



Obtención de aceite de las semillas de *Jatropha curcas* mediada por extractos enzimáticos de *Bromelia pinguin*

Sonia Ruiz-González*, Guadalupe Azucena Castillo-Fong, Isidro Ovando-Medina

Instituto de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, Mexico.

Resumen

Con la finalidad de desarrollar un método de extracción enzimática de aceites a partir de la harina de la planta oleaginosa *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), se evaluaron extractos de la planta tropical con actividad proteasa *Bromelia pinguin* (Bromeliaceae), así como las condiciones de operación (concentración de enzima, la temperatura de reacción, el pH inicial de la mezcla y la velocidad de agitación) que maximizan la eficiencia de extracción de aceite. Se determinó que los extractos de tallo y hoja no poseen actividad proteolítica, mientras que los extractos acuosos de frutos presentan $2.1 \pm 0.26 \mu\text{kat mL}^{-1}$ y la proteína parcialmente purificada tiene $13.9 \pm 0.95 \mu\text{kat g}^{-1}$. La eficiencia de extracción de aceite de la harina de *J. curcas* fue mayor cuando los parámetros de operación fueron: 18 ó 20 U g⁻¹ de harina, 30 °C a 45 °C, velocidad de agitación 50 rpm, pH de 4.0 y 6.0. Las características fisicoquímicas del aceite de *J. curcas* extraído enzimáticamente fueron similares al del aceite extraído con hexano, excepto porque presentó valores estadísticamente más altos en el índice de acidez y en el punto de fusión. La eficiencia de extracción de aceite de *J. curcas* utilizando proteasas de *B. pinguin* se ubicaron entre 31.1 % y 32.1 %, con respecto a la extracción por el método de Soxhlet usando hexano como solvente.

Palabras clave:

Concentración de enzima
Eficiencia
Extracción
Índice de acidez
Proteasas

Keywords:

Enzyme concentration
Efficiency
Extraction
Acidity index
Proteases

Oil extraction from *Jatropha curcas* seeds by enzymatic extracts from *Bromelia pinguin*

Abstract

To develop a method for the enzymatic extraction of oil from the meal of the bioenergy plant *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), the study evaluated extracts from the tropical plant *Bromelia pinguin* (Bromeliaceae), which exhibits protease activity as well as the operating conditions (enzyme concentration, reaction temperature, initial mixture pH, and agitation speed) that maximize oil extraction efficiency. It was determined that stem and leaf extracts lacked proteolytic activity, whereas aqueous fruit extracts showed an activity of $2.1 \pm 0.26 \mu\text{kat mL}^{-1}$ and the partially purified protein showed $13.9 \pm 0.95 \mu\text{kat g}^{-1}$. Oil extraction efficiency from *J. curcas* meal was highest under the following operating parameters: 18 or 20 U g⁻¹ of meal, temperatures between 30 °C and 45 °C, an agitation speed of 50 rpm, and pH levels of 4.0 and 6.0. The physicochemical characteristics of the enzymatically extracted *J. curcas* oil were like those of hexane-extracted oil, except for statistically higher values regarding the acid value and melting point. Oil extraction efficiency from *J. curcas* using *B. pinguin* proteases ranged from 31.1 % to 32.1 % relative to extraction via the Soxhlet method using hexane as the solvent.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias.
Universidad Autónoma de Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, C.P.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
sonia.ruiz@unach.mx

1. Introducción

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), conocida como “piñón” en la región mesoamericana, de donde es originaria esta planta oleaginosa (Salvador-Figueroa et al., 2015), es una especie de rápido crecimiento, tolerante a la sequía y adaptable a suelos marginales bajo diversas condiciones agroclimáticas (Camposeco-Silvestre et al., 2016). Por lo anterior, se ha convertido en un nuevo cultivo cuya importancia radica en que puede acumular aceite en más de 50 % del peso seco de su semilla (Ovando-Medina et al., 2011), además, dicho aceite tiene hasta 80 % de ácidos grasos insaturados, lo que lo vuelve idóneo para la producción de biocombustibles (Navarro-Pineda et al., 2016).

La producción promedio mundial de semillas de *J. curcas* va de 2 a 3 t ha⁻¹ al año, aunque con el manejo agronómico apropiado se pueden producir hasta 5 t ha⁻¹ (Achten et al., 2008; Wani et al., 2016) y, dependiendo de la variedad cultivada y del método de extracción, se obtienen entre 1650 y 2925 kg ha⁻¹ de aceite (Falasca y Ulberich, 2008). Los procesos de extracción más usados son la extracción sólido-líquido con solventes no polares como el hexano y el éter de petróleo y la extracción mecánica con prensas mecánicas tipo *Ram* o *Expeller*; en ambos casos se aplica calor para mejorar la eficiencia (Betancur-Prisco, 2014). En operaciones a gran escala, se utiliza una combinación de métodos, aunque la extracción sólido-líquido es la vía económicamente más eficiente comparada con otros métodos (Martínez-Herrera et al., 2016), sin embargo, el principal problema de contaminación ambiental que causa es la emisión de solvente a la atmósfera (Grasso, 2013). El fundamento de dichos métodos de extracción es la ruptura de las paredes, membranas y organelos celulares (oleosomas) para liberar el aceite contenido en la muestra (Adriano-Anaya et al., 2014; Martínez-Herrera et al., 2016). Esto se logra por desestabilización de las membranas por acción del solvente, por el calentamiento o por la aplicación de fuerza mecánica (Buelvas et al., 2012; Ramos et al., 2013).

Con la finalidad de mejorar la eficiencia y disminuir la contaminación por los procesos de extracción, se han desarrollado técnicas que disminuyen el consumo de solventes orgánicos. Entre ellos se encuentran la radiación por microondas, el ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos y pretratamientos enzimáticos (Azuola y Vargas, 2007; Ramos et al., 2013).

La extracción de aceites vegetales mediada por enzimas es un método alternativo en fase de investigación que se emplea a pequeña escala (Rosenthal et al., 1996). Las enzimas más estudiadas para dicho proceso son hidrolasas de la pared celular de origen microbiano, purificadas y disponibles comercialmente (Acosta-Moreno, 2011). En muestras como la pulpa de aguacate, las pectin líasas y celulasas de *Aspergillus aculeatus*, *A. niger* y *Trichoderma reesei* generaron rendimientos de extracción de aceite de hasta 60 % (Buelvas et al., 2012).

Considerando que los aceites se encuentran dentro de estructuras membranosas, se ha propuesto el uso de proteasas

en la extracción de aceites (Senphan y Benjakul, 2016), entre las que destacan por su uso en la industria las de origen microbiano (hongos y bacterias), de fuentes animales, como la pepsina, tripsina y quimotripsina, y las de origen vegetal, como la papaína, ficina y bromelaína (Patel et al., 2016).

Además, se ha propuesto que la extracción enzimática se incluya en el esquema de manufactura sustentable de biocombustibles para minimizar el gasto energético y la contaminación ambiental (Chhetri e Islam, 2008). Respecto a la fase de obtención de aceites, se está impulsando la llamada “extracción verde”, que propone el uso de solventes alternativos, principalmente agua o agro-solventes, la reducción del consumo y la recuperación de energía, entre otros (Chemat et al., 2012). Se están investigando procesos que operen a temperatura ambiente y con bajo impacto ambiental, como lo reportó Martínez-Herrera et al. (2016), quienes utilizaron la planta *Bromelia hemisphaerica* (timbirichi o timbiriche) como fuente de proteasas para la extracción de aceite de *J. curcas*, obteniendo rendimientos de alrededor de 30 % con base en el peso seco de las semillas. Otra planta productora de proteasas que crece en los mismos ambientes que *J. curcas* es la *Bromelia pinguin* o “piñuela” (Toro-Goyco et al., 1968; Payrol et al., 2005), la cual podría utilizarse en el desarrollo de procesos de extracción verde.

Por lo anterior el objetivo del trabajo fue determinar la capacidad de los extractos enzimáticos de *B. pinguin* para eficientizar la extracción de aceite de las semillas de *Jatropha curcas*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materia prima

Se colectaron frutos maduros de *Jatropha curcas* de la accesión MAP-08 del Banco de Germoplasma de *Jatropha* del Instituto de Biociencias (IBC) de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado en el municipio de Tapachula, Chiapas, México (14.4976 N, 92.4774 O). La recolección se realizó de junio a agosto de 2015. Los frutos se despulparon, se extrajeron las semillas y se secaron al sol, posteriormente se descascararon manualmente y las almendras se molieron para obtener harina. Esta última fue heterogénea y contuvo los siguientes tamaños de partícula: >841 µm (0.56 %), 841 µm (77.63 %), 250 µm (21.75 %) y 149 µm (0.06 %). Se caracterizó el contenido de aceite en muestras representativas de la harina siguiendo el método de Soxhlet (AOAC, 1997), utilizando un equipo ST243 Soxtec® (Foss® Analytical, Suecia).

2.2. Material biológico

Se colectaron frutos maduros, tallo y hojas de *B. pinguin* en Puerto Madero, Chiapas (14.4405 N, 92.2600 O; 8 msnm), donde la temperatura media anual es de 26.6 °C y la precipitación anual de 1578.2 mm (SEMAV, 2010). Los tejidos se lavaron y enseguida se molieron en un procesador de alimentos (Osterizer® 890-00,0445-13, México) mezclando una parte del tejido con cuatro partes de agua purificada. El producto se pasó por un tamiz con tamaño de

poro de 1 mm y, posteriormente, se obtuvo el jugo clarificado por filtración en una matriz de algodón y se almacenó en congelación (-16 °C) hasta su uso.

2.3. Purificación parcial y ensayo enzimático

Se llevó a cabo la purificación parcial del jugo de *B. pinguin* (Payrol et al., 2005), para lo cual se tomaron 300 mL del extracto acuoso, se agregaron 300 mL de etanol al 96 %, se homogeneizó por 5 min y se centrifugó a $7168 \times g$ durante 10 min. El precipitado se descartó, mientras al sobrenadante se le añadieron 800 mL de etanol, se mezcló y se centrifugó a $7168 \times g$ durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el nuevo precipitado se re-disolvió en 300 mL de agua destilada y se centrifugó a $7168 \times g$ durante 30 min, obteniendo un precipitado color blanco que se llevó a sequedad al vacío en una centrífuga Eppendorf® (Concentrator 5301®, Australia) a $8960 \times g$ por 2 h a 35 °C. Al polvo obtenido se le consideró proteasa parcialmente purificada (PPP).

Para conocer la actividad enzimática de cada uno de los extractos de *B. pinguin* se utilizó el método de hidrólisis de la caseína (Kunitz, 1947), modificado por Pandey et al. (2003), como se describe a continuación: en un microtubo de 2 mL se hizo reaccionar 500 µL de caseína (al 1 % p/v en buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.0) con 500 µL de PPP (al 1 % en buffer de fosfatos pH 7.0) o de jugo (al 10 % en buffer de fosfatos pH 7.0). La reacción se llevó a cabo por 10 min, en un baño de agua a 30 °C, después de lo cual se detuvo por adición de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA, 0.4 M). La mezcla se agitó y se centrifugó a $8960 \times g$ durante 10 min. Al sobrenadante se le cuantificó el contenido de aminoácidos liberados, por el método de Lowry et al. (1951), para lo cual se transfirieron 500 µL del sobrenadante a un tubo de ensayos de 13 x 100 mm, junto con 2.5 mL de Na_2CO_3 al 0.4 N y 500 µL de reactivo de Folin (1:5 en agua destilada), se dejó reaccionar a 30 °C durante 30 min, se leyó la absorbancia a 660 nm y esta se comparó con una curva patrón de tirosina (0 - 100 µM).

Para descartar la proteólisis por el procedimiento, se contó con un testigo al que se le agregó primero el TCA que la PPP, impidiendo que la reacción tuviera lugar. Para calcular la actividad enzimática se utilizó la siguiente fórmula:

$$AP = \frac{[muestra] - [testigo]}{(t) (Fd)}$$

Donde, AP: Actividad de proteasa; en $\mu\text{kat g}^{-1}$ para la PPP y en $\mu\text{kat mL}^{-1}$ para el jugo; [muestra]: Concentración de proteína de la muestra ($\mu\text{mol L}^{-1}$); [testigo]: Concentración de proteína del testigo ($\mu\text{mol L}^{-1}$); t: tiempo de reacción enzimática (600 s); Fd: Factor de dilución de la muestra (0.1 para el jugo; 0.01 para la PPP).

2.4. Efecto de la concentración de enzima

Considerando que una unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µmol de sustrato (caseína) por segundo, se evaluó el efecto de la concentración de enzima bajo un diseño completo al azar con siete tratamientos (tres repeticiones): 8.40, 10.50, 12, 14, 16,

18 y 20 U g^{-1} de harina de *J. curcas*. Para esto, se hicieron reaccionar 25 g de harina con el volumen de jugo correspondiente a cada concentración en un vaso de precipitados de 400 mL, se midió el pH y se agitó 6 h a 35 °C sobre una parrilla agitadora/calentadora (50 rpm). Para determinar la cantidad de aceite liberado, la mezcla de reacción se centrifugó en tubos Nalgene® de 50 mL a $4480 \times g$ por 10 min, el sobrenadante se recogió y se volvió a centrifugar a $9279 \times g$ por 10 min para obtener el sobrenadante oleoso, el cual se pesó en una balanza analítica. Se calculó la eficiencia de extracción de cada tratamiento con base en el contenido de aceite determinado por el método de Soxhlet. Cada uno de los siete tratamientos contó con tres repeticiones.

2.5. Efecto de la temperatura

Se evaluó el efecto de la temperatura de la mezcla de reacción (30, 35, 40, 45, 50, 55 y 65 °C) sobre la cantidad de aceite extraído, empleando 18 U g^{-1} de harina de *J. curcas*. Siguiendo el mismo procedimiento que para evaluar la concentración de enzima, a la muestra de reacción se le midió el pH y se puso en agitación constante (50 rpm) por 6 h, manteniendo fija la temperatura sobre una parrilla calentadora marca Barnstead Thermolyne®, modelo Cimarec® con monitoreo cada hora. Después de ese tiempo se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente para separar el aceite y calcular la eficiencia de extracción de cada tratamiento. Los siete tratamientos se hicieron por triplicado.

2.6. Efecto de la agitación

Se determinó el efecto de la velocidad de agitación (0, 25, 50 y 80 rpm) sobre la cantidad de aceite extraído. Para ello se utilizaron 18 U g^{-1} de harina y la mezcla de reacción se agitó en una parrilla magnética con calefacción marca Barnstead Thermolyne®, modelo Cimarec®, a 40 °C, por 6 h. Para determinar la cantidad de aceite liberado y calcular la eficiencia de extracción se realizó el procedimiento antes descrito. Los cuatro tratamientos se llevaron a cabo con sus respectivas repeticiones.

2.7. Efecto del pH

Para determinar la influencia del pH inicial de la mezcla de reacción en la extracción de aceite se evaluaron los siguientes valores de pH: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 y 12.0. Se emplearon 18 U g^{-1} de harina y se agitó por 6 h a 50 rpm manteniendo la temperatura a 40 °C. Al inicio de la reacción se ajustó el pH de la mezcla con HCl 1 N o NaOH 1 N. Los 11 tratamientos se llevaron a cabo por triplicado. Se calculó la eficiencia de extracción como se describió previamente.

2.8. Características químicas del aceite extraído enzimáticamente

Al final del estudio se extrajo aceite de 25 g de harina bajo los parámetros de operación siguientes: 18 U g^{-1} , 40 °C, 50 rpm y pH 6.0. El aceite obtenido mediante extracción

enzimática se analizó para las siguientes variables: humedad y materia volátil (método Ca 2b-38 de AOCS, 1989), índice de acidez (método NMX-F-101-1987), índice de saponificación (método NMX-F-174-S-1981), índice de yodo (método NMX-F-152-S-1981), fósforo (método Ca 12-55 de AOCS, 1989) y punto de fusión (método NMX-F-115-1987). Todas las determinaciones se compararon con el aceite extraído por el método Soxhlet.

2.9. Análisis de datos

Los datos de la variable eficiencia de extracción se procesaron por análisis de varianza en cada uno de los experimentos para comparar los tratamientos y donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas se compararon las medias por el método de Tukey ($\alpha = 0.05$). Para ello se utilizó el programa XLStat© versión 2015. Los datos de las características químicas de los aceites se presentan con medidas de tendencia central y de dispersión.

3. Resultados y discusión

3.1. Actividad enzimática

Los extractos de tallo y hoja de *B. pinguin* no exhibieron actividad proteolítica bajo las condiciones ensayadas, mientras que los extractos de frutos maduros presentaron un promedio de $2.1 \pm 0.26 \mu\text{kat mL}^{-1}$. Por su parte, la actividad enzimática de la PPP fue de $13.9 \pm 0.95 \mu\text{kat g}^{-1}$.

Estos resultados difieren de lo reportado por Pérez et al. (2006), quienes encontraron que la mayor actividad proteolítica en la bromelia *Hohenbergia penduliflora* está en los extractos acuosos de los tallos (10 veces mayor que en las hojas). Una tendencia de actividad similar de la proteasa de la piña comestible fue reportada por Vicente et al. (2016), quienes mencionan que el 80 % de la actividad de bromelaina se encuentra en el tallo y concentraciones mucho menores se encuentran en las hojas, el fruto y la corona.

3.2. Efecto de la concentración de enzima

La eficiencia de extracción del aceite a partir de harina de *J. curcas* dependió de la concentración de enzima. El tratamiento de 8 U de proteasa tuvo eficiencia de extracción de 17.6 %, mientras que los tratamientos de 18 U y 20 U tuvieron 24.2 % y 26.1 %, respectivamente. La diferencia fue significativa ($P < 0.01$) (Figura 1).

A partir del tratamiento de 10 U g^{-1} la eficiencia de extracción se mantuvo casi constante, esto puede deberse a que en presencia de alta cantidad de proteasas el sitio activo no puede ser expuesto a los sustratos debido a que muchas moléculas de la enzima se agregan unas con otras, como ocurre con las lipasas (Liou et al., 1998). Se ha reportado que el aumento en la concentración de enzima puede causar la disminución de la eficiencia de extracción, como lo reportaron Patil y Singh (2017), quienes evaluaron la extracción de aceite de canola utilizando una mezcla comercial de enzimas hidrolíticas, encontrando un rendimiento máximo al 4 % de concentración con disminución al incrementar a 6 %.

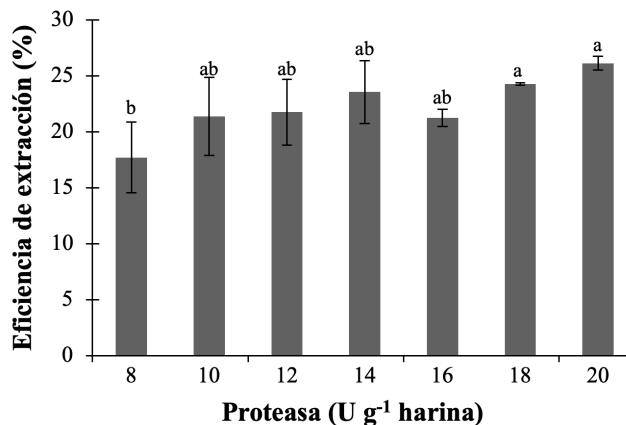


Figura 1. Efecto de la concentración de enzima proteolítica de *Bromelia pinguin* sobre la eficiencia de extracción de aceite de harina de *Jatropha curcas*. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre las medias (Tukey $\alpha = 0.05$).

3.3. Efecto de la temperatura

Se encontró que bajo las condiciones ensayadas la eficiencia de extracción del aceite dependió de la temperatura, siendo las más alta por encima de 30 % presentándose en el rango de 30 °C a 45 °C, mientras que la actividad decae notoriamente (por debajo de 10 %) a partir de 50 °C (Figura 2).

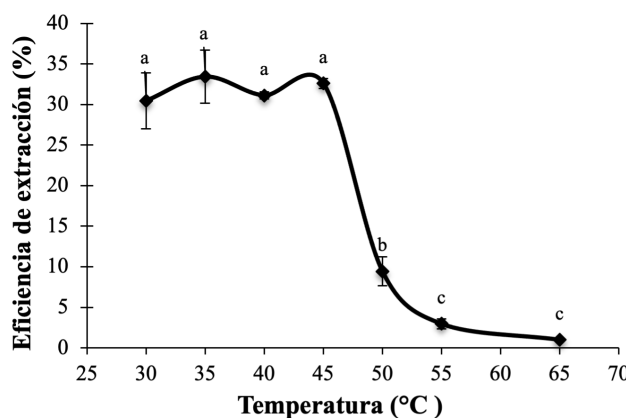


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción de aceite de harina de *Jatropha curcas*. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre las medias (Tukey $\alpha = 0.05$).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Sharma et al. (2002), quienes emplearon enzimas comerciales para la extracción de aceite de cacahuate, obteniendo el mayor rendimiento de aceite a 40 °C. Los datos muestran que las proteasas de *B. pinguin* no toleran temperaturas relativamente altas, probablemente debido a desnaturalización de su estructura terciaria o cuaternaria (Badui-Dergal, 2006), si se compara con otras enzimas hidrolasas que mantienen su actividad a temperaturas superiores a 50 °C.

3.4. Efecto de la agitación

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la eficiencia de extracción de aceite entre los cuatro tratamientos de agitación ($P < 0.0001$). El tratamiento de velocidad de agitación más eficiente, bajo las condiciones de este estudio, fue el de 50 rpm (31.1 %), mientras que la media más baja fue la del tratamiento sin agitación (1.3 %) (Figura 3).

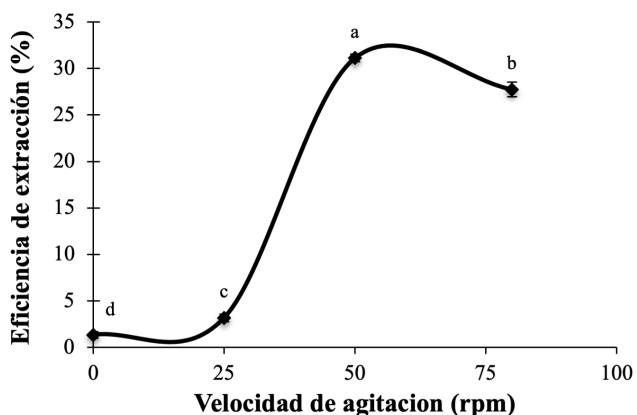


Figura 3. Efecto de la agitación sobre la eficiencia de extracción de aceite de harina de *Jatropha curcas*. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre las medias (Tukey $\alpha = 0.05$).

La velocidad de agitación permite encontrar el punto donde se optimiza el contacto entre el sustrato y el sitio activo, ya sea por la solubilización de sustratos o por mantener en suspensión los componentes de la mezcla (Badui-Dergal, 2006). En el caso estudiado aquí se encontró que a 50 rpm se obtuvo la mayor eficiencia de extracción de aceite y que se mantuvo en valores similares a velocidades mayores, este resultado se encuentra por debajo a lo reportado por Mussatto et al. (2008), quienes evaluaron el efecto de la velocidad de agitación, carga de enzima y la concentración de sustrato en la hidrólisis enzimática de la celulosa del bagazo de cerveza, encontrando la mayor eficiencia a 100 rpm. Por otro lado, estudios reportados por Kumari et al. (2009), quienes trabajaron con la transesterificación enzimática del aceite de *Jatropha* demostraron que la velocidad óptima para la reacción de transesterificación fue 200 rpm. La baja velocidad de agitación requerida para la extracción de aceite de harina de *J. curcas* por medio del extracto acuoso de *B. pinguin* puede deberse a la baja densidad de la materia prima, lo cual permitió mantener la suspensión con facilidad.

3.5. Efecto del pH

A diferencia de los experimentos anteriores, el efecto del pH presentó un comportamiento irregular (Figura 4). El análisis de varianza evidenció diferencias entre los tratamientos de pH ($P < 0.0001$). Los picos de máxima eficiencia de extracción se presentaron a los pH 4.0 (32.1 %) y pH 6.0

(31.1 %), seguidos de un pico de menor intensidad entre los pH 10.0 y 11.0 (aproximadamente 27 %).

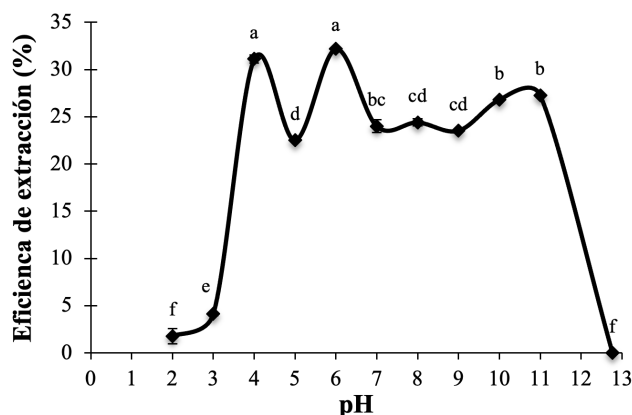


Figura 4. Efecto del pH sobre la eficiencia de extracción de aceite de harina de *Jatropha curcas*. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre las medias (Tukey $\alpha = 0.05$).

La explicación más factible del fenómeno observado es que el extracto de *B. pinguin* contenga varias enzimas proteolíticas y no una sola, cada una con pI y pH óptimo distintos. Heinicke y Gortner (1957) encontraron que los extractos de la piña comestible (*Ananas comosus*) presenta varios picos de actividad proteolítica en un gradiente de pH, con al menos tres picos a pH 4.0, 5.5 y 8.0. En este sentido, el estudio de Payrol et al. (2005) con la PPP de *B. pinguin* encontró que el rango pH óptimo va de 7.2 a 8.8, aunque a la vez encontraron, mediante zimogramas, que la PPP está compuesta por varios componentes proteolíticos con pI entre 4.6 y 8.1. Considerando los resultados de los experimentos de concentración de enzima, temperatura, agitación y pH, la eficiencia de extracción de aceite de *J. curcas* utilizando proteasas de *B. pinguin* aún requiere optimizarse, ya que los valores máximos se ubicaron entre 31.1 % y 32.1 %, lo cual concuerda con el estudio realizado por Martínez-Herrera et al. (2016), quienes evaluaron el rendimiento de extracción de aceite de *J. curcas* mediada por proteasas de *B. hemisphaerica* fue del 32 % por 6 h a 40 rpm y 45 °C.

3.6. Características del aceite extraído enzimáticamente

Como puede verse en el Cuadro 1, las variables químicas índice de saponificación, índice de yodo y contenido de fósforo fueron estadísticamente similares entre los aceites extraídos ($P < 0.058$; $P < 0.238$; $P < 0.060$, respectivamente). Sin embargo, el contenido de humedad del aceite extraído con proteasas de *B. pinguin* fue menor (1.17 %) al extraído por el método de Soxhlet (2.79 %); el análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos ($P < 0.007$). Así mismo, la variable índice de acidez fue estadísticamente distinta entre los aceites evaluados ($P < 0.003$), presentando mayor acidez el aceite extraído enzimáticamente (13.23 %) que el aceite extraído con solvente (10.49 %). También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre métodos de extracción

en la variable punto de fusión ($p < 0.009$), dado que el aceite extraído enzimáticamente presentó mayor punto de fusión (9.33°C) que el aceite extraído con hexano (3.33°C). Los aceites difirieron en contenido de humedad, lo cual pudo deberse a que el método gravimétrico no determina solamente agua, sino toda la materia volátil, existiendo la posibilidad de que en el aceite extraído por el método de Soxhlet hayan quedado residuos de hexano. Los resultados

concuerdan con los estudios realizados por Lafont et al. (2011), quienes trabajaron con la extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla de marañón (*Anacardium occidentale*) encontrando mayor porcentaje de humedad en el aceite extraído por el método Soxhlet en comparación con el extraído por prensado.

Cuadro 1. Características químicas del aceite de *J. curcas* extraído por proteasas de *B. pinguin* comparado con el aceite extraído por el método Soxhlet.

Método de extracción	Humedad (%)	Índice de Acidez (%)	Índice de saponificación (mg KOH g ⁻¹)	Índice de yodo (mg I g ⁻¹)	Fósforo (mg P kg ⁻¹)	Punto de fusión (°C)
Soxhlet	2.79 A	10.49 B	175.74 A	59.88 A	51.79 A	3.33 B
Enzimático	1.17 B	13.23 A	189.32 A	66.03 A	59.44 A	9.33 A

Letras distintas sobre cada una de las determinaciones indican diferencia estadísticamente significativa entre las medias (Tukey $\alpha = 0.05$).

Respecto al mayor índice de acidez del aceite extraído con proteasas de *B. pinguin*, es posible que durante el proceso de extracción hayan quedado trazas del jugo de *B. pinguin* (el cual tiene alta acidez, pH 4.0) en el aceite aumentando la acidez. Estos resultados son similares a lo reportado por Rojas y Burbano (2011), quienes emplearon un pretratamiento enzimático seguido de extracción con solvente de aceite de la semilla del mango (*Mangifera indica*), encontrando mayor índice de acidez cuando se hizo pretratamiento con las enzimas comerciales Crystalzyme® en comparación con el control sin pretratamiento. El aceite extraído con proteasas de *B. pinguin* presentó mayor punto de fusión (9.3°C) comparado con el aceite extraído con hexano, lo cual pudo deberse a que la inter-esterificación de los ácidos grasos, como se ha observado en otros aceites.

4. Conclusión

Los extractos acuosos de tallo y hoja de *B. pinguin* no poseen actividad proteolítica, mientras que los extractos de frutos presentaron $2.1 \pm 0.26 \mu\text{kat mL}^{-1}$ y la PPP tuvo $13.9 \pm 0.95 \mu\text{kat g}^{-1}$. La eficiencia de extracción del aceite de la harina de *J. curcas* fue mayor cuando los parámetros de operación fueron: 10 o más U g⁻¹ de harina, 30°C a 45°C , velocidad de agitación 50 rpm, pH de 4.0 y 6.0. Las propiedades fisicoquímicas del aceite de *J. curcas* extraído enzimáticamente fueron similares al del aceite extraído con hexano, excepto en el índice de acidez y punto de fusión.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

Achten WMJ, Verchot L, Franken YJ, Mathijs R, Singh VP, Aerts R, Muys B. 2008. *Jatropha* bio-diesel production and use. Biomass and Bioenergy, 32, 1063-1084.

- Acosta-Moreno MC. 2011. Evaluación y escalamiento del proceso de extracción de aceite de aguacate utilizando tratamiento enzimático. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.
- Adriano-Anaya ML, Gómez-Pérez JA, Ruiz-González S, Vázquez-Ovando JA, Salvador-Figueroa M, Ovando-Medina I. 2014. Oleosomas de semillas de *Jatropha curcas* L. como estimadores de diversidad en poblaciones del Sur de México. Grasas y Aceites, 65, e031.
- AOAC. 1997 Official methods of analysis. Method 920.39. Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- AOCS. 1989. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.
- Azuola R, Vargas PA. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). Tecnología en Marcha, 20, 30-40.
- Badui-Dergal S. 2006. Química de los alimentos. Pearson-Addison-Wesley. México.
- Betancur-Prisco JC. 2014. Análisis de los factores relevantes en la extracción mecánica de aceite de *Jatropha curcas*, cultivadas en la subregión occidental de Antioquia (Colombia). Tesis de Maestría. Universidad EAFIT. Colombia.
- Buelvas SGB, Patiño JG, Cano JS. 2012. Evaluación del proceso de extracción de aceite de aguacate Hass (*Persea americana* Mill) utilizando tratamiento enzimático. Revista Lasallista de Investigación, 9, 138-150.
- Camposeco-Silvestre CL, De Gyves-Córdova MG, Ruiz-González S, Ovando-Medina I, Salvador-Figueroa M, Adriano-Anaya ML. 2016. Desempeño agronómico de *Jatropha curcas* L. en jardín común. En: Ovando-Medina I, Adriano-Anaya ML, Salvador-Figueroa M. (eds). El Piñón (*Jatropha curcas* L.). Recurso vegetal de usos múltiples. Editorial Trillas. México. Pp. 187-203.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G. 2012. Green extraction of natural products: Concept and principles. International Journal of Molecular Sciences, 13, 8615-8627.
- Chhetri AB, Islam MR. 2008. Towards producing a truly green biodiesel. Energy Sources Part A. 30, 754-764.
- Falasca SL, Ulberich A. 2008. Potencialidad bioenergética sudamericana a partir de forestaciones con *Jatropha* sp. (*J. curcas*, *hieronymi* y *macrocarpa*). Revista Virtual REDESMA, 2, 101-115.

- Grasso FV. 2013. Diseño del proceso: pretratamiento enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Heinicke RM, Gortner WA. 1957. Stem bromelain—a new protease preparation from pineapple plants. *Economic Botany*, 11, 225-234.
- Kumari A, Mahapatra P, Garlapati VK, Banerjee R. 2009. Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. *Biotechnology for Biofuels*, 2, 1-7.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *The Journal of General Physiology*, 30, 291-310.
- Lafont JJ, Páez MS, Portacio AA. 2011. Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla (Almendra) del marañón (*Anacardium occidentale* L.). *Información Tecnológica*, 22, 51-58.
- Liou YC, Marangoni AG, Yada RY. 1998. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. *Food Research International*, 31, 243-248.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Martínez-Herrera J, Arguello-García E, Ovando-Medina I, Salvador-Figueroa M, Adriano-Anaya ML. 2016. Extracción de aceite de *Jatropha curcas* L. no toxica vía enzimática para la producción de biodiesel. En: Ovando-Medina I, Adriano-Anaya ML, Salvador-Figueroa M. (eds). *El Piñón (Jatropha curcas L.)*. Recurso vegetal de usos múltiples. Editorial Trillas. México. Pp. 317-329.
- Mussatto SI, Dragone G, Fernandes M, Milagres AM, Roberto IC. 2008. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Cellulose*, 15, 711-721.
- Navarro-Pineda FS, Baz-Rodríguez SA, Handler R, Sacramento-Rivero JC. 2016. Advances on the processing of *Jatropha curcas* towards a whole-crop biorefinery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 247-269.
- NMX-F-101-1987. 1987. Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de acidez. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-115-1987. 1987. Alimentos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del punto de congelación en grasas. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-152-S-1981. 1981. Alimentos para humanos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de yodo por el método de Wijs. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-174-S-1981. 1981. Alimentos para humanos. Determinación del índice de saponificación en aceites y grasas vegetales o animales. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- Ovando-Medina I, Espinosa-González FJ, Núñez-Farfán J, Salvador-Figueroa M. 2011. Genetic variation in Mexican *Jatropha curcas* L. estimated with seed oil fatty acids. *Journal of Oleo Science*, 60, 301-311.
- Pandey A, Germano S, Osaku CA, Rocha SN, Soccol CR. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 246-251.
- Patel AK, Singhania RR, Pandey A. 2016. Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 7, 64-72.
- Patil A, Singh AK. 2017. Effect of enzyme and microwave pretreatment on oil recovery from canola. *Journal of Food Process Engineering*, 40(1), e12340.
- Payrol JA, Obregón WD, Natalucci CL, Caffini NO. 2005. Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia*, 76, 540-548.
- Pérez AT, Carvajal C, Torres MJ, Martín MI, Pina D, Trujillo R, Hernández M. 2006. Actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia *Bromeliaceae*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11, 1-7.
- Ramos LB, de Figueiredo AK, Crapiste GH, Nolasco SM. 2013. Aplicación de tecnología emergente (microondas) en la extracción de aceite de canola. *Memorias del VII Congreso Argentino de Ingeniería Química 2013*. 20 al 23 de octubre de 2013. Rosario, Argentina.
- Rojas FJM, Burbano FG. 2011. Efecto de un pretratamiento enzimático en el proceso de obtención de la semilla del mango (*Mangifera indica* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia.
- Rosenthal A, Pyle DL, Niranjana K. 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 402-420.
- Salvador-Figueroa M, Magaña-Ramos J, Vázquez-Ovando JA, Adriano-Anaya ML, Ovando-Medina I. 2015. Genetic diversity and structure of *Jatropha curcas* L. in its centre of origin. *Plant Genetic Resources*, 13, 9-17.
- Sharma A, Khare SK, Gupta MN. 2002. Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79, 215-218.
- SEMAV. 2010. Programa de Manejo de la Zona Sujeta a Conservación "El Cabildo Amatl". Secretaría de Medio Ambiente, Vivienda e Historia Natural. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Senphan T, Benjakul S. 2016. Comparative study on virgin coconut oil extraction using protease from hepatopancreas of pacific white shrimp and alcalase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12771.
- Toro-Goyco E, Maretzki A, Matos ML. 1968. Isolation, purification, and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from *Bromelia pinguin* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 126, 91-104.
- Vicente FA, Lario LD, Pessoa A, Ventura SP. 2016. Recovery of bromelain from pineapple stem residues using aqueous micellar two-phase systems with ionic liquids as co-surfactants. *Process Biochemistry*, 51, 528-534.
- Wani SP, Garg KK, Chander G. 2016. Water needs and productivity of *Jatropha curcas* in India: myths and facts. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10, 240-254.