

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

ISABEL VILLATORO TOLEDO

CON EL TEMA:

**INFLUENCIA DE VISCOZYME L SOBRE EL
RENDIMIENTO EN LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE
DE ALMENDRAS DE ZAPOTE MAMEY
(*Pouteria sapota*)**

MEDIANTE:

**OPCIÓN I
(TESIS PROFESIONAL)**

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por estar siempre a mi lado protegiéndome, dándome las bendiciones que han llenado y alegrado mi vida; así como el que me permitiera culminar mis estudios profesionales.

A mis padres

Sra. Eufemia Toledo Alvarado

Sr. Aurelio Villatoro Ordoñez

Por darme la vida y orientarme en el camino del buen ser, así como brindarme todo su apoyo para levantarme de los tropezones que la vida me puso, por todo su apoyo moral, social, económico, por su amor y comprensión y por los sacrificios que hicieron por mí, que me llevaron a hacerme alguien en la vida. Gracias por creer en mí, los amo.

A mi hermano **Aurelio Villatoro Toledo** por estar a mi lado durante el tiempo en que me forme como un profesionista y darme su apoyo incondicional, por estar conmigo en las buenas y en las malas, y por ser mi ejemplo de perseverancia y demostrarme con ello que no hay sueño imposible. Te quiero.

A mi esposo **Josué Vera Maldonado** por presentarse en mi vida y apoyarme incondicionalmente estos años en mi formación profesional y en mi vida personal, por acompañarme en este camino y ayudarme a levantarme en los momentos difíciles, te amo.

A mi hija **Anabel Vera Villatoro** por ser la inspiración de lograr algo más cada día y por ser un regalo que la vida me dio en mi etapa de estudiante, te amo bebé.

A mi directora de tesis, **Dra. Sandy Luz Ovando Chacón**; por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia y su paciencia ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	5
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN:	8
3.1 GENERAL:	8
3.2 ESPECÍFICO:	8
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA.	9
4.1 HISTORIA	9
4.2 MISIÓN	10
4.3 VISIÓN	10
4.4 VALORES	11
4.5 LOCALIZACIÓN	11
4.5.1 INSTALACIONES	12
5. FUNDAMENTO TEÓRICO	14
5.1 MAMEY	14
5.1.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.	14
5.1.2 USOS DE LA SEMILLA DE MAMEY.	17
5.1.3. ESTRUCTURA DE LAS OLEAGINOSAS.	18
5.2 ACEITES.	20
5.3. TÉCNICAS DE EXTRACCION DE ACEITES.	26
5.3.1 EXTRACCIÓN POR PENSADO.	27
5.3.2 EXTRACCIÓN POR SOLVENTE.	27
5.3.3 EXTRACCIÓN POR MICROONDAS.	28
5.3.4 EXTRACCION POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	29
5.3.5 EXTRACCIÓN POR PENSADO EN FRIO.	30
5.3.6 EXTRACCIÓN POR CENTRIFUGACIÓN.	31
5.4 ENZIMAS	32
5.4.1 USO INDUSTRIAL DE LAS ENZIMAS.	36
5.4.2. IMPORTANCIA Y CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS HIDROLASAS.	38
5.5 CASOS DE ESTUDIOS DEL USO DE ENZIMAS EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE	40

6. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	42
6.1 MATERIA PRIMA	42
6.1.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.	42
6.1.2. REDUCCIÓN DE TAMAÑO.	42
6.1.3. SECADO DE LA MUESTRA.	42
6.2. EXTRACCION CON PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO.	43
6.2.1 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.	43
6.2.2 CENTRIFUGACIÓN	44
6.3 EXTRACCIÓN POR SOLVENTE.	44
6.4 PERFIL DE ACIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LA ALMENDRA DE MAMEY ZAPOTE.	45
6.4.1 TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE.	45
6.4.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM) DE LOS METIL ÉSTERES.	45
7. RESULTADOS OBTENIDOS.	47
8. CONCLUSIÓN.	56
9. BIBLIOGRAFIA.	57
10. ANEXOS	63

1. INTRODUCCIÓN

El estado de Chiapas cuenta con una diversidad de cultivos entre los que destaca el zapote mamey (*Pouteria sapota*). El mamey es un fruto muy conocido y la mayoría de la producción se consume como fruta fresca. Esta fruta autóctona de Mesoamérica, ha tenido diversos usos en la historia de los pueblos latinoamericanos y, actualmente, su producción e industrialización para la elaboración de diversos productos alimenticios ha observado ampliaciones importantes. Sin embargo, todavía es muy poca la investigación que se ha realizado en torno a sus múltiples propiedades.

Cuando la fruta se industrializa para procesar su succulenta y apreciada pulpa se generan cantidades diversas de residuos. Dentro de estos residuos está su semilla, la que ha sido objeto de algunas investigaciones debido a su alto contenido de aceite (Solís-Fuentes y col., 2001).

Varios aceites vegetales han sido investigados ampliamente, probados e incluso usados para la producción comercial de biodiesel. Generalmente estos aceites, han sido aquellos que derivan de materias primas que abundan en los países donde se analiza su viabilidad. El uso de aceites comestibles representa entre el 60 a 70% del costo de producción del biodiesel, por lo que el estudio y localización de opciones de materias primas no comestibles o no convencionales de bajo costo, especialmente aquellas que provienen de residuos agroindustriales, es un aspecto de gran importancia (Fukuda y col., 2001; Ma y Hanna, 1999; Özgül-Yücel y Türkay, 2003).

Los aceites de las semillas se encuentran en vacuolas intracelulares y también enlazadas a proteínas y a una amplia variedad de carbohidratos (celulosa,

hemicelulosa, pectina, etc.). Para mejorar el rendimiento y la velocidad de extracción del aceite es necesario degradar las paredes celulares a fin de incrementar la permeabilidad del aceite a través de la membrana (Olsen, 1988). Existen algunas investigaciones relacionadas con la extracción de aceites asistida por enzimas, lo que ayuda en la extractabilidad del aceite al degradar la pared celular de la semilla (Domínguez, 1994). En general, el éxito de la aplicación de enzimas en el proceso extractivo, depende de cada materia prima (Zúñiga y *col.*, 2003; Soto y *col.*, 2004), y no se conocen antecedentes sobre la utilización de enzimas en la extracción de aceite de la semilla de mamey.

A partir de esto, se propuso estudiar la extracción de aceite de la semilla de Zapote mamey empleando un método de extracción por centrifugado y asistida por acción enzimática.

2. JUSTIFICACIÓN

La recuperación de compuestos presentes en los residuos agroindustriales se ha vuelto un tema interesante en los últimos años y ha despertado el interés de muchas industrias para aprovechar y dar uso a los diversos residuos que generan día a día y, el caso de la industria procesadora de la pulpa de mamey no es la excepción, ya que presenta un alto porcentaje de residuos que incluye desde las cáscaras hasta las semillas, esta última puede ser aprovechada para la obtención de aceite.

Uno de los principales objetivos en la industria oleaginosa es la optimización del proceso de extracción de aceite. Si bien existen numerosas referencias al respecto, continúa la búsqueda de tecnologías que reduzcan el consumo energético, que sean más seguras para el medio ambiente y el ámbito laboral. Para facilitar la obtención del aceite se recurren a pre tratamientos para romper y/o degradar la estructura celular y así facilitar no sólo la liberación del aceite de los cuerpos lipídicos sino además el acceso del disolvente (Freccero, 2006).

Es por esto que el siguiente proyecto tiene como finalidad incrementar los rendimientos de extracción de aceite de la almendra de mamey, empleando como método de extracción a la centrifugación con un tratamiento previo de hidrolisis enzimática y compararlos con una extracción convencional por disolventes.

3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 GENERAL

Evaluar el efecto del pretratamiento enzimático con Viscozyme L sobre el rendimiento y la composición en la extracción de aceite obtenido de almendras de zapote mamey (*Pouteria sapota*).

3.2 ESPECÍFICOS:

- Determinar las condiciones adecuadas de concentración de enzima y pH sobre la hidrolisis enzimática de zapote mamey (*Pouteria sapota*) para maximizar la eficiencia de extracción de aceite.
- Comparar los rendimientos de extracción de aceite obtenidos por el método convencional Soxhlet y por el método acuoso-enzimático.
- Determinar el efecto de la extracción acuosa-enzimática sobre el perfil de ácidos grasos del aceite de almendras de mamey.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA.

4.1 HISTORIA

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG), es una institución que nació un 22 de octubre de 1972, con la misión de formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

En la década de los 70s, se incorpora el estado de Chiapas al movimiento educativo nacional extensión educativa, por intervención del Gobierno del Estado de Chiapas ante la federación. Esta gestión dio origen a la creación del Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez (ITRTG) hoy Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG).

El día 23 de agosto de 1971 el Gobernador actual de ese año, colocó la primera piedra de lo que muy pronto sería el Centro Educativo de nivel medio superior más importante de la entidad.

El día 22 de octubre de 1972, con una infraestructura de 2 edificios con 8 aulas, 2 laboratorios y un edificio para talleres abre sus puertas el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez con las carreras de Técnico en Máquinas de Combustión Interna, Electricidad, Laboratorista Químico y Máquinas y Herramientas.

En el año 1974 dio inicio la modalidad en el nivel superior, ofreciendo la carrera de Ingeniería Industrial en Producción y Bioquímica en Productos Naturales, 1980 se amplió la oferta educativa al incorporarse las carreras de Ingeniería Industrial Eléctrica e Ingeniería Industrial Química.

En 1987 se abre la carrera de Ingeniería en Electrónica y se liquidan en 1989 las carreras del sistema abierto del nivel medio superior y en el nivel superior se reorientó la oferta en la carrera de Ingeniería Industrial Eléctrica y se inicia también

Ingeniería Mecánica así también en 1991 surge la licenciatura en Ingeniería en Sistemas Computacionales. Desde 1997 el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ofrece la Especialización en Ingeniería Ambiental como primer programa de posgrado.

Para 1998 se estableció el programa interinstitucional de posgrado con la Universidad Autónoma de Chiapas para impartir en el Instituto Tecnológico la Maestría en Biotecnología posteriormente en 1999 se inició el programa de Maestría en Administración como respuesta a la demanda del sector industrial y de servicios de la región.

A partir de 2000 se abrió también la Especialización en Biotecnología Vegetal y un año después dio inicio el programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Licenciatura en Informática.

En la actualidad es un instituto de alta capacidad ya que cuenta con instalaciones de calidad tal es el caso de polo nacional, así como los laboratorios de alimentos e investigación, aulas entre otros (Universia México, 2011).

4.2 MISIÓN

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

4.3 VISIÓN

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

4.4 VALORES

- El ser humano.
- El espíritu de servicio.
- El liderazgo.
- El trabajo en equipo.
- La calidad.
- El alto desempeño.
- Respeto al medio ambiente

4.5 LOCALIZACIÓN

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez se encuentra ubicado en la Carretera Panamericana Km.1080 Terán, Chiapas (**Figura 4.1**).

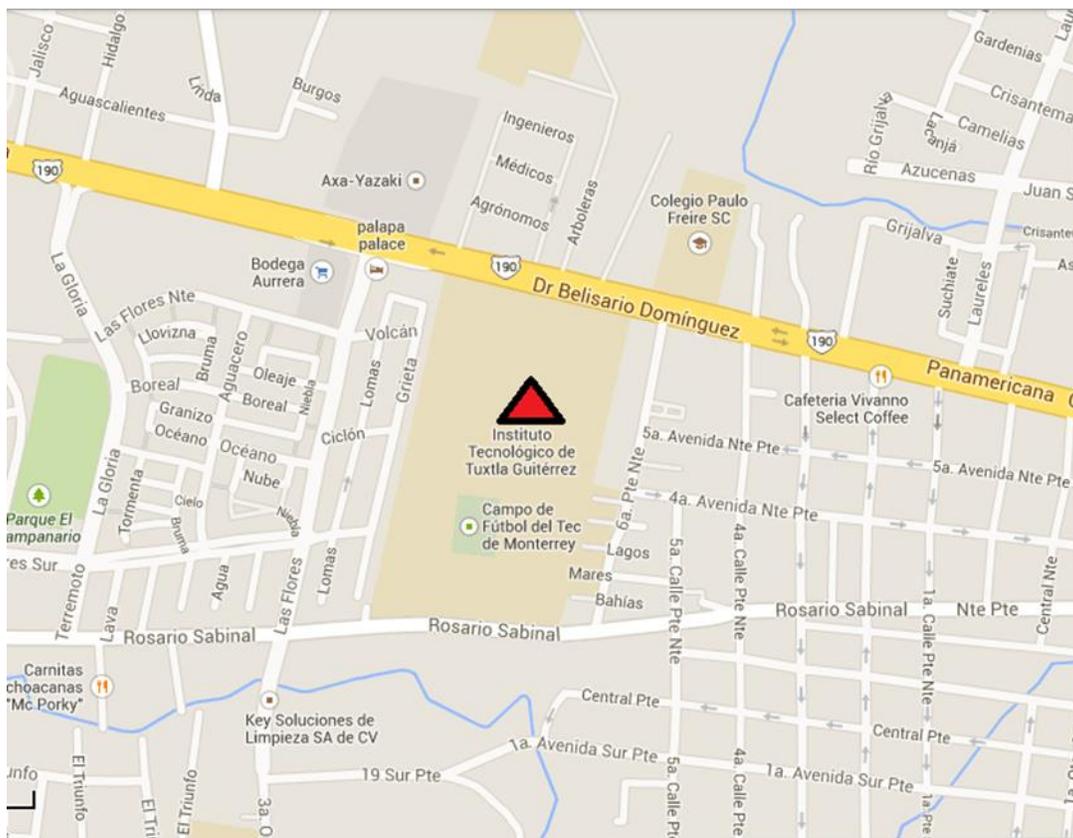


Figura. 4.1. Ubicación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez



Figura. 4.2. Vista de la entrada al instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

4.5.1 INSTALACIONES

El 29 de noviembre de 2011 se inauguró el “Polo Tecnológico Nacional para la Certificación y Pruebas Analíticas en Biocombustibles” (**figura 4.3**), esto con la finalidad de impulsar el programa federal mesoamericano de biocombustibles, actualmente el polo entre los muchos laboratorios cuenta con el laboratorio de análisis bromatológicos (**figura 4.4**), en donde se llevó a cabo el desarrollo de este proyecto que lleva por nombre “evaluación del pre tratamiento enzimático de la semilla de zapote mamey (*Pouteria sapota*) sobre el rendimiento de extracción del aceite.

El laboratorio cuenta con agitadoras con baño maría requeridas como equipo clave para la elaboración del proyecto, así también cuenta con balanzas analíticas, potenciómetros, equipo de digestión así como equipos utilizados para la elaboración de análisis bromatológicos.



Figura. 4.3. Entrada al polo tecnológico.



Figura. 4.4. Laboratorio de bromatología

5. FUNDAMENTO TEÓRICO

5.1 MAMEY

5.1.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.

El mamey pertenece a la familia de las sapotaceae (cuadro 5.1), que además incluye otros árboles frutales como el chicozapote (*Achras zapota L.*) y el zapote verde (*Calocarpum viride L.*).

Cuadro 5.1. Clasificación taxonómica del mamey.

Clase	Angiosperma
Subclase	Dicotiledóneas
Orden	Ebanales
Familia	Sapotaceae
Genero	Pouteria
especie	sapota

Balardi y col, 2009.

El árbol es atractivo (Figura 5.1) de copa abierta con un tronco central grueso y unas cuantas ramas grandes, su corteza es gruesa y fisurada de 1 a 3 cm de espesor y presentan una coloración gris o café en el exterior y un color rosado en el interior. El follaje es abundante de color verde brillante, las ramas son horizontales, la copa es piramidal, las hojas son largas y ovaladas (de 15 a 30 cm de largo) y se agrupan en los extremos de las ramas.

Las flores son blancas, pequeñas, hermafroditas y se agrupan en inflorescencia, son sésiles, esto es no tienen pedicelo o pedúnculo. Se producen abundantemente

a lo largo de ramas pequeñas de 1.3 a 5.1 cm, y tienden a agruparse hacia el final de las ramas.



Figura 5.1. Árbol de mamey
Balerdi y col, 2009.

El peso del mamey oscila entre 0.3 a 2.7 kg y se propaga por semilla tardando de 8 a 10 años para producir, los cuales en un año y medio aproximadamente alcanzan su desarrollo completo. Es un fruto climatérico, de corta vida de anaquel debido a su alta tasa de respiración. Es drupáceo de forma ovoide, sus medidas varían de 15 a 30 cm de largo por 10 a 15 cm de ancho, llegando a pesar hasta 3 Kg, presentan una coloración café en el exterior, adquiriendo un color rosado en su interior con exudado abundante y presenta un olor característico a almendras (figura 5.2) y es recuente encontrar en un mismo árbol frutos en diferentes estados de desarrollo. La cáscara es dura, áspera de color gris rojizo, escamosa; el mesocarpo es de sabor dulce, es de un sabor dulce y aroma muy agradable y/o finamente granular, de color rosa salmón, llegando a ser casi roja. La semilla tiene una superficie dura de color carmelita oscuro y brillante pero en el lado ventral posee una zona más estrecha

(hilo) de color carmelita claro, tiene una testa dura de color café oscuro brillante de forma elíptica y su número puede variar de 1 a 3 (Balerdi y col, 2009).

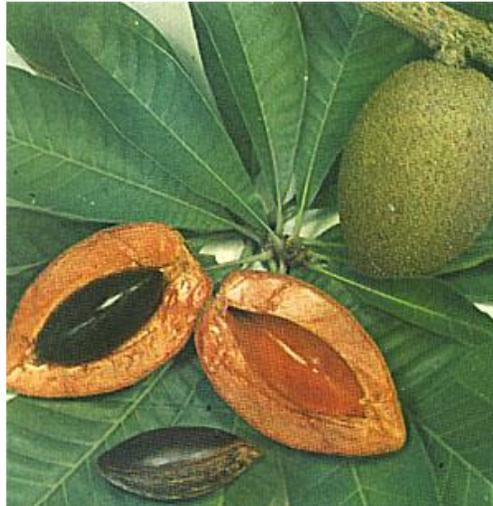


Figura 5.2. Zapote Mamey (*Pouteria sapota*)
Laiz-Saldaña y col, 2009.

La porción comestible, la pulpa, representa aproximadamente el 70% mientras que la porción no comestible representa cerca del 30% de la masa total del fruto, la cascara constituye entre el 14.54 y el 16.21%, la semilla o hueso del mamey aproximadamente el 14% y la almendra contenida en la semilla o hueso entre el 10.07 y 8.83% de la semilla de la fruta respectivamente (Solís-Fuentes y col, 2015).

Es un fruto tropical muy apreciado por su agradable y especial sabor, la pulpa se emplea tanto para consumo en fresco como para la elaboración de helados, ates, jaleas, cremas, mermeladas, dulces, postres. Las semillas se utilizan para obtener aceites, jabones y objetos ornamentales entre otros (Morera, 1994).

El mamey se come usualmente en preparaciones donde la pulpa fresca o congelada se mezcla con otros ingredientes para hacer batidos o helados. Puede comerse

fresco también, cortando la fruta sagitalmente y removiendo la semilla. El mamey es también excelente para hacer pastas y conservas. Las semillas pueden molerse para preparar un “chocolate” amargo.

El mamey es un fruto valioso no sólo para la producción comercial sino también como árbol ornamental, si no hay límites de espacio. Requiere pocos cuidados y produce un fruto atractivo, útil y que tiene buen sabor.

El contenido nutricional de 100 gramos de pulpa de mamey fresca es: calorías 107; 1.0 g de proteínas; 0.5 g de grasas; 28 g de carbohidratos; 1.4 g de fibra; 0.7 g de cenizas; 22 mg de calcio; 14 mg de fósforo; 0.9 mg de hierro; 6 mg de sodio y 226 mg de potasio. En cuanto al contenido vitamínico posee 60 IU de vitamina A; 0.02 mg de tiamina; 0.02 mg de riboflavina; 1.4 mg de niacina y 23 mg de ácido ascórbico (Balerdi y col, 2009).

5.1.2 USOS DE LA SEMILLA DE MAMEY

Esta fruta autóctona de Mesoamérica, ha tenido diversos usos a lo largo de la historia de los pueblos de América Latina y, actualmente, su producción e industrialización para la elaboración de diversos productos alimenticios ha observado ampliaciones importantes. Sin embargo, todavía es muy poca la investigación que se ha realizado en torno a sus múltiples propiedades que los pueblos prehispánicos y la cultura popular en algunos países de Centroamérica ha conocido.

Aunque el valor del zapote mamey radica principalmente en su pulpa, la semilla ha sido utilizada de manera tradicional como fuente de aceite, debido al alto contenido de este componente, aproximadamente el 46% de su peso. A este aceite se le han

dado diversos usos, principalmente en las áreas de cosmetología y farmacéutica entre otras (Solís–Fuentes y col, 2001).

El contenido de lípidos de la semilla de mamey puede fluctuar entre 40 y 60%, cuestión que por sí misma le otorga una gran potencialidad como fuente alterna de grasas y aceites de origen vegetal (Solís–Fuentes y col, 2005).

Laiz–Saldaña y col. (2009), mostraron la posibilidad de usar el aceite de la semilla de mamey para la producción de biodiesel, resaltando una perspectiva favorable desde el punto de vista técnico y económico, ya que la semilla de mamey es considerada un residuo. Sin embargo, esta tiene un alto contenido de aceite en la que predominan ácidos grasos insaturados.

Hoy en día el aceite de la semilla de mamey está siendo evaluado más allá de aplicaciones artesanales y se ha estado analizando en gran detalle, por ejemplo, ha adquirido una posición interesante como una fuente de alcohol triterpeno, cuyas propiedades permiten que sea utilizado para aplicaciones en cosméticos (es comúnmente considerado efectivo en el cuidado y curación de la piel, y para mejorar la tolerancia a los rayos UV, etc.) y en la farmacología (su capacidad anti – inflamatoria, el tratamiento de hematomas y quemaduras, etc.) (Solís–Fuentes y col, 2015).

5.1.3. ESTRUCTURA DE LAS OLEAGINOSAS.

La principal característica de las células de las semillas oleaginosas es la presencia de organelos celulares llamados cuerpos lipídicos y cuerpos proteicos, los cuales contienen respectivamente la mayoría del aceite y proteína presentes en el grano, como se observa en la figura 5.3., que muestra la estructura microscópica de la

semilla de soya, la cual es muy similar a la estructura de la mayoría de las semillas oleaginosas.

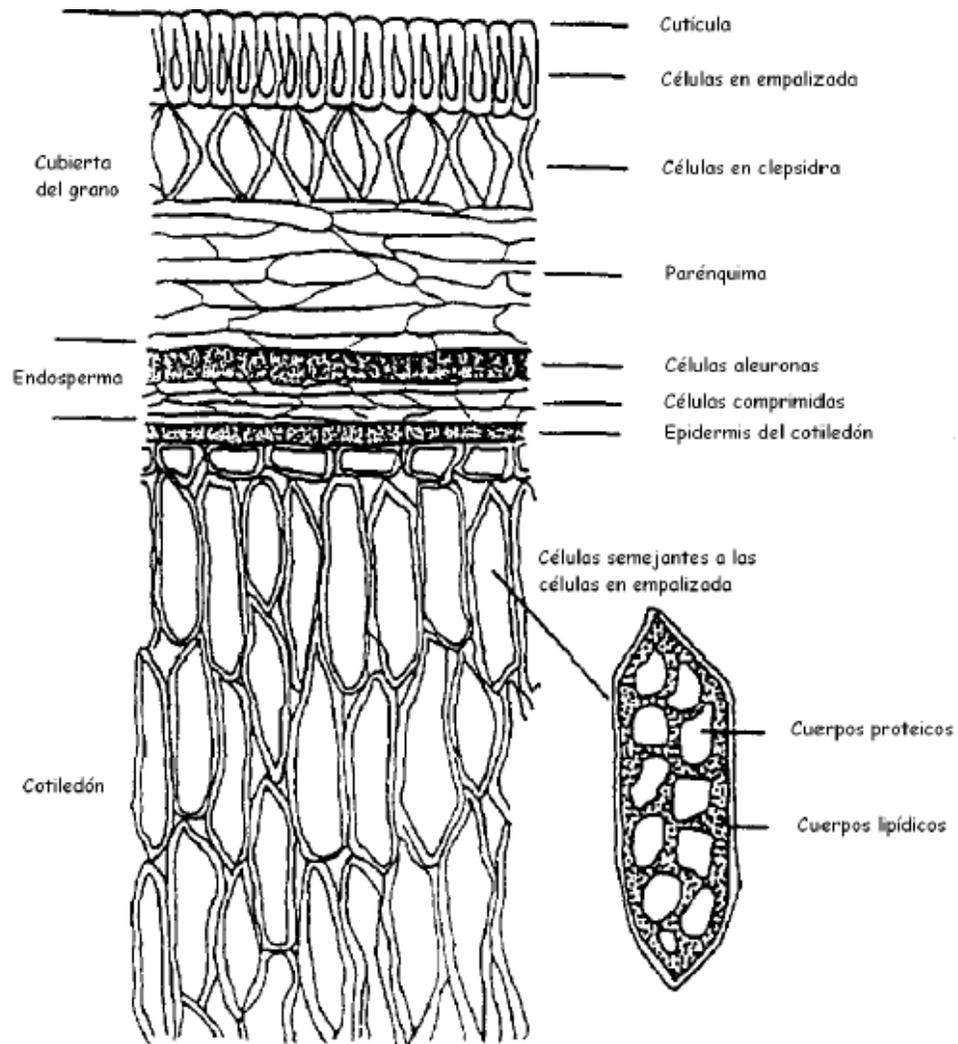


Figura 5.3. Estructura del cotiledón y endosperma de los granos de semilla oleaginosas.
Rosenthal y col, 1996.

Los cuerpos proteicos o granos oleurónicos varían en tamaño dependiendo de la semilla oleaginosa y también varían de tamaño en un amplio rango dentro de cada tipo de oleaginosa. Estos cuerpos proteicos contiene entre 60 y 70% de toda la proteína contenida en la semilla, en tanto que los cuerpos lipídicos (también conocidos como oleosomas o esferosomas) son el sitio principal de depósito de los lípidos, no solo en semillas oleaginosas sino también en frutos oleaginosos. Su tamaño frecuente oscila entre 1 a 2 μm de diámetro para la mayoría de semillas oleaginosas.

A partir de estudios de microscopía se ha demostrado además que los cuerpos lipídicos en las semillas oleaginosas, están inmersos en un entorno citoplasmático presumiblemente compuestos por proteínas, de manera que los espacios entre los cuerpos proteicos presentes en las células son llenados posteriormente por los cuerpos lipídicos y el entorno citoplasmático.

Las células de las semillas oleaginosas están rodeadas por una pared celular conformada principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. La celulosa es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa que se mantienen unidas mediante enlaces β 1,4 glucosídico. Su configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales se unen entre sí mediante enlaces de hidrogeno intermolecular formando una estructura supermolecular cristalina y organizada (Duran, 2010).

5.2 ACEITES

Los aceites son una de las categorías pertenecientes a los lípidos, y debido a esto comparte características similares, como insolubilidad en el agua, mayor viscosidad y menor densidad que ésta (Casimir, 2002).

Los aceites de origen vegetal o animal son triacilglicéridos ya que la glicerina se esterifica en sus tres posiciones con ácidos grasos. La glicerina o glicerol es un alcohol cuyos carbonos están sustituidos por tres grupos oxidrilos (propanotriol). Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas con grupos carboxilo (COOH) en el extremo de la cadena lineal (Rojas, 2011).

Los triacilglicéridos son los acilglicéridos más abundantes en la naturaleza y los principales componentes de todas las grasas y aceites ya que representan más del 95% de su composición. Los acilglicéridos (figura 5.4), lípidos neutros o sin carga, son los productos derivados de la reacción de esterificación entre el glicerol y una, dos o tres moléculas de ácidos grasos (Badui, 1999).

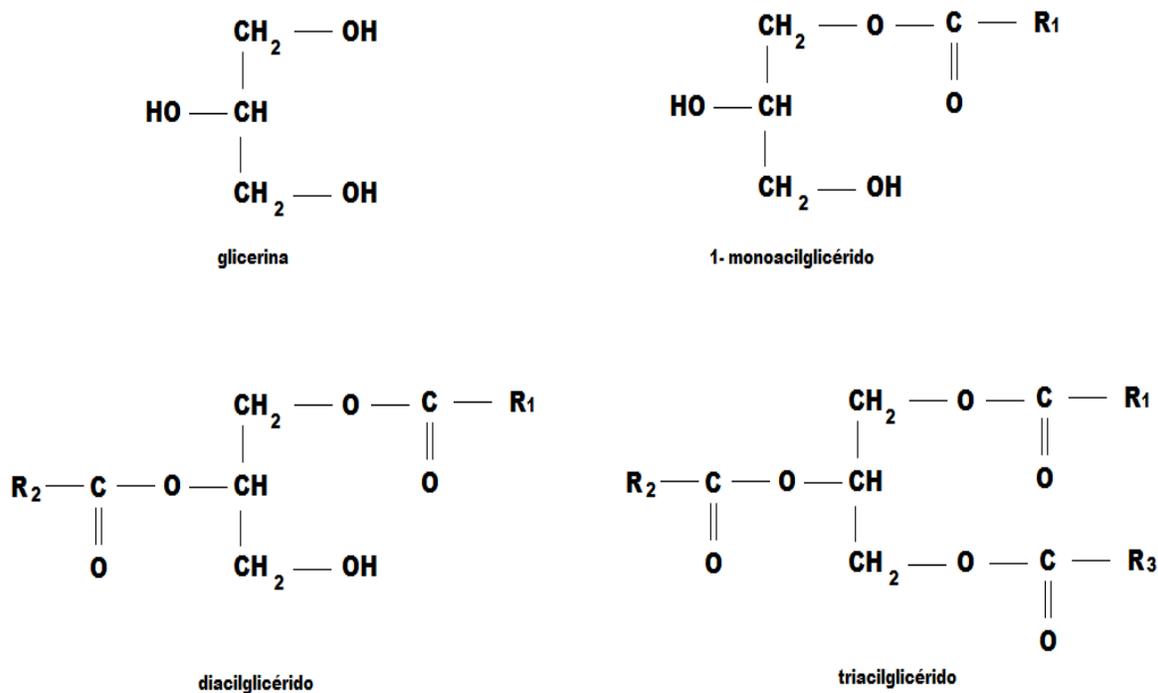


Figura 5.4. Tipos y estructuras de los acilglicéridos.
Badui, 1999.

Tradicionalmente, los ácidos grasos se definieron como ácidos monocarboxílicos de cadena alifática con número par de átomos de carbono, que podían ser saturados e insaturados; sin embargo, en la medida en que las técnicas de análisis cualitativo y cuantitativo mejoraron, se identificaron muchos otros con estructuras diferentes, tales como ácidos cíclicos, ramificados, hidroxilados, con número impar de átomos de carbono, etc., de tal manera que en la actualidad se conocen más de 400 que se localizan en los tejidos animal y vegetal, así como en ciertos microorganismos (Badui, 1999).

Los ácidos grasos se nombran de acuerdo al hidrocarburo que derivan. Por ejemplo, un ácido con una cadena de 18 carbonos es llamado ácido octadecanoico que deriva del octadecano (Casimir, 2002).

En cuanto a los ácidos grasos que comúnmente se localizan en los alimentos, su número se reduce considerablemente y solo resaltan por su importancia los que se muestran en los cuadros 5.2 y 5.3.

Cuadro 5.2. Ácidos grasos saturados más comunes en alimentos.

Nombre trivial	Nombre científico	Fórmula	Punto de fusión(°C)	Punto de ebullición(°C)
Láurico	Dodecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	44.2	130
Mirístico	Tetradecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	54.4	149
Palmítico	Hexadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	63.0	167
Esteárico	Octadecanoico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	69.4	184

Casimir, 2002.

Los ácidos grasos saturados están constituidos principalmente por ácidos de 4 a 24 átomos de carbono; su temperatura de punto de fusión aumenta con el peso molecular o tamaño de la molécula; así los de C₄ a C₈ son líquidos a 25°C, mientras que los de C₁₀ en adelante son sólidos; su solubilidad en agua es inversamente

proporcional al peso molecular. Los ácidos grasos saturados son mucho más estables a los diversos mecanismos oxidativos de deterioro de las grasas que los insaturados; sin embargo, en condiciones de temperatura muy alta (más de 200°C), y en presencia de oxígeno, puede sufrir reacciones de oxidación (Badui, 1999).

Cuadro 5.3. Ácidos grasos insaturados más comunes en alimentos.

Nombre trivial	Nombre científico	Fórmula	Punto de fusión (°C)
Palmitoleico	Hexadeca-9-enoico	CH ₁₅ H ₂₉ COOH	-0.5
Oleico	Octadeca-9-enocio	CH ₁₇ H ₃₃ COOH	13.0
Linoleíco	Octadeca-9:12-dienoico	CH ₁₇ H ₃₁ COOH	- 5.0
Linolénico	Octadeca-9:12:15-trienoico	CH ₁₇ H ₂₉ COOH	- 11.0
Araquidónico	Eicosa-5:8:11.14-tetraenoico	CH ₁₉ H ₃₁ COOH	- 49.5
Vaccénico	Octadeca-11-enoico	CH ₁₇ H ₃₂ COOH	39.5
Gadoleico	Eicosa-11-enoico	CH ₁₉ H ₃₇ COOH	23.5

Casimir, 2002.

Estos ácidos son los llamados ácidos grasos insaturados o ácidos grasos esenciales, llamados así porque el organismo humano no es capaz de sintetizarlos por sí mismo, y es necesario por tanto ingerirlos en los alimentos (Rojas, 2011).

Debido a la presencia de insaturaciones, estos compuestos tienen una gran reactividad química ya que están propensos a transformaciones oxidativas y de isomerización. Son muy abundantes en los aceites vegetales y marinos, su temperatura de fusión disminuye con el aumento de las dobles ligaduras y ésta es siempre menor que la de los saturados para una misma longitud de cadena. Los que contienen solo una insaturación se llaman mono insaturados, y a los demás de una se les denomina poliinsaturados (Badui, 1999).

La nomenclatura de los triacilglicéridos depende de los ácidos, de tal manera que cuando contienen un solo tipo se llaman triacilglicéridos simples y cuando poseen dos o tres ácidos se consideran como mixtos, los nombres de los primeros se forman añadiendo el sufijo “ina” a la raíz que denota el ácido graso que contiene: triestearina, tripalmitina y trioleína, corresponden a triacilglicéridos que contiene solo ácido esteárico, palmítico y oleico, respectivamente; también se pueden nombrar usando la terminación “acilglicéridos”, en cuyo caso se llamarían: triestearilacilglicérido, tripalmitilacilglicérido y trioleilacilglicérido.

Por otra parte, la nomenclatura de los mixtos se basa en indicar consecutivamente los tres ácidos grasos, utilizando la terminación “il” o “ato” para cada uno; cuando se hace en forma ordenada se llama enumeración estereoespecífica, y se denota con el prefijo “sn” que se escribe antes del nombre del compuesto. Por ejemplo, un triacilglicérido con los ácidos linoleico, esteárico y palmítico en posiciones 1,2 y 3 respectivamente, se denomina sn-gliceril-1-linoleato-2-estereato-3-palmitato, o bien, linoleo-estearo-palmitina, ó 1-linolil-2-estearil-3-palmitina. Los que contienen dos ácidos grasos iguales y uno desigual se designan con el prefijo “di”, o bien se numeran las posiciones donde se encuentran dichos ácidos: β -palmitil- α , α' diestearina equivale a la 2-palmitil-1,3-diestearina; en muchos casos se omiten las posiciones de los ácidos, en cuyo caso este compuesto sería la diestearopalmitina ó palmitidildiestearina.

Las características físicas y químicas de los triacilglicéridos dependen fundamentalmente del tipo, concentración y la forma de distribución de sus ácidos grasos en las tres posiciones (Badui, 1999).

Pueden distinguirse dos tipos de aceite: los vírgenes y los refinados. Los primeros se extraen mediante prensado en frío (no más de 27°C) y finalmente se aplica un proceso físico como la decantación durante 40 días para separar los residuos más finos. Los principales aceites vírgenes que se comercializan son los de oliva y de

girasol (aunque la mayor parte de este último es refinado), algunos de semillas como colza, soya, uva, calabaza o de algunos frutos secos como nuez, almendra, avellana., etc.

Los aceites refinados son aquéllos que se someten a un proceso de refinado y desodorizado que permite obtener un aceite que responde a ciertos criterios: organolépticamente es de sabor neutro, visualmente está limpio y con un color adecuado, y además es seguro alimentariamente; la refinación permite que el aceite tenga una mejor conservación. Esta técnica suele utilizarse para modificar aceites que no son aptos para el consumo humano o para aumentar la producción de determinados productos que no resultan rentables cuando se someten a presión en frío (Rojas, 2011).

Dentro de las propiedades físico-químicas de los aceites se encuentran:

Densidad (g/mL): se presenta como la cantidad de aceite (en unidades de masa) contenida en un volumen determinado. Comúnmente se utiliza la densidad del agua para su comparación, la cual es mayor que la de los aceites (Jiménez, 2001).

Índice de refracción: mide el grado de desviación que sufre un haz de luz cuando pasa a través de un medio, (en este caso aceite). Este puede ayudar a determinar de manera cuantitativa y cualitativa la presencia de ácidos grasos saturados; si es alto, la grasa tendrá tendencia a solidificarse y será más turbia (Jiménez, 2001).

Índice de saponificación (mg KOH/g): se define como la cantidad de hidróxido de potasio, expresada en mg, que se precisa para saponificar (hacer jabón) un gramo de muestra (Jiménez, 2001).

Índice de yodo (g I/g): se define como la cantidad de gramos de yodo que resulta ligada por cada 100 gramos de grasa. El índice de yodo es una medida del grado de insaturación de los componentes de una grasa; será tanto mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, por esto se utiliza para comprobar la pureza e identidad de las grasas. Así, el índice de yodo del ácido oleico es 90, del ácido linoleico es 181 y del ácido linolénico es 274 (Jiménez, 2001).

Índice de peróxido (meq/g): indica el estado de oxidación inicial del aceite en miliequivalentes de oxígeno activo por gramo de grasa, permitiendo detectar la oxidación antes de que se note organolépticamente, por medio de olores característicos de la rancidez. A mayor índice de peróxido el aceite se oxidará más fácilmente (Jiménez, 2001).

Índice de acidez (mg KOH /g): es el porcentaje de ácidos grasos libres contenidos en el aceite. En los aceites vegetales se expresa como si todos los ácidos grasos libres fueran ácido oleico $C_{18}H_{34}O_2$. Sólo en casos particulares, según la procedencia de la grasa, se expresa referida a ácido palmítico $C_{16}H_{32}O_2$, ácido Láurico $C_{12}H_{24}O_2$, u otros. Salvo que se indique otra cosa, la acidez de un aceite vegetal se entiende expresada en gramos de ácido oleico por gramos de muestra (100 g) (Jiménez, 2001).

5.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES

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 (Grasso, 2013).

Sin embargo, se han sugerido nuevos métodos de extracción alternativos a los procesos que involucran principalmente el uso de solventes, tal es el caso de extracción por microondas, flúidos supercríticos, prensado en frío y centrifugación.

5.3.1 EXTRACCIÓN POR PRENSADO

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 expeller 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 dificultosos 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, algodón y germen de maíz (Grasso, 2013).

5.3.2 EXTRACCIÓN POR SOLVENTE

La extracción por solventes se inició en Europa en procesos por lotes en 1870. Después de la Segunda Guerra Mundial se desarrollaron técnicas para que la extracción fuera continua y en contracorriente, con el fin de que esta tecnología fuera efectiva inclusive para aquellos materiales con muy bajo contenido de aceite (Rosenthal y col, 1996).

La extracción por Soxhlet es efectiva para varios tipos de semillas, pero es potencialmente perjudicial en consumo de energía (tiempo de extracción 4-48 h) y altos volúmenes de solvente (100-500 mL por muestra). El solvente en particular presenta numerosos retos: debe ser altamente puro y estar en condiciones de reducir picos no deseados en un subsecuente análisis cromatográfico y es por lo tanto muy costoso.

La extracción permite separar los componentes de una solución debido a la distribución desigual de los componentes entre dos líquidos inmiscibles. En general, la sustancia que se va a tratar se pone en contacto directo con un líquido completamente inmiscible capaz de extraer por solubilidad uno o más componentes. Es usual que el aceite obtenido por esta técnica sea utilizado para uso cosmético y farmacéutico (Acosta, 2011).

El proceso de extracción con solventes requiere de una posterior purificación para retirar las impurezas solubles e insolubles presentes, esta etapa en general se conoce como refinación, aunque incluye los procesos de refinación, blanqueo y desodorización (Acosta, 2011).

5.3.3 EXTRACCIÓN POR MICROONDAS

Debido a las preocupaciones ambientales y los riesgos potenciales para la salud de los disolventes orgánicos, los disolventes no orgánicos se han hecho populares. Recientemente se ha informado, el uso de digestión por microondas para la extracción de lípidos. Se sugiere que la energía de microondas, mediante el aumento de la fuerza de rotación sobre enlaces que conectan restos dipolares de las moléculas adyacentes, reduce la energía requerida para interrumpir las asociaciones hidrófobas como el enlace de hidrógeno y las fuerzas electrostáticas, ayudando así a disolver todas las clases de lípidos. La tecnología de microondas ha permitido el desarrollo de métodos rápidos, seguros y rentables para la extracción

de lípidos y no requiere que las muestras sean sometidas a secado para eliminar el agua (Casimir, 2002).

Ortiz y Col, (2005) aplicaron el método combinado de microondas y prensado para la extracción del aceite de aguacate variedad Hass. Obtuvieron los valores más bajos de enantiómeros trans (0.5 g) y concluyeron que la aplicación de microondas no afecta las propiedades físicas ni químicas del aceite obtenido. También observaron del análisis microestructural, que la aplicación de microondas provoca la salida de aceite de las vacuolas sin colapsar su pared celular.

5.3.4 EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La extracción con fluidos supercríticos (SFE), se lleva a cabo cuando el dióxido de carbono se comprime a una temperatura de 31.1°C y una presión de 72.9 atm por encima de su punto crítico, de forma que no se licúa, alcanza un estado gaseoso denso que se comporta como un disolvente. Por lo tanto, se llama CO₂ supercrítico (SC- CO₂). El uso de SC- CO₂ para la extracción de lípidos reduce significativamente el uso de disolventes orgánicos, evita los problemas de eliminación de residuos, elimina el uso de disolventes potencialmente tóxicos e inflamables, y reduce el tiempo de extracción de manera que los lípidos extraídos no son sometidos a altas temperaturas durante el proceso de extracción (Casimir,2002).

De acuerdo a Vinkler y col (2002), en el proceso de extracción con CO₂ supercrítico, la alimentación, generalmente un sólido molido, se carga al extractor. El CO₂ comprimido se calienta en un intercambiador de calor hasta la temperatura de extracción (30-60°C). Luego se alimenta al extractor a través de una bomba de alta presión (100 a 400 Bar) que procede a extraer la esencia del sólido molido cargado. La mezcla CO₂- extracto se envía a un separador (150 a 50 Bar) con un paso previo a través de una válvula de reducción. A la temperatura y presión reducidas, el extracto precipita espontáneamente en el separador, mientras el CO₂, libre de

cualquier extracto, se recicla al proceso, con pasos previos de enfriamiento y compresión.

La extracción SC-CO₂ es capaz de recuperar 97-100% de lípidos en comparación con los métodos convencionales de extracción con disolvente; no se presentó diferencias significativas entre los ácidos grasos extraídos de aceite a partir de soya, germen de maíz y semillas de canola (Taylor y col, 1993).

Varios investigadores han demostrado que la extracción con fluídos supercríticos (SFE) podría sustituir a los métodos de extracción con disolvente en una gran variedad de muestras. De hecho SFE recientemente se ha incluido en los métodos recomendados de la AOAC para extraer lípidos a partir de semillas oleaginosas. El principal inconveniente de SC-CO₂ es el costo del equipo y la extracción de materiales no grasos, tales como agua (Casimir, 2002).

5.3.5 EXTRACCIÓN POR PENSADO EN FRÍO

La extracción por prensado en frío constituye una buena alternativa para obtener un aceite natural sin involucrar productos químicos dentro del proceso, sin embargo, el bajo rendimiento es uno de los puntos cuestionables de esta técnica, aunque últimamente se han postulado alternativas como la degradación de la pared por medio de enzimas, que permiten mejorar la eficiencia del proceso (Clavijo, 2004).

El prensado es la separación de líquido de un sistema de dos fases (sólido -líquido) que no se puede bombear con facilidad, mediante la compresión en condiciones que permiten que el líquido escape al mismo tiempo que retiene el sólido entre las superficies de compresión. Este método se originó en Europa en 1975 (Rosenthal y col., 1996).

El método de prensado utiliza la fuerza de dos planchas metálicas, una fija y la otra móvil accionada por presión, puede ser en forma de mandíbula o de cilindro

compresor y se utiliza para romper las estructuras de la muestra liberando la materia grasa presente en ella. Este método se utiliza para tamaños variables de muestra y en la mayoría de los casos también se utiliza como una etapa previa a la extracción con solventes, para facilitar la acción y disminuir la cantidad necesaria del mismo (Acosta, 2011).

En el proceso las fases sólida y líquida se separan por presión, mientras que la separación final del aceite de la fase acuosa y de otras sustancias, se hace por centrifugación. Es el modelo más común en la producción del aceite de oliva virgen (Acosta, 2011).

5.3.6 EXTRACCIÓN POR CENTRIFUGACIÓN

Otro método de extracción es por medio de centrifugación, este se realiza por medio de equipos que utilizan la fuerza centrífuga y la diferencia de densidades entre el agua y el aceite para la obtención del aceite. Se realiza a temperaturas menores de 45°C, lo que permite que no se modifiquen las propiedades nutricionales de este.

Los separadores centrífugos se basan en el principio de que si un objeto gira a gran velocidad en torno a un punto central, a una distancia radial constante del mismo, está sujeto a la acción de una fuerza. El objeto cambia constantemente de dirección y, por consiguiente, se acelera incluso cuando la magnitud escalar de su velocidad es constante. Esta “aceleración centrípeta” se debe a la fuerza centrípeta que actúa en la dirección hacia el centro de rotación. Si el objeto es un recipiente cilíndrico, su contenido ejerce una fuerza igual y opuesta, la “fuerza centrífuga”, hacia fuera de las paredes del recipiente. Esta fuerza es la que provoca la sedimentación de las partículas sólidas pesadas a través de una capa de líquido (Acosta, 2011).

Fawcett (2004), reportó la obtención de un rendimiento del 57.38% (b.s.), en la extracción del aceite de pulpa de aguacate de la variedad Lorena. El aguacate fue

sometido a un pre tratamiento que incluye el despulpado manual, en el que se descartan la semilla y la cáscara, la maceración y la homogenización se realizaron a 35°C por 15 minutos. La pasta obtenida se dispone para la centrifugación a una velocidad de 8000 rpm durante 10 minutos. Después se retira la fase oleosa y se coloca en una segunda centrífuga a la misma velocidad y durante 5 minutos, se retira de nuevo la fase oleosa y se repite el proceso hasta que se asegure la remoción de restos de agua y tejido celular que pudieran haberse mezclado con el aceite.

5.4 ENZIMAS

Químicamente las enzimas son proteínas con una estructura química especial, contienen un centro activo, denominado apoenzima y algunas veces no proteico, denominado coenzima. Toda la molécula (apoenzima y coenzima) recibe el nombre de haloenzima (Pelczar, 1984).

Las enzimas tienen la capacidad de acelerar las reacciones químicas, sin alterarse como consecuencia de la reacción; son específicas y solo actúan en un determinado tipo de reacción. Como todos los catalizadores funcionan en una concentración molar mucho menor que la del reactivo sobre el cual funciona. Un mol de enzima facilita la conversión de muchos moles de reactivo en producto. Una molécula enzimática generalmente cataliza la conversión de 10 a 1000 moléculas de sustrato/s. Con frecuencia estas reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar con velocidades de 1000 a 1000 000 de veces más rápidas que si no está catalizada la reacción por la enzima.

Las enzimas pueden ser: Enzimas extracelulares o exoenzimas (funcionan fuera de la célula) o enzimas intracelulares o endoenzimas (funcionan dentro de la célula).

La función principal de una enzima es rebajar el nivel de energía de activación para que tenga lugar una reacción química. La energía de activación es la cantidad de energía necesaria para inducir en una sustancia un estado de reactividad. La enzima se combina con la sustancia (S) induciéndole una situación transitoria que requiere una menor energía de activación, para que tenga lugar la reacción. La Figura 5.5 representa este proceso (Pelczar, 1984).

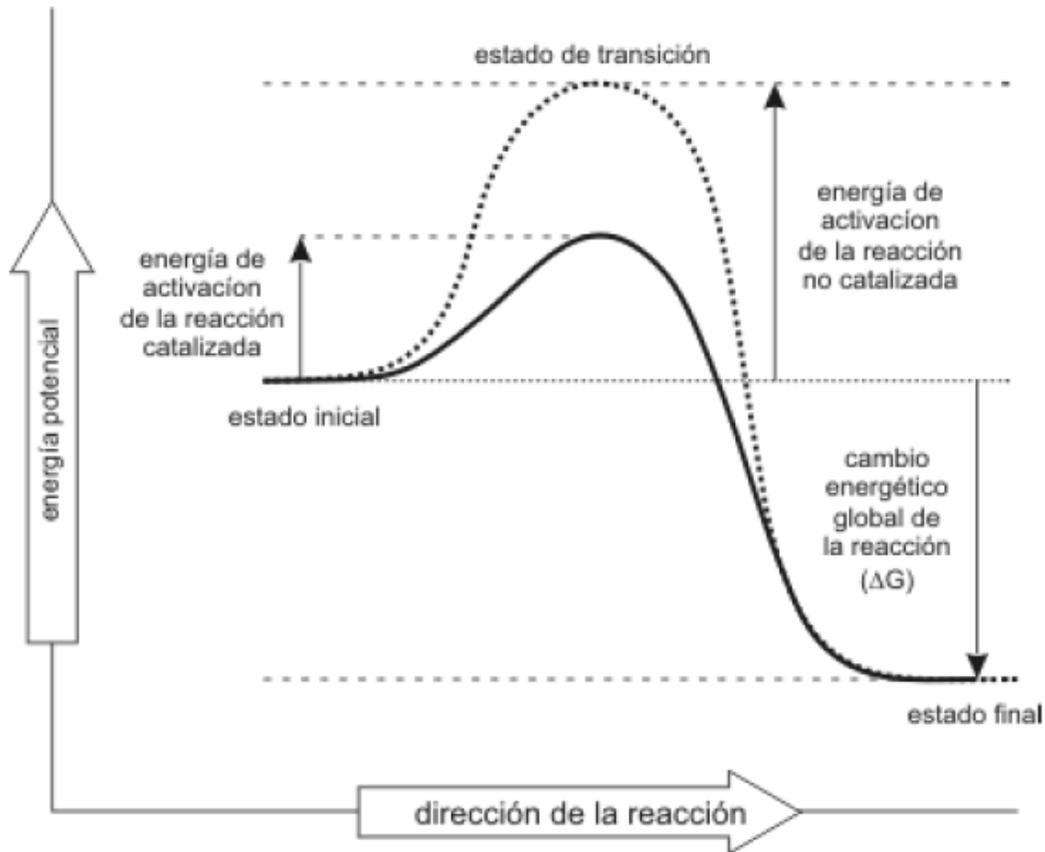


Figura 5.5. Comportamiento del nivel energético en el avance de una reacción enzimática.
Pelczar, 1984

Desde sus inicios, la nomenclatura enzimática ha sido poco sistemática, y carece de los lineamientos necesarios para darles nombres adecuados. Existen muchas enzimas cuyos nombres no ofrecen ninguna información sobre su actividad o sus

propiedades. Unas se han designado con el nombre del descubridor, otras de acuerdo con su procedencia y en otros casos, según el sustrato que utilizan. Debido a esta falta de homogeneidad en la nomenclatura, se integró la comisión de enzimas de la unión internacional de bioquímica. La base de clasificación y nomenclatura está en el tipo de reacción que catalizan, de acuerdo a la clasificación internacional las enzimas se agrupan en seis clases principales, como se muestra en el cuadro 5.5 (Badui, 1999).

Cuadro 5.5. Clasificación de las enzimas

Número	Clase	Reacción catalítica
1	Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción
2	Transferasas	Promueven transferencia de distintos grupos químicos.
3	Hidrolasas	Llevan a cabo la ruptura de enlaces químicos con la introducción de una molécula de agua.
4	Liasas	Rompen los enlaces sin la participación de agua.
5	Isomerasa	Catalizan las isomerizaciones de distintos compuestos.
6	Ligasas	Promueven la unión de dos moléculas por mediación de ATP o de un compuesto similar.

Badui, 1999.

Las enzimas se ven afectadas principalmente por la concentración en la que se empleen, la concentración del sustrato, pH y la temperatura del medio. En la Figura 5.6 se observa que al incrementar la concentración de enzima aumenta la actividad enzimática, mientras que al incrementar la cantidad de sustrato la actividad aumenta hasta cierto punto y luego permanece constante, también se muestra que la

actividad máxima se presenta a un pH determinado y las desviaciones de éste determinan menor actividad. Por su parte, la actividad enzimática crece al incrementarse la temperatura hasta que se alcanza un óptimo. El posterior incremento de la temperatura provoca un descenso de actividad y la eventual destrucción de la enzima, por el efecto de la desnaturalización de las proteínas (Conn, 1996).

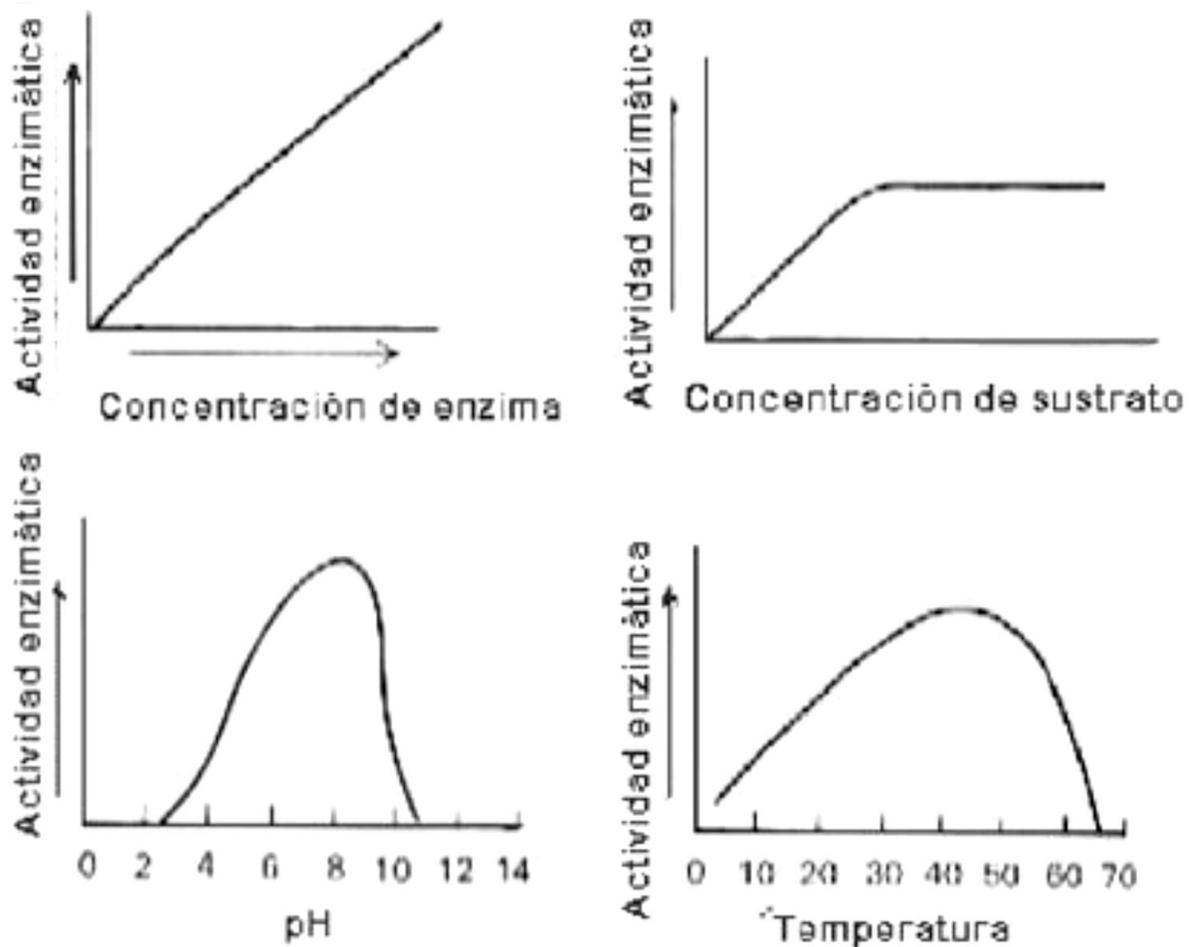


Fig.5.6. comportamientos de la actividad enzimática a diferentes factores.
Conn, 1996.

5.4.1 USO INDUSTRIAL DE LAS ENZIMAS

Las enzimas llamadas industriales se utilizan frecuentemente para mejorar procesos, por ejemplo, para facilitar el empleo de nuevos tipos de materias primas o las propiedades físicas de un material con el objeto de poder procesarlo más fácilmente, ya sea aumentando su solubilidad o disminuyendo su viscosidad de forma que se facilite su transporte durante el procesado. En segundo lugar, las enzimas se utilizan para mejorar el producto; por ejemplo, cambiando el color, aroma, textura, sabor o vida útil de un alimento, con el fin de que resulte más aceptable para el consumidor (Wiseman, 1991).

El empleo de enzimas en la industria no es nuevo, ya que ha estado asociado a procesos tradicionales en algunos casos con una vigencia de cientos de años. Los biocatalizadores se usan en industrias como la licorera, panadera, láctea, textilera, de aplicaciones ambientales, de producción de detergentes, entre otras (Villate y col, 1998).

Las enzimas intervienen en muchos procesos industriales, como se muestra en la figura 5.7 (Carrera, 2003).

De las miles de enzima conocidas, solo algunas se producen en escala industrial para emplearse en la manufactura tanto de alimentos como de las materias primas para su elaboración. Cada día aumenta el número de reacciones que se efectúan por rutas enzimáticas, y esta tendencia seguramente aumentará a medida que existan más catalizadores de este tipo en el comercio, a precios accesibles (Badui, 1999).



Figura 5.7. Usos industriales de las enzimas
Carrera, 2003.

Actualmente la mayoría de las enzimas utilizadas en la industria se emplean en el procesado de alimentos, sin embargo, es muy probable que los usos industriales de las enzimas aumenten en el futuro, ya que se ha estimado que el 40% de la producción industrial de los países desarrollados será de origen biológico (Villate y col, 1998).

La producción de enzimas para uso industrial tuvo sus orígenes en Dinamarca y Japón a finales del siglo XIX. Las enzimas son productos de las células y por lo tanto pueden obtenerse a partir de tejidos animales, tejidos vegetales o mediante

procesos de fermentación empleando microorganismos seleccionados. Las plantas han sido la fuente tradicional de ciertas enzimas (Acosta, 2011).

El empleo de enzimas tiene muchas ventajas: son de origen natural y por lo tanto no deben ser tóxicas; son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables; funcionan en condiciones moderadas de temperatura y de pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni de equipo muy costoso; actúan a bajas concentraciones; su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de enzimas y son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado (Badui, 1999).

Al igual que cualquier aditivo alimentario, las enzimas deben cumplir con determinadas especificaciones de calidad, sobre todo en cuanto a su toxicidad, o la del microorganismo que la produce, en caso de que sea de origen microbiano. Debido a que las enzimas que se emplean en la industria no son puras (resulta muy costosa su purificación completa), es preciso tomar en consideración todos los materiales extras que contienen, por esta razón, una preparación enzimática comercial es en realidad una mezcla de enzimas, en la que una de ellas predomina en actividad (Badui, 1991).

5.4.2. IMPORTANCIA Y CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS HIDROLASAS

Entre las hidrolasas, que son definitivamente las más abundantes, destacan las lipasas, las proteasas y las carbohidrasas (Badui, 1999).

Las lipasas son estereasas ampliamente distribuidas tanto en el reino animal como en el vegetal; abundan en las semillas oleaginosas, así como en la leche; en el páncreas y en muchos hongos y bacterias. Su acción es hidrolizar los enlaces éster, principalmente de los triacilglicéridos, existen diversos tipos de lipasas y su actividad

conjunta puede causar la liberación de los tres ácidos grasos. En general se usan poco y su mayor aplicación es en la elaboración de diversos productos lácteos, principalmente en quesos duros; en estos liberan ácidos grasos de cadena corta (rancidez hidrolítica) que contribuyen al aroma o que sirven de sustrato para reacciones secundarias (Badui, 1999).

Las enzimas proteolíticas o proteasas comerciales hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Existen de origen vegetal como la papaína, la ficina y la bromelina; y de origen animal como la pepsina, la tripsina y la quimotripsina (Badui, 1999).

De todas las enzimas comercialmente disponibles, las carbohidrasas son las más abundantes y tal vez las más empleadas; se obtienen principalmente de fuentes microbianas que pueden ser hongos, levaduras y bacterias. Entre las carbohidrasas más importantes destacan las amilasas, las glucoamilasas, las dextranasas, las lactasas, las pululanasa, las invertasas, las pectinasas, las β – glucanasas, las celulasas y las hemicelulasas (Badui, 1999).

De estas, las tres últimas ejercen una acción hidrolítica sobre los enlaces β (1,4) de diversos polisacáridos, así la celulasa hidroliza las uniones β (1,4) de las glucanas, como la celulosa, produciendo celulodextrinas, se ha usado en forma limitada para mejorar la extracción de aceites, así como para ablandar los tejidos celulósicos de verduras y frutas. Las β – glucanasas se emplean principalmente para mejorar la extracción del mosto de cervecería y las hemicelulasas ayudan a descascarar los granos de café y en la producción del mosto para cervecería (Badui, 1999).

5.5 CASOS DE ESTUDIOS DEL USO DE ENZIMAS EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE

Ghazali y col, (2005) compararon la composición en ácidos grasos del aceite de semilla de *moringa oleifera* extraído con solvente (hexano) y pre-tratamiento acuoso enzimático. En la extracción del aceite con solvente obtuvieron 67.9% de ácido oleico en comparación con 70% en la extracción con enzimas. Otros ácidos grasos predominantes obtenidos fueron: ácido palmítico (7.8% y 6.8%), ácido esteárico (7.6% y 6.5%) y ácido behénico (6.2% y 5.8%) para extracción del aceite con solvente y extracción con enzimas, respectivamente. Reportando que los parámetros de calidad fueron mejores en la extracción asistida con enzimas que con solvente, evidenciándose por el bajo porcentaje de ácidos grasos libres.

La adición de enzimas ha sido utilizada ampliamente en procesos de extracción de aceite de semilla de uva obteniéndose un aumento del 27% (Zúñiga y col, 2003); aplicando un tratamiento enzimático previo a la extracción del aceite de semilla de uva con fluidos supercríticos se obtuvo un aumento del 44% (Passos y col, 2009). También en semillas de girasol y un híbrido, empleando una pectinasa al 2% w/w han reportado un aumento en el rendimiento de extracción del aceite de 13.6 para la semilla de girasol y 1.6 para el híbrido (Freccero y col, 2006).

Rojas-Morales y col, (2011) analizaron el efecto del pretratamiento enzimático, sobre la cantidad y calidad del aceite extraído de la almendra de dos variedades de mango, Tommy y Azúcar. Reportando que luego de utilizar la hidrólisis enzimática hubo un aumento en el rendimiento de la extracción de 9.63 y 8.25 % para el mango Tommy y Azúcar respectivamente, comparado con el método tradicional por solvente; sin embargo, en cuanto a calidad se refiere no reportan una mejora considerable.

Taha y col, (2007) estudiaron el efecto del pretratamiento con mezclas de enzima sobre la extractabilidad del aceite en hojuelas de semilla de algodón. Las enzimas que utilizaron fueron proteasa bacteriana (Bp), papaína (Pa), savinasa (S), temamil (T), pectinasa (Pe) y celulasa (C). El incremento relativo de extractabilidad debido al pretratamiento con mezclas de enzima siguieron el orden S: Pe: Bp > S: Pe > S: C: Pe > S: Bp > S: T < S: C > S: Pa con valores de 44.9%, 38.9%, 37.1%, 34.9%, 30.1%, 28.9%, respectivamente. Las características de los aceites obtenidos aplicando pretratamiento enzimático fueron generalmente similares al aceite control obtenido con hexano como solvente en cuanto a composición de ácidos grasos, acidez, índice de yodo e índice de peróxidos.

Clavijo (2004), analizó el efecto del tratamiento enzimático de Flavourzyme ® y celubrix ® sobre el rendimiento de extracción del aceite de la semilla de maqui (*Aristotelia chilensis*) antes del prensado, con enzimas de actividad pectolítica y celulítica, para ello evaluó la acción enzimática bajo diversas condiciones de concentración de enzima, pH, temperatura y tiempo de reacción, incrementando el rendimiento del proceso de extracción por prensado en frío en aproximadamente un 4%.

6. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

6.1 MATERIA PRIMA

6.1.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Los frutos de mamey fueron comprados en el mercado local de Tuxtla Gutiérrez tomándose en cuenta el estado de maduración del fruto y para ello se seleccionaron los frutos con mayor grado de madurez.

Se separaron la cáscara y la pulpa de las semillas manualmente, posteriormente se lavó las semillas para eliminar los residuos de pulpa, se secó con papel absorbente y se fracturaron empleando un martillo, para extraer las almendras. Previamente los frutos fueron pesados así como las partes anatómicas de los mismos (cáscaras, pulpa, semilla y almendra) con el fin de estimar el porcentaje promedio de cada uno en relación con la masa total del fruto (ANEXO A).

6.1.2. REDUCCIÓN DE TAMAÑO.

Las almendras obtenidas se redujeron de su tamaño original a trozos de aproximadamente 3 mm de espesor con un cuchillo de acero inoxidable, esto con la finalidad de evitar pérdidas de aceite por molienda, teniendo cuidado de que los trozos fueran de tamaño uniforme (ANEXO B).

6.1.3. SECADO DE LA MUESTRA

El material troceado fue deshidratado en una estufa de secado durante 12 horas a temperatura de 70°C hasta un contenido de humedad de aproximadamente del 14%.

6.2. EXTRACCIÓN CON PRETRATAMIENTO ENZIMÁTICO

6.2.1 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

La almendra troceada y deshidratada fue empleada para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, para ello se pesaron 5 g de la semilla previamente troceada en cada uno de los matraces Erlenmeyer, se adicionó 5 mL de agua destilada y se dejó hidratándolas por 24 horas. Posteriormente se adicionó 10 mL más de agua destilada y se ajustaron su pH a 5 y 6, tal como se señala en el cuadro 6.1, con solución de ácido acético 0.1 M.

Se adicionó la enzima comercial Viscozyme L, a la concentración como se indica en el cuadro 6.1.

Cuadro 6.1. Distribución de las muestras.

No. de tratamiento	pH	Concentración de enzima (%V/V)
1	5	0.2%
2		
3		
4		0.5%
5		
6		
7		1.0%
8		
9		
10	6	0.2%
11		
12		
13		0.5%
14		
15		
16		1.0%
17		
18		

Una vez adicionada la enzima, los matraces fueron tapados con papel aluminio y se colocaron en una agitadora con baño maría a 50°C y 200 rpm durante cuatro horas. La enzima que se utilizó fue adquirida de la empresa Sigma Aldrich, su nombre comercial es Viscozyme L, y se clasifica como carbohidrasas, las especificaciones técnicas se presentan en el cuadro 6.2.

Cuadro 6.2. Ficha técnica de la enzima Viscozyme L

Actividad enzimática	Arabanasa, celulasa, β -glucanasa, hemicelulasa y xilanasa.
Apariencia	liquido color marrón
Densidad	1.21 g/mL
Temperatura de actividad	50-60°C
pH de actividad	3.3 - 6

Sigma Aldrich, 2014.

6.2.2 CENTRIFUGACIÓN

Transcurrido el tiempo de incubación enzimática, la mezcla acuosa-enzima-aceite contenida en los matraces Erlenmeyer fue transferida a tubos falcón de 50 mL, posteriormente las muestras se llevaron a centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a 25°C. El aceite fue separado de la torta y se colocó en tubos de ensayo previamente pesados y bajo condiciones de refrigeración (-5°C) hasta su análisis.

6.3 EXTRACCIÓN POR SOLVENTE

Se pesaron 5 g de la almendra troceada deshidratada de mamey y se sometió a extracción en el equipo soxhlet durante 4 horas de reflujo, utilizando hexano como solvente, luego se separó la mezcla hexano-aceite en un evaporador rotatorio de

vacío (rota vapor), se cuantificó la cantidad de aceite extraído y se colocó en un recipiente ámbar y bajo condiciones de refrigeración para su posterior análisis (ANEXO C).

6.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DEL ACEITE DE LA ALMENDRA DE ZAPOTE MAMEY

6.4.1 TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE

Para la determinación del perfil de ácidos grasos se llevó a cabo su transesterificación de la siguiente manera, a partir de 100 μL de aceite se llevó a cabo una hidrólisis alcalina utilizando 1.0 mL de solución de NaOH 0.5 M preparada en metanol grado HPLC, la hidrólisis se llevó a cabo a 80°C por 20 minutos con agitación constante. Transcurrido este tiempo se adicionó 1.0 mL de BF_3/MeOH 14% y se mantiene a 20°C por 20 minutos con agitación constante. Posteriormente se realizó la extracción de los metil ésteres utilizando 1.0 mL de hexano grado HPLC, finalmente el extracto hexánico se inyectó al cromatógrafo de gases (Taha y Hassanein, 2007).

6.4.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM) DE LOS METIL ÉSTERES

Del extracto hexánico obtenido al finalizar la esterificación, se inyectó 1 μL de las muestras. La separación de los compuestos se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL (Net Work GC system), equipado con una columna DB-Wax (Agilent Technologies) de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 70°C, la cual se mantuvo durante 5 min. Posteriormente la temperatura se elevó hasta 210°C usando una rampa de calentamiento de 10°C/min. De 210°C pasa a 213°C a una velocidad de 1°C/min, finalmente de esta temperatura pasó a 225°C a una velocidad de 5°C/min durante 20 minutos haciendo

un total de 44.4 min por corrida para cada muestra. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue 250°C, en inyección Split.

Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada una de las señales cromatográficas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL. Los espectros de masa se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto con la base de datos NIST MS Library versión A.00.1995.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La masa total del fruto del zapote mamey en promedio fue de 501.67 ± 41.93 g, el porcentaje promedio que representa cada una de las partes que componen el fruto de zapote mamey en relación con su masa total se presentan en el cuadro 7.1.

Cuadro 7.1. Porcentaje de cada constituyente de la fruta de mamey (*Pouteria sapota*).

Partes del fruto	Peso (g)	Porcentaje (%)
Cáscara	95.00 ± 8.66	18.94
Pulpa	368.33 ± 36.17	73.42
Semilla con almendra	40.00 ± 5.00	7.97
Almendra	20.67 ± 2.05	4.12

Los porcentajes para cada componente del fruto en relación con la masa total de la fruta son similares con los reportados por Solís-Fuentes, (2015); quien reportó que cerca del 30% de toda la masa total del fruto corresponde a la porción no comestible, de las cuales, la cáscara representan entre el 16.215% y el 14.54%, las semillas con la almendra cerca del 14% y la almendra que se encuentra dentro de la semilla entre el 10.07% y el 8.83% esto para frutos inmaduros y maduros respectivamente. En nuestro estudio aunque la parte no comestible representa un dato similar a lo reportado por Solís-Fuentes (2015), para la cáscara el porcentaje fue mayor con un 18.94%, para la semilla con la almendra se obtuvieron porcentajes menores con un 7.97% y para la almendra un 4.12%. Sin embargo, la parte comestible representó 73.42% ligeramente mayor comparado con el 70% que reporta el mismo autor. Esto puede atribuirse al grado de madurez del fruto, la variedad, el desarrollo del fruto por las condiciones climáticas y las condiciones de cultivo.

A continuación se presenta en el cuadro 7.2 los resultados obtenidos en la extracción de aceite por vía acuoso-enzimática a tres diferentes concentraciones de la enzima viscozyme L empleando pH 5.

Cuadro 7.2. Rendimientos de aceite para muestras a pH 5 y a diferentes concentraciones de Viscozyme L.

pH	Concentración de enzima	Total aceite extraído(g)	% aceite (g aceite*100)/5
5	1%	1.87 ± 0.06	37.33 ± 1.15
	0.5%	1.93 ± 0.06	38.67. ± 1.15
	0.2%	2.03 ± 0.06	40.67 ± 1.15

Así también se muestran resultados para el tratamiento enzimático con pH 6, con las mismas tres diferentes concentraciones de enzima utilizadas para el tratamiento con pH 5 (cuadro 7.3).

Cuadro 7.3. Rendimientos de aceite para muestras a pH 6 y a diferentes concentraciones de Viscozyme L.

pH	concentración de enzima	total aceite extraído(g)	% aceite (aceite*100)/5
6	1%	2.00 ± 0.30	40 ± 4.24
	0.5%	1.90 ± 0.10	38 ± 2.00
	0.2%	1.60 ± 0.30	32 ± 6.00

Para validar los resultados obtenidos, se sometieron los datos a un análisis estadístico en el programa estadístico STATGRAPHICS centurión XVI, en donde se analizó el efecto de la concentración de enzima y del pH sobre el porcentaje de aceite extraído. En el cuadro 7.4 se muestra el análisis de varianza realizado.

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Para el contenido de aceite en porcentaje obtenido en los tratamientos con pH 5 y con pH 6, el valor de P nos indica que los porcentajes de aceites obtenidos son similares para las tres concentraciones es decir, no hubo diferencia significativa.

Cuadro 7.4. Análisis de varianza para el porcentaje de aceite.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:concentracion	5.77778	2	2.88889	0.31	0.7395
B:pH	10.8889	1	10.8889	1.17	0.3013
INTERACCIONES					
AB	67.1111	2	33.5556	3.60	0.0598
RESIDUOS	112.0	12	9.33333		
TOTAL (CORREGIDO)	195.778	17			

Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores ó interacciones tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de aceite extraído con un 95.0% de nivel de confianza; lo que significa que tanto la concentración de enzima como el pH no tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de aceite obtenido. Para tener una mejor visión sobre el efecto de la concentración de enzimas a pH 5 y 6 sobre el porcentaje de extracción del aceite, se presenta el gráfico de interacciones (Figura 7.1).

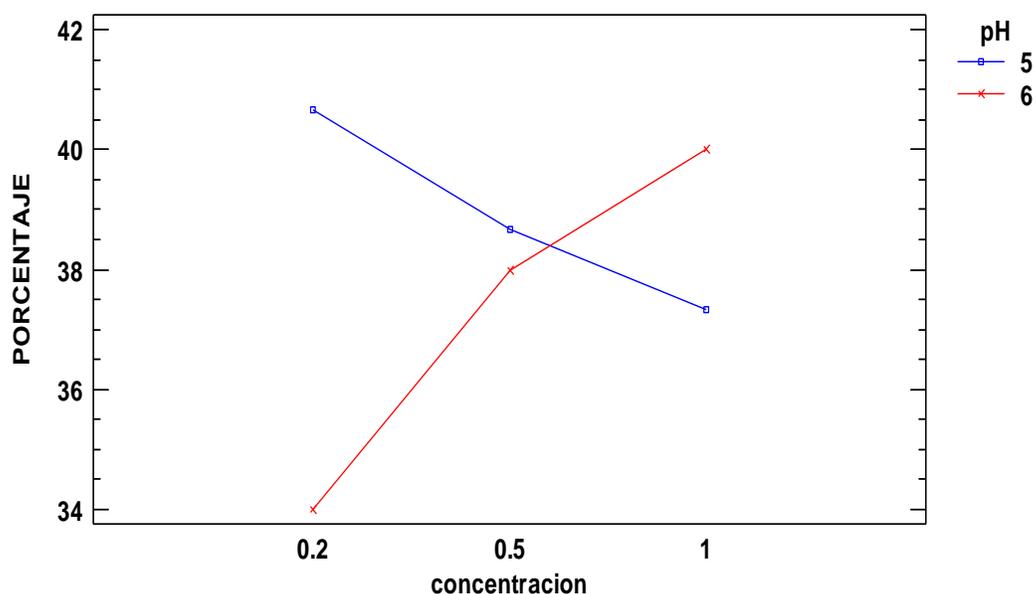


Figura 7.1. Gráfico de interacciones del efecto de la concentración de Viscozyme L sobre el porcentaje de aceite para pH 5 y 6

Se observa que existe una interacción para pH 5 y pH 6 es decir, el efecto del pH sobre el porcentaje de aceite depende de la concentración de enzima. Por lo que de acuerdo al comportamiento que se presenta, para un pH igual a 5, a mayor concentración de enzima disminuye los rendimientos de aceite, lo contrario para una pH de 6 donde a mayores concentraciones mayores rendimientos de aceite.

Así mismo se presenta el cuadro 7.5, que muestra los rendimientos de aceite, para la extracción por centrifugación con un previo tratamiento enzimático se tomó el valor máximo de porcentaje de aceite obtenido y para la extracción convencional con solvente por el método soxhlet es el porcentaje promedio.

Cuadro 7.5. Rendimientos de aceite para extracción con y sin tratamiento enzimático.

	Extracción por centrifugado con tratamiento enzimático.	Extracción con solvente por método soxhlet.
Aceite obtenido (g)	2.03 ± 0.06	1.23±0.21
Porcentaje de aceite (%)	40.67 ± 1.15	24.67±4.16

Una vez comparados los valores de rendimientos de aceite tanto para el procedimiento que utiliza un tratamiento enzimático previa a la extracción por centrifugación como para la extracción por solvente con equipo soxhlet, se observó diferencia entre los porcentajes de aceite extraído, ya que el aceite obtenido por el método de extracción soxhlet representaba aproximadamente la mitad de lo que se obtuvo en la extracción con un previo tratamiento enzimático. De acuerdo a Laiz-Saldaña y col, (2009) obtuvieron 37.5% de aceite por método soxhlet, el cual fue superior al extraído en este proyecto, pero se obtuvo un porcentaje mayor (40.67%) empleando el método del tratamiento enzimático.

Para obtener el incremento del rendimiento del proceso de extracción de aceite de la semilla de mamey, se calculó respecto al porcentaje de aceite obtenido con extracción con solvente por método soxhlet de acuerdo a la ecuación 1:

% incremento en

$$\text{Porcentaje de aceite} = \frac{(\% \text{aceite TE} - \% \text{aceite SS})}{\% \text{aceite TE}} * 100 \quad (1)$$

Donde;

Aceite TE= aceite extraído con aplicación de tratamiento enzimático.

Aceite SS = aceite extraído con solvente con equipo soxhlet.

Obteniéndose un valor de: 39.35 %. Un dato aceptable y que se encuentra dentro de los resultados reportados por otros autores como Zúñiga y col, (2003) quienes incrementaron hasta un 27% el rendimiento de aceite de semillas de uvas por prensado en frío con un previo tratamiento enzimático comparado con la extracción por prensado sin enzimas. Así también Passos y col, (2009) aplicaron un tratamiento enzimático previo a la extracción del aceite de la semilla de uva con fluidos supercríticos obteniendo un incremento del 44%.

Por otro lado, además de evaluar el efecto del tratamiento enzimático sobre el rendimiento del aceite, se observó que el aceite obtenido con la ayuda del equipo soxhlet no mostró un olor y color característicos como el que presentó el aceite extraído de forma enzimática (ANEXO D), esto probablemente puede ser atribuido a las condiciones drásticas principalmente de temperatura que se emplean en la extracción con el método Soxhlet, lo cual puede originar cambios en el perfil de ácidos grasos.

Los aceites obtenidos con ambos métodos fueron analizados para determinar el perfil de ácidos grasos (cuadro 7.6).

Cuadro 7.6. Perfil de ácidos grasos del aceite de la semilla de mamey (*Pouteria sapota*).

Ácidos grasos	Métodos de extracción	
	Enzimático (%)	Solvente (%)
Oleico 18:1	51.68± 3.80	52.31±0.82
Esteárico 18.0	31.76± 4.20	31.14±0.30
Palmítico 16.0	9.92± 2.00	10.69±0.37
Linoleíco 18:2	5.10± 2.3	4.00±1.5
Araquídico 20:0	1.04±0.19	0.96±0.19
Linolénico 18:3	0.26±0.05	0.15±0.11
Láurico 12:00	0.04±0.01	0.05±0.04
Caprílico 8:0	0.03±0.02	-----
Cáprico 10:0	0.01±0.0	-----
Gondoico 20:1 <i>trans</i>	-----	0.19±0.03
N.I	0.17± 0.02	0.51± 0.06

Dentro del perfil de ácidos grasos se reportaron con mayor abundancia el ácido oleico, esteárico, palmítico, linoleico y araquídico, casi a la misma proporción tanto para las muestras de aceite extraídas por método soxhlet como por la enzimática. Comparando estos datos con los de Solís-Fuentes y *col*, (2015); ellos encontraron en frutos maduros de mamey 48.62% del ácido oleico, 28.65% del ácido esteárico, 10.77 % del ácido Linoleíco, 10.50% del ácido palmítico, 0.58% del ácido Linolénico, 0.40% del ácido behénico y 0.36% del ácido Araquídico. Estos datos son similares para los ácidos grasos como el oleico, el esteárico y el palmítico; por lo que respecta a los ácidos linoleíco y linolénico, se encontraron en menor proporción en

cantidades de 5.10% y 4.00% para el ácido linoleico mientras que para el ácido linolénico 0.26% y 0.15%; para muestras con y sin tratamiento enzimático respectivamente. El ácido araquídico se encontró en mayor proporción en ambas muestras con 1.04% para aceite con tratamiento enzimático y 0.96% para aceite extraído con solvente.

El ácido behénico no se encontró en este estudio en ninguno de los aceite extraídos por los dos métodos empleados, comparado con el aceite reportado por Solís-Fuentes y *col*, (2015), esto es importantes ya que a pesar de su baja disponibilidad en comparación con el ácido oleico, se ha reportado que el ácido behénico puede aumentar los niveles de colesterol en los seres humanos (Caterm-Nilo y *col*, 2001), al igual que el ácido gondoico, un ácido graso monoinsaturados con isómeria *trans* (Miwa,1971), que se encontró únicamente en aceite obtenido por soxhlet, esto probablemente a las condiciones de temperatura en que se realiza la extracción de aceite por este método.

Así también se encontraron otros ácidos como el ácido láurico en 0.04% y 0.05% en muestras de aceite extraídas por vía enzimática y por método convencional respectivamente, así como ácidos grasos de cadena corta como el ácido caprílico y el ácido cáprico, estos solo se detectaron en muestras de aceite extraída por el método enzimático y a los que se le puede atribuir la responsabilidad del olor característico a la semilla.

La relación entre los ácidos grasos encontrados en este estudio fue de 42.8% y 42.84% para ácidos grasos saturados, 51.68 y 52.5% para ácidos grasos monoinsaturados, 5.36 y 4.15% para ácidos grasos poliinsaturados; para muestras de aceite obtenidas con y sin tratamiento enzimático. Comparando estos resultados con los obtenidos por Solís-Fuentes y *col*, (2015); ellos encontraron en sus muestras 39.9% para ácidos grasos saturados, 48.6% para monoinsaturados y

10.7% poliinsaturados. Estos valores demuestran un bajo contenido de ácidos grasos poliinsaturados frente a los que reportan los autores, pero presentan valores altos para ácidos grasos monoinsaturados y saturados.

De acuerdo a estudios realizados por Salinas y col (2012), la grasa de cacao contiene predominantemente triglicéridos de ácidos grasos consistentes de ácidos oleico (37,3%), esteárico (34,4%), y palmítico (26,2%) y más de 73% de los glicéridos están presentes como formas monoinsaturadas. Tomando en cuenta que en este estudio para el aceite obtenido por vía enzimática el 51.68% corresponde a ácidos grasos monoinsaturados, y que el ácido esteárico es su principal fuente de ácido graso saturado, similar a como se muestra en los datos reportados por el autor, este aceite podría tener un posible uso como sustituto de manteca de cacao, una de las principales grasas industriales.

Cabe señalar que el ácido esteárico como ácido graso saturado predominante no representa problema alguno ya que de acuerdo a Salinas y col, (2012), el ácido esteárico, a diferencia de otros ácidos grasos saturados, no aumenta el nivel de colesterol en la sangre. El exceso de ácido esteárico es convertido en ácido oleico mediante una enzima desaturasa en el hígado, y luego recircula esterificado en los triglicéridos presentes en la lipoproteína VLDL, por lo que no tiene poder hipercolesterolémico, por esto no eleva los niveles de colesterol en el plasma en la fase post-hepática.

Así también, la presencia de altos niveles de ácido oleico y linoleico permite que en las zonas tropicales a temperatura ambiente, el aceite de la semilla de zapote mamey sea en forma líquida y no una grasa (Solís –Fuentes, 2015); es por esta razón y con el alto porcentaje de ácido oleico encontrado en las muestras analizadas, el aceite obtenido estaba en estado líquido a temperatura ambiente.

8. CONCLUSIÓN

- El uso de la enzima Viscozyme L[®] en el proceso de extracción del aceite de las semillas de mamey, permitió aumentar el rendimiento de extracción hasta de un 39.35% comparado con la extracción por solvente con equipo soxhlet.
- La máxima eficiencia de extracción con Viscozyme L[®] (40.67 %) se alcanzó usando un pH de 5 y una concentración de enzima de 0.2% a una temperatura de 50°C con una agitación de 200 rpm, en un tiempo de 4 horas.
- El pH óptimo para la extracción del aceite de semilla de mamey por centrifugación con un previo tratamiento enzimático con Viscozyme L[®] es a 6, ya que permite mejores rendimientos de aceite conforme la concentración de enzima aumenta.
- La extracción con ayuda de la enzima Viscozyme L[®] permite conservar en el aceite el olor característico de las semillas debido a la presencia de ácidos graso de cadena corta que proporcionan aroma, mientras que por extracción por soxhlet el aceite se tornó inodoro.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta - Moreno, M. C. (2011). Evaluación y escalamiento del proceso de extracción de aceite de aguacate utilizando tratamiento enzimático. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico, Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Badui - Dergal, S. (1999). Química de los Alimentos. Editorial Pearson Educación, México.
- Balerdi, C.F., Crane J.H. (2009). El mamey sapota en Florida. Departamento de Ciencias Hortícolas, SERVICIO DE EXTENSIÓN COOPERATIVA DE LA FLORIDA, INSTITUTO DE ALIMENTOS Y CIENCIAS AGRÍCOLAS, UNIVERSIDAD DE FLORIDA. PAG 10.
- Carrera, E. (2003). Producción y Aplicación de Enzimas Industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca.
- Casimir, A. (2002). Food Lipids Chemistry Nutrition and Biotechnology. Second Edition, Editorial Marcel Dekker, New York.
- Caterm-Nilo B., Denke-Margo A. (2001) Behenic acid is a cholesterol-raising saturated fatty acid in humans. American Journal of Clinical Nutrition.73:41-44
- Conn E., Stumpf, P. (1996). Bioquímica Fundamental. Editorial Limusa, México.

- Clavijo – Rodríguez. C. (2004). Extracción de aceite de semilla de maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz) por prensado en frío, caracterización química del aceite y mejoramiento del proceso mediante tratamiento enzimático de la semilla previo al prensado. Trabajo de grado para optar al título de Maestro en Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago-Chile
- Domínguez, H., Nuñez, M.J., Lema, J.M. (1994). Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: A review. *Food Chemistry*. 49:271-286.
- Duran O. J. F. (2010). Aplicación de enzimas en el proceso de extracción del aceite residual de la torta de palmiste. Trabajo de grado para optar al título de Químico, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Fawcett, I. (2004). Análisis de Extracción de Aceite de Aguacate por Métodos Físicos y evaluación de una producción a gran Escala. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico, Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Freccero, E., Pérez, E. (2006). Acción de las enzimas en la extracción de aceite por solvente. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Biosciences Bioengineering*. 92:405-416.

- Ghazali - Abdulkarim, H.S. (2005). Some physico-chemical properties of Moringa oleifera seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chemistry*. 93:253-263.
- Grasso, F.V. (2013). Pretratamiento enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna. Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Ingeniería, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de la Plata. Argentina
- Jiménez, M.E., Aguilar, M.R, Zambrano, M.L (2001). Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 45: 89-92.
- Laiz-Saldaña J. C., Tovar-Miranda R., Durán-de-Bazúa M. C., Solís-Fuentes J. A. (2009). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Producción de biodiesel por transesterificación alcalina de aceite crudo de “almendras” de zapote mamey (*Pouteria sapota*). *Tecnología, Ciencia, Educación*. 24:48-56.
- Ma, F., Hanna, M.A. (1999). Biodiesel production: A review. *Biores. Technol.*70:1-15.
- Miwa, T. (1971). Jojoba Oil Wax Esters and Derived Fatty Acids and Alcohols: Gas Chromatographic Analyses. *Journal of the American Oil Chemists Society* 48: 259.
- Morera JA. (1994). Sapote (*Pouteria sapota*). In *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*. JE Hernández -Bermejo and J León (Eds.) Plant Production and Protection Series 26. Rome, Italy. 103–109.

- Olsen, H. S. (1988). Aqueous enzymatic extraction of oil from seeds. In: Asian Food Conference Proceedings, Bangkok, Thailand. Reprinted by: Novo Industry A/S, A-06041a.
- Ortiz, A. Dorantes, L. Galindez, C. (2005). Desarrollo de un proceso para la obtención de aceite de aguacate de alta calidad empleando una tecnología emergente [online]. Disponible en <http://www.pncta.org.co/investigaciones_03>
- Özgül-Yücel, S., Türkay, S. 2003. FA Monoalkylesters from rice bran oil by *in situ* esterification. Journal of the Mexican Chemical Society. 80:81-84.
- Passos, C., Silva, R., Da Silva., F. (2009). Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. The Journal of Supercritical Fluids. 48:225-229.
- Pelczar, J. (1984). Elementos de microbiología. Editorial Mc Graw Hill, México.
- Rojas - Morales, F.J., Burbano – Galindo, F. (2011). Efecto de un pretratamiento enzimático en el proceso de obtención de aceite de la semilla del mango (*Mangífera Indica L.*). Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Alimentos, Universidad del Valle. Santiago de Cali.
- Rosenthal, A., Pyle, D., Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. Enzyme and Microbial Technology. 19:402–420.

- Salinas, N., Bolívar, W. (2012). Ácidos grasos en chocolates venezolanos y sus análogos. *Anales Venezolanos de Nutrición*.25:34-35
- Solís-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*.12:23-28.
- Solís-fuentes, J. A., Duran-de-Bazúa, M.C. (2005). Recovery fats and oils from Agro-industrial wastes and by –products for use in industrial applications. *Journal of Applied Sciences*.5:983-987.
- Solís-fuentes, J. A, Ayala-Tirado, R. C., Fernández-Suarez, A. D., Duran-de-Bazúa, M.C. (2015). Mamey sapote seed oil (*Pouteria sapota*).Potential, composition, fractionation and thermal behavior. *Grasas y Aceites*. 66:56-64.
- Soto C, Chamy R, Zúñiga ME. 2004. Effect of enzymatic application on borage (*Borago officinalis*) oil extraction by cold pressing. *Journal Chemical Engineer of Japan*.37:326- 331.
- Taha F.S., Hassanein M.M. (2007). Pretreatment of cottonseed flakes with proteases and amylase for higher oil yields. *Revista Grasas y Aceites*. 58:297-306.
- Taylor, S. L., King, J. W. and List, G. R. (1993). Development of oil content in oilseeds by analytical supercritical fluid extraction. *Journal American Oil Chemistry*. 70:437

- Villate, S., Castellanos, O. (1998). Perspectivas de la biotecnología de alimentos en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2:69-72.
- Wiseman, A. (1991). *Manual de Biotecnología de las enzimas*. Editorial Acribia, España.
- Zúñiga - Guerra, M., E. (2003). Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinífera* por prensado en frío. *Revista Grasas y Aceites*.54:53-57.
- Zúñiga, M.E, Soto C, Mora A, Chamy R, Lema JM. (2003). Enzyme pre-treatment of *Guevina avellana mol* oil extraction by pressing. *Process Biochemistry*.39:51-57.

10. ANEXOS

ANEXO A. porcentaje de cascaras, pulpa, semillas y almendras.



Fig.10.1. fruto entero y sus partes de zapote mamey.
Fuente: autor.



Fig.10.2. Fruta de zapote mamey cortado longitudinalmente
Fuente: autor.



Fig.10.3. Cáscaras del fruto zapote mamey.
Fuente: autor.



Fig.10.4. Semilla de zapote mamey.
Fuente: autor.



Fig.10.5. Semilla con almendra del fruto zapote mamey.
Fuente: autor.

Los parámetros de porcentaje de cada constituyente con respecto al fruto entero son muy útiles a escala industrial ya que determinan los rendimientos esperados, por esta razón a cada fruto se le separa la cáscara, pulpa y semilla con almendras, para cada una de las muestras, teniendo cuidado de no confundirlas, respetando la marcación inicial de las mismas. En la balanza analítica, se pesa cada uno de los componentes, registrando el peso en gramos, para posteriormente, calcular el porcentaje de cada uno. Registrando la relación Semilla: Cáscara: Pulpa.

$$\% \text{ cáscara} = \frac{\text{peso cáscara}}{\text{peso total fruto}} * 100$$

$$\% \text{ pulpa} = \frac{\text{peso pulpa}}{\text{peso total fruto}} * 100$$

$$\% \text{ semilla c/ almendra} = \frac{\text{peso semilla}}{\text{peso total fruto}} * 100$$

$$\% \text{ almendra} = \frac{\text{peso almendra}}{\text{peso total fruto}} * 100$$

ANEXO B. Semillas enteras y troceadas.





ANEXO C. Extracción del aceite por método soxhlet.

FUNDAMENTO: Una cantidad seca y pesada de almendra de mamey se somete a una extracción con éter de petróleo o hexano, libre de peróxidos o mezcla de ambos. Posteriormente, se realiza la extracción total de la materia grasa libre por Soxhlet.

MATERIAL Y EQUIPO
Sistema extractor Soxhlet
Rota vapor
Balanza analítica
Dedal de celulosa

REACTIVOS
Hexano grado analítico



PROCEDIMIENTO:

Pesar 5g de almendra de mamey previamente secadas y colocarle en el dedal a peso constante.

Pesar el matraz o balón de extracción y colocarlo en el sistema Soxhlet. Posteriormente colocar el dedal en el tubo de extracción y adicionar el solvente al matraz, aproximadamente 140 ml de hexano.

Extraer la muestra con el solvente por 4 horas de reflujo. Una vez terminada la extracción eliminar el solvente por evaporación en rota vapor. Hasta que no se detecte olor a hexano.

Secar el matraz con la grasa en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 min, enfriar en desecador y pesar.

CALCULOS

$$\% \text{ ACEITE} = \frac{W_{a+b} - W_b}{M} * 100$$

Donde

W_{a+b} = peso del matraz balón con aceite.

W_b = peso del matraz balón vacío.

M = peso de la muestra

ANEXO D. Aceite obtenido con y sin tratamiento enzimático.



Aceite extraído
por solvente con
soxhlet

Aceite extraído
por tratamiento
enzimático