



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Obtención de aceite de aguacate (*Persea americana*) por
medio de celulasa y hemicelulasa**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

María del Carmen Moctezuma Sánchez

Asesores:

Dr. Victor Robles Olvera

Dra. Madeleine Hidalgo Morales

Dr. Miguel Angel Garcia Alvarado

INDICE

INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Producción de Aguacate en México.....	3
2.2 Estructura del aguacate.	6
2.3 Razas de Aguacate.....	9
2.4 Madurez del Aguacate	11
2.5 Aceite de aguacate.....	13
2.6 Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate.....	15
2.7 Clasificación de aceites según su grado de refinación.....	16
2.8 Extracción de aceite de aguacate.	16
2.8.1 Extracción por solventes.....	17
2.8.2 Extracción por prensado en frío.....	18
2.8.3 Centrifugación.....	19
2.8.4 Extracción con fluidos supercríticos.....	20
2.8.5 Extracción de aceite de aguacate asistida con enzimas.....	21
2.9 Síntesis de antecedentes	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Materias primas.....	26
4.2 Preliminares para la evaluación del efecto de la agitación orbital sobre la actividad enzimática de la celulasa y hemicelulasa.	26
4.3 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa.....	28
4.3.1 Ajuste de pH.	29

4.3.2	Determinación de actividad enzimática para la celulasa y hemicelulasa.	29
4.3.3	Evaluación del efecto de la concentración de sustrato y pulpa de aguacate sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa.	29
4.4	Evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la liberación de aceite de aguacate por medio de la celulasa y hemicelulasa.	30
4.4.1	Extracción de aceite por el método Soxhlet.	31
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1	Preliminar para la evaluación del efecto de la agitación orbital sobre la actividad enzimática de la celulasa y hemicelulasa.	32
5.2	Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa.	33
5.3	Efecto de la concentración de sustrato y pulpa de aguacate sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa.	41
5.4	Evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la liberación de aceite de aguacate	46
6	CONCLUSIONES	50
7	RECOMENDACIONES	51
8	REFERENCIAS	52
9	ANEXOS	55
9.1	Preparación de la curva patrón de glucosa para determinación de azúcares reductores por el Método de DNS	55
9.2	Extracción de aceite por el método Soxhlet	56
9.3	Análisis preliminares para la caracterización de las enzimas.	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.- Producción de Aguacate en México.	4
Tabla 2.2.- Contenido nutricional del mesocarpio de aguacate Hass (100 g).	8
Tabla 2.3.- Contenido de grasa de las diferentes variedades de aguacate.	10
Tabla 2.4.- Contenido de aceite según la etapa de madurez en aguacate Hass. .	11
Tabla 2.5.- Perfil de ácidos grasos en mg de ácido/g de aceite de aguacate.	13
Tabla 2.6.- Propiedades Físicas y Químicas del aceite de aguacate.	15
Tabla 2.8.- Rendimientos máximos obtenidos para la extracción enzimática de aceite de aguacate	23
Tabla 5.1.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de celulosa	34
Tabla 5.3.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de hemicelulosa	36
Tabla 5.3.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de mesocarpio de aguacate por acción de celulasa.	38
Tabla 5.4.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de mesocarpio de aguacate por acción de hemicelulasa	40
Tabla 5.5.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial (V_0 , g/L-h) de la reacción de hidrólisis enzimática de celulosa.....	41
Tabla 5.6.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial (V_0 , g/L-h) de la reacción de hidrólisis enzimática de hemicelulosa.....	42
Tabla 5.7.- Efecto de la concentración de pulpa de aguacate sobre la velocidad inicial (V_0 , g/L-h).	44
Tabla 5.8.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial (V_0 , g/h) de la reacción de hidrólisis enzimática de mesocarpio de aguacate por la acción de hemicelulasa a 50 °C.	45
Tabla 5.9.- Efecto de la acción hidrolítica de celulasa sobre el rendimiento de aceite.....	47
Tabla 5.10.- Efecto de la acción hidrolítica de hemicelulasa sobre el rendimiento de aceite.....	49
Tabla 9.1 Características métricas de los componentes del fruto de aguacate Hass.	57
Tabla 9.2 Datos para el cálculo de materia grasa por Soxhlet	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.- Estados mexicanos productores de Aguacate SIAP-SAGARPA	4
Figura 2.2.- Estructura del fruto de aguacate (modificado a partir de Cummings y Schroeder, 1942).	6
Figura 2.3.- Idioblastos y parénquima de mesocarpio del aguacate. CP= Células de parénquima; A= gota de aceite; PR= protoplasma; PI= pared del idioblasto.	7
Figura 2.4.- Diagrama del proceso de extracción de aceite de aguacate con solventes. (Martinez <i>et al.</i> , 1988)	17
Figura 2.5.- Diagrama de extracción de aceite de aguacate por prensado con y sin hueso molido (Martinez <i>et al.</i> , 1988).	18
Figura 2.6.- Diagrama de extracción de aceite de aguacate por centrifugación. (Martinez <i>et al.</i> , 1988)	19
Figura 2.7.- Diagrama de extracción con fluidos supercríticos (Sena, 2011).	20
Figura 2.8.- Diagrama de extracción de aceite de aguacate asistida con enzimas.	21
Figura 4.1.- Diseño experimental (plan central compuesto) para evaluar el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática.	28
Figura 5.1.- Cinéticas de hidrólisis de celulosa a diferentes agitaciones orbitales.	32
Figura 5.2.- Cinéticas de hidrólisis de celulosa a diferentes condiciones de pH y temperatura.	33
Figura 5.3.- Cinéticas de hidrólisis de hemicelulosa a diferentes condiciones de temperatura y pH	35
Figura 5.4.- Cinéticas de liberación de glucosa equivalente durante la hidrólisis de mesocarpio de aguacate por acción de celulasa.	37
Figura 5.5.- Cinéticas de liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis de mesocarpio de aguacate por acción de hemicelulasa.	39
Figura 5.3.- Cinéticas de hidrólisis de celulosa a diferentes concentraciones.	41
Figura 5.7.- Cinéticas de hidrólisis de hemicelulosa a diferentes concentraciones.	42
Figura 5.8.- Efecto de la concentración de mesocarpio de aguacate sobre las cinéticas de producción de glucosa equivalente debido a la acción hidrolítica de celulasa.	43
Figura 5.9.- Efecto de la concentración de mesocarpio de aguacate sobre las cinéticas de liberación de glucosa equivalente por la acción hidrolítica de hemicelulasa.	44

Figura 5.10.- Efecto del pH y la temperatura sobre la cinética de extracción de aceite de aguacate por acción de celulasa.	46
Figura 5.11.- Efecto de la temperatura y del pH sobre la liberación de aceite de aguacate por la acción hidrolítica de hemicelulasa.	48
Figura 9.1.- Curva de calibración DNS.....	55
Figura 9.2.- Cinética de secado de pulpa de aguacate	56
Figura 9.3.- Cinética enzimática de la celulasa	59

RESUMEN

Moctezuma Sánchez del Carmen. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Enero de 2017. “Obtención de aceite de aguacate (*Persea americana*) por medio de celulasa y hemicelulsa”. Asesores: Dr. Víctor José Robles Olvera, Dra. Madeleine Hidalgo Morales, Dr. Miguel Ángel García Alvarado.

El aguacate es un fruto de alto valor nutricional por su elevada proporción ($\approx 70\%$) de ácido oleico y por su contenido de vitaminas y compuestos funcionales como la luteína, éstos se encuentran principalmente en el mesocarpio del aguacate, más específicamente en los idioblastos que están protegidos por una pared celular compuesta de celulosa y hemicelulosa. El aceite de aguacate contiene los compuestos anteriormente mencionados y por ello es un aceite benéfico para la salud, en la actualidad es utilizado en alimentos, cosméticos y como auxiliar terapéutico. Existen diversos métodos para la extracción del aceite de aguacate a partir del mesocarpio: extracción con solventes, extracción por centrifugación, por prensado en frío, o mediante el uso de enzimas más centrifugación, éste último es un proceso denominado “verde” que genera altos rendimientos. Es posible encontrar en la literatura trabajos sobre el uso de enzimas para la extracción de dicho aceite, sin embargo no se han encontrado estudios cinéticos que soporten y den repetitividad a los resultados. En este trabajo se evaluó el proceso de extracción de aceite de aguacate por medio de dos enzimas libres: celulasa (E.C. 3.2.1.4) y hemicelulasa (E.C. 3.2.1.8), de *Aspergillus niger* a las cuales se les determinaron las condiciones de temperatura y pH adecuadas utilizando celulosa, hemicelulosa y mesocarpio de aguacate Hass con grado de “madurez comestible”, por medio de un diseño central compuesto ($T = 35 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 3 - 7$). La actividad de las enzimas se evaluó por la cantidad de azúcares reductores liberados y el porcentaje de aceite liberado. El rendimiento se calculó tomando como base la cantidad de aceite extraída por Soxhlet. Las mejores condiciones de reacción ($\text{pH} 5$ y 50°C), de ambas enzimas, usando sustrato puro, concordaron con las reportadas en la ficha técnica. La celulasa tuvo un mejor desempeño que la hemicelulasa durante la hidrólisis de sustrato puro mientras que el de la hemicelulasa fue mejor con pulpa de aguacate. Las mejores condiciones de reacción ($\text{pH} 3$ y 50°C) de la hemicelulasa con aguacate como sustrato, fueron diferentes a las reportadas en la ficha técnica de la enzima. El porcentaje de aceite recuperado fue mayor al 90% con cada una de las enzimas. Sin embargo el análisis de varianza no mostró diferencia significativa entre ambas condiciones y entre ambas enzimas. Por lo cual es posible trabajar con las condiciones y enzima más económicas.

ABSTRACT

Moctezuma Sánchez del Carmen. M.Sc. Biochemical Engineering. Instituto Tecnológico de Veracruz. January 2017. “Production of avocado (*Persea americana*) oil using cellulose and hemicellulase”. Advisors: PhD. Víctor José Robles Olvera, PhD. Madeleine Hidalgo Morales, PhD. Miguel Ángel García Alvarado.

The avocado (*Persea americana*) is a highly nutritional fruit; it has a high proportion of oleic acid ($\approx 70\%$), vitamins and functional compounds such as lutein. Avocado oil is located in the mesocarp, specifically in idioblasts, which are protected by a cellulose and hemicellulose cell wall. Since avocado oil contains those compounds, it is considered as beneficial oil for health; currently used in food, cosmetics and as an alternative therapeutic agent. There are several methods to extract avocado oil: solvent extraction, centrifugation and cold pressing, among others; the use of enzymes plus centrifugation has also been reported with high yields and low environment impact but, to date our knowledge no kinetic studies or enough information for repeatability have been reported. This work evaluated the process of avocado oil extraction by means of two free and immobilized enzymes: cellulase (EC 3.2.1.4) and hemicellulase (EC 3.2.1.8) from *Aspergillus niger*, the enzymes were tested under a composite central design at different conditions ($T = 35-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 3-7$) in an aqueous matrix composed by mesocarp of *Persea americana*, var. Hass with an “edible maturity” degree. The activity of the enzymes was evaluated by the amount of glucose equivalent released and also by the percentage of oil extracted. The yields were calculated on the basis of the amount of oil extracted against the Soxhlet method as reference. The best reaction conditions ($\text{pH} 5$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) of both enzymes, using pure substrate, were as reported in the datasheet. Cellulase showed a better performance than hemicellulase during the hydrolysis of pure substrates, in contrast hemicellulase showed a better performance when mesocarp was used as substrate. The best reaction conditions ($\text{pH} 3$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) of hemicellulase with mesocarp as substrate were different from those reported in the enzyme datasheet. The recovered oil was $> 90\%$ with both enzymes. However, the analysis of the variance did not show the difference between the conditions and between both enzymes. So it is possible to work with the most economical conditions and enzymes.

1 INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana*) es originario de Mesoamérica, deriva del vocablo náhuatl ahuatl. A nivel mundial, México es el principal país productor de este fruto con alrededor del 44 %, el cual en su mayoría se genera en el estado de Michoacán. Aproximadamente el 78 % de las exportaciones van dirigidas a Estados Unidos de América (E.U.A.). Este fruto se encuentra conformado principalmente por tres partes: el exocarpio o cáscara, mesocarpio o pulpa y endocarpio, que es la fina capa que recubre a la semilla. Dentro de la pulpa es posible encontrar grandes cantidades de aceite (≈ 25 % b.h.) las cuales se encuentran en forma de gotas dentro de los idioblastos y células de parénquima. La composición de la pared celular que protege estas células es de 35 % pectina, 30 % celulosa y 30 % hemicelulosa.

El aceite de aguacate contiene 78 % de ácidos grasos monoinsaturados, de los cuales, el 80 % es ácido oleico; también es rico en vitaminas. Gracias a estos compuestos es ampliamente utilizado para la elaboración de cosméticos y alimentos, y como auxiliar terapéutico. La calidad del aceite depende del método extractivo que se utilice. Dentro de estos métodos se encuentra la extracción con solventes, el prensado en frío, la centrifugación, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción asistida con enzimas. La extracción asistida con enzimas alcanza un rendimiento del 98 %, siendo el mayor reportado hasta ahora; además es un proceso “verde” y el aceite así extraído es considerado extra virgen. Estos altos rendimientos se deben a la acción de las enzimas las cuales rompen la pared de los idioblastos y células de parénquima liberando el aceite que se encuentra dentro de estas.

La acción de la celulasa se divide en tres pasos principales: Ruptura de la estructura cristalina (actividad endocelulasa), ruptura de la cadena de polímero a azúcares más pequeños (actividad exocelulasa) y la hidrólisis de los disacáridos o tetrasacáridos a glucosa.

La hemicelulasa en cambio tiene diferentes actividades con el fin de hidrolizar enlaces β (1,4) que conforman a la hemicelulosa formada por diversos monosacáridos.

2 ANTECEDENTES

El aguacate es un fruto del género *Persea* especie *americana*, de la familia Lauráceas, orden Ranales y clase *Dicotyledoneae*. Originario de México y Guatemala, el nombre de aguacate o ahuacatl proviene de la lengua Nahuatl (hablada por los aztecas), se reconoce como uno de los mayores aportes hacia el mundo debido a su exquisito sabor y la variedad de usos que se le puede dar (Morera, 1989; Baíza, 2003).

El árbol de aguacate se considera como una especie polimorfía, ya que es capaz de adaptarse a diferentes ambientes, gracias a esto en la actualidad es posible cultivarse en diversos países como Puerto Rico, todo el continente Africano, China, las Filipinas, Israel, entre otros.

2.1 Producción de Aguacate en México.

En México la producción de aguacate Hass ha ido en aumento, esto después de entrar al mercado de EUA) ya que estuvo prohibida su venta por problemas fitosanitarios. Dicha situación se solucionó en 1997, especialmente para el estado de Michoacán. Esta apertura al comercio con EUA generó un crecimiento en la producción (aproximadamente 120 mil hectáreas) y 187 mil empleos directos para los municipios de Michoacán. Por lo anterior, este estado es el principal productor de aguacate con aproximadamente el 85% de la producción (Pérez, 2014).

Según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) este fruto aporta el 3.4% del valor de la producción agrícola total. La producción del 2007 al 2012 en promedio se incrementó en 2.9%. Aunque Michoacán es el principal productor, Jalisco, Morelos, Nayarit, Guerrero y el Estado de México tienen una participación del 3 % (Figura 2.1). En la actualidad el 96.4% de la producción del país corresponde al aguacate Hass, el 2.7% al criollo y 0.1% al Fuerte, las otras variedades no se encuentran clasificadas (Financiero Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural, 2014).

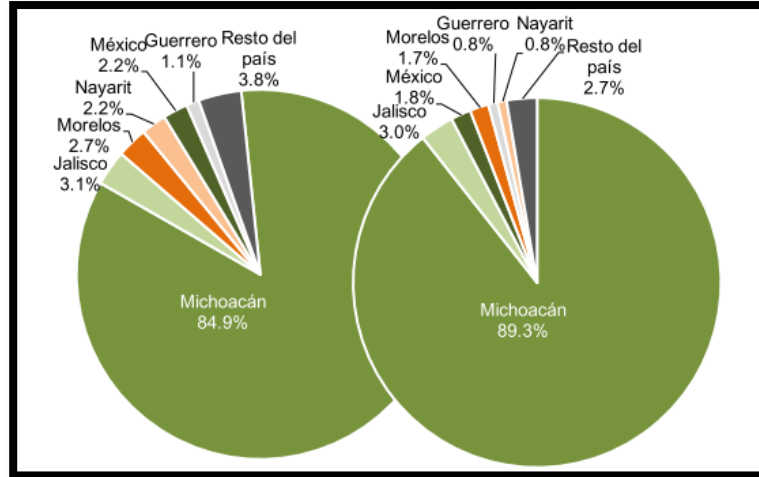


Figura 2.1.- Estados mexicanos productores de Aguacate SIAP-SAGARPA

Las exportaciones van dirigidas principalmente a EUA con 78%, Japón y Canadá con 10 y 6% respectivamente (Morales 2014). En los hogares de México se considera un alimento básico, a pesar de esto las empresas prefieren el mercado con otros países (Morales 2014). En la Tabla 2.1 se muestra la producción del 2000 al 2013.

Tabla 2.1.- Producción de Aguacate en México.

Año	Superficie (miles ha)		Volumen producción (miles ton)	Rendimiento (ton/ha)	Precio medio rural (\$/ton)	Valor producción (mdp)
	Sembrada	Cosechada				
2000	94.9	94.1	907.4	9.6	4,645.8	4,215.80
2001	94.5	94.1	940.2	10	5,350.7	5,030.90
2002	97.6	93.8	901.1	9.6	4,482.8	4,039.30
2003	97.8	95.4	905	9.5	5,937.4	5,373.60
2004	101.9	100.1	987.3	9.9	6,163.9	6,085.80
2005	112.3	103.1	1,021.5	9.9	7,456.7	7,617.20
2006	114.8	105.5	1,134.2	10.8	8,043.2	9,123.00
2007	117.3	110.4	1,142.9	10.4	10,516.60	12,019.40
2008	122.3	112.5	1,162.4	10.3	10,718.4	12,459.40
2009	129.4	121.5	1,231.0	10.1	12,245.1	15,073.30
2010	134.3	123.4	1,107.1	9	12,795.0	14,165.80
2011	142.1	126.6	1,264.1	10	14,346.8	18,136.40
2012	151	130.3	1,316.1	10.1	12,619.2	16,608.10
2013	168.3	144.2	1,467.8	10.2	N/D	N/D

SIAP-SAGARPA, 2013

Aunque México es el principal productor de aguacate y se espera un incremento en la producción y exportación anual, aún existen dificultades que pueden retrasar este desarrollo como son el clima, las plagas, la estacionalidad y la inseguridad en la que se encuentra sumergido el país actualmente. Para conservar el impulso de la producción de aguacate se han otorgado créditos de aproximadamente 1,136 millones de pesos a través de la banca comercial y las Sociedades Financieras de Objeto Múltiple (SOFOME) (Pérez, 2014).

2.2 Estructura del aguacate.

Como puede observarse en la Figura 2.2, el aguacate es una baya que está conformada por una semilla, el exocarpio (o cáscara), mesocarpio (pulpa) y endocarpio (cubierta delgada alrededor de la semilla) (Cummings y Schroeder 1942).

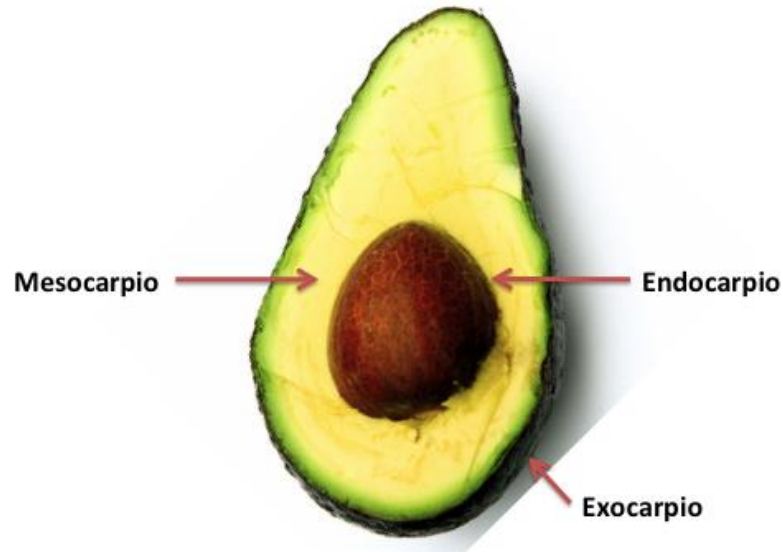


Figura 2.2.- Estructura del fruto de aguacate (modificado a partir de Cummings y Schroeder, 1942).

El endocarpio es una capa fina que sirve como envoltura a la semilla, difícil de reconocer en los frutos maduros (Baya *et al.*, 1996)

El exocarpio varía de acuerdo a la especie del aguacate, puede ser rugoso, irregular o liso. La textura está fuertemente ligada a las condiciones climatológicas del ambiente donde se encuentre el árbol, por ejemplo; en clima cálido la textura de la cascara es rugoso. A su vez el grosor del exocarpio también es variado, siendo 0.5 cm el mayor valor que se tenga registrado (Baya *et al.*, 1996).

El mesocarpio o pulpa está compuesto de células isodiamétricas de parénquima (Figura 2.3), esta célula tiene una medida aproximada de 60 μm de diámetro. Está conformada por una pared delgada de celulosa, cloroplastos, gotas

de aceite, en algunas de las células es posible encontrar cristales de oxalato de calcio y almidón (Cummings y Schroeder, 1942).

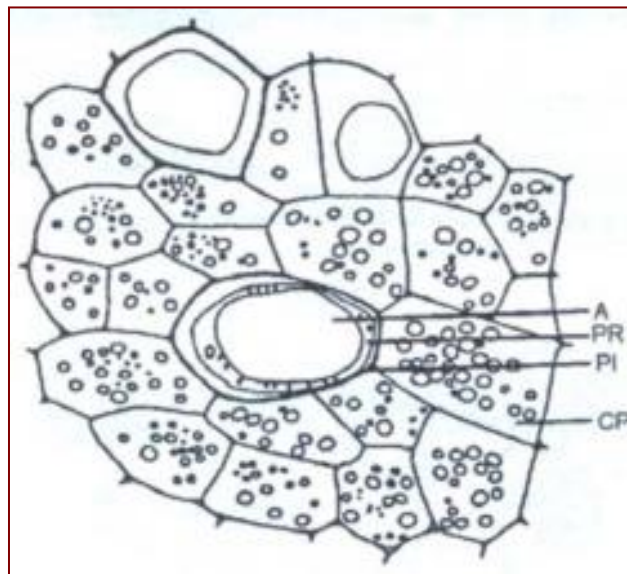


Figura 2.3.- Idioblastos y parénquima de mesocarpio del aguacate. CP= Células de parénquima; A= gota de aceite; PR= protoplasma; PI= pared del idioblasto.

(Cummings y Schroeder 1942).

Las gotas de aceite que se encuentran alojadas en las células son de diferente tamaño, encontrándose en mayor abundancia en las regiones internas (Baya *et al.*, 1996). Los idioblastos son los sacos dentro de la célula que contienen las gotas de aceite, llenando casi por completo el interior de la célula; su contenido son ácidos grasos saturados e insaturados y trazas de terpenos (Cummings y Schroeder, 1942). Además contiene compuestos anticancerígenos (Tabla 2.2) como glutatión que es un tripéptido no proteínico y β -sitosterol, que ayuda a evitar la absorción de colesterol (Baíza, 2003).

Tabla 2.2.- Contenido nutricional del mesocarpio de aguacate Hass (100 g).

Compuesto	Cantidad (g)	Compuesto	Cantidad (mg)	Vitaminas	Cantidad (mg)
Fibra	0.4	Ácido Pantoténico	0.87	Retinol (A)	17
Carbohidratos	5.9	Aminoácidos	0.466	Tiamina	17
Proteínas	1.8	Calcio	24	Riboflavina	0.1
Grasa Total	18.4	Hierro	0.5	Niacina	1.8
Ácidos Grasos		Magnesio	45	Ácido ascórbico	15
Saturados	3	Sodio	4	α -tocoferol	1.53
Monoinsaturados	8.9	Potasio	604	Folato	0.25
Poliinsaturados	2	Zinc	0.42	Vitamina (B6)	10%
		Beta-sitosterol	76		
Glutation	27.7	Kilocalorías	181		

(Adaptación propia a partir de Baíza, 2003).

2.3 Razas de Aguacate

En la actualidad se tiene registrado 4 razas de aguacate; la mexicana, la guatemalteca, la Antillana y la Híbrida.

- Raza mexicana; (*Persea americana* var. *drymifolia*) se adapta a temperaturas de 2.2 °C y a alturas superiores a 1,700 m.s.n.m. (metros sobre el nivel del mar), en este tipo el tiempo de maduración en el árbol es de seis a ocho meses. De las tres razas, la mexicana tiene mayor contenido de grasa (30%), menor contenido de azúcar (2%). Los frutos son de un peso de entre 80 a 250 g. La semilla de esta especie es pequeña, la cascara es delgada y los colores van desde verde, rojas, moradas hasta negras (Bernal *et al.*, 2008).
- Raza guatemalteca; (*Persea nubigena* var. *guatemalensis*) su temperatura óptima es de 4°C a 19°C, se adaptan a alturas de 1,000 a 2,000 m.s.n.m. Las hojas de esta especie son de mayor tamaño que la mexicana, el color de la cascara es verde opaco hasta morado cuando el fruto está maduro. La pulpa del aguacate contiene un 20% de grasa con una consistencia fibrosa. El tamaño de la semilla varía y llena toda la cavidad donde se encuentra esta (Bernal *et al.*, 2008; Morera, 1989).
- Raza antillana; (*Persea americana* var. *americana*) se adapta a temperaturas de 18 a 26°C y altura de 1,000 m.s.n.m. Sus frutos son de gran tamaño que van de 250 a 2,500 g, su corteza es delgada, de color verde o amarillo rojizo, la pulpa tiene un contenido de grasa del 5% al 15% y el contenido de azúcar es de 5%. La semilla es de gran tamaño y no llena el espacio que las contiene (Bernal *et al.*, 2008).
- Raza híbrida; Desde principios del siglo XX se inició el mejoramiento del aguacate mediante la hibridación de las razas, con estas hibridaciones se optimizó la adaptación a ambientes y el cambio en las fechas de cosecha adelantándola o atrasándola según sea el caso. Cabe mencionar que la hibridación sí bien ha presentado ventajas en la adaptación, cosecha y

tamaño de fruto, no representa una mejora para el contenido de ácidos grasos (Bernal *et al.*, 2008).

En la Tabla 2.3 se enlistan algunas variedades de cada raza anteriormente mencionada, así como también el contenido de grasa presentes en los frutos.

Tabla 2.3.- Contenido de grasa de las diferentes variedades de aguacate.

MEXICANA		GUATEMALTECA		ANTILLANA		HÍBRIDA	
Raza	Contenido de grasa (%)	Raza	Contenido de grasa (%)	Raza	Contenido de grasa (%)	Raza	Contenido de grasa (%)
Benedict	15	Anaheim	15 a 22	Fuchs	4 a 6	Bacon	18
Duke	21	Dickinson	13.5	Fucsia	4 a 6	Ettinger	15 a 20
Ganter	18	Hass	18 a 25	Hulumanu	15.4	Fuerte	18
Gottfried	9 a 13	Hazzard	27.50	Lorena	9.00	Lula	12 a 16
Notrhrop	26	Itzamna	15	Pollock	3 a 5	Ryan	25
Susan	12.7	Linda	12	Ruehle	2 a 5	Sharwil	26
Topa Topa	15.5	Mac Arthur	13 a 16	Simmonds	3 a 6		
Zutano	16	Mayapan	18.5	Trapp	3 a 6		
		Nabal	10 a 15	Waldin	6 a 10		
		Panchoy	18				
		Pinkerton	25				
		Queen	13				
		Reed	18.9 a 20				
		Rincon	16 a 18				
		Schmidt	12 a 16				
		Sharpless	16				
		Sinaloa	16				
		Spinks	15				
		Taft	18				
		Taylor	13 a 17				
		Tonnage	6 a 8				

Adaptada de (Bernal *et al.*, 2008)

2.4 Madurez del Aguacate

El aguacate consigue la madurez después de aproximadamente 7 días de ser recolectado, este estado es posible determinarlo mediante la observación de las características externas como color, tamaño, consistencia y la cantidad mínima de aceite (8% base húmeda) aunque esto es difícil de comprobar a nivel comercial (Villa-Rodríguez *et al.*, 2011).

La cantidad de aceite aumenta con la maduración fisiológica, estos cambios no son notables después de la cosecha. Villa-Rodríguez *et al.* en 2011, demostraron que el contenido de aceite y materia seca de aguacate Hass cambia conforme la maduración de este fruto. A su vez el aumento en el contenido de aceite en el aguacate es el mismo porcentaje de disminución de agua dentro del fruto. En la Tabla 2.4 es posible observar como en la etapa de maduración 2 y 3 se encuentra el mayor porcentaje de aceite en el aguacate (Ozdemir y Topuz 2004).

Tabla 2.4.- Contenido de aceite según la etapa de madurez en aguacate Hass.

Etapa de madurez	Contenido de aceite (%)
1	18.43
2	20.36
3	19.89
4	19.45

Adaptación propia a partir de (Villa-Rodríguez *et al.*, 2011)

Se ha reportado (Baudi, 1997) que para que el aguacate pueda ser consumido necesita tener un grado de textura de 4 y 3.5 kg f/cm². Se ha demostrado que después de estos valores comienza una disminución en el contenido de grasa, cambio de color, así como la capa externa se debilita. En almacenamiento los aguacates con menor contenido de aceite presentaron una

organización celular que los de mayor contenido de aceite. Cabe mencionar que frutos con porcentajes de aceite altos muestran una disminución de grosor y aumento de lignificación de la pared celular (Ozdemir y Topuz, 2004).

2.5 Aceite de aguacate

Con lo anterior mencionado se sabe que la madurez del aguacate juega un papel de vital importancia para el contenido de ácidos grasos (Ozdemir y Topuz 2004). En la Tabla 2.5 se observa el perfil de ácidos grasos para el aceite de aguacate.

Tabla 2.5.- Perfil de ácidos grasos en mg de ácido/g de aceite de aguacate.

Ácido graso	Refinado	Prensado en frío
16:0 Palmítico	16.3	14.1
16:1 Palmitoleico	7.7	5.7
18:0 Esteárico	0.6	0.4
18:1 ω 9 Oleico	62.7	69.1
18:2 ω 6 Linoleico	11.4	9.6
18:3 Linolénico	0.8	0.3
20:0 Araquídico	0.1	0.1
20:1 ω 9 Eicosanoico	0.2	0.2
22:0 Behénico	<0.1	<0.1

(Haiyan *et al.*, 2007)

El método más usado para la determinación del perfil de ácidos grasos es la cromatografía de gases, ya que es posible analizar la cantidad de ácidos grasos saturados e insaturados y establecer si el aceite se encuentra adulterado.

La presencia de ácidos grasos insaturados es un rasgo distintivo en el aceite de aguacate ya que se encuentran en éste algunos de los ácidos grasos insaturados de importancia como el ácido linoleico, el oleico y el linolénico. Estos ácidos grasos “buenos” son capaces de prevenir en el ser humano enfermedades coronarias y cardiovasculares (Haiyan *et al.*, 2007).

La acetil-CoA en el aguacate es el precursor de nuevos ácidos grasos y gracias a los mecanismos de la planta para fijar dobles enlaces se encuentran las insaturaciones. La cantidad y calidad de los ácidos grasos presentes en el aguacate están a su vez ligados a los factores ambientales pre-cosecha, post-cosecha y a la variedad de aguacate con la que se trabaje (Ozdemir y Topuz, 2004).

2.6 Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate

Las propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate son variadas y dependen de la variedad de aguacate, madurez, método de extracción, entre otros. En la Tabla 2.6 se presenta las propiedades físicas y químicas del aceite extraído mediante prensado, con solventes (éter de petróleo) y las proporcionadas por un aceite comercial extraído por prensado en frío.

Como se observa en la Tabla 2.6 el índice de acidez es determinado por el ácido graso más abundante, en este caso el oleico. Por lo cual el índice es expresado en función de ese ácido graso. Con el índice de yodo es posible saber el grado de saturación de los componentes de una grasa, el índice será mayor entre más dobles enlaces por unidad de grasa se encuentren presentes.

Tabla 2.6.- Propiedades Físicas y Químicas del aceite de aguacate.

Propiedad	Extracción con éter de petróleo	Extracción por prensado	Aceite comercial
Densidad (g/cm ³)	0.9079	0.9073	0.9105
Índice de Refracción a 25°C	1.468	1.4671	1.4688
Índice de acidez (% ácido oleico)	0.471	0.32	2.98 (mg KOH/g)
Índice de peróxidos (meq/g)	5.21	2.76	38.1
Índice de saponificación (mg KOH/g)	165.31	148.48	217
Índice de Yodo (g L/100 g)	83.9	80.33	83.35
Punto de Humo (°C)	212	218	_____

Fuente: (Jiménez *et al.*, 2001; Gonzalez- Vanegas *et al.*, 2000.)

2.7 Clasificación de aceites según su grado de refinación.

Dentro de los que más se conoce por sus altos beneficios al ser humano son el de almendra, lino, girasol, y el de olivo. Es posible encontrarlos en diferentes presentaciones las cuales son:

- Aceite Extra virgen; Obtenido de un solo prensado siendo este el de mayor calidad y con mayores cualidades sensoriales.
- Aceite Virgen; Es aquel que se obtiene de la segunda extracción, con una menor calidad.
- Aceite puro; después de la segunda extracción se utiliza filtros y procesos, se obtiene una menor calidad pero es aun saludable.
- Aceite ligero; este tipo de aceite es obtenido mediante el uso de solventes, de todos es el que tiene menor calidad ya que pierde propiedades nutricionales y sensoriales.

Por todas sus propiedades el aceite de aguacate ha sido fuente de investigaciones para obtener al máximo rendimiento.

2.8 Extracción de aceite de aguacate.

El aceite de aguacate se puede extraer de diferentes maneras, estas dependen del uso que se le dará al aceite así como los recursos con los que se cuenta. Para la industria cosmética se utiliza el aceite de aguacate extraído a partir de solventes y para la industria alimentaria aquel que se extrae por medios mecánicos. Debido a que el aceite de aguacate tiene un amplio campo de utilización, se siguen realizando investigaciones para obtener aceite de manera fácil, económica y amigable con el medio ambiente.

2.8.1 Extracción por solventes

La extracción de aceite de aguacate con solventes es el método más empleado por diversos autores, utilizando el éter de petróleo, hexano y una mezcla de cloroformo y metanol. El aceite obtenido por esta vía solo es posible utilizarlo en productos cosméticos y no es apto para el consumo humano. En algunos trabajos se somete la pulpa de aguacate sin un secado previo a extracciones con solventes durante 4 horas, este procedimiento ha reportado bajos rendimientos motivo por el cual ha sido rechazado actualmente. Cuando la pulpa de aguacate se somete a secado antes del proceso extractivo con solventes y posteriormente a una evaporación se obtiene mayores rendimientos (Martinez *et al.*, 1988). Si bien esta técnica es ampliamente utilizada con rendimientos reportados de 95 % presenta una gran desventaja a nivel ambiental, así como también el aceite que se obtiene es ligero (Restrepo *et al.*, 2012). La Fig. 2.4 presenta un diagrama del proceso.

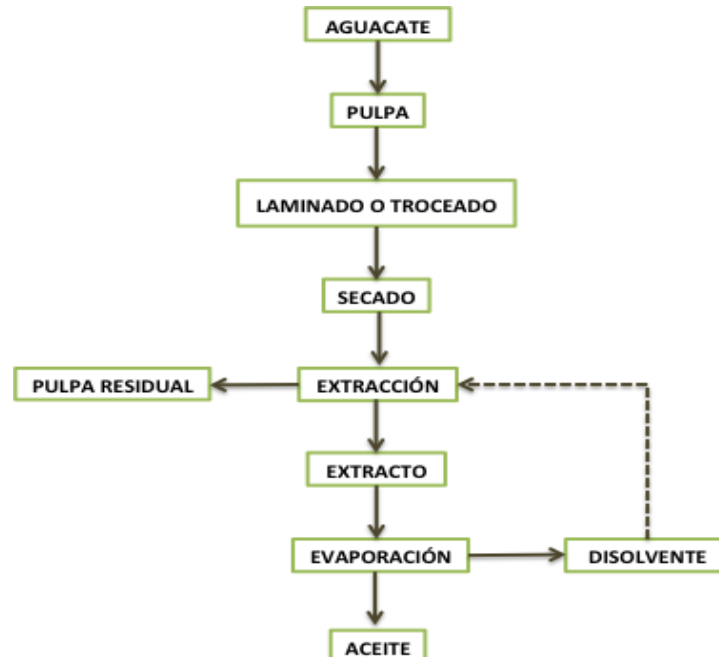


Figura 2.4.- Diagrama del proceso de extracción de aceite de aguacate con solventes. (Martinez *et al.*, 1988)

2.8.2 Extracción por prensado en frío

Este tipo de extracción se da por la separación de líquido en un sistema de fases solido-líquido, esto mediante la compresión dejando que el líquido fluya y los sólidos permanezcan. La centrifugación se utiliza como un paso posterior al prensado para la separación del aceite (Rosenthal *et al.*, 1996). Este proceso (Figura 2.5) es ampliamente utilizado en industrias donde producen el aceite de olivo virgen, es también usado como un etapa previa en la extracción con solventes (Acosta Moreno, 2011). Para la extracción de aceite de aguacate se tiene reportado rendimientos del 12% de un aceite extra virgen (Restrepo *et al.*, 2012).



Figura 2.5.- Diagrama de extracción de aceite de aguacate por prensado con y sin hueso molido (Martínez *et al.*, 1988).

El equipo de prensado está conformado por un cilindro metálico hueco, perforado con orificios en la superficie lateral y base inferior. La base superior es compacta, plana y se desliza con un buen ajuste a lo largo del cilindro al ejercer presión.

2.8.3 Centrifugación

Este tipo de extracción al igual que el de prensado se realiza con equipos. Dichos equipos utilizan la fuerza centrífuga y la diferencia existente entre las densidades. Se trabaja a temperaturas de alrededor de 45°C que son viables para no cambiar las propiedades del aceite de aguacate. La fuerza centrípeta actúa hacia el centro de rotación causando la sedimentación de partículas sólidas y de mayor peso presentes en un líquido. En la actualidad es un método utilizado en empresas mexicanas para la extracción de aceite. El proceso consiste en la eliminación de la cáscara del aguacate obteniendo toda la pulpa sin la semilla homogenizando la pulpa. La pasta se somete a centrifugación durante aproximadamente 10 minutos (depende de las revoluciones por minuto “rpm” que se trabaje), posterior a ese tiempo se retira el sobrenadante y se repite la operación hasta obtener el aceite libre de agua o tejido celular (Figura 2.6) (Acosta Moreno, 2011). Con este proceso se obtiene un aceite puro con un rendimiento del 50 % (Restrepo *et al.*, 2012).

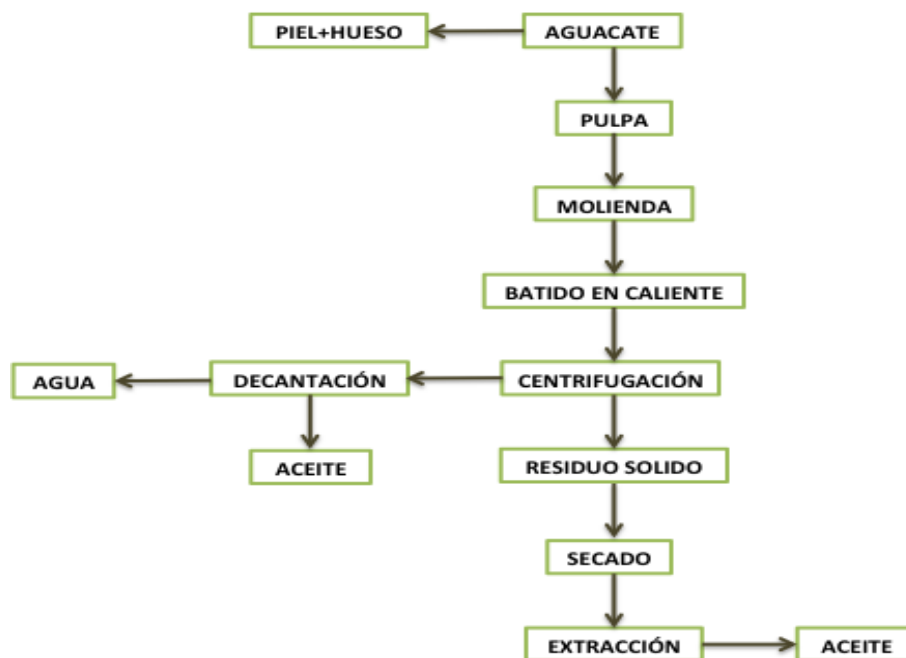


Figura 2.6.- Diagrama de extracción de aceite de aguacate por centrifugación. (Martinez *et al.*, 1988)

2.8.4 Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (FSC), es un gas o líquido a presión y temperatura de en su punto crítico. El punto crítico es aquel en el cual las fases se vuelven indistintas, esto es posible determinarlo mediante la medición de la presión crítica, temperatura crítica y densidad crítica (Esquível y Bernardo-Gil, 1993). El primer proceso en el cual se empleó esta tecnología fue el descafeinado de café en 1978. En la actualidad tiene un amplio campo de aplicación entre los cuales se encuentra la conservación de productos, inactivación enzimática, diseño de partículas, producción de etanol entre otras (Domínguez y Parzanese, 2005).

El dióxido de carbono, propano, agua, hexano y tolueno son algunos de los solventes que se utilizan para la extracción supercrítica. El dióxido de carbono sin duda es el más utilizado gracias a sus bajos parámetros críticos, a su química inerte, a su nula toxicidad y su bajo costo (Esquível y Bernardo-Gil, 1993). Las ventajas de este método son los altos rendimientos (80%) así como también que se obtiene un aceite extra virgen y la fácil recuperación de los solventes (Restrepo *et al.*, 2012). La Figura 2.7 muestra un panorama general de la extracción con fluidos supercríticos.

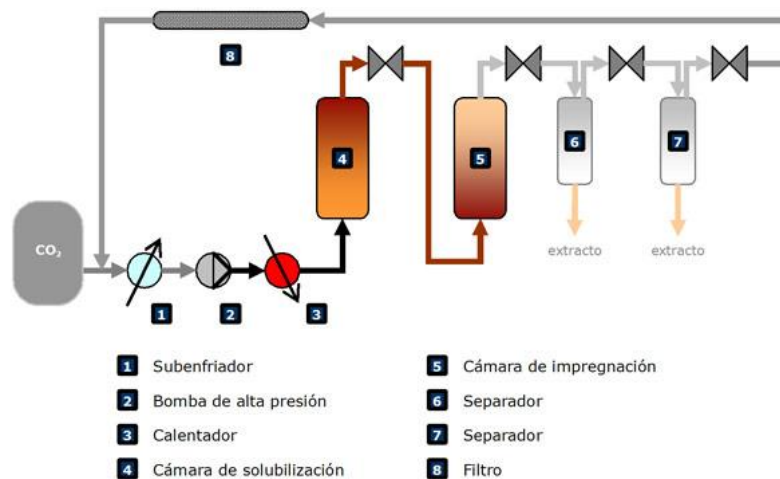


Figura 2.7.- Diagrama de extracción con fluidos supercríticos (Sena, 2011).

2.8.5 Extracción de aceite de aguacate asistida con enzimas

La extracción de aceite de aguacate usando enzimas va de la mano con procesos mecánicos para aumentar el rendimiento. Las enzimas libres y preparados comerciales de estas se utilizan con éxito para extraer el aceite que se encuentra dentro de los idioblastos (Buelvas Salgado *et al.*, 2013; Baya *et al.*, 1996).

La hemicelulasa y la celulasa actúan sobre los enlaces β 1-4 presentes en las células del mesocarpio de aguacate. Para que se lleve a cabo el rompimiento de enlaces se debe trabajar a los valores de temperatura y pH ideales de las enzimas, así como tener una materia prima en el estado maduro apropiado (Buelvas Salgado *et al.*, 2013). Este proceso de extracción es utilizado para la obtención de aceite grado alimenticio. El proceso por el cual se extrae el aceite consiste en la separación de la pulpa del aguacate, posteriormente se hace una dilución con agua y se le añade las enzimas a las condiciones establecidas previamente. Una vez se haya llevado a cabo la reacción enzimática se centrifuga para obtener aceite de aguacate como puede observarse en el diagrama de la Figura 2.8 (Buenrostro y López-Munguía 1986).

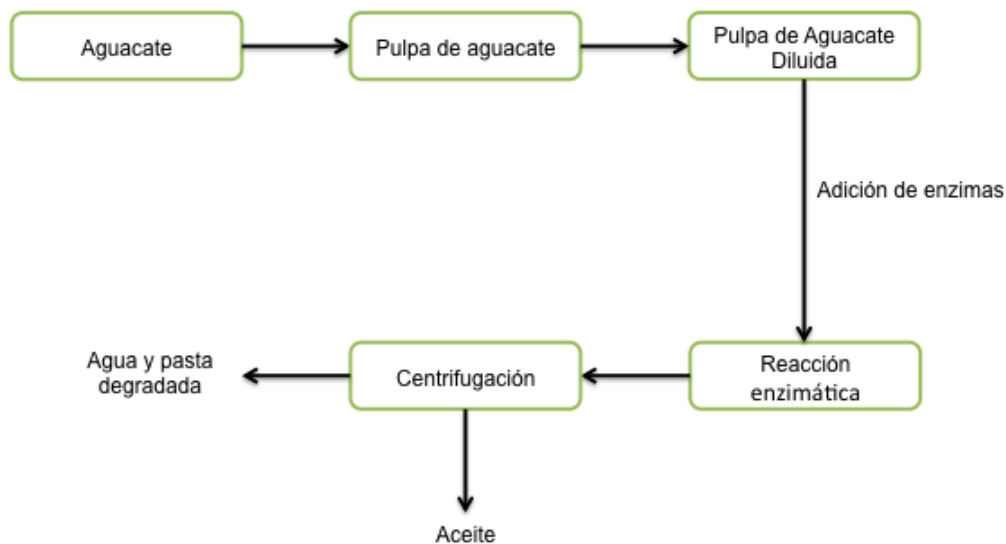


Figura 2.8.- Diagrama de extracción de aceite de aguacate asistida con enzimas.

Adaptación de (Buenrostro y López-Munguía 1986)

Buenrostro y Lopez (1986) utilizaron seis enzimas para la extracción de aceite de aguacate a partir de la variedad Hass. De este trabajo solo se reportan resultados de las enzimas α -amilasa, papaína y celulasa. Con la α -amilasa se obtuvo un rendimiento de 70% (b.s) usando frutos almacenados a una temperatura de 65 °C durante 13 días después de ser cosechados y utilizando una relación de dilución 1:5 (aguacate: agua). Con esta misma enzima pero con frutos recién cosechados obtuvo un rendimiento de 49.5% (b.s). Cabe mencionar que estos autores no hacen mención de la cantidad de enzima con la cual se realizó el trabajo así como tampoco las unidades de actividad enzimática.

Costa (2011) utilizó dos complejos enzimáticos de los cuales uno contenía poligalacturonasa y el otro una mezcla de poligalacturonasa y hemicelulasa. Obtuvo un rendimiento máximo de 82.2% con la mezcla de ambos complejos a una temperatura de 50 °C, pH 5 y dilución 1:4 (%p/p). No hizo mención de las unidades de actividad, agitación orbital y manejo las concentraciones en porcentajes.

Acosta (2011) trabajó con 5 variedades diferentes de aguacate y tres complejos enzimáticos; el primero contenía pectinasa, arabanasa y hemicelulasa. El segundo pectinasa y hemicelulasa; el tercero solo pectinasa. Este último mostro mayor rendimiento en la extracción de aceite de aguacate con 98.41 % a 50 °C, pH 5, con agitación, dilución 1:3, utilizando la variedad Hass y a un tiempo de hidrólisis de dos horas. En este trabajo si se muestra las unidades de actividad enzimática sin embargo, trabajan en gramos de enzima añadida por tonelada de pulpa de aguacate. Salgado y colaboradores (2012) obtuvieron un rendimiento máximo de 66.47% con el aguacate de la variedad Hass, utilizando para la hidrólisis enzimática la poligalacturonasa a las mismas condiciones que Acosta en 2011, solo que a una temperatura de 50 °C.

Vanegas y colaboradores (2009) utilizó aguacate de la variedad Hass y dos complejos enzimáticos, obtuvo un rendimiento máximo de 48.36 con la mezcla de las enzimas pectinasa y carbohidrasa a pH 4.8 y 30 °C. Este trabajó no presenta

datos de las concentraciones a las cuales trabajó, así como tampoco unidades de actividad enzimática.

En la Tabla 2.8 se muestran los mejores rendimientos de extracción de aceite de aguacate con enzimas y las condiciones a las cuales se obtuvo.

Tabla 2.7.- Rendimientos máximos obtenidos para la extracción enzimática de aceite de aguacate

Autor	Enzima	Temperatura (°C)	pH	Dilución	Rendimiento (%)
Buenrostro y Munguia, 1986	α -amilasa	65	5	1:5	70
Costa, 2001	Mezcla poligalacturonasa, pectinasa y hemicelulasa	40	5	1:3	82.2
Vanegas et al., 2009	Pectinasa y carbohidrasa	30	4.8	1:3	48.36
Acosta, 2011	Poligalacturonasa	50	5	1:3	98.41
Salgado et al., 2013	Poligalacturonasa	45	5	1:3	66.47

Si bien se han reportado altos rendimientos no es posible reproducirlos debido a la falta de información, tal es el caso de Salgado *et al* (2013) que

trabajaron a las mismas condiciones de Acosta sin lograr el rendimiento que éste obtuvo.

2.9 Síntesis de antecedentes

Los antecedentes muestran que se han utilizado enzimas libres para la obtención de aceite de aguacate, sin embargo no especifican todas las condiciones del proceso por lo que no es posible replicarlos.

Los reportes indican que los valores ideales de pH, temperatura y agitación, determinantes en el desempeño del proceso, dependen del sistema a tratar, aún para una misma enzima.

No se encontró, en la revisión bibliográfica el reporte de cinéticas enzimáticas de liberación de aceite por lo que no existen datos reportados que permitan plantear estrategias para mejorar el proceso.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el proceso de liberación de aceite de aguacate por medio de enzimas libres.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la temperatura, pH y agitación sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa de las enzimas libres.
2. Evaluar el efecto de la temperatura y pH sobre la liberación del aceite de aguacate.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo de investigación se realizó en tres etapas; en la primera se evaluó el efecto de la temperatura, pH y agitación sobre la actividad de las enzimas libres. En la segunda etapa se evaluó el efecto de la temperatura y pH sobre la liberación del aceite de aguacate. Finalmente en la tercera etapa se evaluó el efecto de la inmovilización de las enzimas celulasa y hemicelulasa sobre sus actividades.

4.1 Materias primas

Las enzimas celulasa (E.C. 3.2.1.4) y hemicelulasa (E.C. 3.2.1.8) a partir de *Aspergillus niger* se obtuvieron en (SIGMA ALDRICH®) así como también el quitosano en forma de hojuelas extraída del exoesqueleto de camarón. La celulosa y la hemicelulosa en forma de sal se adquirieron en SIGMA ALDRICH®

El aguacate Hass en estado maduro se obtuvo en un mercado local de la ciudad de Veracruz.

4.2 Preliminares para la evaluación del efecto de la agitación orbital sobre la actividad enzimática de la celulasa y hemicelulasa.

Para establecer las condiciones a las cuales se trabajó cada enzima se realizaron cinéticas a pH 4, 40°C (pH y temperatura que contiene la ficha técnica de la celulasa y hemicelulasa). Se trabajó a 0, 0.054 (80 rpm), 0.189 (150 rpm) y 0.336 G (200 rpm). En un equipo Thermo Scientific MaxQ 4000 con diámetro orbital de 1.9 cm.

Las cinéticas de la hemicelulasa y celulasa se llevaron a cabo en una solución amortiguadora de acetato pH 4 en el cual se disolvió la enzima a una concentración de 3 g/L y el sustrato a una concentración de 0.5 g /L. Se incubó la solución de enzima y la del sustrato por separado durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se mezcló a una proporción 1:1 e inmediatamente se colocaron 0.250 mL de la mezcla de reacción en un tubo de ensayo con 0.250 mL de NaOH 1M

para detener la reacción. Posterior a esto se cuantificó la cantidad de glucosa equivalente liberados por el método de DNS (Lee, 2001).

La determinación de los tiempos ideales de la hidrólisis enzimática se realizó mediante cinéticas con hemicelulasa de *Aspergillus niger* y celulasa de *Aspergillus niger* usando como sustrato hemicelulosa y celulosa (SIGMA-ALDRICH®) respectivamente. Estas cinéticas se realizaron a las condiciones de temperatura y pH establecidas en la ficha técnica que proporciona la empresa. Las cuales fueron para ambas enzimas (pH 5, 50 °C).

4.3 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa

La evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de ambas enzimas se llevó a cabo a las temperaturas y pH establecidos por el diseño plan central compuesto (Figura 4.1). A concentraciones de sustrato de 3 g/L usando sustratos puros y 200 g/L para la pulpa de aguacate. Utilizando la agitación orbital y el tiempo establecido en los preliminares.

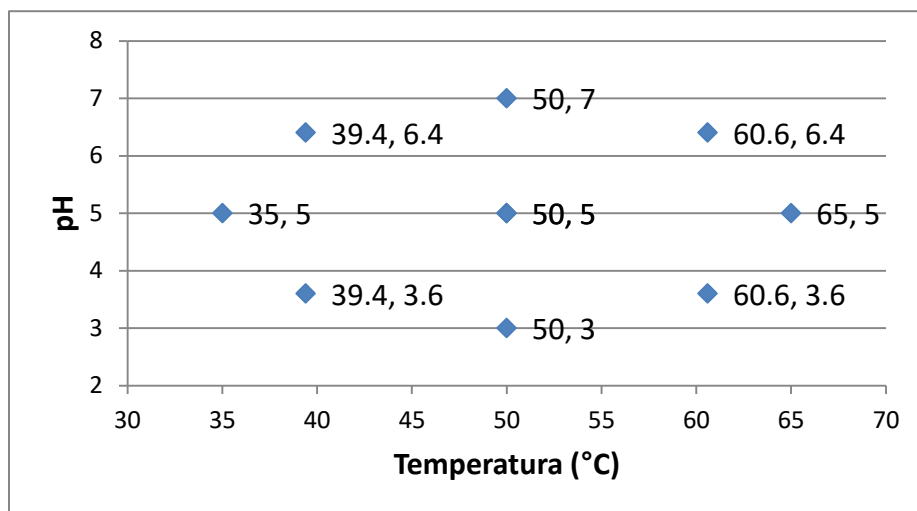


Figura 4.1.- Diseño experimental (plan central compuesto) para evaluar el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática.

Se realizaron 18 experimentos por enzima (2 enzimas), para un total de 72 experimentos con sus respectivos duplicados usando sustratos puros y 72 experimentos usando pulpa de aguacate. La variable de respuesta fue la glucosa equivalente.

4.3.1 Ajuste de pH.

Los valores de pH indicados en la Tabla 2.9 se alcanzaron ajustando el medio de reacción con soluciones amortiguadores de fosfatos y de acetato de sodio.

4.3.2 Determinación de actividad enzimática para la celulasa y hemicelulasa.

La determinación de actividad enzimática para ambas enzimas se realizó a través de la cuantificación de glucosa equivalente por el método de DNS (Ácido dinitrosalicílico) (Miller 1959). A 0.5 ml de la mezcla resultante de la hidrólisis enzimática se le adicionó 1.5 mL de reactivo DNS. Se calentó la mezcla resultante en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, transcurrido el tiempo inmediatamente se enfrió en un baño de agua a 18 °C; posterior a esto se agregaron 3 mL de agua destilada y la cantidad de glucosa equivalente se determinó a 550 nm utilizando un espectrofotómetro UV / VIS (Marca Thermo scientific Modelo GENESYS 10S UV-VIS) (Lee, 2001). Se utilizó glucosa como estándar. La actividad enzimática se determinó comparando la absorbancia de las mezclas derivadas de las reacciones enzimáticas con los que se obtuvo con los estándares de glucosa (Long *et al.*, 2011).

4.3.3 Evaluación del efecto de la concentración de sustrato y pulpa de aguacate sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa.

Para la evaluación del efecto de la concentración de sustrato y pulpa de aguacate sobre la actividad de ambas enzimas, se realizaron cinéticas a 5 diferentes concentraciones de sustrato puro (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L) y pulpa de aguacate (40, 80, 120, 160 y 200 g/L). La variable de respuesta fue la aparición de glucosa equivalente mediante el método de DNS.

4.4 Evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la liberación de aceite de aguacate por medio de la celulasa y hemicelulasa.

La evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la liberación de aceite de aguacate se realizó a las condiciones de temperatura y pH establecidas en el diseño estadístico. Se trabajó a las mismas unidades de actividad con ambas enzimas a la agitación orbital establecida en los preliminares. A una dilución de 1:5 (p/v) para la pulpa de aguacate. Los frutos de aguacate se cortaron a la mitad, se separó la cáscara, semilla y pulpa manualmente. Posteriormente, la pulpa se colocó en un recipiente para el mezclado homogéneo con una batidora de inmersión durante 15 min (Acosta, 2011).

El monitoreo de la reacción se llevó a cabo mediante la toma de muestra del medio de reacción cada determinado tiempo, parando la reacción con la adición de hidróxido de sodio 1 M.

La mezcla del producto obtenido de la hidrólisis enzimática se colocó en tubos para centrifuga y se centrifugó en un equipo Eppendorf 5810 R, durante 30 minutos a 2057 G (Salgado *et al.*, 2013). El aceite que se obtuvo se recolectó mediante la toma del sobrenadante con pipeta Pasteur del tubo de centrifuga. La pipeta usada se enjuago con hexano, finalmente se rota-evaporó la muestra para su posterior cuantificación por diferencia de peso.

Para la determinación de rendimientos se utilizó la siguiente relación matemática:

$$\%R = \frac{g(\text{aceite})}{g(\text{grasa total})} = 100\%$$

Donde g (aceite): gramos de aceite obtenido por hidrólisis enzimática y g (grasa total): gramos de extracto etéreo obtenido por método Soxhlet (Salgado *et al.*, 2013).

4.4.1 Extracción de aceite por el método Soxhlet

Se realizó extracción de aceite de aguacate por el método Soxhlet se trabajó con aguacate seco, por lo cual se realizó una cinética de secado en la cual se cortó 51.3 g de aguacate en forma de láminas de 3 mm de espesor y se secó en un secador de bandejas durante 6 horas a 60 °C y 2 m/s de flujo de aire. Se pesó 10.0174 g de aguacate seco en papel filtro sobre un dedal. El matraz de extracción a peso constante se colocó en el sistema Soxhlet, el dedal en el tubo de extracción y se adiciono 140 mL de éter de petróleo al matraz. Se realizó el proceso de extracción en 5 ciclos a 70-90°C.

Finalizada la extracción se eliminó el solvente mediante la evaporación en un rota vapor a 330 mbar y 40°C. Se secó en estufa a 103± 2 °C por 10 min, se enfrió y peso nuevamente. Para el cálculo de porcentaje de aceite se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Aceite = \frac{W_{b+a} - W_b}{m}$$

Dónde:

W_b = Peso matraz balón

W_{b+a} = Matraz + aceite

m = Peso de la muestra

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preliminar para la evaluación del efecto de la agitación orbital sobre la actividad enzimática de la celulasa y hemicelulasa.

En la evaluación del efecto de la agitación orbital sobre ambas enzimas se obtuvo las siguientes cinéticas (Figura 5.1).

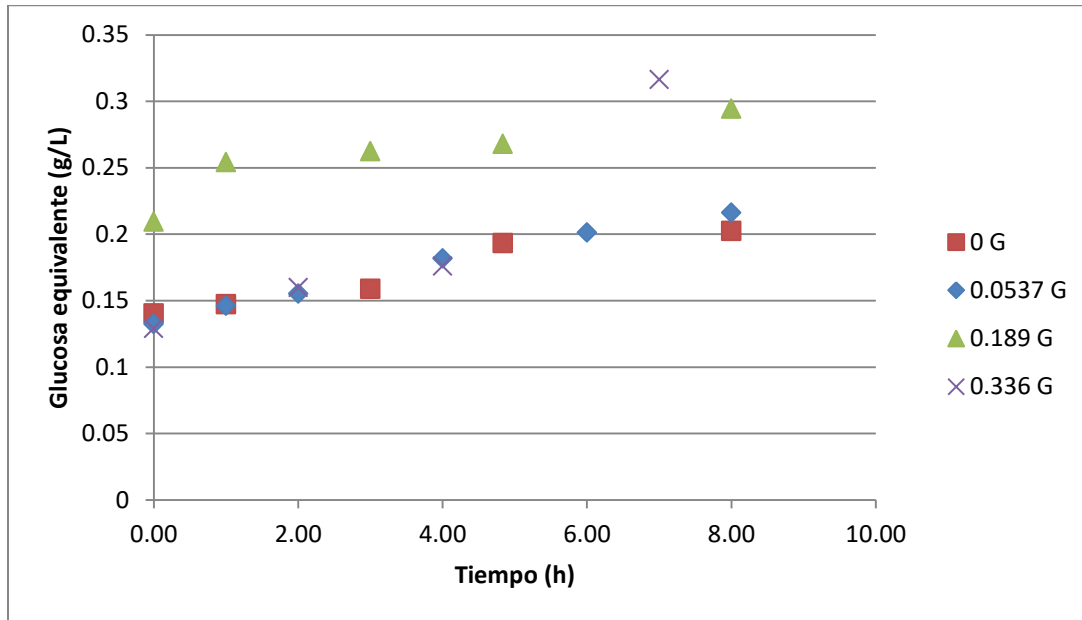


Figura 5.1.- Cinéticas de hidrólisis de celulosa a diferentes agitaciones orbitales.

Se observa en las cinéticas de hidrólisis de celulosa a 4 diferentes agitaciones orbitales a una temperatura de 40 °C, que la mejor agitación fue a 0.189 G o 150 rpm ya que desde el inicio de la reacción se obtuvo una mayor concentración de glucosa equivalente. En la literatura se describe que la utilización de celulasas para la liberación de aceite de aguacate se puede encontrar diferentes valores de agitación en rpm, por lo que no es posible la reproducción de dichos trabajos. En otros trabajos, como el de Vanegas *et al.* (2009), solo se menciona que se trabajó con agitación, sin proporcionar más información. Por todo lo anterior, este experimento permitió establecer el valor de agitación orbital a la cual se trabajarían las cinéticas enzimáticas de hidrólisis.

5.2 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa.

Para la evaluación de la temperatura y pH sobre la actividad de la celulasa usando como sustrato celulosa se obtuvieron las cinéticas de la Fig. 5.2.

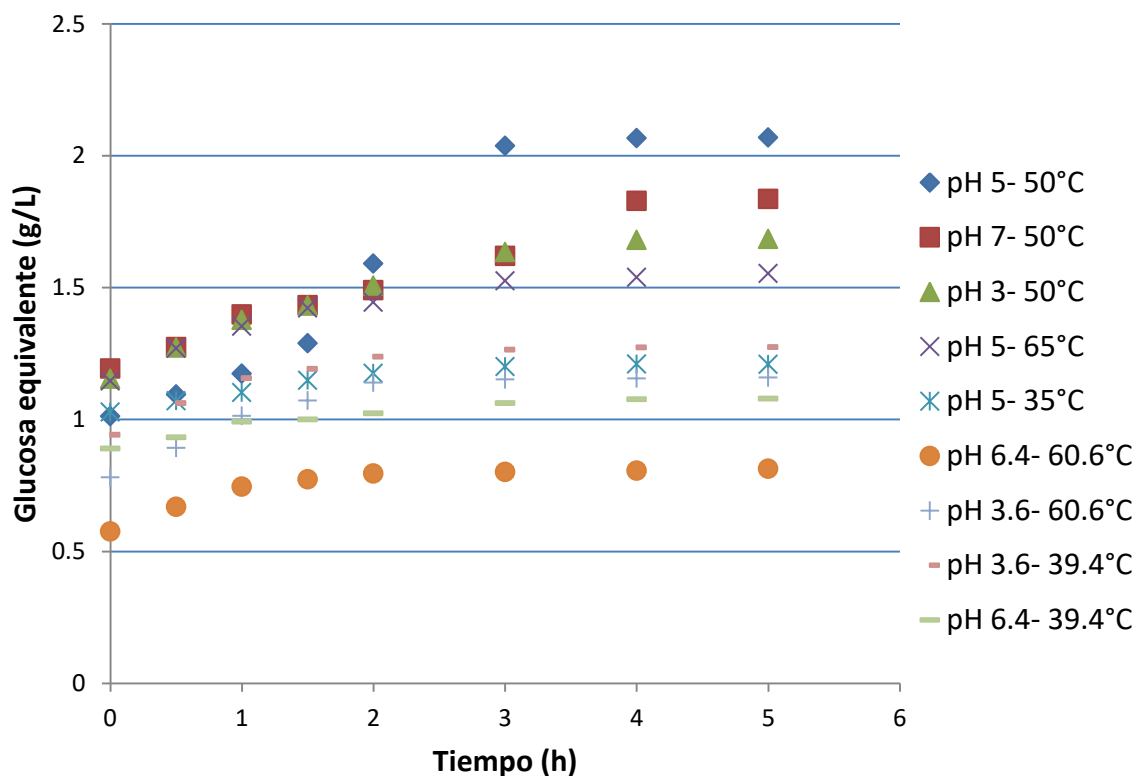


Figura 5.2.- Cinéticas de hidrólisis de celulosa a diferentes condiciones de pH y temperatura.

Estas cinéticas muestran que a 50°C y pH 5 se obtiene una mayor concentración de azúcares reductores, llegando a la máxima concentración de glucosa equivalente a las 3 horas. Esta información coincide con lo reportado por Mao *et al.* (2006) y Zang *et al.*, (2014). Así como también la información proporcionada por la ficha técnica de Sigma, sobre las condiciones ideales para la enzima

A partir de estas cinéticas se obtuvieron los datos de V_0 que se muestran en la Tabla 5.1, a diferentes valores de pH y temperatura.

Tabla 5.1.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de celulosa

	T (°C)	pH	Vo (g/L-h)
A	50	5	0.34575
B=C,D,F,G,H	50	7	0.1502
C=D,F,G,H	50	3	0.148
D= F,H	65	5	0.1209
E=I	35	5	0.0656
F=H	60.6	6.4	0.1088
G=H	60.6	3.6	0.1794
H= B,C,D,F,G	39.4	3.6	0.1442
I=E	39.4	6.4	0.05565

La velocidad inicial de la reacción (Vo) es igual a la pendiente de la curva de la reacción. Se realizó un análisis estadístico de varianza y se encontró que ña condición a pH 5 y 50 °C mostraba diferencia significativa entre las condiciones. Evaluando los valores de Vo se confirma que la mejor condición para esta enzima fue, como se mencionó anteriormente, a 50°C y pH 5 por lo que a estas condiciones se probó el efecto de la concentración de sustrato.

Para la evaluación de efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de la hemicelulasa se obtuvieron las cinéticas que se muestran en la Figura 5.3

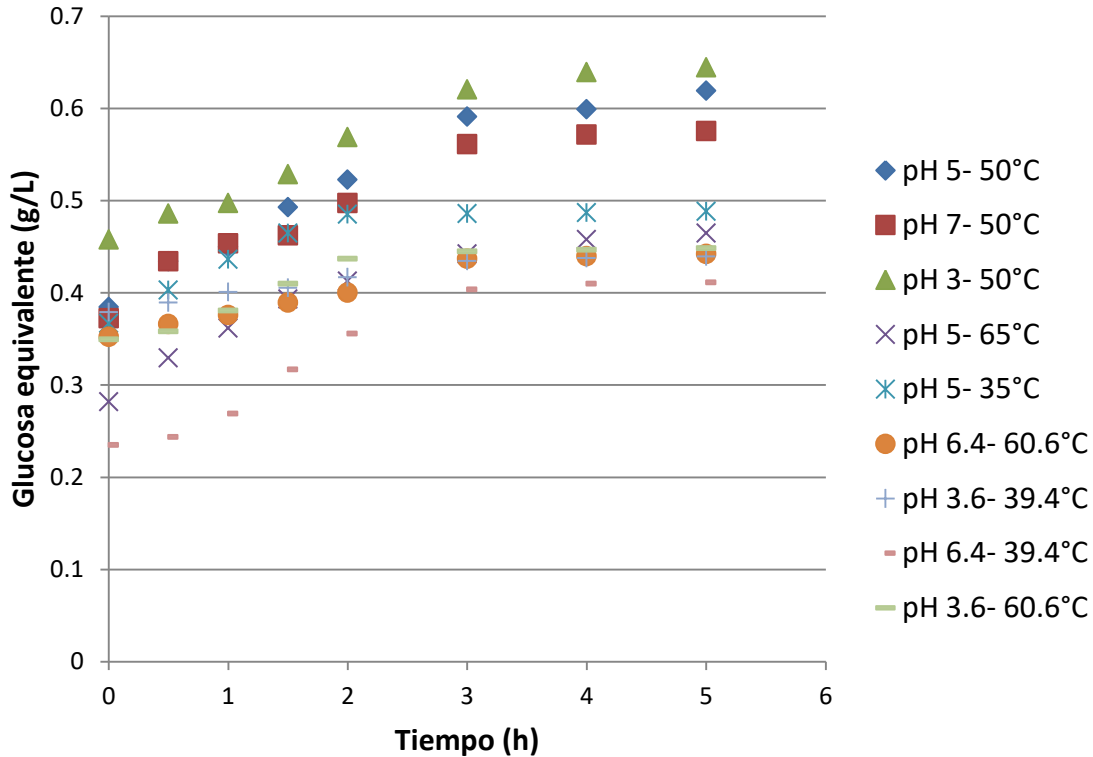


Figura 5.3.- Cinéticas de hidrólisis de hemicelulosa a diferentes condiciones de temperatura y pH

Se observa que a 50°C y pH 3 se obtiene una mayor concentración de glucosa equivalente, llegando a un máximo de concentración de esta a las 3 horas. Esta observación coincide con los resultados de temperatura reportados por Zang *et al.* (2014) así como también por la proporcionada por la ficha técnica de Sigma, sin embargo en cuanto a pH presentó variación, ya que la ficha técnica menciona que el pH óptmo de la hemicelulasa es de 5. A partir de estas cinéticas se obtuvieron los datos de V_o .

En la Tabla 5.3 se muestran las V_o a diferentes valores de pH y temperatura.

Tabla 5.2.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de hemicelulosa

	T (°C)	pH	V_o (g/L-h)
A ≠ F,G,H	50	5	0.0671
B ≠ F,H	50	7	0.0573
C ≠ F, H	50	3	0.0533
D ≠ F,H	65	5	0.0526
E ≠ F, H	35	5	0.0597
F ≠ G, I	60.6	6.4	0.0273
G ≠ H	60.6	3.6	0.0453
H, ≠I	39.4	3.6	0.01835
I ≠, H	39.4	6.4	0.0611

Se realizó un análisis estadístico de varianza a las diferentes condiciones y se encontró diferencias significativas entre algunas. No obstante los valores de V_o más altos no mostraron diferencias, por lo tanto se decidió elegir como las condiciones ideales para esta enzima usando hemicelulosa un pH 3, 50 °C.

A estas condiciones seleccionadas se realizó la evaluación del efecto de la concentración de sustrato.

Para la evaluación de la temperatura y pH sobre la actividad de la celulasa usando como sustrato pulpa de aguacate se obtuvieron las cinéticas de la Fig. 5.4

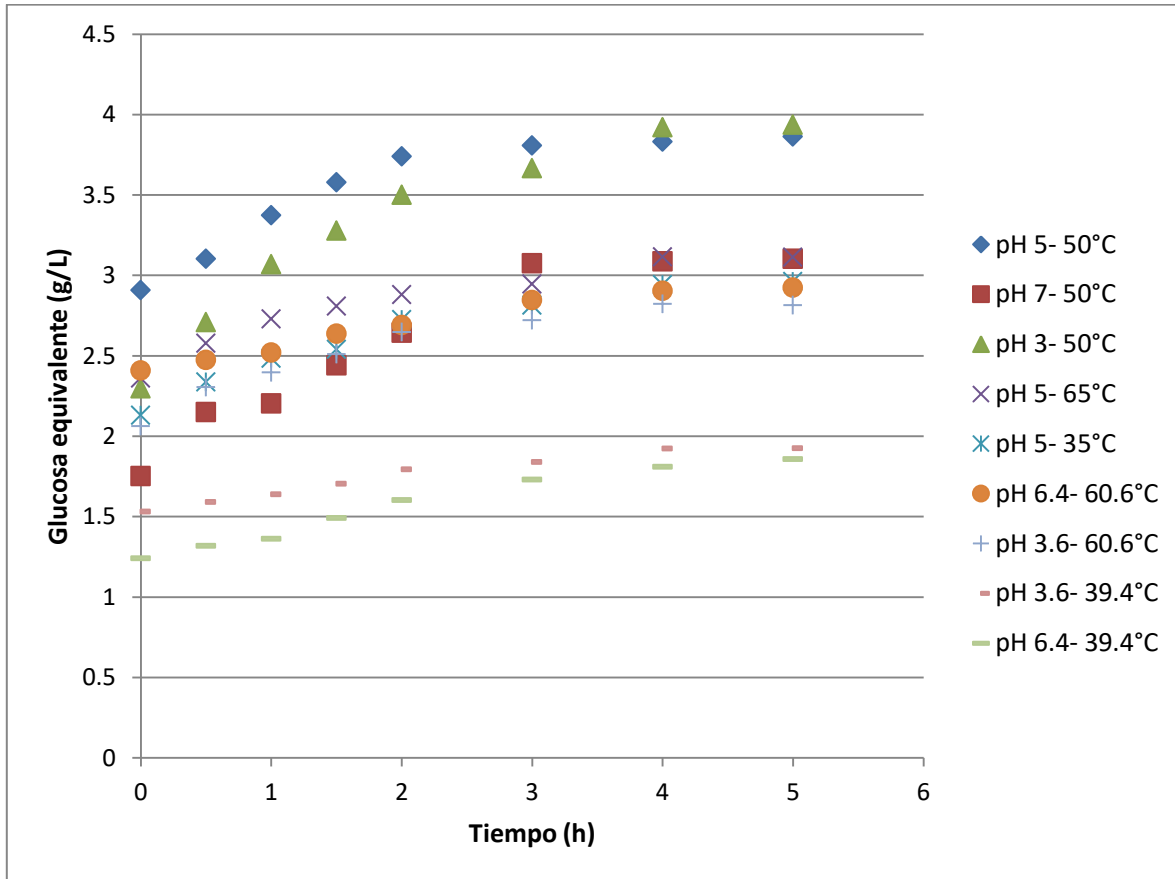


Figura 5.4.- Cinéticas de liberación de glucosa equivalente durante la hidrólisis de mescarpio de aguacate por acción de celulasa.

Las mejores condiciones para la producción de glucosa equivalente fue pH 5 y 50 °C, alcanzando el máximo a las 2 horas de reacción. Estos valores óptimos coinciden con lo establecido por la ficha técnica cuando la enzima actúa sobre sustratos puros. No se encontró en la literatura trabajos que soporten o sirvan de comparación

A partir de las cinéticas mostradas en la Figura 5.4 se obtuvieron los valores de V_0 que se muestran en la Tabla 5.3 a diferentes valores de pH y temperatura.

Tabla 5.3.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de mesocarpio de aguacate por acción de celulasa.

T (°C)	pH	Vo (g/L-h)
50	5	0.42785
50	7	0.41665
50	3	0.3817
65	5	0.21105
35	5	0.2194
60.6	6.4	0.14205
60.6	3.6	0.27555
39.4	3.6	0.118
39.4	6.4	0.1624

Se realizó un análisis estadístico de varianza a las diferentes condiciones y se encontró diferencias significativas entre algunas. Por lo tanto se decidió elegir como las condiciones ideales para esta enzima usando mesocarpio de aguacate un pH 5, 50 °C. Estos valores coinciden con los resultados de los sustratos puros. Sin embargo no se encontró en la literatura trabajos que puedan ser comparables con estos resultados.

A estas condiciones seleccionadas se realizó la evaluación del efecto de la concentración de sustrato.

Para la evaluación de la temperatura y pH sobre la actividad de la hemicelulasa usando como sustrato pulpa de aguacate se obtuvieron las cinéticas de la Fig. 5.5

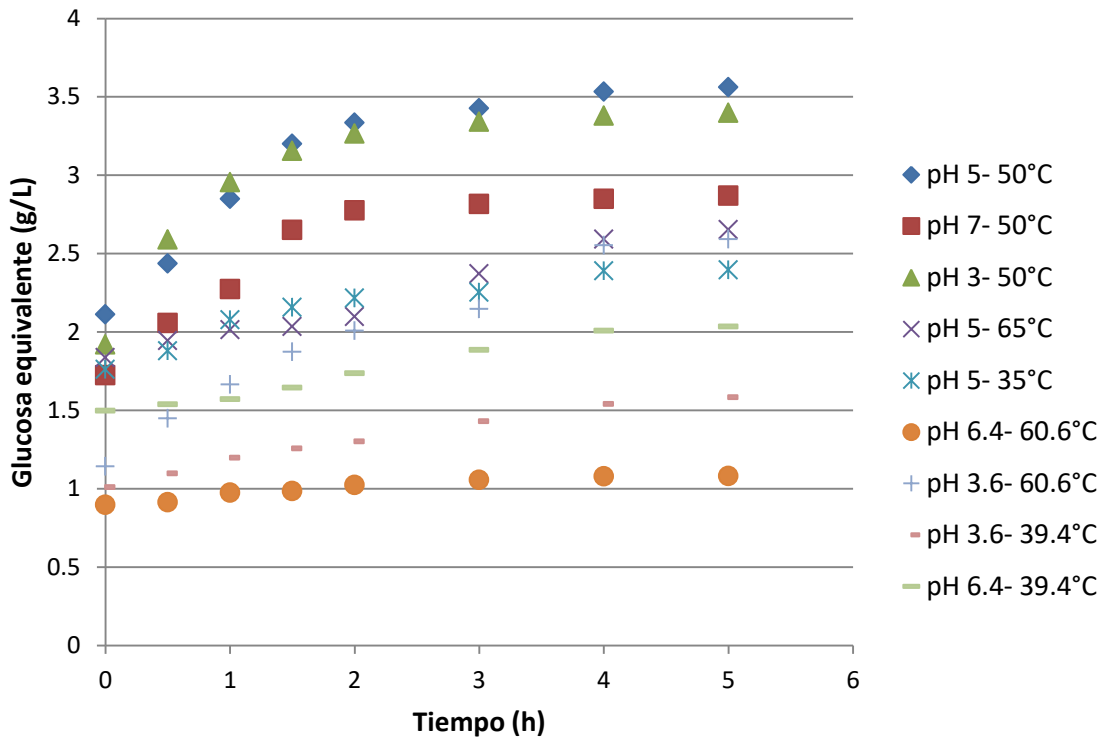


Figura 5.5.- Cinéticas de liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis de mesocarpio de aguacate por acción de hemicelulasa.

En la Figura 5.5 puede observarse que la mejor condición para la obtención de azúcares reductores fue pH 5 y 50 °C, alcanzando un máximo en la concentración de glucosa equivalente a las 2 horas. Estas condiciones coinciden con las reportadas en la ficha técnica cuando la enzima actúa sobre sustratos puros. No se encontró en la literatura trabajos con los cuales sea posible una comparación.

A partir de estas cinéticas se obtuvieron los datos de V_o que se muestran en la Tabla 5.4

Tabla 5.4.- Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis enzimática de mesocarpio de aguacate por acción de hemicelulasa

	T (°C)	pH	V_o (g/L-h)
A= B, C	50	5	0.6422
B=A,C	50	5	0.53915
C= B, A	50	3	0.65145
D= E, F,G,H,I	65	5	0.18315
E= F,G,H,I	35	5	0.20285
F= D,E,I, H	60.6	6.4	0.11385
G= D, E	60.6	3.6	0.3237
H= D, E, H, I	39.4	3.6	0.12955
I= ,D,E,F,H	39.4	6.4	0.1412

Se realizó un análisis estadístico de varianza a las diferentes condiciones y se encontró diferencias significativas entre algunas. Por lo tanto se decidió elegir como las condiciones ideales para esta enzima usando mesocarpio de aguacate un pH 3, 50 °C. Sin embargo no se encontró en la literatura trabajos que puedan ser comparables con estos resultados. Es importante mencionar que los valores de V_o son mayores que los de la celulosa, esto posiblemente a que la pared celular del mesocarpio y los idioblastos es más afín a la hemicelulasa.

A estas condiciones seleccionadas se realizó la evaluación del efecto de la concentración de sustrato.

5.3 Efecto de la concentración de sustrato y pulpa de aguacate sobre la actividad de la celulasa y hemicelulasa.

Para la evaluación de la concentración de sustrato (celulosa) sobre la actividad de la celulasa se obtuvieron las siguientes cinéticas.

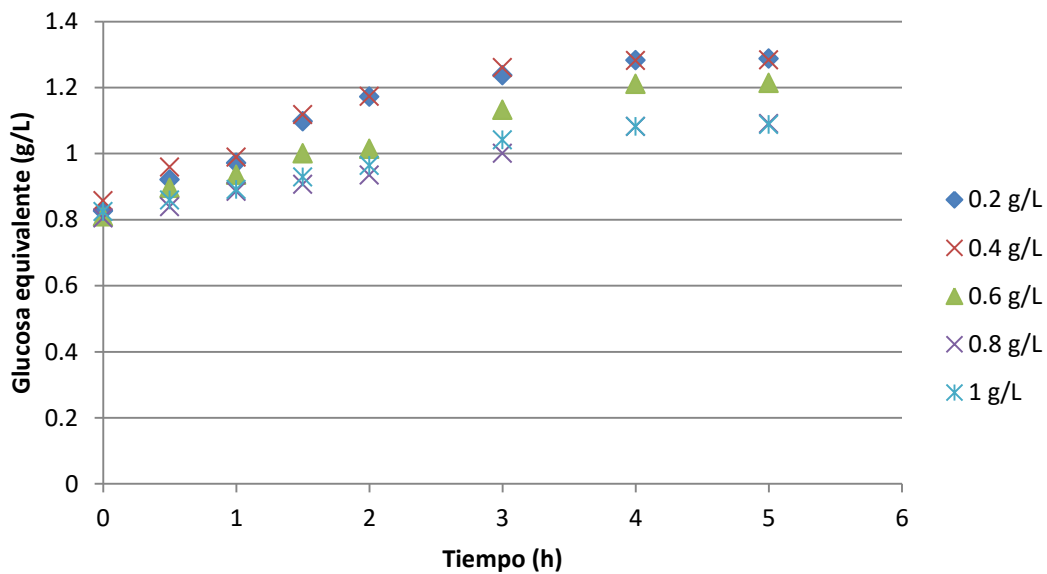


Figura 5.6.- Cinéticas de hidrólisis de celulosa a diferentes concentraciones.

Se obtuvo una mayor producción de glucosa equivalente a la concentración de 0.2 g/L. Con un máximo en la concentración de glucosa equivalente a 3 horas. A partir de estas cinéticas se obtuvieron los datos de V_o que se muestran en la Tabla 5.5

Tabla 5.5.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial (V_o , g/L-h) de la reacción de hidrólisis enzimática de celulosa.

[S] g/L	V_o (g/L-h)
0.2	0.17285
0.4	0.1623
0.6	0.122
0.8	0.06995
1	0.06925

Para la evaluación de la concentración de sustrato (hemicelulosa) sobre la actividad de la hemicelulasa se obtuvieron las siguientes cinéticas.

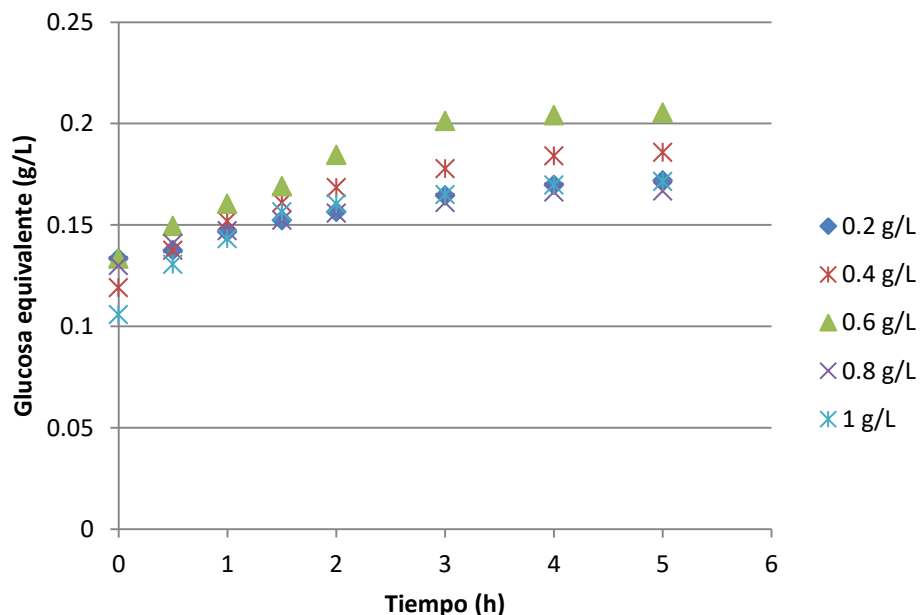


Figura 5.7.- Cinéticas de hidrólisis de hemicelulosa a diferentes concentraciones.

Se obtuvo una mayor producción de glucosa equivalente a la concentración de 0.6 g/L. Con un máximo en la concentración de glucosa equivalente a 3 horas. A partir de estas cinéticas se obtuvieron los datos de V_o que se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial (V_o , g/L-h) de la reacción de hidrólisis enzimática de hemicelulosa.

[S] g/L	V_o g/L-h
0.2	0.0093
0.4	0.022
0.6	0.0224
1	0.02705

La Tabla 5.6 muestra que la mayor V_o fue a 1 g/L. Se realizó un análisis estadístico de varianza y no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones. Motivo por el cual se decidió elegir la concentración (0.6 g/L) de sustrato a la cual se registró una mayor concentración de glucosa equivalente.

Para la evaluación de la concentración de pulpa de aguacate sobre la actividad de la celulasa se obtuvieron las siguientes cinéticas.

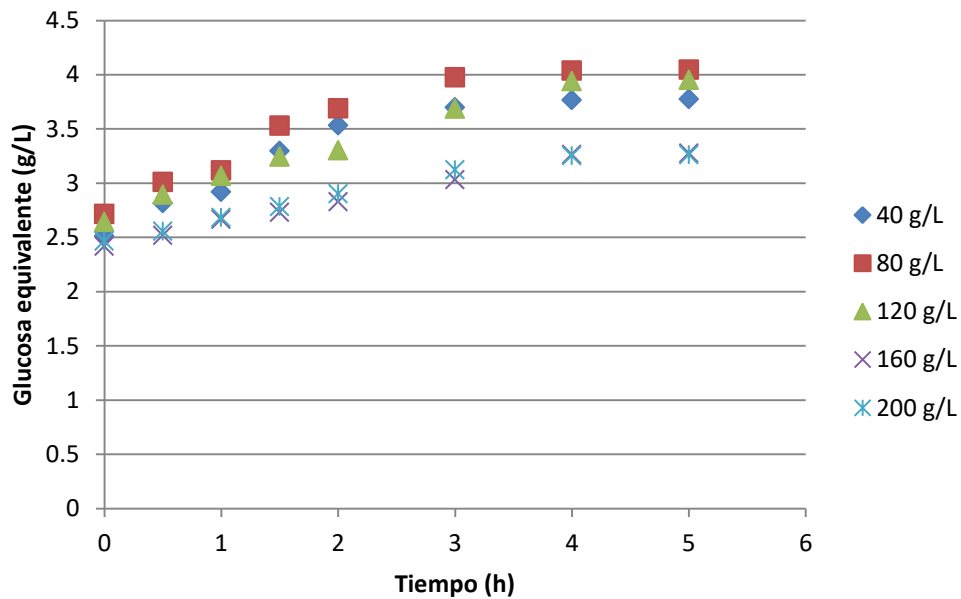


Figura 5.8.- Efecto de la concentración de mesocarpio de aguacate sobre las cinéticas de producción de glucosa equivalente debido a la acción hidrolítica de celulasa.

Analizando las cinéticas se determinó que hay una mayor producción de glucosa equivalente a la concentración de 80 g/L. Con un máximo en la concentración de glucosa equivalente a 3 horas.

A partir de estas cinéticas se calcularon las V_o que se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7.- Efecto de la concentración de pulpa de aguacate sobre la velocidad inicial (V_o , g/L-h).

[S] g/L	V_o g/L-h
40	0.6072
80	0.5946
120	0.506
160	0.20355
200	0.18055

La Tabla 5.7 muestra que la mayor V_o fue a 40 g/L. Sin embargo se realizó un análisis estadístico de varianza y no se encontró diferencia significativa entre las primeras tres concentraciones de pulpa de aguacate. Por lo cual se puede decir que la mejor concentración (40 g/L) es a la cual se obtuvo mayor rendimiento de glucosa equivalente.

Para la evaluación de la concentración pulpa de aguacate sobre la actividad de la hemicelulasa se obtuvieron las siguientes cinéticas.

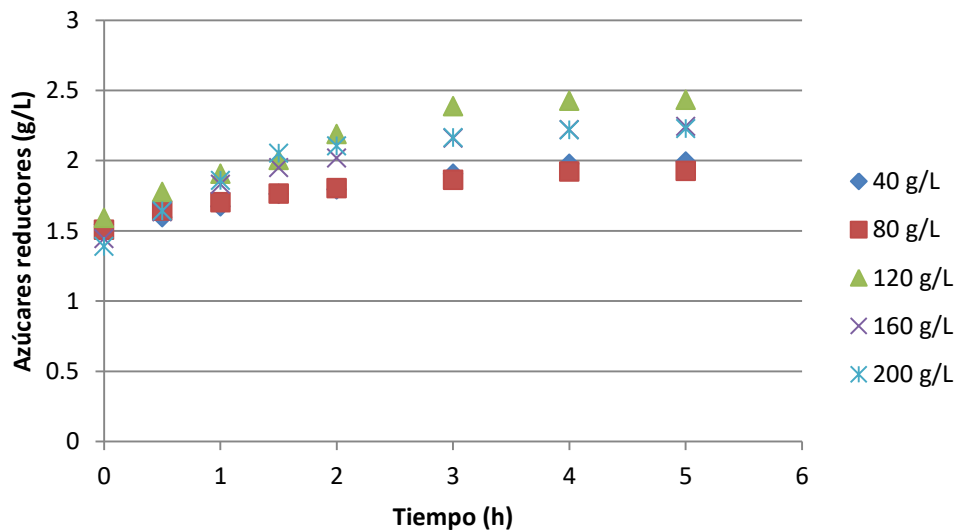


Figura 5.9.- Efecto de la concentración de mesocarpio de aguacate sobre las cinéticas de liberación de glucosa equivalente por la acción hidrolítica de hemicelulasa.

Se obtuvo una mayor producción de glucosa equivalente a la concentración de 120 g/L. Con un máximo en la concentración de glucosa equivalente a 3 horas.

A partir de estas cinéticas se obtuvieron los datos de V_0 que se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.8.- Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial (V_0 , g/h) de la reacción de hidrólisis enzimática de mesocarpio de aguacate por la acción de hemicelulasa a 50 °C.

[S] g/L	V_0 g/L-h
40	0.1271
80	0.1978
120	0.31455
160	0.387
200	0.46925

La Tabla 5.8 muestra que la mayor V_0 fue a 200 g/L, se realizó un análisis estadístico de varianza y no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones. Motivo por el cual se decidió elegir la concentración de sustrato (120 g/L) a la cual se registró una mayor concentración de glucosa equivalente.

5.4 Evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la liberación de aceite de aguacate

Para la evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la liberación de aceite de aguacate usando centrifugación asistida por la celulasa se obtuvieron las siguientes cinéticas a las diferentes condiciones establecidas en el plan central compuesto.

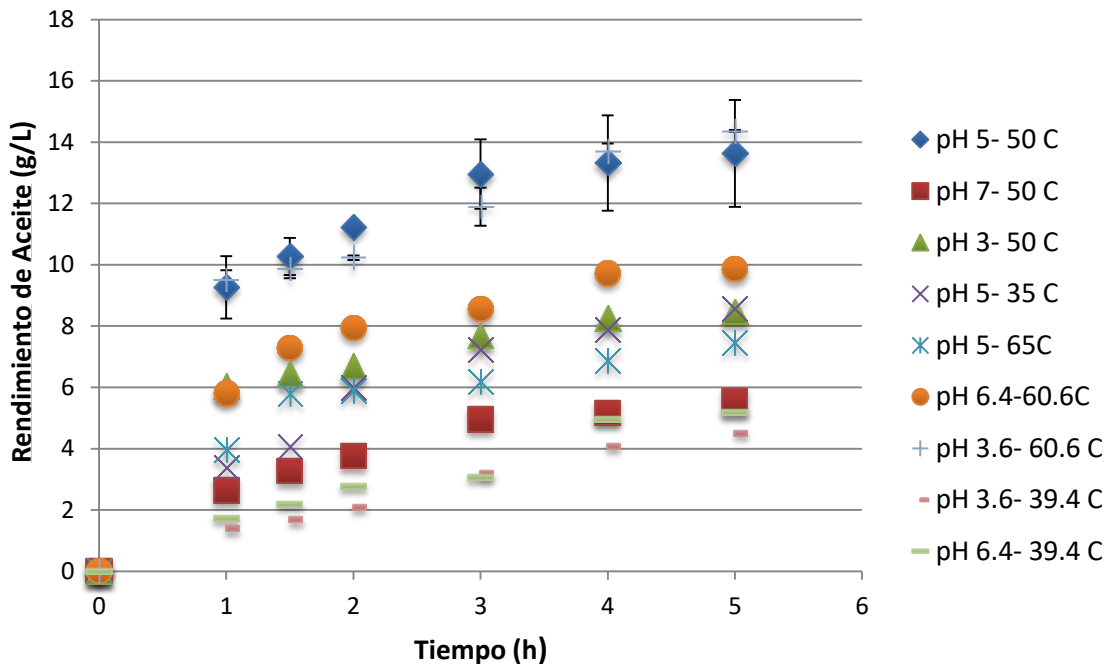


Figura 5.10.- Efecto del pH y la temperatura sobre la cinética de extracción de aceite de aguacate por acción de celulasa.

Es posible determinar a partir de la figura 5.10 que las mejores condiciones para la liberación de aceite de aguacate usando centrifugación asistida por la celulasa son, pH 5, 50 °C. A estas condiciones se obtiene un máximo rendimiento de aceite de aguacate a las 3 hrs.

Estas condiciones también coinciden con las mejores reportadas para la liberación de azúcares reductores. Es importante mencionar que no se encontró

en la literatura trabajos donde realicen cinéticas de liberación de aceite de aguacate.

El porcentaje total del rendimiento del aceite recuperado después del tratamiento hidrolítico debido a la actividad celulasa se muestra en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9.- Efecto de la acción hidrolítica de celulasa sobre el rendimiento de aceite.

Temperatura (°C)	pH	Aceite recuperado (%)	
		Tratamiento	Testigo
50	5	90.68	52.13
50	7	89.69	51.15
50	3	77.12	50.96
65	5	84.27	51.06
35	5	85.52	51.12
60.6	6.4	85.53	50.65
60.6	3.6	73.63	50.02
39.4	3.6	88.98	51.93
39.4	6.4	81.39	50.98

Se realizó un análisis estadístico entre condiciones del tratamiento con el uso de celulasa, mostrando un valor p de 0.309, lo que demuestra que no existe una diferencia significativa entre las nueve diferentes condiciones.

Después del tratamiento enzimático, el medio de reacción fue centrifugado para facilitar la separación del aceite, la columna titulada “testigo” presenta la cantidad de aceite recuperada por el sólo efecto de la centrifugación, en este tratamiento, no hubo presencia de enzima. Comparando ambas columnas, puede observarse que la cantidad de aceite recuperado es mayor cuando la enzima está presente en el medio de reacción. El porcentaje máximo de aceite recuperado fue de 90.68 % a 50°C y pH 5. El análisis de varianza de estos resultados mostró un valor p de 0.0139, lo que sugiere que los tratamientos son significativamente diferentes, por lo tanto, es evidente el efecto de la centrifugación más el uso de enzimas en los rendimientos de liberación de aceite de aguacate.

Para la evaluación del efecto de la temperatura y pH sobre la liberación de aceite de aguacate usando centrifugación asistida por la hemicelulasa se obtuvieron las siguientes cinéticas a las diferentes condiciones establecidas en el plan central compuesto.

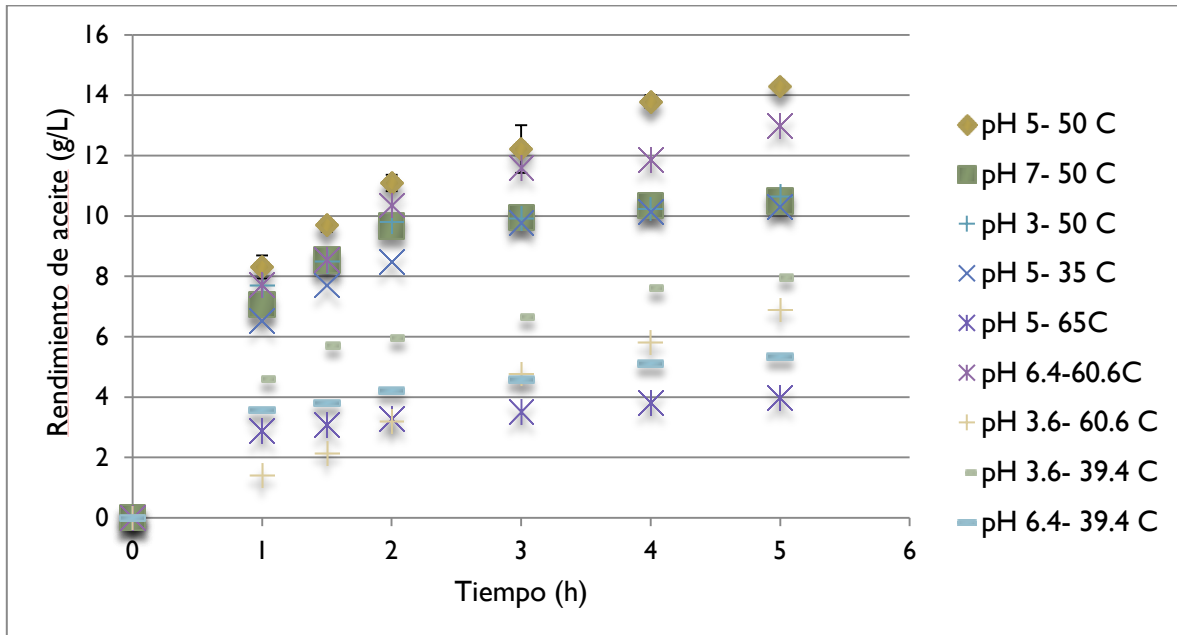


Figura 5.11.- Efecto de la temperatura y del pH sobre la liberación de aceite de aguacate por la acción hidrolítica de hemicelulasa.

La mejor condición para la extracción de aceite de aguacate fue pH 5 y 50 °C, donde se alcanza el máximo rendimiento a partir de las 4 horas, tiempo en el cual es posible detener la reacción obteniendo el mayor rendimiento posible. Las condiciones de temperatura y pH no coincidieron con las reportadas para la liberación de glucosa equivalente. Es importante hacer resaltar que no se ha encontrado en la literatura trabajos donde se realicen cinéticas de extracción de aceite de aguacate.

Los rendimientos por cada condición usando hemicelulasa más centrifugación se muestran en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10.- Efecto de la acción hidrolítica de hemicelulasa sobre el rendimiento de aceite.

Temperatura (°C)	pH	Aceite Recuperado (%)	
		Tratamiento	Testigo
50	5	94.7	52.13
50	7	85.75	51.15
50	3	87.95	50.96
65	5	83.73	51.06
35	5	88.73	51.12
60.6	6.4	88.95	50.65
60.6	3.6	91.06	50.02
39.4	3.6	88.56	51.93
39.4	6.4	86.13	50.98

Se realizó un análisis estadístico entre condiciones del tratamiento con el uso de hemicelulasa, mostrando un valor p de 0.407, lo que demuestra que no existe una diferencia significativa entre las nueve diferentes condiciones.

Después del tratamiento enzimático, el medio de reacción fue centrifugado para facilitar la separación del aceite, la columna titulada “testigo” presenta la cantidad de aceite recuperada por el sólo efecto de la centrifugación, en este tratamiento, no hubo presencia de enzima. Comparando ambas columnas, puede observarse que la cantidad de aceite recuperado es mayor cuando la enzima está presente en el medio de reacción. El porcentaje máximo de aceite recuperado fue de 94.7 % a 50°C y pH 5. El análisis de varianza de estos resultados mostró un valor p de 0.0107, lo que sugiere que los tratamientos son significativamente diferentes, por lo tanto, es evidente el efecto de la centrifugación más el uso de enzimas en los rendimientos de liberación de aceite de aguacate.

6 CONCLUSIONES

La reacción enzimática puede verse limitada por transferencia de masa externa, por lo cual es necesario suministrar energía mecánica, este aspecto cobra más importancia cuando se trabaja con soluciones viscosas.

Las mejores condiciones para ambas enzimas usando sustrato puro concordaron con la ficha técnica del proveedor.

Empleando sustrato puro, la celulasa tuvo un mejor desempeño que la hemicelulasa, para la producción de azúcares reductores.

Usando aguacate como sustrato, la hemicelulasa tuvo un mejor desempeño que la celulasa para la producción de azúcares reductores, pero las mejores condiciones de reacción fueron diferentes a las reportadas en la ficha técnica de la enzima.

Con la hemicelulasa se obtuvo un 94 % de rendimiento para la liberación de aceite de aguacate. Sin embargo al realizar un análisis estadístico de varianza se encontró que no hay diferencia significativa entre enzimas. Por lo cual es posible trabajar usando la enzima y condiciones más económicas

7 RECOMENDACIONES

Estudiar el efecto de la agitación durante la hidrólisis enzimática con pulpa de aguacate como sustrato, para mejorar la transferencia de masa.

Evaluar el efecto de mezclas de enzimas con el objetivo de reducir el tiempo de liberación del aceite.

Evaluar otros métodos de inmovilización y otros soportes que permitan el paso de la pulpa de aguacate.

8 REFERENCIAS

- 1.- Acosta Moreno, M.C. 2011. Evaluación y escalamiento del proceso de extracción de aceite de aguacate utilizando tratamiento enzimático. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia
- 2.- Asora, K. 2011. Literature Review on Avocado oil for SROS technological purposes. Scientific Research Organisation of Samoa. pp 11-15.
- 3.- Arroyo, M. 1998. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*. 39(2): 23-29.
- 4.- Badui Dergal, S. 2006. Química de los Alimentos 4 Ed. Pearson Educación, México, pp 373-375.
- 5.- Baíza, V.H., 2003. Guía Técnica Del Cultivo Del Aguacate 1er. Ed. Maya, impreso en San Salvador.
- 6.- Barrientos, A.F., García, E., Avitia E. 1996. Avocado Fruit Anatomy, ¿Drupe or Berry? *Chapingo Ser. Hortic.* 2(2):189-198.
- 7.- Bernal, E. y Díaz, C., 2005. Tecnología para el cultivo del aguacate 1er. Ed. CORPOICA, impreso en Colombia.
- 8.- Costa V., 2001. Extracción enzimática y caracterización del aceite de palta (*Persea americana Mill*). Tesis Licenciatura. Universidad de Chile. Chile
- 9.- Gordon, F., 2006. Immobilization of Enzymes and cells 2nd. Ed. Humana Press, impreso en Nueva Jersey.
- 10.- Buelvas Salgado, G. A., Patiño Gómez, J.H. & Cano-Salazar, J. A., 2013. Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate hass (*Persea americana mill*) utilizando tratamiento enzimático. *Revista Lasallista de Investigación*, 9, pp.138–150.
- 11.- Buenrostro, M. y López-Munguía, C., 1986. Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnology Letters*. 8(7), pp.505–506.
- 12.- Castañeda, C., Salcido, N., Pacheco, R., Ortiz, T., Barboza, J. 2011. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. *Acta Universitaria*. 21(3), pp.14–23.
- 13.- Cirillo, G., Pasquale, F., Curcio, M., Spizzirri, U., Picci, N. y lemma F. 2014 Enzyme immobilization on Smart polymers: Catalysis on demand. *React Funct Polym.* 83 pp 62-69.
- 14.- Cummings, K. y Schroeder, C. 1942. Anatomy of the avocado fruit. *Calif Avocado Assoc.* 27, pp.56–64.
- 15.- Datta, S., Christena, L.R. & Rajaram, Y.R.S., 2012. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, pp.1–9.

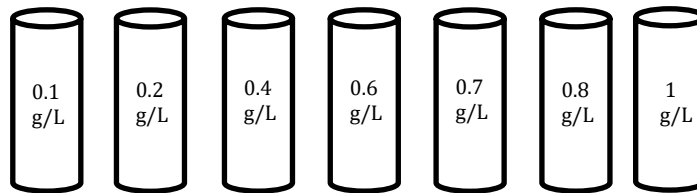
- 16.- Domínguez, L. y Parzanese, M. 2005. Fluidos supercríticos. Alimentos Argentinos. 1, pp.1–12.
- 17.- Esquível, M. y Bernardo-Gil, M.G., 1993. El uso de fluidos supercríticos en la industria de aceites alimentarios. *Grasas y Aceites*, 44(1), pp.1–5.
- 18.- SIAP-SAGARPA 2014. Panorama del Aguacate El aguacate es un producto de gran importancia en la agricultura y en la dieta mexicana. Cuenta con más Anexo Estadístico. , pp.30–31.
- 19.- Gonzalez- Vanegas, M., Forero- Longas, F. y Sandoval- Aldana, A. 2009 Efecto del tratamiento enzimático en la extracción de aceite de aguacate (*Persea americana Mill*). Corpoica, pp. 15-19.
- 20.- Haiyan, Z., Bedgood, Jr., Bishop, G., Prenzer, P. y Robards, K. 2007. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chem.* 100, pp.1544–1551.
- 21.- Morera, J. A. 1989. El Aguacate. CATIE/GTZ. Impreso en Costa Rica.
- 22.- Jiménez, Ma. E., Aguilar, Ma., Zambrano Ma. Y Kolar E. 2001. Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 45(2), pp.89–92.
- 23.- Lee, J. 2001. *Biochemical Engineering*. Prentice-Hall. Impreso en Washington. pp (4-19)-(4-20).
- 24.- Leite, J., Almeida, N. y Johnson, L. 2009. Scale-up of Enzyme-Assisted Aqueous Extraction Processing of Soybeans. *J Am Oil Chem Soc* 86 pp 809-815.
- 25.- Long, J., Fu, Y., Zu, Y., Li, J., Wang, W., Gu, C. y Luo M. 2011. Ultrasound-assisted extraction of flaxseed oil using immobilized enzymes. *Bioresource Technology*. 102 pp 9991-9996.
- 26.- Martínez, L., Camacho, F., Rodríguez, S. y Moreno, M. 1988. Extracción y caracterización del aceite de aguacate. *Grasas y Acei.* 39(4–5), pp.272–277.
- 27.- Mao, X., Guo, G., Huang, J., Du, Z., Huang, Z., Ma, L., Li, P. y Gu, L. 2006. A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization. *J Chem Technol Biotechnol.* 81 pp 189-195.
- 28.- Miller, G., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:1 pp 427-429.
- 29.- Morales, R., 2014. Ve EU récord en exportación de aguacate | El Economista. Available at: <http://eleconomista.com.mx/industrias/2014/12/23/ve-eu-record-exportacion-aguacate> [Accessed March 19, 2015].
- 30.- Moreno, S. y Bayo, J., 1996. *Diseño de biorreactores y enzimología*, EDITUM. Impreso en Murcia.
- 31.- Ozdemir, F. y Topuz, A., 2004. Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chem.* 86, pp.79–83.

- 32.- Pérez, M., 2014. La Jornada: Producción de aguacate Hass mexicano se multiplicó casi 200 veces en 15 años. La Jornada, p.39. Available at: <http://www.jornada.unam.mx/2014/02/10/sociedad/039n1soc> [Accessed March 19, 2015].
- 33.- Restrepo, A., Londoño, J., González, D., Benavides, Y. y Cardona, B. 2012. Comparación del aceite de aguacate variedad Hass cultivado en Colombia, obtenido por fluidos supercríticos y métodos convencionales: una perspectiva desde la calidad. Rev. Lasallista de Investigación 9:2 pp 151-161.
- 34.- Rosenthal, A., Pyle, D.L. y Niranjana, K., 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. Enzyme Microb. Technol, 19(6), pp.402–420.
- 35.- Salgado, B., Patiño, A. y Caño, J. 2012. Evaluation of the oil extraction from has avocado (*Persea americana Mill*) by the use of an enzymatic treatment. Rev. Lasallista de Investigación, 9:2 pp 138-150.
- 36.- Sena, 2011. Introducción a La Industria De Los Aceites Esenciales De Plantas Medicinales Y Aromaticas. Servicio Nacional de Aprendizaje. pp 18-20. Colombia
- 37.- Vanegas, G., Forer, M., y Aldana, F., 2009. Efecto del tratamiento enzimático en la extracción de aceite de aguacate (*Persea americana Mill*). CORPOICA. Colombia.
- 38.- Villa-Rodríguez, J., Molina, F., Ayala, F., Olivas, G., y Aguilar G. 2010. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of “Hass” avocado. Food Res. In. 44(5), pp.1231–1237.
- 39.- Xu, J., Huo, S., Yuan, Z., Zhang, Y., Guo, Y., Liang, C. y Zhuang, X. 2011. Biocatal. Biotransformation. 29(2-3) pp 71-76.
- 40.- Zang, L., Qiu, J., Wu, X., Zhang, W., Sakai, E. y Wei, Y. 2014. Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization. Ind. Eng. Chem Res. 53 pp 3448-3454.

9 ANEXOS

9.1 Preparación de la curva patrón de glucosa para determinación de azúcares reductores por el Método de DNS

Se preparó una solución patrón de 1 g/L de la cual se realizó diluciones de la siguiente manera:



En la siguiente Figura se muestra la curva que se obtuvo con las concentraciones anteriores mencionadas (por triplicado), que fueron tratadas previamente como se menciona en la metodología.

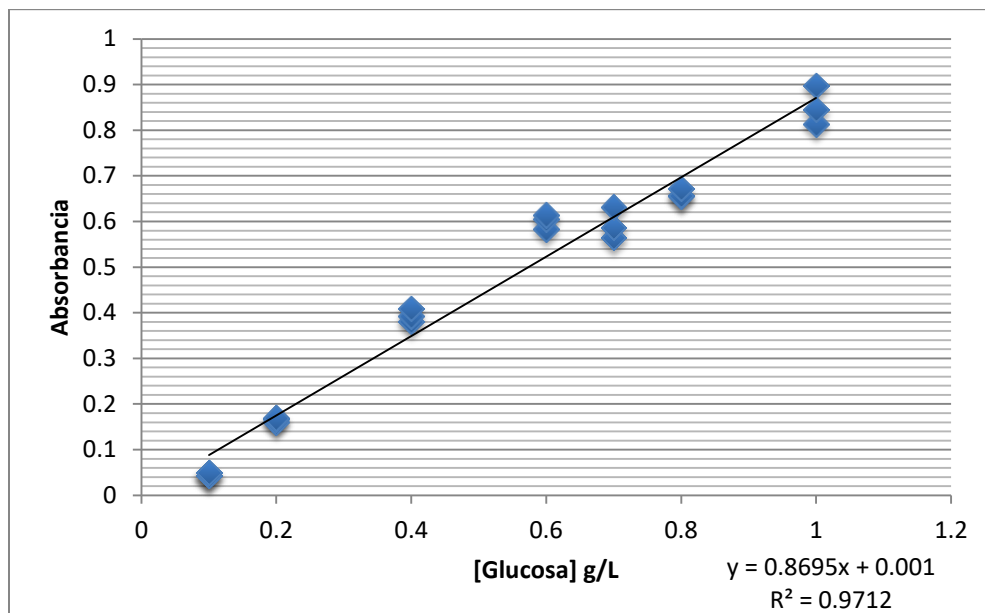


Figura 9.1.- Curva de calibración DNS

9.2 Extracción de aceite por el método Soxhlet

Los datos obtenidos en la cinética de secado de la pulpa de aguacate se presentan en la Figura 9.2.

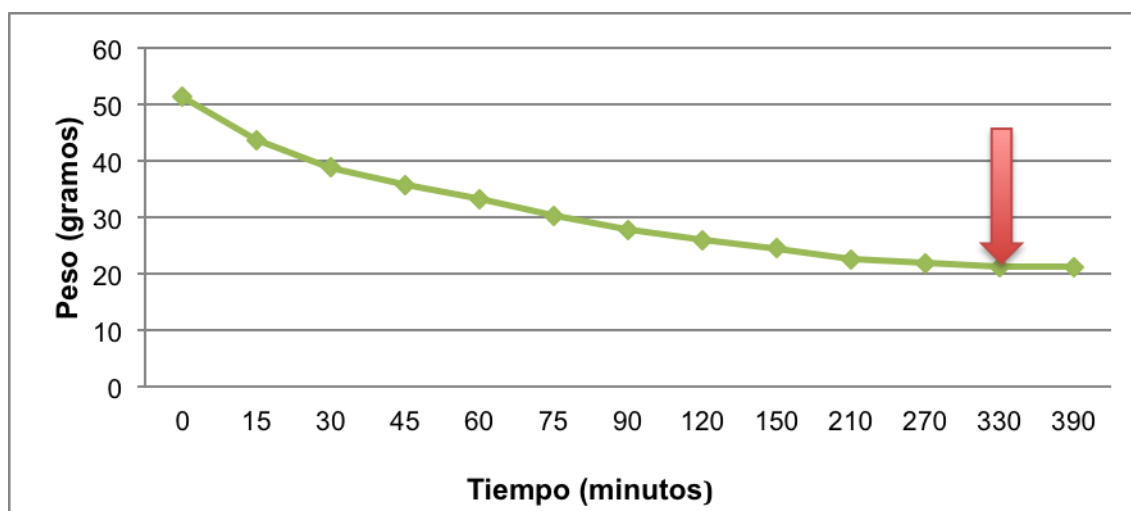


Figura 9.2.- Cinética de secado de pulpa de aguacate

Es posible observar por los datos y el gráfico que a partir de 330 minutos (5.5 horas) el peso de la pulpa del aguacate se vuelve constante. Por lo que se deduce que se está perdiendo un 58.87 % de agua. Estos datos obtenidos sirvieron para establecer el tiempo de secado de la pulpa de aguacate con 3 mm de espesor.

Se muestra los valores (Tabla 9.1) de 3 aguacates Hass los cuales sirvieron para realizar por triplicado la extracción por Soxhlet .

Tabla 9.1 Características métricas de los componentes del fruto de aguacate Hass.

	Aguacate 1	Aguacate 2	Aguacate 3
Diámetro mayor (cm)	9.1	10.2	9.8
Diámetro menor (cm)	6.5	7.2	7.5
Peso Total (g)	214.3	252.9	290.4
Semilla (g)	44.5	26.8	46.5
Cáscara (g)	20.63	21.95	22.05
Mesocarpio (g)	114.8	149.4	156.7
Mesocarpio deshidratado (g)	40.1	51.2	47.4

La extracción por Soxhlet se realizó con la pulpa seca de los aguacates que se caracterizaron anteriormente.

En la Tabla 9.2 se muestra el porcentaje de aceite que se obtiene de la pulpa de cada uno de los aguacates.

Tabla 9.2 Datos para el cálculo de materia grasa por Soxhlet

	Aguacate 1	Aguacate 2	Aguacate 3
Peso matraz (g)	112.3035	84.0151	86.0580
Peso muestra (g)	10.0174	10.2649	10.0379
Peso aceite + matraz (g)	116.3509	88.5293	89.1263
Aceite %	40.39	43.97	30.56

9.3 Análisis preliminares para la caracterización de las enzimas.

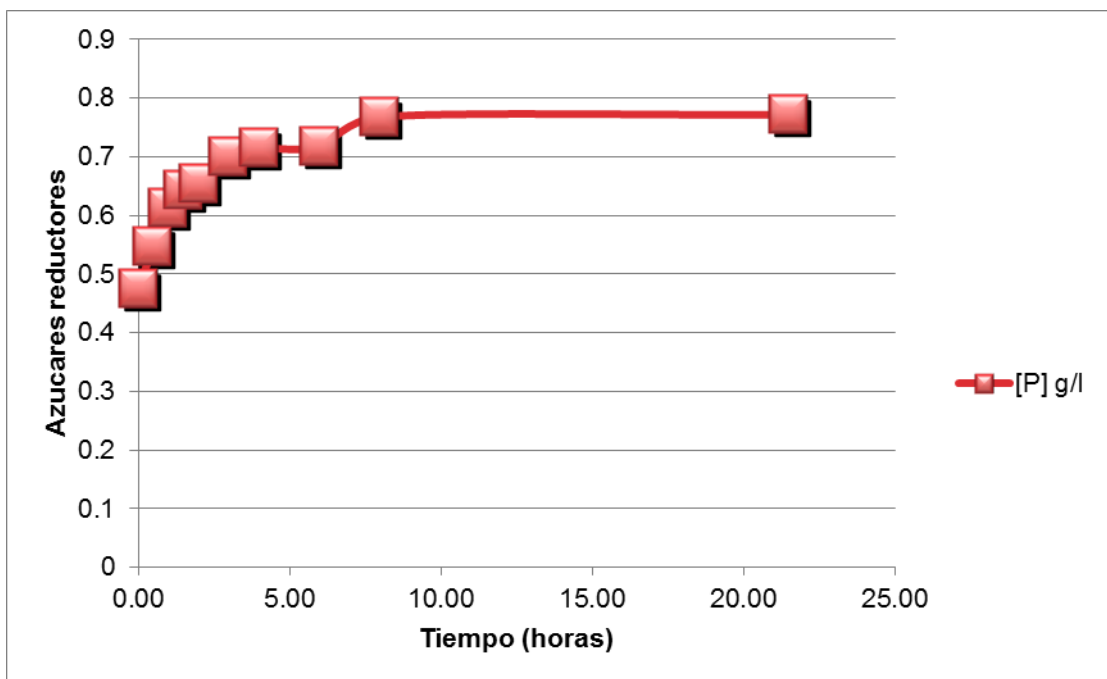


Figura 9.3.- Cinética enzimática de la celulasa

A pH 4 y 40° C se necesitaron de 8 horas para que la concentración del producto fuera constante, es posible que estas sean las condiciones ideales.