: CECSA.

Ghodsvali A., Khodaparast H., Hosein ., Levente L.D 2009. Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*. 42(1):171-175.

Grasso F., Maroto B., Camusso C. 2006. Pretratamiento enzimático de expandido de soya para la extracción de aceite con solvente. *Información Tecnológica*. 17(3):41-46.

Guerra E.G., Zúñiga M.E. 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinífera*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites*. 54(1):53-57.

Gutiérrez B.G. 1994.  *Icacinaceae*. Flora de Veracruz. *Acta Botánica Mexicana*. 80:1-16.

Heller J. 1996. Physic nut (*Jatropha curcas* L.) promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research/ Rome: International Plant Genetic Resources Institute. ISBN 92-9043-278-0. p10-15.



Hoffmann, A. 1998. Flora silvestre de Chile. Zona Central. Ed. 4 Fundación Claudio Gay, San- tiago 254 p.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2005. Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México.

Johnson L.A., Lucas E.W. 1983. Comparison of alternative solvents for oils extraction. Journal of the American oil chemists' Society. 60:229-242.

Kapchie V.N., Wey D., Hauck C., Murphy P.A. 2008. Enzyme-assisted aqueous extraction of oleosomes from soybeans (*Glycine max*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56:1766-1771.

Karnofsky, R. (2001) – Diseño de extractores para semillas oleaginosas. Aceites y Grasas, 42, 109.

Kulkarni, B.S.; A. D'Anquin y V. Graci (1955) – Measurement of extractability of raw and cooked cottonseed flakes. JAOCS, 23, 178.

Lanzani, A.; M.C. Petrini, O. Cozzoli, P.Gallavresi, C. Carola G. Jacini (1975) – “On the use of enzymes for vegetable-oil extraction. A preliminary report”. Riv. Ital. Sostanze Grasse, L11, 226.

Lascurain., Angeles-Álvarez G., Ortega-Escalona F., Ordoñez-Candelaria V.R., Ambrosio M., Avendaño S. 2007. Características anatómicas y propiedades mecánicas de la madera de *Oecopetalum mexicanum* Greenm & C.H Thomps. (Icacinaceae) de la sierra de Misantla, Veracruz, México. Madera y Bosques. 13(02):83-95.

Latif S., Anwar F. 2008. Quality assessment of *Moringa concanensis* seed oil extracted through solvent and aqueous-enzymatic techniques. *Grasas y Aceites*. 59(1):69-75.

Lawhon, J.T.; L.J. Manak; K.C. Rhee and E.W.Lusas (1981a) – Production of oil and protein food products from raw peanuts by aqueous extraction and ultrafiltration. *J. Food Sci.*, 46, 391.

Lawhon, J.T.; L.J. Manak; K.C. Rhee; K.S. Rhee and E.W.Lusas (1981b) – Combining aqueous extraction and membrane isolation techniques to recovery protein and oil from soybeans. *J. Food Sci.*, 46, 912.

Lenhinger, A.L. 2003. *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular*. Segunda edición. Barcelona. Editorial omega. p 189-190.

Lusas, E.W. and G.M. Jividen (1987) – Glandless cottonseed: A review of the first 25 years of processing and utilization research. *JAOCS*, 64, 839.

Makkar H.P.S., Becker K., Schomook B. 1988. Edible provenances of *J. curcas* from Quintana Roo state of México and effect of roasting on antinutrient and toxic factor seeds. *Plant Food for Human Nutrition*. 52:31-36.

Martínez, H.J. 1987. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. p. 1247.

Matos C.A., Acuña H.J. 2010. Influencia del tiempo, tamaño de partícula y proporción sólido líquido en la extracción de aceite crudo de la almendra de durazno (*Prunus pérsica*). *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología*.

McGlone, O.C.; C.A. Lopez-Munguia and J.V. Cater (1986) – Coconut oil extraction by a new enzymatic process. *J.Food Sci.*, 51, 695-697.

Medina A.M.E. 2000.  *Icacinaceae*. Bioclimatología de flora de Veracruz. *Acta botánica*. 23:30-57.

Mejía-Giraldo L.F., Martínez-Correa H.A., Betancourt-Gutiérrez J.E., Castrillón-Castaño C.E. 2007. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Magnifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. *Ingeniería y Ciencia*. 3(06):41-62.

Milligan, E.D. (1976) – Survey of solvent extraction equipment. *JAOCS*, 53, 234.

Mustakas, G.C. (1980) - Recovery of oil from soybeans. In: *Handbook of Soy Oil Processing and Utilization* (Erikson, D.R. Ed.) St. Louis, USA: American Soybean Association and American Oil Chemist's Society.

Olsen, H.S. (1988) - "Aqueous enzymatic extraction of oil from seeds" In: *Asian Food Conference Proceedings-Bangkok, Thailand* Reprinted by Novo Industry A/S, ppA-06041a.

Ovando-Chacón S.L., Waliszewski K.N. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21(42):113-122.

Pearson, D. (1981) – *Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos*. 2da Edición, Zaragoza, España.

Quintas G.S. 2005. Fundamentos para el manejo y aprovechamiento de *Oecopetalum mexicanum* Greeman & Thompson (*Icacinaceae*), en Pueblo Viejo,

municipio de Misantla, Veracruz. Manejo Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. Tesis de Licenciatura. p. 30-35.

Reporte técnico. Alfaro Cruz S.G. 2012. Hidrólisis de la *Jatropha curcas* con carbohidrasas comerciales para mejorar la extracción del aceite. p. 1, 11-16.

Reporte técnico. Bernal-Astorga A. 2011. Perfil comercial: Compilación de *Jatropha curcas*. p. 10,15.

Reporte Técnico. Octagón S.A., Biocombustibles. 2006. *Jatropha curcas* su expansión agrícola para producción de aceites vegetales con fines de comercialización energética. p. 9-12.

Reporte Técnico. Van der Putten E., Franken Y.J., Jongh J.2009. Manual de *Jatropha*, versión en español. Fuels from Agriculture in Communal Technology p. 7-12.

Reybal, R.E. (1980) – Operaciones de Transferencia de Masa. 2da Edición. MéxicoD.F.: McGraw Hill S.A.

Rosenthal A., Pyle D.L., Niranjan K. 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*. 19(6):402-420.

Rosenthal, A.; D.L.Pyle and K. Niranjan (1996) – Aqueous and Enzymatic Extraction of Edible Oils from Oilseeds. *Enzymes and Microbiol. Tech.*, 19, 401.

Sandoval-Aldana, A., González-Venegas, M.E., Forero-Longas, F. 2009. Efecto del tratamiento enzimático en la extracción de aceite de aguacate (*Persea americana* Mill). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA espinal, Colombia. p. 1-5.

Sant'Anna B.P.M., Freitas S.P., Coelho M.A.Z. 2003. Enzymatic aqueous technology for simultaneous coconut protein and oil extraction. *Grasas y Aceites*. 54(1):77-80+

Schwartz, J.A. Olaeta, P. y Undurraga V. C. 2007. Mejoramiento del rendimiento de extracción de aceite de palta (aguacate). *Proceedings VI World Avocado Congress Santiago, Chile*. p.1-8.

Sherba, S.E.; R.B. Steigerwalt; W.T: Faith and C.V. Smythe Jr. (1972) – Soybean fractionation employing a protease. U.S. patent 3.640.725.

Shi L., Lu J., Jones G., Loretan P.A., Hill W.A. 1998. Characteristics and composition of peanut oil prepared by an aqueous extraction method. *Life Support Biosphere of Science Journal*. 5:225-229.

Sineiro, J.; H. Dominguez y M.J. Núñez (1998) – Influencia del tratamiento enzimático en la calidad de aceites vegetales" - *Grasas y Aceites*, 49, 191

Solis-Fuentes, J.A., Tapia-Santos, M., Durán-de-Bazúa, M.C. 2001. Aceite de almendra de zapote mamey, un análisis de rendimientos y condiciones de extracción. *Información Tecnológica*. 12(6):23-28.

Sosulski, K.; F.W. Sosulski and E.Coxworth (1988) – Carbohydratase hydrolysis of canola to enhance oil extraction with hexane. *JAOCS*, 65, 357.

Sosulski, K. y F.W.Sosulski (1993) – Enzyme-Aided vs Two-Stage Processing of Canola: Technology Product Quality and Cost Evaluation. *JAOCS*, 70, 825.

Taha F.S., Hassanein M.M. 2007. Pretreatment of cottonseed flakes with proteases and an amylase for higher oil yields. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58(3):297-306.

Taha F.S., Youssef E.A.A., Omar S. 2002. Preliminary studies on the enzymatic treatment of cottonseed for higher oil yield. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 58(3):297-306.

Tano-Debrah, K. and Y. Ohta (1995a) – Enzyme-assisted aqueous extraction of shea fat: a rural approach. *JAOCS*, 72, 251.

Tano-Debrah, K y Y. Ohta (1995b) – Application of Enzyme-Assisted Aqueous Fat

Tano-Debrah, K. and Y. Ohta (1994) – Enzyme-assisted aqueous extraction of fat from kernels of shea tree *Butyrospermum parkii*. *JAOCS*, 71, 979.

Tano-Debrah, K. and Y. Ohta (1995a) – Enzyme-assisted aqueous extraction of shea fat: a rural approach. *JAOCS*, 72, 251.

Zúñiga M.E., Soto C., Mora A., Chamy R., Lema J.M. 2003. Enzymatic pre-treatment of *Guevina avellana* mol oil extraction by pressing. *Process Biochemistry*. 39:51-57.

Wiese, K.L. y H.E. Snyder (1987) – Analysis of the oil extraction process in soybeans: A new continuous procedure. *JAOCS*, 64, 402.

Woodroof, J.G. 1979. *Tree Nuts: production, processing, products: Pistachio nuts: 572-603*. Avi Publishing Company Inc. Westport, Connecticut.

Woodroof, J.G. 1979. *Tree Nuts: production, processing, products: Pistachio nuts: 572-603*. Avi Publishing Company Inc. Westport, Connecticut.

Yoon, S.H.; I.H. Kim; S.H. Kim and T.W. Kwon (1991) – Effects of enzyme treatments and ultrasonification on extraction yield of lipids of protein from soybean by aqueous process. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23, 673.

Zweytick, D.; K. Athensteadt y G. Daum (2000) – Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469, 101.

# ANEXOS

## (A-1) Enzimas

Novo Nordisk      Viscozyme® L      Page | 1

Product Sheet  
Enzyme business

### Viscozyme® L

Viscozyme L is a multienzyme complex containing a wide range of carbohydrases, including arabanase, cellulase, Q-glucanase, hemicellulase and xylanase. The enzyme also has activity against the branched pectin like substances found in soy bean cell walls. The enzyme preparation is produced from a selected strain of the *Aspergillus* group.

The optimum conditions for the activities of this enzyme complex are pH 3.3-5.5 and a temperature of 40-50°C.

**Specification**

**Appearance**  
Viscozyme L is a clear brown liquid with a density of approximately 1.2.

**Activity**  
Viscozyme L has a declared activity of 100 FBG/g. The analytical method is available upon request.

**Standard packing**  
Viscozyme L is available in 30-kg jerry cans and in 250-kg steel drums.

**Storage**  
When Viscozyme L is stored at 25°C, the declared activity is maintained for at least 3 months. For longer storage periods, a loss of 1-2% per month may occur. When stored at 5°C, the product will maintain the declared activity for at least one year.

**Safety Aspects**

**Approval status**  
Viscozyme L is produced according to FAO/WHO JECFA and FCC recommendations, supplemented with a maximum limit of 10<sup>2</sup>/g for moulds.

**Handling precautions**  
The product is non-flammable, completely miscible with water and safe when used according to directions. Enzyme dust may cause sensitization when inhaled. Use normal handling precautions against inhalation of dust from the dried product or direct body contact. In case of spillage or accidental contact with skin or eyes, rinse by flushing with water.  
A separate Novo Nordisk leaflet, "How to handle liquid Novo Nordisk enzymes - safely" (B 144), and a Material Safety Data Sheet on the product are available on request.

**Enzyme business**  
Novo Nordisk A/S  
Novo Allé  
2880 Bagsvaerd

Tel. +45 4444 8888  
Fax +45 4444 1021  
Telex 37560

Ferment Ltd.  
Neumatt  
Dittingen  
Switzerland

Tel. +41 61 7656111  
Fax +41 61 7656333  
Telex 962970



Product Sheet  
Enzyme business

**Application**

Viscozyme L is a special enzyme used in the breakdown of cell walls for the extraction of useful components from plant tissues and in the processing of cereal and vegetable materials.

Extraction of materials from plant cells may be improved by pretreating the plant material with Viscozyme either before conventional processing or as part of an enzyme-based extraction process. The ability of the enzyme to function at low temperatures will result in a reduced energy demand for the extraction and less thermal degradation of the desired materials. In addition the absence of significant levels of amylase and lipase activity in the preparation means that these major components of plant materials will not be affected during the extraction process. The multi-component nature of Viscozyme is of particular use for the processing of plant materials in the alcohol, brewing, starch and related industries. The ability of the enzyme to liberate bound materials and to degrade non-starch polysaccharides can be used to improve starch availability in fermentation and to generally reduce viscosity and hence improve yields.

For reduction of (3-glucans a dose rate of 0.02-0.1% on grist weight is recommended. For other applications a preliminary recommendation is 0.05-0.1%.

**Technical Service**

Novo Nordisk's experienced industrial application group has laboratory facilities in the USA, Japan, South-East Asia, Switzerland and Denmark and we will be pleased to assist you with further information on the properties and optimum use of Viscozyme.

Enzyme business  
Novo Nordisk A/S  
Novo Allé  
2880 Bagsvaerd

Tel. +45 4444 8888  
Fax +45 4444 1021  
Telex 37560

Ferment Ltd.  
Neumatt  
Dittingen  
Switzerland

Tel. +41 61 7656111  
Fax +41 61 7656333  
Telex 962970

## **Pectinase from *Aspergillus aculeatus***

**aqueous solution, ≥3,800 units/mL**

Synonym: **Pectinex<sup>®</sup> Ultra SPL**

### **Descripción**

#### **Other Notes**

View more information on [enzymes for complex carbohydrate analysis](http://www.sigmaaldrich.com/enzymeexplorer) at [www.sigmaaldrich.com/enzymeexplorer](http://www.sigmaaldrich.com/enzymeexplorer)

#### **Legal Information**

A product of Novozyme Corp.

Pectinex is a registered trademark of Novozymes Corp.

#### **Application**

Pectinase is an enzyme from *Aspergillus aculeatus* that is used in plant protoplast preparation to digest cell wall prior to organelle isolation. It has been used to conduct partial saccharification of sugars. Pectinases are used to study their role in the invasion of plant tissues by phytopathogens, the spoilage of produce and various food processing and plant biotechnology applications. Pectinase, product P2611, has been used to treat leaf discs from fifth wild-type and *sitiens* leaves<sup>1</sup>.

#### **Biochem/physiol Actions**

Pectinase is an active pectolytic enzyme preparation produced by a selected strain of *Aspergillus aculeatus* that contains mainly pectintranseliminase, polygalacturonase, and pectinesterase and small amounts of hemicellulases and cellulases. Pectinase hydrolyzes pectin, which is a component of the cell wall. They may attack methyl-esterified pectin or de-esterified pectin. It is a source of pectinase activity, also containing cellulase and hemicellulase activities.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2611?lang=es&region=MX>

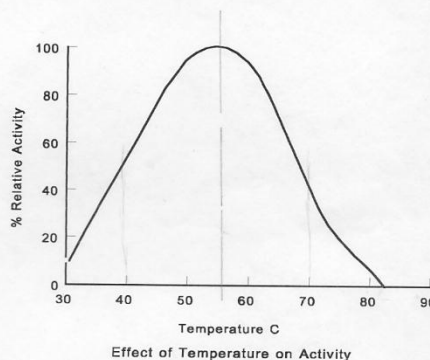
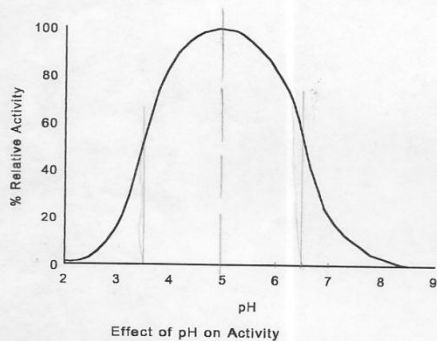
Ficha Técnica de Sigma Aldrich

# CELLULASE

## DESCRIPTION

**CELLULASE** is an enzyme derived from the fermentation of a selected strain of *Trichoderma longibrachatum*. This product is characterized by its ability to modify, hydrolyze, or degrade the carbohydrate cellulose. **CELLULASE** contains all three enzymatic activities (endo- and exo-cellulase and beta-glucosidase activities) required to achieve complete cellulose hydrolysis. Other significant side activities include  $\alpha$ -glucanase, pectinase and arabinoxylanase. Typical applications include releasing bound water from adsorbent gums, filtration improvement, viscosity reduction, degradation and modification of soluble gums and fiber, and freeing materials from enveloping cellulosic matrices. **CELLULASE** can be used for both partial or complete hydrolysis, depending on dosage and conditions.

## CHARACTERISTICS



- # **CELLULASE** is supplied as a tan powder which is readily miscible in water.
- # The product is standardized to 75,000 CU / g.
- # **CELLULASE** can be sold as a custom blend at any strength below 75,000 CU / g.
- # **CELLULASE** is sold as a GRAS product and complies with current FAO/WHO and FCC recommendations for food grade enzymes.
- # This product is essentially free of protease, amylase, and lipase activities.

## STORAGE & PACKAGING

Please inquire about our available packaging options.

This product should be kept in a cool dry location. The drum should be kept closed when not in use. Exposure to high humidity and temperature is not recommended.

Bio-Cat Inc. 9117 Three Notch Road  
Troy, Va 22976

[www.bio-cat.com](http://www.bio-cat.com)