

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO PARA LA
EXTRACCIÓN MECÁNICA DEL ACEITE VEGETAL DE LAS
SEMILLAS DE MARACUYÁ (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa Degener*)”**

Presentado por:

MARCOS RICARDO INFANTES GARCÍA

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima – Perú

2014

*Para mi esposa, Ana;
por su incondicional apoyo
y amor desde que nuestros corazones se unieron.*

*Para mi pequeño hijo, Alejandrino;
cuya sonrisa siempre fue mi motivación.*

*Para mis padres, Elvia y Marcos;
cuyo amor y sacrificios infinitos han sido
la base para mi formación como persona y profesional.*

*Para mi familia,
que son los que me vieron crecer
y a los que dedico este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa, Ana; quien fue partícipe activa en el desarrollo de esta tesis.

A mis asesores, colegas y amigos Mg. Sc. Eduardo Morales Soriano y Mg. Sc. Gloria Pascual Chagman, ambos profesores de la FIAL; por sus invaluable consejos, tanto el aspecto científico-técnico como en lo personal.

A mis colegas y amigos: Dra. Bettit Salvá, Dr. Américo Guevara y Mg. Sc. Indira Betelleluz por sus buenos deseos y confianza vertida sobre mi persona.

A CONCYTEC por darnos la confianza y financiar nuestra propuesta de investigación.

A los miembros del Jurado del presente trabajo: Mg. Sc. Francisco Salas, Dr. David Campos y Mg. Sc. Christian Encina, por sus valiosos aportes para mejorar esta investigación.

A Máximo Zúñiga, Juan Maihuire y Zahara Prudencio; por su gran apoyo en el desarrollo de la parte experimental de esta tesis.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	2
2.1	PLANTA DEL MARACUYÁ	2
2.1.1	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	2
2.1.2	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA PLANTA.....	3
2.1.3	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	3
2.2	FRUTO DEL MARACUYÁ.....	3
2.2.1	COMPOSICIÓN DEL FRUTO DE MARACUYÁ.....	4
2.2.2	PRODUCCIÓN NACIONAL DE MARACUYÁ	4
2.3	SEMILLAS DE MARACUYÁ.....	4
2.3.1	COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS SEMILLAS	5
2.3.2	USOS DE LA SEMILLA.....	6
2.4	ACEITE DE LAS SEMILLAS DE MARACUYÁ.....	6
2.4.1	COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE	6
2.4.2	ESTABILIDAD DEL ACEITE	8
2.4.3	IMPORTANCIA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE MARACUYÁ...9	
2.4.4	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES.....	9
2.4.5	EXTRACCIÓN MECÁNICA DEL ACEITE.....	10
2.4.6	EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.....	11
2.5	APLICACIÓN DE ENZIMAS INDUSTRIALES EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES.....	12
2.5.1	DEFINICIÓN DE ENZIMA	12
2.5.2	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	12
2.5.3	VENTAJAS DEL USO INDUSTRIAL DE LAS ENZIMAS	14
2.5.4	ENZIMAS UTILIZADAS EN LA DEGRADACIÓN DE PAREDES CELULARES PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITES VEGETALES	15

2.5.5	EVIDENCIAS DE EMPLEO DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES DE DIFERENTES FUENTES.....	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	21
3.2	MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	21
3.2.1	MATERIA PRIMA	21
3.2.2	ENZIMAS	21
3.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	22
3.3.1	MATERIALES.....	22
3.3.2	EQUIPOS	23
3.3.3	REACTIVOS	23
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	24
3.4.1	ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA	24
3.4.2	CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE	29
3.5	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	35
3.5.1	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	40
4.2	EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	42
4.2.1	<i>SCREENING</i>	42
4.2.2	MAXIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO.....	47
4.2.3	VALIDACIÓN DE LOS NIVELES ÓPTIMOS TEÓRICOS	51
4.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS ACEITES OBTENIDOS ..	51
4.3.1	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE LA HUMEDAD Y COMPUESTOS VOLÁTILES.....	51
4.3.2	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE LA GRAVEDAD ESPECÍFICA .	52
4.3.3	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL COLOR FOTOMÉTRICO.....	54
4.3.4	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE REFRACCIÓN .	56
4.3.5	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE ACIDEZ (IA)	57
4.3.6	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE PERÓXIDOS (IP) .	60
	

4.3.7	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE YODO (II)	62
4.3.8	EFFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE P-ANISIDINA (IAN)	63
4.3.9	COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS ACEITES	67
V.	CONCLUSIONES	69
VI.	RECOMENDACIONES	70
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
VII.	ANEXOS	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
N°		
1	Composición del fruto fresco de maracuyá	4
2	Composición química de las semillas de maracuyá	5
3	Características fisicoquímicas de los principales aceites y grasas	6
4	Características fisicoquímicas del aceite crudo de las semillas de maracuyá	7
5	Perfil lipídico del aceite crudo de las semillas de maracuyá y otros aceites vegetales	8
6	Niveles de los factores que intervienen en el tratamiento enzimático	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Título	Pág.
1	Evolución de la producción de maracuyá en el Perú en el período 2006 – 2013	5
2	Diagrama de flujo para la extracción de aceite crudo de las semillas de maracuyá mediante el método mecánico convencional	37
3	Análisis químico proximal de las semillas de maracuyá (% base seca)	39
4	Fibra detergente ácido (FDA) y neutro (FDN) en las semillas de maracuyá (%p/p) (base seca)	42
5	Rendimientos promedio (peso/peso) de la extracción convencional y con asistencia de enzimas del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) (base seca)	45
6	Gráficas de Superficie de Respuesta para la optimización del Rendimiento de extracción del aceite de las semillas de maracuyá aplicando Deltazym VRAC-100	49
7	Gráficas de Contornos estimadas para la optimización del Rendimiento de extracción del aceite de las semillas de maracuyá aplicando Deltazym VRAC-100	50
8	Humedad y compuestos volátiles (% peso/peso) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas	52
9	Color fotométrico del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas	55
10	Índice de acidez (mg KOH/ g aceite) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas	59

11	Índice de peróxidos (meq de O ₂ equivalente/kg aceite) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas	61
12	Índice de yodo (g yodo/100 g aceite) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas	64
13	Índice de p-anisidina del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas	66
14	Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de maracuyá obtenido sin y con tratamiento enzimático	68

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Título	Pág.
N°		
1	Ficha técnica Deltazym VRAC-100	77
2	Ficha técnica Celulasa (Sigma-Aldrich)	78
3	Ficha técnica Hemicelulasa (Sigma-Aldrich)	79
4	Composición químico-proximal y fibra detergente ácido (FDA) y fibra detergente neutro (FDN) de las semillas de maracuyá	80
5	Rendimientos extracción del aceite de las semillas de maracuyá – Screening	80
6	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas, Análisis de Varianza Multifactorial para los factores que afectan el “Rendimiento” y Tabla de promedios para el “Rendimiento”	81
7	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el factor “tipo de enzima”	82
8	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple entre los tratamientos aplicados	83
9	Características del Diseño Experimental aplicado en la Optimización	84
10	Resultados de las corridas de optimización del tratamiento enzimático	85
11	Análisis de Varianza – Optimización del Rendimiento de extracción	86
12	Niveles óptimos, rendimiento óptimo y modelo matemático arrojados por software estadístico	86
13	Resultados resumidos de la caracterización física de los aceites obtenidos	87

14	Resultados resumidos de la caracterización química de los aceites obtenidos	88
15	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas, Análisis de Varianza para el “Porcentaje de humedad y compuestos volátiles”	89
16	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el “Porcentaje de humedad y compuestos volátiles” por el factor “tiempo de hidrólisis”	89
17	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Porcentaje de humedad y compuestos volátiles” por “Tipo de Tratamiento”	90
18	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Prueba de Kruskal-Wallis para la “Gravedad Específica (GE)”	90
19	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Gravedad Específica (GE)” por “Tipo de Tratamiento”	91
20	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Prueba de Kruskal-Wallis para el Color Fotométrico	92
21	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Color Fotométrico” por “Tipo de Tratamiento”	93
22	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el “Índice de Refracción (IR)”	94
23	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de Refracción (IR) por el factor “tipo de enzima”	95
24	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el “Índice de Refracción (IR)” por el factor “tiempo de hidrólisis”	95
25	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Refracción (IR)” por “Tipo de Tratamiento”	95

26	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el “Índice de Acidez” (IA)	96
27	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de acidez por el factor “tipo de enzima”	97
28	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de acidez por el factor “tiempo de hidrólisis”	97
29	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Acidez (IA)” por “Tipo de Tratamiento”	97
30	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el Índice de Peróxidos (IP)	98
31	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de Peróxidos (IP) por el factor “tipo de enzima”	99
32	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Peróxidos (IP)” por “Tipo de Tratamiento”	99
33	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el “Índice de Yodo (II)”	100
34	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el “Índice de Yodo (II)” por el factor “tipo de enzima”	100
35	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Yodo (II)” por “Tipo de Tratamiento”	101
36	Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el Índice de p-anisidina (IAN)	101
37	Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de p-anisidina (IAN) por el factor “tipo de enzima”	102
38	Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de p-anisidina (IAN)” por “Tipo de Tratamiento”	102

39	Cromatograma de ácidos grasos correspondientes al aceite extraído convencionalmente	103
40	Cromatograma de ácidos grasos correspondiente al aceite extraído con asistencia de enzimas	105
41	Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de maracuyá obtenido sin y con tratamiento enzimático	105
42	Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de ácidos grasos saturados”	106
43	Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:1 ω -9”	106
44	Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:1 ω -7”	106
45	Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:2 ω -6”	106
46	Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:3 ω -3”	107

RESUMEN

En la presente investigación, se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para maximizar el rendimiento al emplear un tratamiento enzimático previo a la extracción con prensa hidráulica para obtener aceite de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*), las cuales contienen un 26,36 % (b.s.) de aceite (extracto etéreo). De la misma forma, se evaluó el efecto que tiene este tratamiento sobre las características de calidad de los aceites obtenidos. Los factores evaluados pertenecen a la operación unitaria de tratamiento enzimático y estos fueron: tipo de enzima (celulasa, hemicelulasa y un complejo enzimático con actividad celulolítica y hemicelulolítica), concentración de enzima (0,5 y 2% resp. al sustrato), relación MP: agua (3:1 y 5:1) y tiempo de hidrólisis (4 y 18 horas). Los niveles optimizados fueron: concentración de enzima=1,95%, Relación MP: agua=5,68:1 y Tiempo de hidrólisis=22,8 horas; con los que logró alcanzar un rendimiento experimental de $20,19 \pm 0,40$ % (b.s.) a comparación del rendimiento obtenido con una extracción convencional (sin aplicación de enzimas) fue de 11,87 % (p/p) (b.s.). En cuanto al efecto del tratamiento enzimático sobre la calidad del aceite; la humedad y compuestos volátiles, color fotométrico, índice de refracción, índice de acidez e índice de p-anisidina se ven significativamente afectados cuando se aplican enzimas al ser comparados con la extracción convencional; asimismo la gravedad específica, índice de refracción, índice de peróxidos, índice de yodo y la composición de ácidos grasos no se ve significativamente afectados. Por ende, la aplicación de esta tecnología es viable y podría resultar rentable por los volúmenes de maracuyá que se manejan a nivel nacional.

Palabras clave: aceite, semillas de maracuyá, tratamiento enzimático, prensa hidráulica.

ABSTRACT

In this research, Response Surface Methodology (RSM) was applied to maximize the performance when using enzyme treatment prior to passion fruit (*Passiflora edulis*) seed oil extraction with hydraulic press, which contain 26,36% (d.b.) oil (ether extract). Likewise, the effect of this treatment on the quality characteristics of obtained oils was assessed. Evaluated factors belong to the enzyme treatment as unit operation and these were: enzyme type (cellulase, hemicellulase and an enzyme complex with hemicellulolytic and cellulolytic activity), enzyme concentration (0,5 and 2% resp. substrate), ratio MP: water (3: 1 and 5: 1) and hydrolysis time (4 to 18 hours). Optimized levels were: enzyme concentration = 1,95%, Relationship MP: water = 5,68: 1 and Time hydrolysis = 22,8 hours; with which was possible to reach an experimental performance of $20,19 \pm 0,40\%$ (w/w) (d.b.), compared with the performance obtained with a conventional extraction (without application of enzymes) of 11,87% (w/w) (d.b.). And for the effect of enzymatic treatment on oil quality; moisture and volatiles compounds, photometric color, refractive, acid and p-anisidine index are significantly affected when enzymatic treatment were compared to conventional extraction; also the specific gravity, refractive index, peroxide index, iodine index and fatty acid composition are not significantly affected. Therefore, the application of this technology is feasible and could be profitable for passion fruit volumes handled at national level.

Keywords: oil, passion fruit seeds, enzymatic treatment, hydraulic press equipment.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú se encuentra entre los cuatro países con mayor producción de maracuyá, después de Brasil, Ecuador y Colombia. Casi toda la producción de este fruto se consume internamente y del total del consumo nacional, aproximadamente el 30 por ciento se destina hacia la agroindustria (AMPEX, 2006).

Por lo anteriormente mencionado, se demuestra que el maracuyá es un fruto de gran importancia en el mercado nacional. Sin embargo, existe un desaprovechamiento de los residuos generados (cáscaras y semillas) en la agroindustria de este sector, de tal manera que se genera un impacto ambiental negativo. En el caso de las cáscaras, es posible obtener pectina a partir de ellas y en algunas industrias se lleva a cabo este proceso. Pero en el caso de las semillas, muchas empresas desconocen que es posible utilizar este residuo con fines industriales.

A partir de las semillas de la fruta de maracuyá es posible obtener dos sub productos: aceite y torta (mayoritariamente conformada por fibra dietaria insoluble según Chau y Huang, 2004). El aceite que se extrae de las semillas puede ser utilizado para la fabricación de jabones, tintas y barnices. Es comparable, en valor nutritivo y digestibilidad, con el aceite de algodón debido a su contenido similar de ácido linoleico; por lo que existe posibilidad muy atractiva de producirse con fines comerciales (Jiménez, 1972).

En el presente trabajo, se empleó una extracción mecánica del aceite de las semillas de este fruto, con la previa aplicación de un tratamiento enzimático, que se utiliza para aumentar el rendimiento de extracción de aceites vegetales, y se evaluará el efecto de este tratamiento sobre las características de calidad del aceite.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 PLANTA DEL MARACUYÁ

El maracuyá es una dicotiledónea nativa de América del Sur que en la actualidad ha tenido una amplia distribución a diversas regiones tropicales y sub tropicales del mundo en general, y del hemisferio occidental en particular. (Zulueta y Calatayud, 1997).

El género *Passiflora*, al que pertenece el maracuyá, posee 80 especies con frutos comestibles de características deseables. El importante número de frutos potenciales para el consumo humano posiciona a *Passiflora* como el segundo género más rico en especies frutales después del género *Psidium*. (Ortiz, 2010).

2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según Feulliet y MacDougal (2003) mencionados por Ortiz (2010), la clasificación más reciente de la planta de maracuyá es la que se presenta a continuación:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Violales
Familia	:	Passifloraceae
Género	:	Passiflora
Subgénero	:	Passiflora
Supersección	:	Passiflora
Serie	:	Passiflora
Especie	:	<i>Passiflora edulis</i>

2.1.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA PLANTA

Según Zulueta y Calatayud (1997), las principales características de la planta de maracuyá son las siguientes: el sistema radical presenta una raíz principal y raíces laterales ramificadas provistas de pelos absorbentes que pueden penetrar hasta unos 135 cm de profundidad; los tallos perennes son acanalados en la parte superior, cilíndricos y ligeramente angulosos, de pigmentación algo difusa y con zarcillos auxiliares largos y alternos que les facilitan la trepación; las hojas son de color verde lustroso con pecíolos glabros acanalados en la parte superior, posee dos nectarios en la base del folíolo, la lámina en palmeada y casi siempre con tres lóbulos; las flores son axiliares, bisexuales y radiadas, poseen cinco pétalos y una corona de filamentos radiantes, de color púrpura en la base y blanco en el ápice además de tener cinco estambres y tres estigmas..

El fruto es una baya, de forma globosa u ovoide, con un diámetro de 0,04 – 0,08 m y de 0,06 – 0,08 m de largo, la base y el ápice son redondeados, la corteza puede ser de color amarillo u morado, de consistencia dura, lisa y cerosa, de unos 0,003 m de espesor; el pericarpio es grueso, contiene de 200- 300 semillas, cada una rodeada de un arilo (membrana mucilaginosa) que contiene un jugo aromático en el cual se encuentran las vitaminas y otros nutrientes (Zulueta y Calatayud, 1997).

2.1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Jiménez (1972) menciona que en Brasil se le cultiva bastante y crece en forma silvestre. Del Brasil se introdujo al Perú, Venezuela, Florida, Hawái, etc. Según la AMPEX (2006), los países con mayor producción son Brasil, Ecuador, Colombia y Perú. Se cultiva también en Australia, Nueva Guinea, Kenia, Sudáfrica, Nueva Zelanda e India.

2.2 FRUTO DEL MARACUYÁ

El maracuyá (*Passiflora edulis*) es una fruta tropical conocida también como la fruta de la pasión, Lilikoi y Poka. El género *Passiflora* está compuesto por plantas leñosas tipo enredadera, nativa de las regiones Tropicales de América del Norte y del Sur. De las 400 especies conocidas de *Passiflora*, cerca de 50 a 60 producen frutas comestibles, sin

embargo pocas son agradables y de valor comercial. Existen dos variedades que se cultivan en gran escala en el mundo y éstas son el maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa Degener*) y el maracuyá púrpura (*Passiflora edulis* var. *Edulis*) (Zulueta y Calatayud, 1997).

2.2.1 COMPOSICIÓN DEL FRUTO DE MARACUYÁ

Ferrari *et al.* (2001), realizaron el análisis de composición del fruto fresco de maracuyá, los resultados se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Composición del fruto fresco de maracuyá

Componente	(%)
Cáscara	50,3
Jugo	23,2
Semillas	26,2

Fuente: Ferrari *et al.* (2001)

2.2.2 PRODUCCIÓN NACIONAL DE MARACUYÁ

En la Figura 1, se puede apreciar la evolución de la producción de maracuyá en el Perú. Según INEI (2014), la producción de este fruto ha aumentado a más del triple desde el 2006 hasta el 2013. Esto se traduce en un aumento de los residuos generados y que podrían ser aprovechados.

2.3 SEMILLAS DE MARACUYÁ

Las semillas de *P. edulis* var. *Flavicarpa* miden entre 3 y 4 mm de ancho y 5 a 6 mm de largo y se caracterizan por tener una forma oval-reticular que se encuentra dentro de una cavidad única del fruto de color pardo oscuro, rodeadas de una pulpa mucilaginosa semi espesa de color amarillo que contiene un jugo bastante ácido, muy aromático y de sabor agradable (Zulueta y Calatayud, 1997).

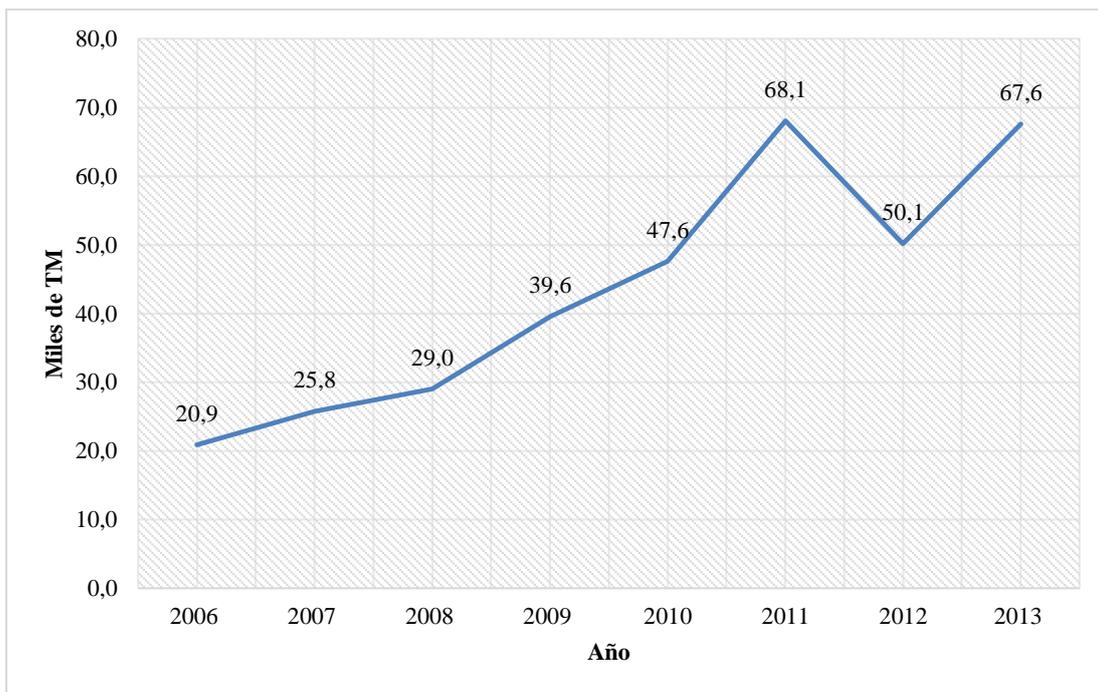


Figura 1: Evolución de la producción de maracuyá en el Perú en el período 2006 – 2013

Fuente: INEI (2014)

2.3.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS SEMILLAS

Chau y Huang (2004) realizaron una caracterización de las semillas de maracuyá, los resultados de sus estudios se muestran a continuación (Cuadro 2).

Cuadro 2: Composición química de las semillas de maracuyá

Componente	g/100 g de semilla cruda (peso seco)
Humedad	6,60 ± 0,28
Proteína cruda	8,25 ± 0,58
Extracto etéreo	24,5 ± 1,58
Fibra dietaria total	64,8 ± 0,05
Fibra dietaria insoluble	64,1 ± 0,02
Fibra dietaria soluble	0,73 ± 0,07
Cenizas	1,34 ± 0,08
Carbohidratos	1,1

Fuente: Chau y Huang (2004)

Jiménez (1972) también realizó un análisis a las semillas de maracuyá. Obtuvo un valor de extracto etéreo promedio de 20,2 por ciento.

2.3.2 USOS DE LA SEMILLA

No se ha encontrado registros sobre el uso industrial de este tipo de semillas en el Perú. En otros países productores, se utiliza básicamente como suplemento alimenticio para animales de abasto, en raciones para bovinos y aves (Ferrari *et al.*, 2004).

En Brasil, Kobori y Jorge (2005) citado por Lima *et al.* (2010) mencionan que las semillas se pueden utilizar para la producción de aceites comestibles o en la industria de los cosméticos. Según Ferrari *et al.* (2004), la semilla de maracuyá tiene 25,7% de aceite y un contenido de proteína de 15,62%, que también es una fuente de fibra. El aceite muestra un predominio de ácidos grasos oleico y linoleico. Lima *et al.* (2010) establecen que la harina de cáscara de maracuyá ya conocida por sus propiedades para ayudar a bajar los niveles de azúcar en la sangre, lo cual es genial para aquellos que tienen diabetes, la harina ahora gana estatus de bloqueador natural de grasas.

Debido a la elevada cantidad de fibra dietaria que posee la semilla, se abre la posibilidad de utilizar la torta [con un contenido de 85,9 por ciento de fibra dietaria insoluble según Chau y Huang (2004)] como aditivo alimentario o para la síntesis de bioetanol.

2.4 ACEITE DE LAS SEMILLAS DE MARACUYÁ

2.4.1 COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE

En el Cuadro 3, se muestran algunas características fisicoquímicas de los principales tipos de aceites y grasas que comúnmente son consumidas.

Cuadro 3: Características fisicoquímicas de los principales aceites y grasas

Grasa o aceite	Índice de Yodo	Índice de Saponificación	Índice de Refracción		Peso específico	
			°C		°C	
Linaza	170-204	188-196	25	1,477-1,482	15	0,931-0,938
Cártamo	140-150	188-194	40	1,467-1,469	15	0,919-0,924
Pepita de uva	125-143	179-206	25	1,470-1,476	15	0,909-0,926

Continuación

Soya	120-141	189-195	25	1,470-1,476	15	0,924-0,928
Girasol	125-136	188-194	25	1,472-1,474	15	0,922-0,926
Maíz	103-128	187-193	25	1,471-1,474	15	0,922-0,926
Sésamo	103-116	188-195	25	1,470-1,474	15	0,920-0,926
Algodón	99-113	189-198	25	1,463-1,472	15	0,922-0,924
Salvado de arroz	92-110	183-194	40	1,465-1,468	15	0,918-0,928
Colza	97-108	170-180	25	1,470-1,474	15	0,913-0,918
Almendra	102-105	188-197	40	1,462-1,465	15	0,91-0,917
Palta	84-100	188-195	25	1,467-1,470	15	0,917-0,921
Oliva	80-88	188-196	25	1,466-1,468	15	0,914-0,919
Palma	44-54	195-205	40	1,433-1,456	15	0,921-0,925
Manteca de cacao	35-40	190-200	40	1,453-1,458	15	0,990-0,998
Palmiste	14-33	245-255	40	1,449-1,452	40	0,900-0,913
Coco	7,5-10,5	250-264	40	1,448-1,450	15	-
Grasa de cerdo	53-77	190-202	40	1,459-1,461	15	0,931-0,938

Fuente: Bernardini (1981).

En el Cuadro 4, se puede apreciar el perfil lípido de las semillas del aceite crudo de maracuyá y de otros aceites vegetales.

Cuadro 4: Características fisicoquímicas del aceite crudo de las semillas de maracuyá

Características	Valor		
	Jiménez (1972)	Ferrari <i>et al.</i> (2004)	Malacrida y Jorge (2012)
Índice de refracción (25 °C)	1,474 – 1,475	NR	1,468
Densidad (25 °C)	NR	0,905	NR
Índice de acidez (ácido oleico)	1,2 – 2,5	1,34	2,35
Índice de saponificación (mg KOH/ g aceite)	187 - 199	NR	190,7
Índice de peróxidos (meq. O₂ act/1000 g aceite)	1,0 – 1,8	4,7	1,46
Índice de yodo (g de yodo/ 100 g aceite)	130 – 153	136,5	128

NR: no realizado

2.4.2 ESTABILIDAD DEL ACEITE

En el Cuadro 5, se puede apreciar que el aceite crudo obtenido de las semillas de maracuyá contiene una alta cantidad de ácido linoleico (67,99 por ciento). Esta elevada cantidad de omega 6 provoca que el aceite crudo al estar en contacto con la atmósfera se oxide rápidamente y forme una masa pastosa que no es soluble en ningún solvente (Jiménez, 1972). Además, no se existen investigaciones donde se reporte sobre la presencia de antioxidantes naturales en estas semillas que impidan la oxidación de este ácido graso.

Cuadro 5: Perfil lipídico del aceite crudo de las semillas de maracuyá y otros aceites vegetales

Aceite o grasa	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido linolénico	Total saturados
Pepitas de maracuyá¹	14,54	67,99	TR	17,4
Pepitas de maracuyá²	18,06	68,79	0,69	12,46
Linaza	9-27	8,3-29	45-60	15-16
Nogal	9-35	57-76	4	10
Cártamo	7,1-36,6	56,7-80	ND	5-13
Pepita de uva	12-33	45-72	ND	15
Soya	16-30	48-60	8-9	15
Girasol	25-40	40-68	ND	12-14
Maíz	4-39,4	51,5-74,4	ND	10-20
Sésamo	40	40	ND	más de 14
Algodón	20-40	45-50	ND	21
Palta	40-66	19-37	ND	15-24
Oliva	77-86	7	ND	11-12
Palma	35-40	10-15	ND	35-40
Coco	5-8	1-2,5	ND	70-80

ND: no detectado, TR: trazas

Fuente: ¹ Ribeiro (2006), ² Ferrari *et al.* (2004) y Bernardini (1981)

Sin embargo este mismo autor reporta que dentro de sus experiencias, evaluó la evolución del índice de peróxido en el aceite crudo durante 60 días. Al final de esta experiencia,

obtuvo valores acumulados de índices de peróxido que variaban desde 6,46 hasta 7,60 miliequivalentes de oxígeno activo/1000 gramos de aceite. Si se tiene en cuenta la norma del CODEX para grasas y aceites comestibles, no se superó el límite permitido que es de 15 miliequivalentes de oxígeno activo/1000 gramos de aceite.

2.4.3 IMPORTANCIA DEL ACEITE DE LAS SEMILLAS DE MARACUYÁ

A pesar de que en la actualidad en nuestro país no se ha extraído el aceite de la materia prima en cuestión a nivel industrial, existe un gran potencial para que pueda utilizarse para el consumo masivo debido al buen perfil lipídico que posee tal como se muestra en el Cuadro 5. Se aprecia que posee un elevado contenido en omega 6, el cual es considerado un ácido graso esencial debido a que no pueden ser sintetizados por nuestro organismo.

Tivizay (1995) mencionado por Arellano (2003) menciona que los ácidos grasos esenciales cumplen varias funciones imprescindibles; su deficiencia, exceso o desproporción entre ellos, está involucrada en la aparición de problemas metabólicos relacionados con alteraciones de la piel (piel seca, eczemas), arterioesclerosis, exacerbación de las complicaciones diabéticas, alteraciones de la inmunidad, fenómenos inflamatorios y trombóticos, enfermedades cardiovasculares y predisposición al cáncer. Esto se debe a que estos ácidos grasos forman parte de la membrana celular, regulan su flexibilidad y permeabilidad; por lo que de ello depende la respuesta celular a los impulsos nerviosos, funcionales y hormonales. Además estos omegas son precursores de las prostaglandinas, tromboxanos y eicosanoides; moléculas que regulan el metabolismo corporal. Además de poder ser empleado para alimentación humana, se puede aplicar en la alimentación de animales, también en la industria de los cosméticos.

2.4.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES

Según O'Brien (2009), el propósito de emplear métodos de recuperación o extracción de aceites es obtener triglicéridos con un alto rendimiento y pureza para generar co-productos de máximo valor. Las fuentes oleaginosas son procesadas por uno de los siguientes tipos de procesos: Extracción mecánica (proceso discontinuo y continuo) y la extracción por solventes. El tipo de proceso extractivo preferido depende de la cantidad del aceite

presente en la semilla, la cantidad de aceite residual en la torta, la cantidad de proteína desnaturalizada permitida, la capacidad de inversión y el impacto ambiental generado.

2.4.5 EXTRACCIÓN MECÁNICA DEL ACEITE

a. Prensado discontinuo

Según Bailey (1984), es el procedimiento más antiguo y casi único de extracción de aceite. Se basa en la aplicación de la presión sobre una masa de productos oleaginosos confinados en bolsas, telas, mallas u otros artificios adecuados. Las prensas discontinuas se pueden dividir en dos tipos principales: las “abiertas”, en las cuales el producto oleaginoso debe estar encerrado entre filtros de tela; y en las “cerradas”, que prescinden de esos filtros y en las cuales la materia oleaginosa se introduce en una especie de jaula.

Este mismo autor menciona que el rendimiento en la obtención de aceite por prensado mecánico depende de una serie de factores relacionados con la afinidad del aceite por los sólidos de las semillas. Entre estos factores se encuentra: el grado de humedad, método de cocción y composición química de la semilla; además las semillas alteradas retienen, generalmente, más aceite que las sanas. Para una carga determinada de semillas, acondicionada y lista para prensado, el rendimiento en aceite depende de la velocidad a que se aplica la presión, el máximo de ésta, tiempo de drenaje del aceite a la presión total y temperatura o viscosidad del aceite (Bailey, 1984). O’Brien (2009) menciona que generalmente la torta generada en este proceso tiene un contenido de aceite residual desde 15 hasta 18%.

b. Prensado continuo

Shahidi (2005) menciona que el aparato que se utiliza comúnmente para extraer el aceite de la materia oleaginosa es el “expeller”, el cual es un dispositivo mecánico que utiliza un tornillo horizontal con un diámetro del cuerpo creciente cuyo objetivo es aumentar la presión sobre la materia prima a medida que avanza a través del tornillo. El cilindro alrededor del tornillo está perforado de tal manera que permite incrementar la presión interna para que en primera instancia desaloje el aire y posteriormente el aceite a través del cilindro. Al final de todas las operaciones, se suele hacer pasar el aceite por un filtro-

prensa para eliminar aquellas partículas que, por su tamaño pequeño, no han sido separadas por las rejillas.

O'Brien (2009) reporta que la torta proveniente del expeller presenta un contenido de aceite residual entre 3 y 10%. Esta torta es normalmente transformada en harina y expandida como fuente proteica.

2.4.6 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

Este método es el más eficiente. El proceso de extracción con solventes empieza cuando se pone en contacto la materia prima oleaginosa con el solvente. Las micelas del solvente que se encuentran en la superficie del material se difunden a través de la pared celular hacia los cuerpos oleosos localizados dentro de las células. La micela rápidamente solubiliza a los cuerpos oleosos. Mientras las micelas continúan entrando y solubilizando al aceite, la presión interna se acumula y la micela concentrada se difunde de regreso fuera de la célula. Esta micela concentrada se difunde a través de las paredes de las células adyacentes y eventualmente alcanza la superficie de la partícula. Una vez que la micela concentrada alcanza a las demás de afuera del material oleaginoso, se solubiliza con ellas y las concentra. Este proceso continúa hasta que la concentración de las micelas dentro de las células del material oleaginoso se equilibre con la concentración de la micela fuera de éste (Shahidi, 2005).

Una vez que termina el proceso extractivo, se procede a la separación de las partículas agotadas de las micelas concentradas con el aceite. Esto se puede realizar en una centrífuga o en un filtro. Luego de la separación de los sólidos, se buscará separar las micelas del solvente del aceite; esto se logra mediante una destilación fraccionada en la que se obtiene por separado el aceite y el solvente recuperado (Shahidi, 2005).

O'Brien (2009) afirma que los solventes se pueden emplear tanto para extraer el aceite residual a partir de tortas provenientes de prensado hidráulico (con un contenido de 15-18% de aceite) como para oleaginosas íntegras en forma de hojuelas (previamente extruidas con el fin de expandir la estructura de la semilla y facilitar el ingreso del solvente)

2.5 APLICACIÓN DE ENZIMAS INDUSTRIALES EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES

2.5.1 DEFINICIÓN DE ENZIMA

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica. Como todas las proteínas, están formadas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El que una proteína tenga actividad catalítica, es decir enzimática, depende de su secuencia de aminoácidos que determina la conformación de la cadena. Solamente unos pocos grupos reactivos de la proteína enzimática, que se sitúan en el llamado centro activo, son responsables de la catálisis (Nelson y Cox, 2005).

El centro activo se compone del centro catalítico y del centro de enlace (separados espacialmente). El primero es el responsable de la naturaleza química de la reacción catalizada (especificidad de acción), el segundo de la afinidad por el sustrato (especificidad de sustrato). Mientras que el centro catalítico puede ser relativamente inespecífico, la especificidad del centro de enlace es extremadamente alta, de tal forma que solo unas pocas sustancias de naturaleza química muy parecida pueden ser empleadas como sustrato (Nelson y Cox, 2005).

2.5.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

a. Efecto del pH

La mayoría de las enzimas posee un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH, la actividad disminuye. La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato, así como de otros muchos factores que son por lo general difíciles de analizar cuantitativamente (Nelson y Cox, 2005). Este comportamiento ácido-base de la enzima depende de los grupos ionizables que posee, ya que los cambios de pH pueden alterar su conformación, su capacidad de unión con el sustrato y la actividad catalítica de los grupos que forman el centro activo (Wiseman, 1991).

b. Efecto de la temperatura

Al igual que ocurre con la mayoría de reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementan en general con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activo. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica, aproximadamente, por cada 10 °C de aumento de la temperatura ($Q_{10} = 2,0$) (Nelson y Cox, 2005).

Aunque las reacciones catalizadas por los enzimas parecen, con frecuencia, poseer una temperatura óptima, el pico que se observa al representar la actividad catalítica frente a la temperatura se produce porque las enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan por acción del calor y se inactivan cuando la elevación de la temperatura sobrepasa un cierto punto. La aparente temperatura “óptima” es, por tanto, la resultante de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica del enzima al sobrepasar una temperatura crítica (Nelson y Cox, 2005).

c. Efecto de la concentración/Actividad de agua

Normalmente las actividades de las enzimas tienen lugar *in vitro* en medios acuosos, aunque las reacciones enzimáticas *in vivo* pueden ocurrir no sólo en el citoplasma, sino también en las membranas celulares, en los depósitos de lípidos y en el sistema de transporte electrónico, donde se sabe que la transferencia de electrones ocurre en una matriz lipídica (Fennema, 2000).

Fennema (2000) menciona que existen diversos métodos para evaluar el efecto de la actividad de agua sobre las enzimas. Uno de ellos consiste en desecar cuidadosamente una muestra biológica no calentada (o sistema modelo) que contenga actividades enzimáticas, equilibrarla a varias actividades de agua y medir la actividad enzimática. De esta manera se ha observado que por debajo de una actividad de agua de 0,35 (menos de uno por ciento del agua total) no hay actividad de la fosfolipasa sobre la lecitina. Otro caso observado es el de la β -amilasa, la cual no tiene actividad sobre el almidón hasta alrededor de una actividad de agua de 0,8 (aproximadamente un dos por ciento del agua total); su actividad aumenta unas quince veces hasta 0,95 (aproximadamente doce por ciento del agua total). A

partir de estos ejemplos, se pudo concluir que el contenido total de agua tiene que ser menos que 1-2 % para evitar la actividad enzimática.

d. Efecto de la presencia de inhibidores

A partir del estudio de los inhibidores de las enzimas se ha obtenido información de importancia sobre el mecanismo y los caminos de la catálisis enzimática, la especificidad de sustrato de las enzimas, la naturaleza de los grupos funcionales en el centro activo y la participación de ciertos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación activa de la molécula de la enzima (Nelson y Cox, 2005).

Muchos otros productos de origen animal y vegetal contienen sustancias capaces de inhibir la actividad catalítica de algunas enzimas: su función biológica no es muy clara, aunque en muchos casos forman parte de diversos mecanismos reguladores o de defensa contra depredadores. Entre los inhibidores más conocidos están los que evitan la acción de proteasas, que se encuentran en las leguminosas y en el maíz, trigo, arroz, la papa y otros alimentos. Además de estos existen otros inhibidores de proteasas, como el ovomucoide y el ovoidinhibidor de la clara de huevo. Los cereales contienen inhibidores de amilasas, cuya función es proteger contra los depredadores, impidiendo la degradación del almidón, y por tanto el desarrollo de infecciones. También se han identificado inhibidores de lipasas y de algunas enzimas pépticas (Badui, 1990).

2.5.3 VENTAJAS DEL USO INDUSTRIAL DE LAS ENZIMAS

Según Badui (1990), de las miles de enzimas conocidas, sólo algunas se producen a escala industrial para emplearse tanto en la manufactura de alimentos como de las materias primas para su elaboración. Cada día aumenta el número de reacciones que se efectúan por rutas enzimáticas, y esta tendencia seguramente aumentará a medida que existan más catalizadores de este tipo en el comercio, a precios accesibles.

El empleo de enzimas tiene muchas ventajas, entre ellas destacan:

- Son de origen natural y por lo tanto no deben ser tóxicas.
- Son muy específicas en su manera de actuar, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables.

- Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y de pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni de equipos muy costosos.
- Actúan a bajas concentraciones.
- Su velocidad puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de la enzima.
- Son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado.

Por otra parte, la principal limitante es que algunas de ellas son muy costosas y no se consiguen fácilmente; sin embargo es conveniente hacer un balance de las ventajas y desventajas que trae consigo llevar a cabo una determinada reacción con enzimas, o con otros métodos químicos o físicos. Cabe indicar que en este sentido hay muchas innovaciones tecnológicas que están logrando hacer esta tecnología más económica, como es el caso de la ingeniería genética que modifica el material genético de los microorganismos y los hace sobre productores de enzimas (Badui, 1990).

2.5.4 ENZIMAS UTILIZADAS EN LA DEGRADACIÓN DE PAREDES CELULARES PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITES VEGETALES

Sineiro *et al.* (1998) mencionan que la pared celular vegetal está compuesta por dos membranas: la primera compuesta de una matriz amorfa de pectina, hemicelulosa y proteínas con microfibrillas de celulosa; y la segunda prevalecen la celulosa y hemicelulosa. Reed (1975) señala que las enzimas utilizadas para degradar paredes celulares son del tipo *carbohidrasas*, las cuales generalmente son específicas para un enlace glucosídico en particular.

Por esta razón, Sineiro *et al.* (1998) recomiendan emplear celulasas y hemicelulasas. Las pectinasas son también efectivas, sobre todo en vegetales y frutas ya que las pectinas son componentes estructurales de estos.

a. Pectinasas

El término pectinasas o enzimas pectolíticas concierne sólo a enzimas que degradan la parte galacturónica de estas sustancias. Así las enzimas que degradan las cadenas laterales

(arabinasa, galactanasas, etc.) no son consideradas dentro de las enzimas pectolíticas. En consecuencia, las enzimas que degradan los enlaces α -1,4 entre los residuos del ácido galacturónico y las enzimas desesterificantes de estos ácidos constituyen el grupo de pectinasas (Bruchmann, 1980).

Según Bruchman (1980), las pectinasas se pueden clasificar en:

a.1 Pectinestearasas: La enzima solo separa grupos metilo que se encuentren en la proximidad de grupos carboxilo libres. La pectina totalmente esterificada con metanol es atacada lentamente. La hidrólisis empieza por un extremo y va progresando en la dirección de formación de la cadena. La pectinestearasa es una enzima muy específica que ataca casi únicamente a los grupos metilos de las sustancias pépticas.

a.2 Poligalacturonasas: Las enzimas de este tipo hidrolizan en general enlaces α -1,4-D-galacturonidos en los pectatos y otros galacturónidos. Se pueden distinguir varios tipos de actividades dependiendo de si las cadenas de pectina son descompuestas cuando están metiladas o cuando no lo están, y si el ataque empieza por cualquier punto no seleccionado (endoenzimas) o por el final de la cadena (exoenzimas).

a.3 Pectatoliasas: Esta enzima elimina restos Δ -4,5-D-galacturónicos de la pectina, ejerciendo así una despolimerización no hidrolítica.

b. Celulasas

Bruchmann (1980) menciona que las celulasas hidrolizan los enlaces β -1,4-glucano de las cadenas de celulosa y de sus productos de degradación dando como molécula final a la glucosa. La “celulasa” no es ninguna enzima asilada sino un sistema enzimático que posee por lo menos tres actividades: endoglucanasa (EC.3.2.1.4), celobiohidrolasa (EC. 3.2.1.91), exoglucohidrolasa (EC. 3.2.1.74) y β -glucosidasas (EC. 3.2.1.21) (Fennema, 2000).

La mejor fuente de obtención de preparados técnicos capaces de atacar a la celulosa cristalina es el hongo *Trichoderma viride*. También los preparados obtenidos a partir del *Aspergillus niger* tienen cierta importancia (Bruchmann, 1980).

El pH óptimo de los sistemas celulolíticos suele estar entre 4 y 6. Son termoestables y la temperatura óptima para alguno de ellos se encuentra alrededor de 60 °C (Bruchmann, 1980). Además Reed (1975) menciona que estas enzimas son fuertemente inhibidas por gluconolactonas.

c. Hemicelulasas

Fennema (2000) menciona que existen varias endo- y exo- pentanasas (hidrolasas), debido a la gran complejidad de las hemicelulosas. Las enzimas de tipo endo- son de dos tipos: las arabanasas que hidrolizan los enlaces glucosídicos 1,4- α -D-arabinopiranosilo en el esqueleto lineal de los arabanos y las xilanasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos 1,4- β -D-xilanopiranosilo en xilanos y arabinoxilanos. Las enzimas del tipo exo- de un primer grupo actúan en el extremo no reductor de los arabanos (las arabinosidasas), xilanos (xilosidasas) y las arabinoxilanos (xilanosidasas). Los enzimas del tipo exo- del segundo tipo (arabinosidasas) eliminan unidades arabinofuranosílicas laterales de los arabinoxilanos.

Algunos hongos producen cantidades considerables de pentosanasas. También existen varias endo y exo pentosanasas en niveles muy bajos en el trigo. La concentración de algunas pentosanasas aumenta en unas 6-10 veces durante la germinación de las semillas. Se cree que las pentosanasas están primariamente localizadas en el salvado, pero se desconoce dónde están localizadas las enzimas que son sintetizadas de nuevo durante la germinación (Fennema, 2000).

2.5.5 EVIDENCIAS DE EMPLEO DE ENZIMAS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES DE DIFERENTES FUENTES

Domínguez *et al.* (1994) mencionan que existen muchas aplicaciones de enzimas en extracción de grasas y aceites como: extracción de aceites, producción de mono y diglicéridos, transformaciones de esteroides y ácidos grasos, etc. En el caso de procesos de extracción de aceites, dos ventajas son ofrecidas por este tratamiento: los rendimientos más elevados y la mejor calidad de las tortas obtenidas. Hace algunas décadas, esta tecnología no era considerada viable debido al alto costo de las enzimas. Sin embargo, en estos

últimos años, con el desarrollo de la ingeniería genética y la biotecnología, es posible obtener enzimas con un precio significativamente menor.

Wiseman (1991) menciona que existen varias publicaciones acerca del empleo de enzimas en la extracción de aceites a partir de pescados, levaduras y semillas de colza, palma y soya. Por ejemplo, las celulasas y pectinasas se emplean en la extracción del aceite de palma. En la soya y el pescado, la mayor parte del aceite está asociado con proteínas, de forma que la adición de proteasas incrementa el rendimiento de aceite y de proteína.

La acción enzimática, al igual que el tratamiento térmico o mecánico, daña las paredes celulares, aumentando la permeabilidad del aceite. Un gran número de enzimas ha sido utilizado para mejorar la extractibilidad del aceite de semillas: amilasas, glucanasas, proteasas, pectinasas, asimismo las celulasas y hemicelulasas. (Domínguez *et al.*, 1994)

Taha y Hassanein (2007) trabajaron en un tratamiento enzimático aplicado a semillas de algodón. Utilizaron proteasas de diferentes fuentes, puras y mezcladas. Estos autores reportan un incremento en la extractabilidad del aceite de 27,73 por ciento en comparación con el control. Estos dos investigadores aplicaron una extracción mecánica.

Por otra parte, Zúñiga *et al.* (2003) reportan un rendimiento de extracción de 98,6 por ciento al aplicar una mezcla de enzimas sobre avellanas (*Guevina avellana mol*). Estos autores trabajaron con un doble prensado a 39,2 MPa con la aplicación previa de un precalentamiento de la materia prima.

Ranalli y Serraiocco (1996) evaluaron el efecto de la aplicación del complejo enzimático “Olivex” sobre tres variedades de frutos de olivo. El método de extracción utilizado fue uno mecánico el cual se trabajó a una presión máxima de 380 kg/cm². Bajo estas condiciones, estos investigadores obtuvieron un rendimiento de 88,8 por ciento en base al fruto.

Soto *et al.* (2007) aplicaron una mezcla de complejos enzimáticos “Olivex” y Celulasas sobre borrajas. El mayor rendimiento se obtuvo trabajando bajo las siguientes condiciones: doble prensado (39,2 MPa), precalentamiento de la materia prima (70 °C por 5 minutos) y condiciones específicas para el tratamiento enzimático (0,25 por ciento de enzimas,

temperatura de reacción de 45°C, 20 por ciento de humedad y nueve horas de reacción); con lo cual el rendimiento se elevó por encima de 95 por ciento a comparación del tratamiento control que se encuentra por debajo de 90 por ciento. Además estos autores reportan que la calidad del aceite obtenido no cambió significativamente.

Badr y Sitohy (1992) optimizaron el tratamiento enzimático para la extracción acuosa de aceite de semillas de girasol. Estos investigadores utilizaron celulasas, hemicelulasas, pectinasas y proteasas de diferentes fuentes. El mayor rendimiento reportado fue el de la proteinasa ácida (57,08 por ciento) respecto al tratamiento control (41,6 por ciento), las que fueron tratadas bajo las siguientes condiciones: 2 por ciento de concentración de enzima, 30 por ciento de concentración de sustrato y un tiempo de reacción de tres horas.

Domínguez *et al.* (1995) obtuvieron aceite de soya a partir de una extracción acuosa de las habas previamente acondicionadas y tratadas enzimáticamente con complejos multienzimáticos. Estos autores obtuvieron un incremento en el rendimiento de extracción de 10 por ciento respecto al proceso de extracción acuoso.

Latif y Anwar (2008) trabajaron con semillas de moringa (*Moringa concanensis*) a las que sometieron a una extracción acuosa asistida y no asistida (control) con complejos enzimáticos. El contenido de aceite de la semilla reportado es de aproximadamente 38,4 por ciento. Las condiciones del tratamiento enzimático que se emplearon fueron las siguientes: 2 por ciento de concentración de enzima. Con el tratamiento control se obtuvo un rendimiento de 15,41 por ciento mientras que con el tratamiento enzimático con el complejo “Kemzyme” (mezcla de α -amilasa, β -glucanasa, celulasas, proteasas y xilanasas) fue de 27,46 por ciento.

Guerra y Zúñiga (2003) utilizaron un tratamiento enzimático para aumentar el rendimiento de extracción de las semillas de uva (*Vitis vinifera*) con un prensado en frío. Estos rendimientos aumentaron desde alrededor de 60 por ciento con el tratamiento control hasta por encima de 70 por ciento con una concentración de 2 por ciento del complejo “Ultrazym 100G”. Esto significó un aumento de aproximadamente 26 por ciento en cuanto al rendimiento de extracción.

Schwartz *et al.* (2007) aplicaron dos complejos enzimáticos (“Pectinex” y “Olivex”) y una mezcla de ambos para facilitar la extracción del aceite de palta (*Persea Americana*). El mayor rendimiento se obtuvo con la mezcla de los complejos enzimáticos con el que se alcanzó el valor de 82,2 por ciento con una concentración de enzima de 0,06 por ciento. Se menciona además que las propiedades fisicoquímicas del aceite crudo son adecuadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en los siguientes establecimientos:

- Planta Piloto de Alimentos de la Facultad de Industrias Alimentarias.
- Laboratorio de Análisis Físicoquímico de la Facultad de Industrias Alimentarias
- Laboratorio de Instrumentación de la Facultad de Industrias Alimentarias

3.2 MATERIA PRIMA E INSUMOS

3.2.1 MATERIA PRIMA

Se utilizaron semillas secas de maracuyá provenientes de Sullana, Piura; las cuales fueron donadas por la empresa “Agrojugos”. Esta empresa envió un saco de 50 kg de semillas secadas al sol, las que provenían de un lote de maracuyá procesado en noviembre del 2012.

Por cada extracción, se emplearon aproximadamente 350 gramos de semillas tratadas.

3.2.2 ENZIMAS

Las enzimas empleadas se mencionan a continuación:

- Complejo multienzimático DELTAZYM® VRAC-100 (WeissBioTech)

Este complejo contiene una mezcla de enzimas con una actividad significativa de β -glucanasa y hemicelulasa. Estas enzimas fueron extraídas y purificadas a partir del microorganismo *Aspergillus niger*. El rango de pH de actividad de este complejo es entre

3-7; y temperatura de 40-70°C; mientras que las condiciones óptimas de actividad son pH 4,5 y temperatura 50-60°C (ver Anexo 1). En el presente trabajo, se utilizó un pH de 6 y temperatura de 55°C, ambos valores dentro del rango de actividad.

- Celulasa (Sigma Aldrich)

Celulasa extraída a partir de *Aspergillus niger*. Es posible determinar su actividad mediante el empleo de papel filtro o CMC como sustrato (ver Anexo 2 para mayor detalle). Se empleó una temperatura de 37°C y pH 6 durante su aplicación.

- Hemicelulasa (Sigma Aldrich)

Hemicelulasa purificada a partir de *Aspergillus niger*, cuya actividad β -galactasa puede ser determinada empleando goma de algarrobo como sustrato (ver Anexo 3 para mayor detalle). Se empleó una temperatura de 37°C y pH 6 durante su aplicación.

3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1 MATERIALES

- Balones esmerilados de 250 mL
- Balones Kjeldahl para digestión de proteínas
- Beakers de 50, 250 y 500 mL
- Bureta de 25 mL
- Campana desecadora
- Cápsulas de porcelana
- Embudo Buchner
- Erlenmeyers de 250 mL
- Papel filtro rápido y Whatman # 42
- Picnómetro con termómetro
- Pipetas de 5 y 10 mL
- Placas petri
- Probetas de 10, 50 y 100 mL

- Tamices
- Termómetro

3.3.2 EQUIPOS

- Balanza Analítica. Marca OHAUS. Mod. E12140.
- Balanza Digital de precisión. Marca OHAUS. Mod. TA 3001.
- Baño María. Marca MEMMERT. Mod. WNB14.
- Cromatógrafo de gases equipado con FID (Detector de Ionización de Flama). Marca: Perkin Elmer Autosystem XL.
- Estufa de convección forzada. Marca BINDER. Mod. FED 53.
- Estufa al vacío. Marca LABOR MUSZERIPARI. s/modelo.
- Equipo de filtración al vacío. S/M.
- Equipo Soxhlet de Laboratorio S.M.
- Mufla. Marca SXHIMAGEN.
- Potenciómetro. Marca HANNA INSTRUMENTS. Mod. HI 2211.
- Prensa Hidráulica. S/M. Presión hasta 100 000 kg.
- Refractómetro ABBE. Marca AUS JENA.
- Termómetro digital tipo punzón HANNA INSTRUMENTS. Mod. HI 145000.
- Computadora con software estadístico Statgraphics Centurion.

3.3.3 REACTIVOS

- Ácido acético glacial. Marca MERCK.
- Ácido bórico. Marca MERCK.
- Ácido clorhídrico concentrado. Marca MERCK.
- Ácido sulfúrico concentrado. Marca FERMONT.
- Alcohol etílico 95%. Marca MERCK.
- Almidón en polvo. Marca MERCK.
- Catalizador para proteínas. Marca MERCK.
- Cloroformo. Marca MERCK.
- Fenolftaleína. Marca MERCK.

- Metanol. Marca MERCK.
- Hexano de grado técnico. Marca MERCK.
- Hidróxido de sodio. Marca SIGMA-ALDRICH.
- Isooctano GR. Marca MERCK.
- P-anisidine. Marca RUICHEM.
- Reactivo de Wijs. Marca MERCK.
- Tetracloruro de carbono. Marca HI MEDIA.
- Yoduro de potasio. Marca SIGMA-ALDRICH.

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

La materia prima y el aceite fueron sometidos a los siguientes análisis:

3.4.1 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

a. Humedad

Se fundamenta en la pérdida de agua hasta peso constante, para lo cual se coloca en una estufa tal como se describe a continuación:

- Se pesó $5 \pm 0,2$ g de la muestra dentro de un plato de aluminio para humedad de capacidad 5 cm de diámetro y 2 cm de profundidad (previamente tarado) cogiéndolo firmemente con las pinzas.
- Se secó la muestra hasta peso constante en una estufa a 105°C hasta peso constante.
- Se enfrió la muestra en un desecador por 30 minutos y se pesó la muestra.
- Se reportó el % de pérdida de peso como humedad.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso de muestra}} \times 100$$

La muestra es digerida con ácido sulfúrico empleando sulfato de cobre pentahidratado como catalizador y sulfato de potasio para elevar el punto de ebullición, para liberar el nitrógeno a partir de la proteína y retener el nitrógeno como sal de amonio. Se agrega hidróxido de sodio al cincuenta por ciento para liberar el amoniaco, el cual es destilado y recogido en una solución de ácido bórico para luego ser titulado. Para transformarlo en

porcentaje de proteína bruta (peso/peso), se multiplica el porcentaje de nitrógeno obtenido por 6,25. El proceso seguido es el siguiente:

- Se pesó 1 g de muestra de semillas completamente seca y se colocó en un tubo de digestión.
- Se agregó el catalizador (5 g de sulfato de potasio y 0,5 g de sulfato de cobre), 5 mL de agua destilada y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocaron cinco perlas de ebullición.
- El equipo fue calentado hasta 230°C, donde se conecta el tubo de digestión con el sistema de neutralización en el que los gases formados son neutralizados con una solución de NaOH al 10%.
- Una vez evidenciada la formación de un color verde esmeralda en el fondo de los tubos, se deja digerir por 30 minutos.
- Apenas terminó la digestión, se retiraron los tubos y se enfriaron sin desconectar del sistema de neutralización.
- Luego los tubos se colocaron en un destilador que generó amoníaco, el cual es recogido en una solución de ácido bórico al 3%.
- Finalmente se titula con HCl 0,1 N y se empleó la siguiente ecuación para calcular el % de proteínas:

$$\% \text{ de proteínas} = \frac{(\text{Gasto}_{\text{HCl}} \times N_{\text{HCl}} \times 0,014)}{\text{Peso de la muestra}} \times 6,25$$

b. Grasa total (extracto etéreo)

La grasa es extraída de la muestra seca con la ayuda de solventes orgánicos, para lo cual se utiliza el equipo de extracción Soxhlet tal como se indica a continuación:

- Se pesó 5 g de las muestras de semillas completamente seca y se colocaron en los cartuchos de extracción. Previamente se pesó el balón de destilación del evaporador rotatorio.
- Este cartucho se colocó en el equipo Soxhlet y se vertieron 120 mL de éter de petróleo. Se activó el equipo y se mantuvo la extracción durante 2 horas de arrastre por solvente.

- El extracto se recogió en el balón de destilación y se procedió a evaporar hasta eliminar todo el éter de petróleo. El balón se colocó en una estufa durante 1,5 horas para eliminar residuos de éter. Luego se enfrió en un desecador.
- Su peso se cuantificó en una balanza analítica. Los diferentes pesos registrados se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{C - (B - A)}{C} \times 100$$

Donde:

A = Peso del balón de destilación limpio y seco.

B = Peso del balón de destilación con la grasa.

C = Peso de la muestra seca en gramos.

c. **Fibra cruda**

La fibra cruda es la pérdida por ignición del residuo seco que queda después de la digestión de una muestra con soluciones de 1,25% (p/v) de ácido sulfúrico y 1,25% (p/v) de hidróxido de sodio bajo condiciones específicas según se explica a continuación:

- Se pesó con aproximación de miligramos 2 gramos de la muestra desengrasada y seca. Se colocó en el matraz y adicionó 200ml de la solución de ácido sulfúrico en ebullición.
- Se colocó el condensador y llevó a ebullición por un minuto. Se dejó hervir exactamente por 30 min, manteniendo constante el volumen con agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas a las paredes.
- Se instaló el embudo Buchner con el papel filtro y precalentó con agua hirviendo. Simultáneamente y al término del tiempo de ebullición, retiró el matraz, dejó reposar por un minuto y filtró cuidadosamente usando succión. Se lavó el papel filtro con agua hirviendo.
- Se transfirió el residuo al matraz con ayuda de una piseta conteniendo 200ml de solución de NaOH en ebullición y deje hervir por 30 min como en paso 2.
- Se precalentó el crisol de filtración con agua hirviendo y filtró cuidadosamente después de dejar reposar el hidrolizado por 1 min.

- Se lavó el residuo con agua hirviendo, con la solución de HCl y nuevamente con agua hirviendo, para terminar con tres lavados con éter de petróleo. Se colocó el crisol en el horno a 105°C por 12 horas y enfrió en desecador.
- Se pesaron rápidamente los crisoles con el residuo y colocaron en la mufla a 550°C por 3 horas, se dejó enfriar en un desecador y pesados nuevamente. El cálculo de la fibra crida es:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Donde:

A = Peso del crisol con el residuo seco (g)

B = Peso del crisol con la ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

d. Cenizas

Es la cantidad de materia incombustible que sobra luego de someterla a calcinación en un equipo llamado mufla. Este procedimiento se menciona a continuación:

- Se tomaron unos 30 g de muestra de semillas y se dejaron en una estufa a 105°C hasta peso constante. Esta muestra se dejó enfriar durante media hora en un desecador.
- Se pesaron 5 g de semillas en una balanza analítica y colocaron en un crisol previamente tarado.
- El crisol y la muestra se colocaron en una mufla a 550°C durante 4 horas.
- Luego de la incineración, el crisol es enfriado durante una hora en un desecador y luego pesado en una balanza analítica.
- Los pesos obtenidos se reemplazan en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Donde:

A = Peso de crisol a peso constante con muestra seca (g)

B = Peso de crisol con cenizas (g)

C = Peso de la muestra seca (g)

e. **Fibra detergente ácido (FDA)**

Este método permite tener una aproximación del grado de digestibilidad de las fibras en el alimento. La muestra es digerida por medio de cetil-trimetil-amonio en ácido sulfúrico y el residuo es considerado como la fibra no digerible. El procedimiento aplicado es el siguiente:

- Se molió la muestra hasta pase la malla de 1 mm y se secó durante la noche en un horno a 105°C.
- Se pesó (con aproximación de miligramos) un gramo de la muestra seca (A) y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- Se adicionó 100 ml de la solución de detergente ácido y 2 ml del antiespumante.
- Después, se llevó rápidamente a ebullición (3 a 5 minutos) y continuó el calentamiento por 2 horas.
- Se filtró el contenido del matraz por gravedad en un crisol previamente pesado. Se enjuagó el matraz con agua destilada caliente y filtró también.
- Luego se enjuagó el contenido del crisol con 300 ml de agua destilada caliente. Use succión débil (por vacío).
- Posteriormente, se enjuagó el residuo con acetona y se secó. Se colocó el crisol en el horno a 105°C durante 12 horas.
- Por último se enfrió dentro de un desecador la muestra e inmediatamente después se determinó el peso (B).
- Los pesos determinados se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$\% FDA = \frac{A}{B} \times 100$$

f. **Fibra detergente neutro (FDN)**

Este método es útil para la determinación de fibras vegetales en alimentos. Aparentemente tiene la capacidad de separar los componentes nutricionales solubles de aquellos que no son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación biológica para su aprovechamiento. El método tiene limitaciones en su precisión cuando los valores de

proteína son muy altos y los valores de fibra son bajos. El procedimiento que se siguió es el que se muestra a continuación:

- Primero se pesó aproximadamente 1 g de muestra molida para pasar el tamiz de 1 mm y se depositó en un matraz de fondo redondo para iniciar el reflujo.
- Se agregaron en orden 100 ml de detergente neutro a temperatura ambiente y luego 2 ml de amilasa por muestra.
- Luego se calentó hasta que la solución hierva de 5 a 10 minutos. Se ajustó la temperatura para que la solución hierva suavemente y mantenga en reflujo por 60 minutos a partir del instante en que empieza a hervir.
- Después se agitó el matraz para suspender y decantó la muestra en un crisol previamente pesado y preparado para succión al vacío. Se pasó toda la muestra al crisol utilizando un mínimo de agua caliente (80°C) para el lavado del matraz. Se eliminó el vacío, se aflojó la capa de muestra en el fondo del crisol sin removerla y se agregó agua caliente, repitiendo el lavado varias veces. Finalmente se lavó dos veces con acetona sin remover la muestra del filtro y se secó con vacío.
- Se secaron los crisoles a 105°C durante 12 h y se pesaron en caliente.
- Se calcule el contenido celular (material soluble) substrayendo este valor de 100.

3.4.2 CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE

El aceite crudo obtenido fue sometido a los siguientes análisis fisicoquímicos:

a. Determinación y Cuantificación de ácidos grasos

Los triglicéridos y fosfolípidos fueron saponificados y metilados a la vez por reacción de las soluciones NaOH 2N y HCl 2N en metanol respectivamente. Los ácidos grasos metilados fueron inyectados al cromatógrafo de gases donde fueron separados al ser arrastrados por el gas hidrógeno que es el gas de arrastre a través de la fase estacionaria de la columna.

El procedimiento de este método es el que sigue:

- En un tubo de ensayo se introdujo aproximadamente 50 mg de aceite.

- Se agregó aproximadamente 2,5 mL de éter de petróleo y agitó en Vórtex hasta que se disolvió.
- Se agregó alrededor de 0,25 mL de NaOH 2N en metanol. Se agitó vigorosamente en Vórtex por 10 segundos.
- Se sumergió en baño maría a aproximadamente 50 ° C durante 20 segundos, se agitó 10 segundos en Vórtex.
- Se agregó alrededor de 0,30 mL de HCl 2N en metanol. Se agitó y luego esperó hasta que se separen las dos fases.
- Se separó la fase del éter de petróleo que contiene los ácidos grasos metilados con ayuda de una pipeta, y se introdujo en un vial de vidrio.
- Se colocó el vial en el Autosampler del cromatógrafo de gases y programó el equipo.

Las condiciones de análisis fueron:

- Temperatura del horno : 160°C - 230 ° C
- Temperatura del inyector: 250 ° C
- Temperatura del detector: 270 ° C
- Presión del hidrógeno: 5 psi
- Split: 100:1

La cuantificación de los ácidos grasos metilados se realizó mediante el software del equipo; y se reportó como porcentaje relativo. Los resultados proporcionados por el equipo (duplicado) se promediaron.

b. Gravedad específica

Se llevó a cabo utilizando picnometría de acuerdo a la siguiente metodología:

- Se pesó el picnómetro vacío (P_0), previamente secado en estufa y enfriado en un desecador, en una balanza analítica.
- Se pesó el picnómetro con agua destilada (P_1) a 20 °C en una balanza analítica.
- Se pesó el picnómetro con la muestra de aceite (P_2) a 20°C en una balanza analítica.
- Los pesos obtenidos fueron reemplazados en la siguiente fórmula:

$$\text{Gravedad Específica} = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0}$$

c. **Humedad y materia volátil**

Esta prueba se basa en la pérdida de peso del aceite hasta que su peso sea constante por la diferencia de temperaturas de ebullición entre el agua y los compuestos volátiles y el aceite, en donde se sometió la muestra a un calentamiento al vacío para conservar el aceite.

El procedimiento seguido es el siguiente:

- Se pesó $5 \pm 0,2$ g de la muestra dentro de un plato de aluminio para humedad de capacidad 5 cm de diámetro y 2 cm de profundidad (previamente tarado) cogiéndolo firmemente con las pinzas.
- Se secó la muestra hasta peso constante en una estufa al vacío a $30\text{ }^\circ\text{C}$ a una presión máxima de 100 mm Hg (13,3 kPa) durante 2 horas.
- Se enfrió la muestra en un desecador por 30 minutos y se pesó la muestra.
- Se reportó el % de pérdida de peso como humedad y materia volátil.

$$\% \text{ de Humedad y materia volátil} = \frac{\text{Pérdida en peso} \times 100}{\text{Peso de muestra}}$$

d. **Índice de acidez**

Consiste en cuantificar a los ácidos grasos libres presentes en la muestra, los cuales se forman por hidrólisis de los triacilglicéridos. Este valor se expresa como el número gramos de ácidos grasos libres contenidos en cien gramos de grasa. La metodología que se siguió fue la siguiente:

- Se pesó $5 \pm 0,2$ g de muestra dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 mL.
- Se calentó 50 mL de alcohol previamente neutralizado con 2 gotas de fenolftaleína.
- Se tituló con KOH 0,1 N hasta un ligero color rosa.
- Se anotó el gasto y reemplazó en la siguiente ecuación para determinar el índice de acidez:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{G \times N \times 56,1}{W}$$

Donde:

G = Gasto de KOH

N = Normalidad del KOH

W = Peso de la muestra en gramos

e. Índice de yodo

Es una medida de la insaturación de los ácidos grasos que componen el aceite o grasa. Se define como la cantidad de gramos de yodo que son absorbidos por cien gramos de muestra. Se adicionó en exceso el halógeno para que una parte reaccione con la muestra y el resto en la titulación con tiosulfato de sodio, mediante el uso almidón como indicador, lo cual es descrito a continuación (Método de Wijs):

- Se pesó de 0,1 a 0,5 g de aceite en un matraz Erlenmeyer con tapa.
- Se añadió 20 mL de tetracloruro de carbono y 25 mL de reactivo de Wijs.
- Se dejó en reposo 30 minutos a oscuras.
- Se añadió 20 mL de solución de yoduro de potasio al 15% y 100 mL de agua destilada, se agitó.
- Se tituló con solución de tiosulfato de sodio 0,1 N; empleando 0,5 mL almidón como indicador hasta que se consiguió desaparecer el color azul.
- Simultáneamente hizo la prueba en blanco. El cálculo fue el siguiente:

$$\text{Índice de Iodo} = \frac{(B - M) \times N \times 12,69}{W}$$

Donde:

M = mL de solución de tiosulfato en la muestra.

B = mL de la solución de tiosulfato en el blanco.

N = Normalidad de la solución de tiosulfato.

W = Peso de la muestra en gramos

f. Índice de peróxido

Es una medida del contenido de oxígeno activo presente en una muestra de aceite o grasa. Se basa en la determinación de las sustancias que oxidan al yoduro de potasio bajo las condiciones de la prueba, tal como se señala en el método 965.33 AOAC (2007). Esta medida se expresa como el número de miliequivalentes de oxígeno activo por mil gramos de muestra, el procedimiento es descrito a continuación:

- Se pesó 5 g de muestra de aceite en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Se adicionó 30 mL de mezcla de ácido acético – cloroformo y se agitó por rotación hasta formar la disolución.
- Se agregó 0.5 mL de solución de yoduro de potasio saturado.
- Después de exactamente un minuto se añadieron 30 mL de agua.
- Se tituló el yodo liberado con el tiosulfato de sodio 0,1 N hasta que desaparezca el color azul. Los datos obtenidos se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de Peróxidos} = \frac{(S - B) \times N \times 1000}{W}$$

Donde:

S = mL de solución de tiosulfato en la muestra.

B = mL de la solución de tiosulfato en el blanco.

N = Normalidad de la solución de tiosulfato.

W = Peso de la muestra en gramos

g. Índice de anisidina

Es una medida de la formación de compuestos de oxidación secundarios. Se basa en la determinación espectrofotométrica de una base de Schiff formada entre este reactivo y los grupos carbonilos de los compuestos de oxidación. El método se describe a continuación:

- Se pesó 1g de muestra, y transfirió a un balón aforado de 25 ml. Posteriormente se diluyó al volumen Iso-octano.
- Se midió la Absorbancia (Ab) de la solución a 350 nm usando como blanco el solvente.

- Se pipeteó exactamente 5 ml de la solución con grasa o aceite dentro de un tubo de ensayo y exactamente 5 ml del solvente dentro de un segundo tubo de ensayo.
- Se agregó exactamente 1 ml del reactivo de p-Anisidina a cada tubo, taparlos y agitar vigorosamente.
- Después de exactamente 10 minutos se midió la Absorbancia (As) del primer tubo de ensayo a 350 nm, utilizando la solución del segundo tubo como blanco de referencia.
- El índice o valor de Anisidina (IAN) se calculó por la fórmula:

$$IAN = \frac{25 \times (1,2As - Ab)}{m}$$

Donde:

As = Absorbancia de la solución de grasa después de la reacción con el reactivo (p-Anisidina)

Ab = Absorbancia de la solución de grasa.

m = masa, en g de la muestra de aceite o grasa.

h. Índice de refracción

Mide el cambio de dirección que experimenta un haz de luz al pasar a través del material a evaluar. Se determinó mediante un refractómetro de ABBE siguiendo los siguientes pasos:

- Se colocaron dos gotas del aceite limpio (centrifugado) a 20°C sobre la plataforma para muestras.
- Posteriormente se regula la intensidad de luz con el espejo.
- Se toma la medida visualizada a través del ocular del equipo.

i. Color

Se determinó espectrofotométricamente según la metodología descrita a continuación:

- Se ajustó la temperatura del aceite limpio entre 25-30°C y llevó a una cubeta empleando una suficiente cantidad de muestra.

- Se colocó la cubeta en el espectrofotómetro y determinó la absorbancia a 460, 550, 620 y 670 nm.
- Los valores arrojados por el equipo son reemplazados en la siguiente ecuación:

$$\text{Color fotométrico} = 1,29A_{460} + 69,7A_{550} + 41,2A_{620} - 56,4A_{670}$$

3.5 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.5.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este trabajo se buscó comparar los rendimientos entre la extracción mecánica del aceite asistida y no asistida por enzimas con el fin de demostrar si la optimización es efectiva. Para demostrar este hecho, se muestra la metodología que se empleó:

- Materia Prima.** Se utilizaron semillas de maracuyá con un porcentaje humedad aproximado de 4 por ciento.
- Selección.** Las semillas de maracuyá fueron seleccionadas y se eliminaron aquellas en mal estado (partidas).
- Lavado.** En esta operación se procedió a separar a las semillas de las impurezas (restos de tallos, piedras, hojas secas, etc.) y que pudieran encontrarse entre las semillas, además de restos de pulpa impregnados en la superficie de estas.
- Secado I.** Esta operación unitaria tuvo el objetivo de reducir la humedad de la materia prima lavada como método de conservación. Se llevó a cabo en un secador de bandejas a 60°C.
- Tratamiento térmico.** Los principales objetivos de esta operación fueron coagular las proteínas de la semilla (esta coagulación provoca una mayor permeabilidad al flujo del aceite), disminuir la afinidad del aceite a la superficie de los sólidos y aglomerar el aceite en gotas más grandes (Shahidi, 2005). Este mismo autor menciona que los objetivos secundarios de esta operación son reducir la humedad hasta un nivel óptimo para la posterior extracción, insolubilizar fosfátidos y otras impurezas indeseables y reducir la

carga microbiana. Se empleó una estufa a 100°C en la que se colocaron las semillas hasta que estas alcancen unos 80°C.

f. Molienda. La extracción del aceite de una semilla oleaginosa se realiza mucho más rápidamente cuando la semilla se somete a una trituración previa o una laminación.

El aceite está contenido en una infinidad de células, y la rotura de estas células se puede realizar sólo por una fuerte compresión sobre la semilla. Se ha confirmado que aún después de una fuerte trituración o laminación de las semillas hay todavía células que no se rompen, de ahí la dificultad de poder extraer la totalidad del aceite presente en la semilla. Para esta operación, se usó un molino de discos hasta conseguir un tamaño de partícula menor a 0,5 mm tal como lo utilizó Guerra y Zúñiga (2003).

g. Tratamiento enzimático. En esta operación unitaria, se sometieron a las semillas previamente acondicionadas según las variables que se manipulará (tipo de enzima a emplear, concentración de la enzima, relación materia prima: agua y tiempo de hidrólisis). El objetivo de este tratamiento es degradar las paredes celulares para que se libere el aceite más fácilmente y de esta manera el rendimiento de extracción aumente.

Se llevó a cabo en un equipo de baño maría para que la temperatura se mantenga constante durante todo el tratamiento. El pH de la materia prima acondicionada es de aproximadamente 6, la cual se encuentra dentro del rango de acción de las enzimas empleadas (ver Anexo 1, 2 y 3), por lo que el pH se considerará un parámetro. La temperatura del medio dependerá del tipo de enzima empleado (Deltazym VRAC-100: 55°C, Celulasa y Hemicelulasa: 37°C). Los factores a evaluar son el tipo de enzima, concentración de enzima, relación MP: agua y el tiempo de hidrólisis.

h. Inactivación enzimática. Una vez que el tratamiento enzimático concluyó, se procedió a inactivar las enzimas mediante la aplicación de calor hasta que las semillas tratadas alcancen una temperatura de 80°C en una estufa a 100°C.

i. Secado II. El objetivo de esta operación fue llevar la pasta que se forma luego del tratamiento enzimático a una humedad adecuada para su posterior extracción en la prensa hidráulica, por lo que la pasta se colocará en una estufa.

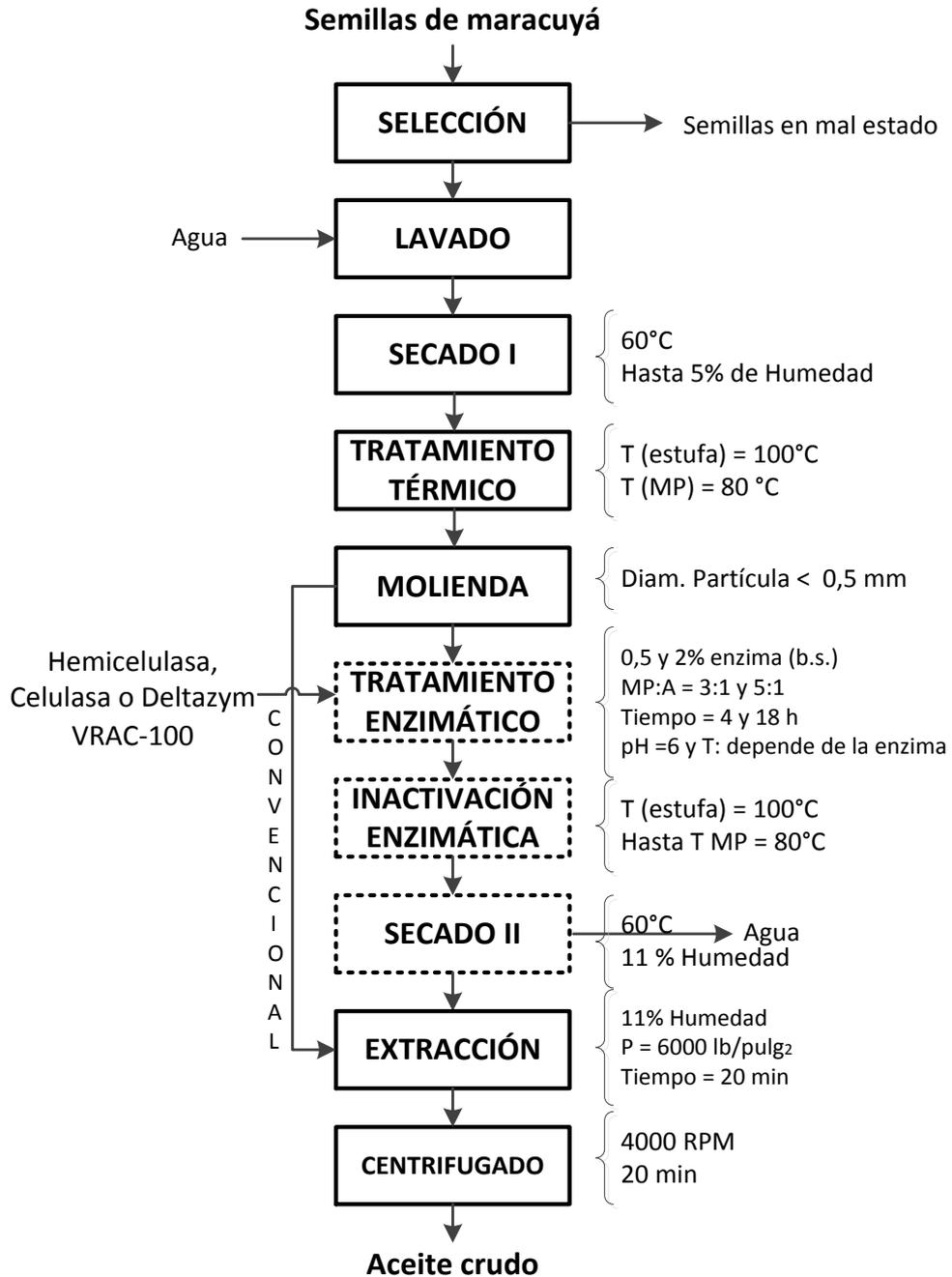


Figura 2: Diagrama de flujo para la extracción de aceite crudo de las semillas de maracuyá mediante el método mecánico convencional

Bernardini (1981) señala que se debe alcanzar una humedad de 11% para la extracción. Taha y Hassanein (2007) aplicaron una temperatura de 60 °C para secar sus muestras como operación previa al tratamiento enzimático.

j. Extracción mecánica. Esta operación consistió en someter a las semillas tratadas a fuerzas de compresión (prensa hidráulica) con el fin de que éstas liberen el aceite deseado. La presión alcanzada es de alrededor de 6000 lb/pulg² por 20 minutos. Se eligió esta presión debido a que el equipo a utilizar no soporta una presión mayor a esta. Además Zúñiga *et al.* (2003) menciona que aplicó presiones en el rango de 1700 – 5700 lb/pulg² con una prensa hidráulica para laboratorio similar con la que se cuenta en la Planta Piloto de Alimentos.

En esta etapa también se acondicionará la humedad de las semillas. Bernardini (1981) menciona que la humedad adecuada para la extracción mecánica es de 11 por ciento. El equipo a utilizar es una prensa hidráulica de 0,5 kg de capacidad por batch.

k. Centrifugación. La centrifugación se realizó con el objetivo de separar el aceite crudo de restos de partículas y de humedad absorbida por las semillas en el tratamiento térmico.

Esta operación se llevó a cabo a 4000 r.p.m. durante 15 minutos tal como lo realizaron Badr y Sitohy (1992).

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Los tres factores a evaluar presentaron variables continuas con las que es posible aplicar la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para optimizar esta operación. Esta se divide en las siguientes fases:

a. Screening: Se procedió a identificar todos los factores que puedan afectar el rendimiento de extracción del aceite en el tratamiento enzimático. Estos factores se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6: Niveles de los factores que intervienen en el tratamiento enzimático

Factor Natural	Símbolo	Niveles de factores codificados (X _i)	
		-1	1
Tipo de enzima	-	-	-
Concentración de la enzima	x ₁	0,5	2
Relación MP: Agua	x ₂	3	5
Tiempo de reacción	x ₃	4	18

Para pasar del nivel del factor codificado (X_i) al factor natural (x_i), se procede según las siguientes ecuaciones: (I): $x_1 = 1,25 + 0,75X_1$; (II): $x_2 = (2X_2+3):1$; (III): $x_3 = 11 + 7X_3$

Para establecer los valores de los niveles que se presentan en el cuadro anterior, se tomó como referencia la investigación realizada por Badr y Sitohy (1992), quienes utilizaron un modelo de primer orden para optimizar la extracción enzimática de aceite de semillas de girasol. Además de los tres factores presentados, se consideró al “tipo de enzima” como un factor que afecta el rendimiento de extracción. Luego de la identificación de los factores, se procedió a determinar la significancia de estos a través del planteamiento de un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial.

b. Maximización del rendimiento: Se utilizó un Diseño Central Compuesto (DCC) para determinar las condiciones óptimas de operación en el tratamiento enzimático.

c. Validación de la maximización: Se procedió a llevar a cabo la extracción aplicando los niveles optimizados de los factores evaluados y obtener el rendimiento optimizado experimental para ser comparado con el valor predicho por el modelo matemático.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

En la primera etapa de la investigación, se caracterizó a la materia prima con el objetivo de En la Figura 3, se presenta el análisis químico proximal de las semillas de maracuyá.

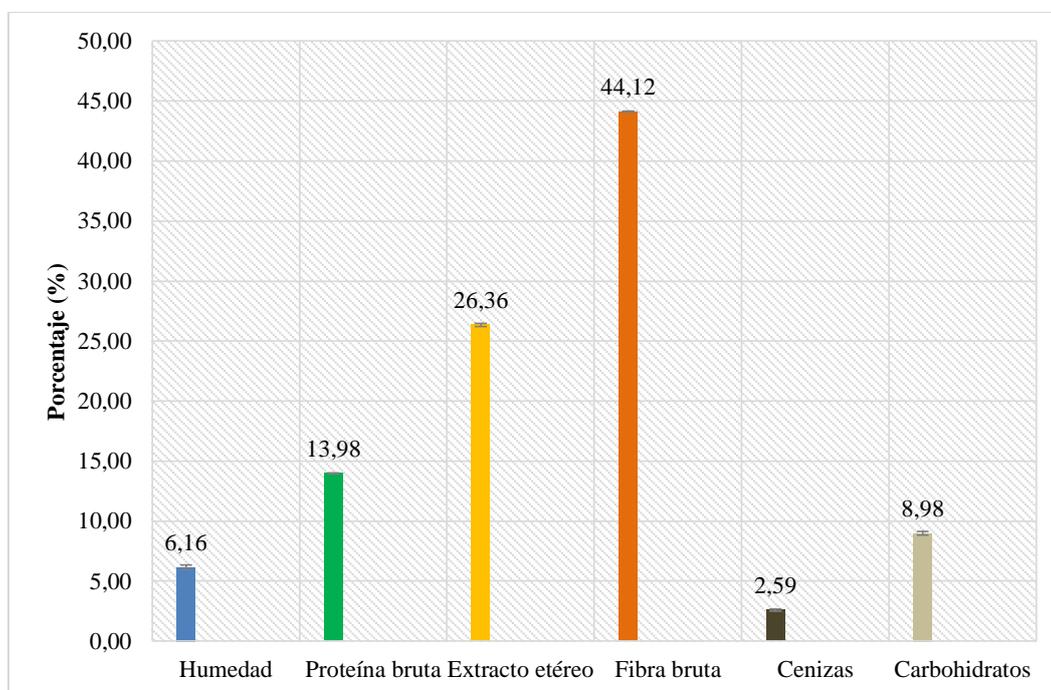


Figura 3: Análisis químico proximal de las semillas de maracuyá (% base seca)

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 3 y Anexo 4, se puede apreciar que la semilla de maracuyá presenta valor de fibra ($44,12 \pm 0,03\%$ b.s.), más bajo que el reportado por López y Morales (1982) y Chau y Huang (2004) que indican valores de $56,01\%$ (b.s.) y $64,8\%$ (b.s.) respectivamente. El valor del contenido de fibra obtenido experimentalmente es casi la mitad del peso seco de la semilla, por lo que este componente se encuentra en una importante cantidad. Chau y Huang (2004) mencionan que actualmente se considera a

la fibra como un componente funcional ya que reduce el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y obesidad.

Respecto al contenido de extracto etéreo (grasa) la semilla de maracuyá presenta un valor ($26,36 \pm 0,13\%$ b.s.), ligeramente superior al reportado por Chau y Huang (2004), López y Morales (1982), que indican valores de 24,5%, y 25,14% (b.s.) respectivamente y valor inferior al reportado por Malacrida y Neuza (2012) que indican un valor de 30,39% (b.s.) El valor de contenido de aceite es ligeramente superior al de la soya (18-20%) y algodón (18-20%), tal como lo reporta O'Brien (2009), las cuales son oleaginosas altamente comercializadas a nivel mundial; por lo que esta oleaginosa puede ser fácilmente procesada de acuerdo a su contenido de óleo.

Referente al valor de ceniza de la semilla de maracuyá presento valor de ($2,59 \pm 0,09\%$ b.s.) al más alto que el reportado por Malacrida y Neuza (2012), Chau y Huang (2004), y por López y Morales (1982) que indican valores de 1,27%, 1,34% y 1,52% (b.s.) respectivamente. Esta diferencia puede deberse a la procedencia de la semilla y los factores que afectaron su cultivo, tales como condiciones climáticas, tipo de suelo, tipo de manejo agronómico empleado, etc.

El porcentaje de humedad la semilla de maracuyá presenta un valor de ($6,16 \pm 0,20\%$), el cual es ligeramente superior al reportado por Pruthi (1962), citado por López y Morales (1982) que indica 4,93% y valor inferior al reportado por Malacrida y Neuza (2012), Chau y Huang (2004), que indican valores de 7,38%, y 6,60% respectivamente.

Respecto al porcentaje de proteína, la semilla de maracuyá presenta valor de $13,98 \pm 0,04\%$ b.s., valor superior al reportado por Malacrida y Neuza (2012), Chau y Huang (2004), López y Morales (1982), que indican valores de 12,23%, 8,25%, y 11,63% b.s. , respectivamente. Otras oleaginosas como la soya presentan valores muy superiores (40,3% según Domínguez *et al.*, 1995) de proteína; sin embargo, la soya es una leguminosa, razón por la que su contenido proteico es elevado. Otras semillas como la onagra, presentan valores similares de proteína (15,6% según Collao *et al.*, 2007).

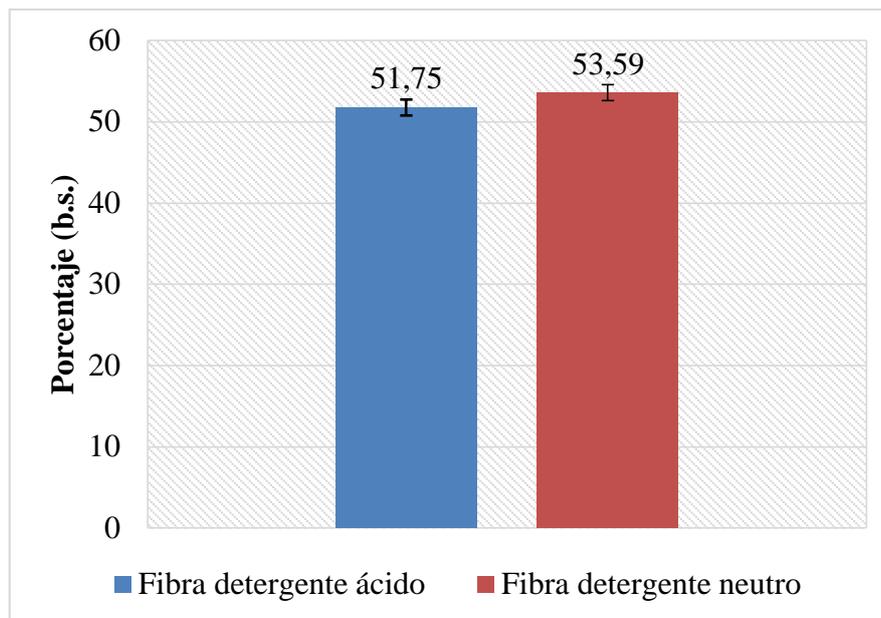


Figura 4: Fibra detergente ácido (FDA) y neutro (FDN) en las semillas de maracuyá (%p/p) (base seca)

Los valores de fibra detergente ácido (FDA) y neutro (FDN) mostrados en la Figura 4 indican que en las semillas de maracuyá existe una alta cantidad de celulosa y lignina (fibra detergente ácido) mientras que la hemicelulosa, que es la diferencia entre la FDN y FDA, tan solo representa el 1,73%. Chau y Huang (2004) encontraron un valor de 64,1% de fibra dietaria insoluble, que además de la celulosa, hemicelulosa y lignina, incluye a la familia de las pectinas.

4.2 EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

4.2.1 SCREENING

En esta primera fase, se evaluaron los factores que según Domínguez *et al.* (1994) afectan normalmente al tratamiento enzimático previo a la extracción: concentración de enzima (0,5 y 2%), relación materia prima: agua (5:1 y 3:1) y tiempo de hidrólisis (4 y 18 horas). Además se consideró al tipo de enzima (Deltazym VRAC-100, celulasa y hemicelulasa) como variable cualitativa independiente.

Los resultados de las pruebas realizadas en la etapa de *Screening* se muestran en la Figura 5 y Anexo 5, los cuales corresponden a evaluaciones por triplicado según las condiciones expresadas en la Figura 2.

a. Extracción convencional

Chau y Huang (2004) reportan un contenido de lípidos de 24,5% (b.s.) para las semillas de maracuyá. En la presente investigación el contenido encontrado en las semillas fue de 26,36% (b.s.). En la Figura 5, se observa que el rendimiento obtenido con la extracción sin tratamiento enzimático (convencional) alcanza aproximadamente un 11,87% (b.s.). Con este valor de rendimiento, se calculó la eficiencia de la extracción (% de aceite extraído respecto al aceite total), la cual fue de 45,03%, lo que significa que con este método de extracción se logró obtener menos de la mitad del contenido total del aceite en las semillas de maracuyá.

Soto *et al.* (2007) extrajo aceite de las semillas de borraja por prensado en frío. Durante la extracción, trabajó con una presión de 49 MPa durante 20 min y una humedad de las semilla de 11%. Con estos niveles, lograron una eficiencia de extracción promedio de 77,7%. Así mismo Anwar *et al.* (2013) obtuvieron una eficiencia promedio de 72,3% al extraer aceite de las semillas de linaza trabajando a una presión de máxima de 49 MPa durante 20 min. Además Collao *et al.* (2007) extrajeron aceite de las semillas de onagra por prensado en frío (44,1 MPa, 45 min y 10% de humedad de las semillas) y obtuvieron una eficiencia promedio de 60,7%. Zúñiga *et al.* (2003) aplicaron un prensado en frío para extraer aceite de las semillas de avellanas con una presión máxima de 39,2 MPa por 15 min, con el que obtuvieron un 58% de eficiencia promedio. Todas las eficiencias mencionadas anteriormente son superiores al obtenido en esta investigación (45,03%), trabajando con una presión de 41,4 MPa (6000 psi), 15 min de tiempo de prensado y 11% de humedad de las semillas. Esta diferencia puede deberse al tipo de semilla empleada, al acondicionamiento de la misma y al equipo empleado para la extracción. Otros autores como Malacrida y Jorge (2012) reportan rendimientos de extracción del aceite de semillas de maracuyá de 30,39% (b.s.) utilizando solventes.

b. Extracción con asistencia de enzimas

En la Figura 5 y Anexo 5 se muestran los resultados de las extracciones (rendimiento p/p en base seca) mediante la aplicación de enzimas para mejorar la extracción. Antes de proceder con el Análisis de Varianza, se llevaron a cabo las pruebas de Normalidad (p-valor > 0,05) y Homogeneidad de Varianzas (p-valor > 0,05), mostradas en el Anexo 6a y

6b respectivamente, a partir de lo que se puede concluir que se cumplen con estos supuestos, por lo que una estadística paramétrica es aplicable en el análisis de los efectos de los factores trabajados.

b.1 Efecto de la “concentración de enzima” sobre el Rendimiento

En el caso del factor “concentración de enzima”, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que no presenta diferencias significativas dentro de sus niveles a un nivel de confianza de 95% (p -valor $> 0,05$), en consecuencia trabajar con 0,5 o 2% de enzima serán estadísticamente equivalentes a un nivel de confianza del 95%, tal como se aprecia en el Análisis de varianza en el Anexo 6c.

Guerra & Zúñiga (2003) y Latif & Anwar (2008) emplearon y recomiendan una concentración de enzima máxima de 2% por razones económicas. Sin embargo, Domínguez *et al.* (1994) mencionan que el nivel óptimo de dosis varía respecto al tipo de enzima que se emplea y del tipo de matriz alimentaria a la que se aplica la enzima.

Zúñiga *et al.* (2003) evaluaron el efecto de la concentración de enzima (0; 0,5; 1; 1,5 y 2%) sobre la eficiencia de extracción del aceite de semillas de avellana. Estos autores mencionan que con el nivel de 1% obtuvieron los mayores rendimientos aplicando mezclas de enzimas (celulasas y pectinasas).

b.1 Efecto de la “relación MP: agua” sobre el Rendimiento

Según el Anexo 6c, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el factor MP: agua no presenta diferencias significativas en sus niveles (p -valor $> 0,05$) a un nivel de confianza del 95%, por lo que es indiferente trabajar a un nivel de este factor de 3:1 o 5:1.

Montedoro & Petruccioli (1973) citado por Domínguez *et al.* (1994) mencionan que el nivel de humedad mínimo en general para que la actividad enzimática sea considerable es de 35%. Con los niveles de relación MP: agua trabajados se alcanza una humedad mínima de aproximadamente 16,7% (MP: agua = 5:1), por lo que según los autores mencionados no se cumpliría con el nivel de humedad mínimo; no obstante, mediante las pruebas preliminares llevadas a cabo antes de esta investigación se determinaron los niveles trabajados.

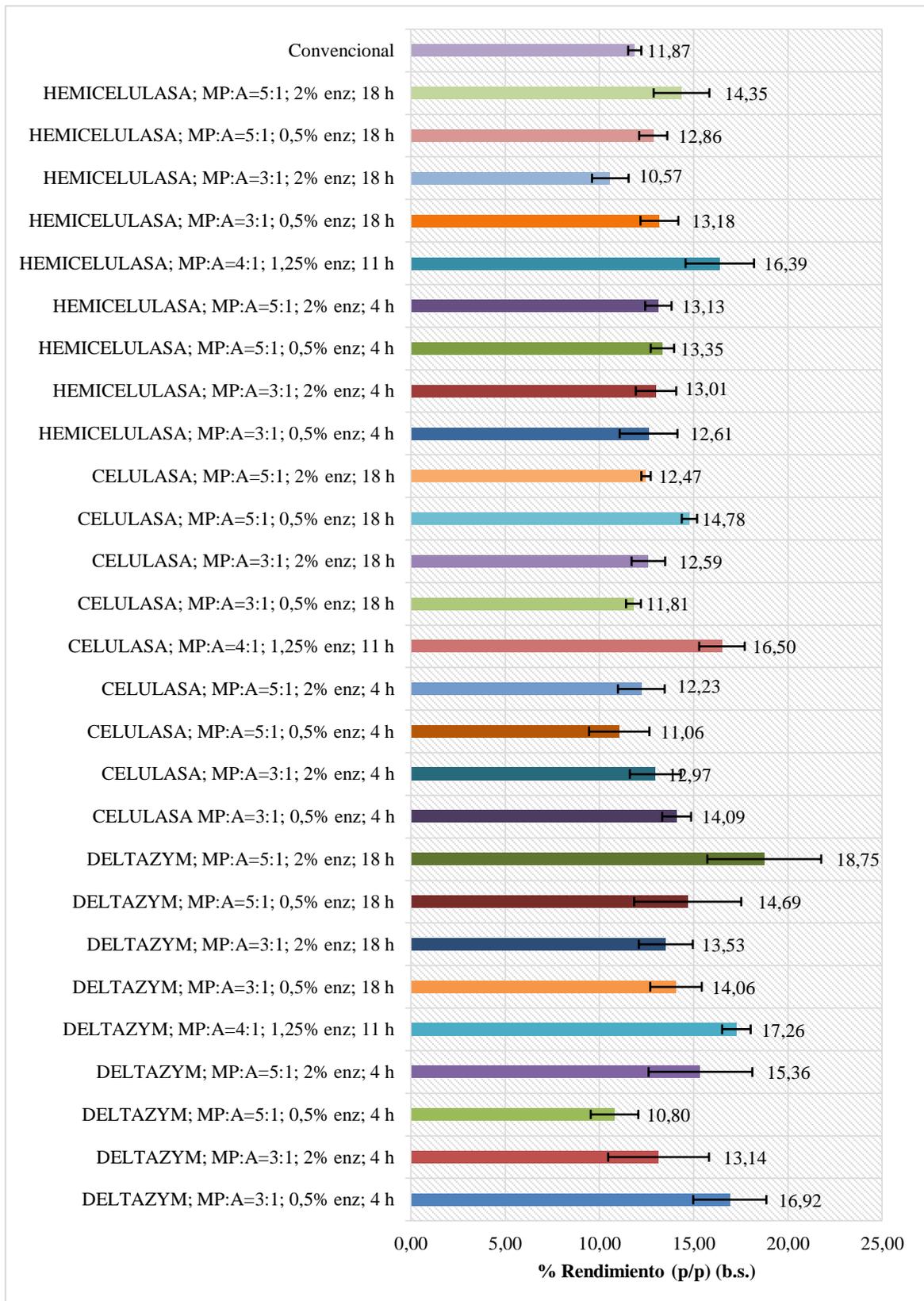


Figura 5: Rendimientos promedio (peso/peso) de la extracción convencional y con asistencia de enzimas del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*) (base seca)

Además en la Tabla de Mínimos Cuadrados Medios del Anexo 6d, se aprecia que el rendimiento promedio global para el nivel 5:1 es ligeramente mayor al nivel 3:1 (13,6 y 13,2 % p/p respectivamente).

Soto *et al.* (2007) evaluaron el efecto la humedad durante el tratamiento enzimático. Estos autores indican que las mejores eficiencias de extracción se obtienen al mantener una humedad de 20% (MP: agua \approx 4:1) y 9 horas de tratamiento con 0,25% de un mix enzimático con la cual obtuvieron un 85,5% de eficiencia en el aceite de semillas de borraja.

En el caso del aceite de avellana, Zúñiga *et al.* (2003) comprobó que un nivel de humedad de 45% (MP: agua \approx 1:1) genera una eficiencia máxima de 74% cuando aplicó un mix enzimático compuesto de actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa.

b.2 Efecto del “tiempo de hidrólisis” sobre el Rendimiento

En cuanto al factor “tiempo de hidrólisis”, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que no presenta diferencias significativas (p -valor $> 0,05$) dentro de sus niveles con un 95% de confianza, a partir de esto se deduce que estadísticamente es indiferente tener un tiempo de hidrólisis de 4 o 18 horas. (ver Anexo 6c)

Diversos autores como Domínguez *et al.* (1994), Rosenthal *et al.* (1996); Sineiro *et al.*, (1998b) mencionan que generalmente los tratamientos enzimáticos tienen una duración entre 0,25 – 2 h, con lo que se consiguieron aumentos de rendimientos de máximo 15% (respecto al tratamiento control). En contraste, Passos *et al.* (2009) aplicó tratamientos de hasta 120 horas con lo que consiguió aumentos de rendimiento (% rendimiento de extracción con tratamiento enzimático respecto al rendimiento convencional) de hasta 163% en semillas de uva tratadas con una extracción acuosa. En la presente investigación, el nivel máximo de tiempo es de 18 horas, con lo cual se consiguió un aumento de rendimiento 14,6 % al comparar el promedio de 18horas (ver Anexo 6d) respecto al promedio del tratamiento convencional.

b.3 Efecto del “tipo de enzima” sobre el Rendimiento

Respecto a los tratamientos donde se aplica el tratamiento enzimático, según el Análisis de Varianza para el rendimiento en peso/peso (b.s.) mostrado en el Anexo 6c, se puede apreciar que de los cuatro efectos principales (factores), el único que presenta diferencias significativas dentro de sus niveles es el tipo de enzima para un nivel de confianza de 95%, ya que el p-valor es menor a 0,05.

Según la Figura 5, se puede observar que se trabajó con 3 enzimas/complejos enzimáticos. Se puede apreciar que en general los rendimientos en los que se aplica el complejo enzimático Deltazym son estadísticamente superiores (p-valor < 0,05) a los rendimientos de las otras enzimas a un nivel de confianza de 95% (ver Anexo 7). Esto se debe a que el complejo es una mezcla de celulasas y hemicelulasas que actúan en conjunto y mejoran notablemente la extracción a diferencia de la performance de las enzimas que actúan individualmente. Domínguez *et al.* (1994) mencionan que las células vegetales que constituyen las semillas oleaginosas están compuestas por una serie de compuestos orgánicos, como celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas; por lo que un tratamiento que incluya un mix enzimático será más efectivo. Además de este hecho, según la Figura 4, la cantidad de fibra detergente ácida y neutra indica que existe una gran cantidad de celulosa y lignina y una pequeña parte de hemicelulosa. Estos compuestos son el sustrato del complejo enzimático con el que se obtuvieron los mayores rendimientos.

Por los motivos expuestos, el tratamiento con el mayor rendimiento fue: Deltazym VRAC-100, con una relación MP: agua = 5:1, concentración de enzima 2% y tiempo de hidrólisis de 18 horas con el que se obtuvo 18,75% (p/p) (b.s.) de rendimiento (ver Anexo 8) y una eficiencia de extracción de 71,13%. Por lo tanto, se eligió trabajar con el complejo Deltazym VRAC-100 para la siguiente etapa (optimización) por los mayores rendimientos que se obtuvieron al ser aplicado en el tratamiento enzimático.

4.2.2 MAXIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO

En la etapa anterior se eligió trabajar con el complejo enzimático Deltazym VRAC, ya que los rendimientos de extracción obtenidos al aplicarlo en el tratamiento enzimático fueron significativamente superiores. En esta etapa se aplicó un Diseño Compuesto Central (DCC) 2^3 + puntos estrella + puntos centrales (ver Anexo 9 para mayor detalle), donde los factores

a evaluar fueron tres: concentración de enzima, relación materia prima: agua y tiempo de hidrólisis.

Los resultados de las evaluaciones realizadas se encuentran en el Anexo 10. Algunos tratamientos presentaron niveles negativos, estos niveles se consideraron nulos (valor cero), en consecuencia se trabajó como si no se aplicara el tratamiento enzimático (extracción convencional).

En el Anexo 11 se puede apreciar el Análisis de Varianza para el rendimiento. Se observa que a un nivel de confianza de 95%, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el factor “Concentración de enzima” y “Relación MP: agua” no tienen un efecto significativo sobre el Rendimiento (p -valor $> 0,05$). Sin embargo, existe suficiente evidencia estadística con un 95% de confianza para afirmar que el factor “Tiempo de hidrólisis” sí tiene un efecto significativo sobre el Rendimiento (p -valor menor a $0,05$).

En la Figura 6, se pueden apreciar las gráficas de Superficie de Respuesta estimadas para lograr maximizar el Rendimiento de extracción. Este tipo de gráficas se emplean para visualizar si es posible encontrar una variable respuesta óptima, la que se visualiza como un vértice. Este punto no es encontrado en la Figura 6, por lo cual es posible manifestar que no existe un valor óptimo para el rendimiento, sino que se obtuvo una respuesta predicha maximizada.

Asimismo, en la Figura 7 se observan las gráficas de Contornos para los diferentes factores empleados. Estas gráficas también se emplean para visualizar las respuestas optimizadas; sin embargo, al igual que en las gráficas de superficie, no se pudieron encontrar estos valores, que se observan como un punto entre los contornos.

En el Anexo 12 se observan los niveles óptimos de cada factor evaluado, los cuales son: concentración de enzima=1,95%, relación MP: agua=5,68:1 y tiempo de hidrólisis=22,8 horas; con los que se puede alcanzar un rendimiento de 24,5 % (p/p) (b.s.).

El software Statgraphics Centurion también brinda el modelo estadístico que relaciona los niveles de los factores que afectan al Rendimiento, el cual es un modelo de segundo orden que se ajusta con un R-cuadrado de 75%. Este modelo se muestra en el Anexo 12.

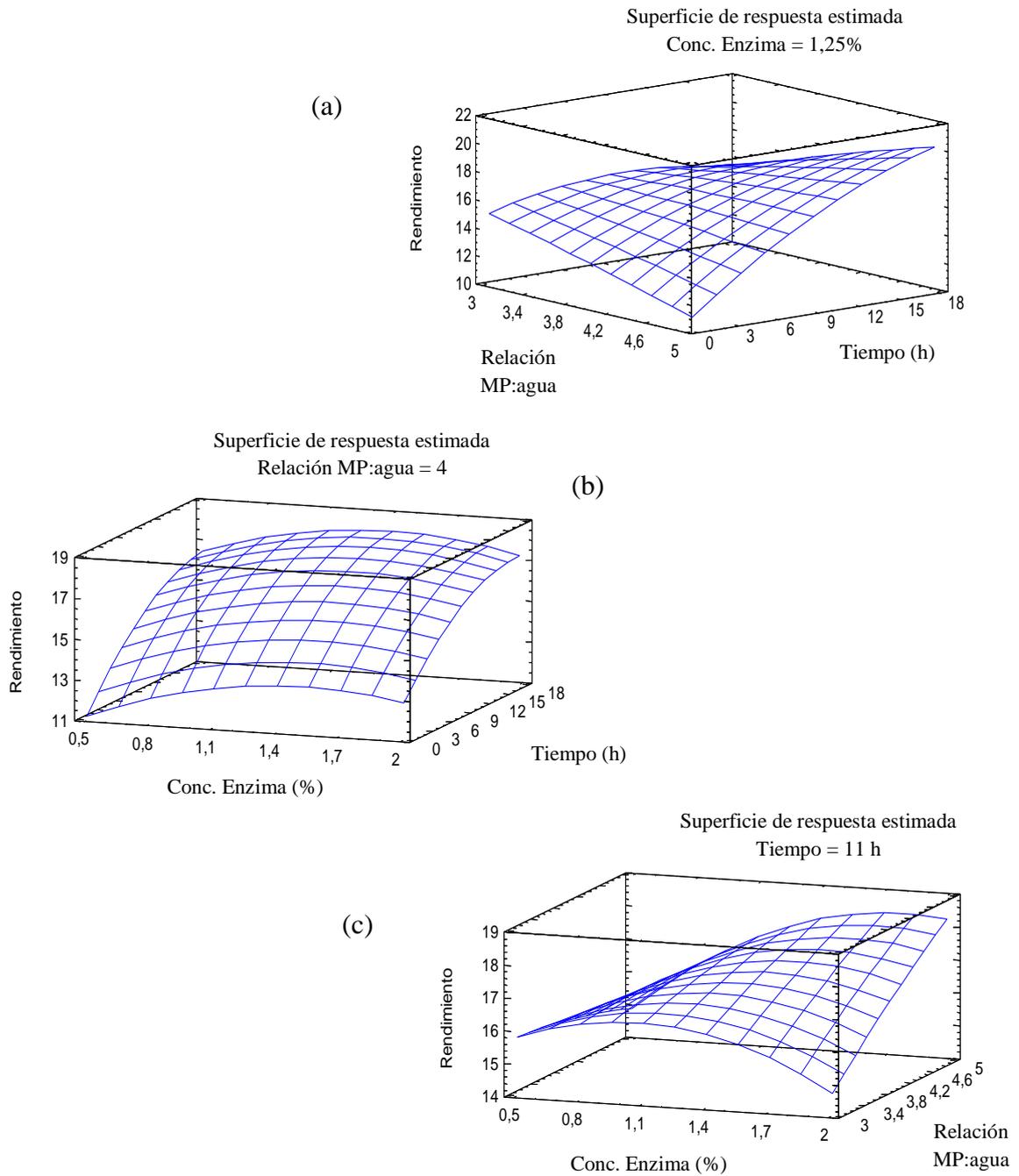


Figura 6: Gráficas de Superficie de Respuesta para la maximización del Rendimiento de extracción del aceite de las semillas de maracuyá aplicando Deltazym VRAC-100. (a) Gráfica que relaciona la relación MP: agua y el tiempo. (b): Gráfica que relaciona la concentración de enzima y el tiempo. (c): Gráfica que relaciona la concentración de enzima y la relación MP: agua.

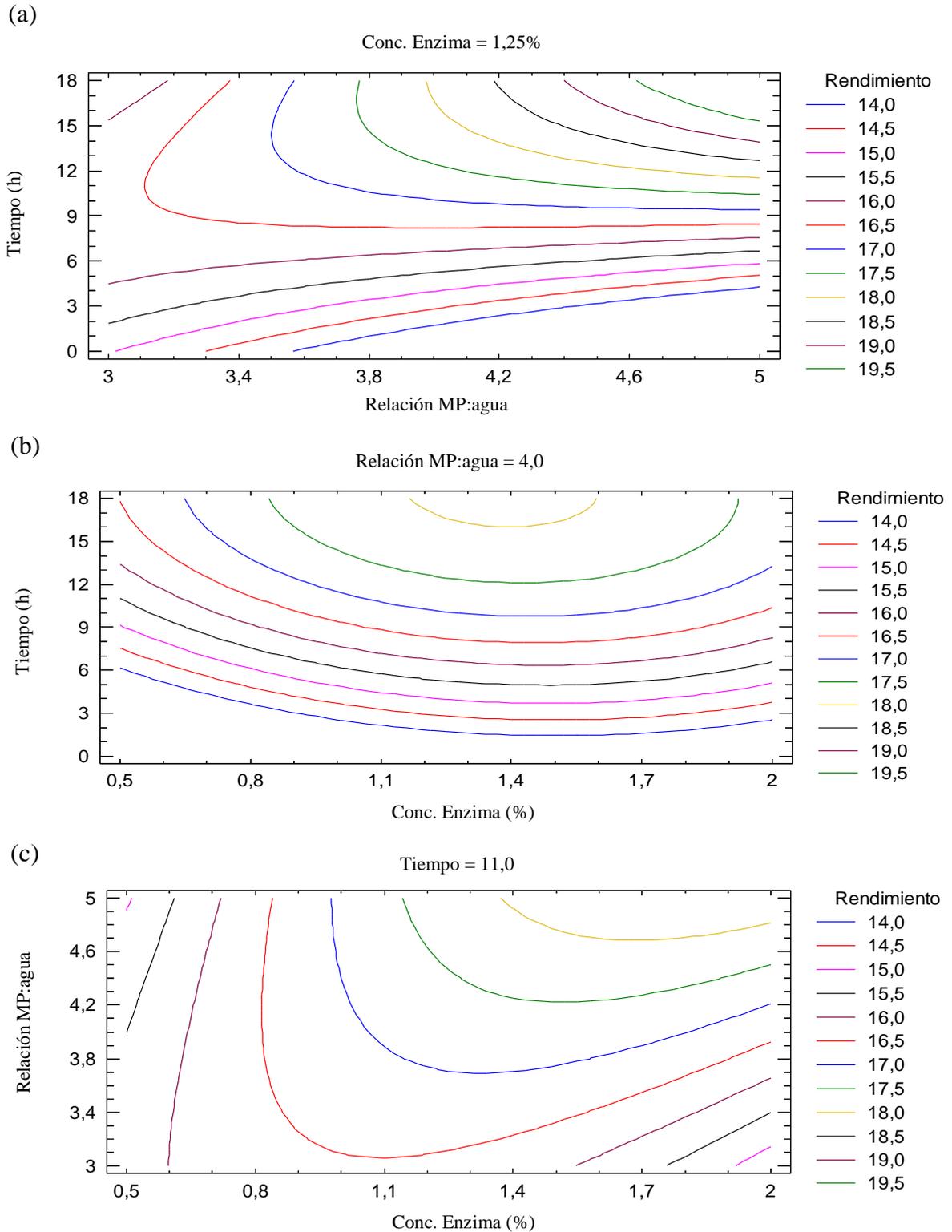


Figura 7: Gráficas de Contornos estimadas para la maximización del Rendimiento de extracción del aceite de las semillas de maracuyá aplicando Deltazym VRAC-100. (a) Gráfica que relaciona la relación MP: agua y el tiempo. (b): Gráfica que relaciona la concentración de enzima y el tiempo. (c): Gráfica que relaciona la concentración de enzima y la relación MP: agua.

4.2.3 VALIDACIÓN DE LOS NIVELES MÁXIMOS TEÓRICOS

Con la comprobación final se logró alcanzar un rendimiento promedio de $20,19 \pm 0,40$ % (b.s.), valor significativamente inferior (p -valor $< 0,05$) al predicho (24,5%) con un nivel de confianza de 95% (ver Anexo 12c). Esta diferencia podría deberse a que los modelos matemáticos presentan cierto margen de error y a que por encima del 20% de rendimiento ya se está alcanzando el contenido total de aceite en las semillas de maracuyá por lo que la recuperación por prensado hidráulico ya no es tan efectiva (O'Brien, 2009). Otra posible explicación viene dada por el tiempo prolongado que se dejó almacenada la semilla hasta la realización de la validación, lo que pudo haber provocado la degradación del aceite.

4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS ACEITES OBTENIDOS

Los aceites extraídos en la fase de *Screening* fueron caracterizados física y químicamente para demostrar si existen diferencias entre los niveles de los factores evaluados. Los resultados promedio se encuentran en el Anexos 13 y 14.

4.3.1 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE LA HUMEDAD Y COMPUESTOS VOLÁTILES

En el Anexo 15a y 15b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $> 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) respectivamente confirman que es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica) ya que sus promedios se ajustan a una distribución normal y sus varianzas son estadísticamente equivalentes.

Según el Análisis de Varianza mostrado en el Anexo 15c; con un nivel de confianza del 95%, existe suficiente evidencia estadística para establecer que los factores: “tipo de enzima”, “concentración de enzima”, “MP:agua” no tienen un efecto significativo sobre la Humedad y compuestos volátiles de los aceites obtenidos (p -valor $> 0,05$). En contraste, el factor “tiempo de hidrólisis” sí presenta un efecto significativo (p -valor $< 0,05$) sobre la característica evaluada. En el Anexo 16, se puede apreciar que la diferencia entre los niveles del factor “tiempo de hidrólisis” es de 0,0322; valor relativamente bajo que ha generado la diferencia significativa, siendo el nivel de 18 horas mayor al de 4 horas. Esta diferencia puede deberse a que a mayor tiempo de hidrólisis, ocurre una mayor producción de compuestos volátiles generados por la oxidación lipídica (Sineiro *et al.*, 1998).

Según el CÓDEX STAN 19 (1981), la humedad y material volátil debe ser como máximo 2%. De acuerdo a esta norma y a la Figura 8, ninguno de los aceites obtenidos supera este valor, por lo que son conformes respecto a este requisito.

Se puede observar en la Figura 8 y Anexo 17b que los aceites procedentes de los tratamientos enzimáticos poseen un valor de humedad promedio significativamente mayor al extraído convencionalmente (Prueba Student-Newman-Keuls con un nivel de confianza de 95%). Esto puede deberse a que durante el tratamiento enzimático los tejidos vegetales microestructurales son degradados (Sineiro *et al.*, 1998), por lo que a pesar que las extracciones por prensado en frío se realizan a una humedad de 11%, una mayor cantidad de agua es extraída en esta operación, además se debe considerar la mayor generación de compuestos volátiles derivados del enranciamiento lipídico.

4.3.2 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE LA GRAVEDAD ESPECÍFICA

En el Anexo 18a y 18b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $< 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) respectivamente confirman que no es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica) ya que este variable no se ajusta a una distribución normal, razón por la que será necesario aplicar un análisis estadístico no paramétrico.

En el Anexo 18c se muestra la Prueba de Kruskal-Wallis realizada para la gravedad específica, donde se aprecia que no existen diferencias significativas (p -valor $> 0,05$) entre las medianas de esta variable con un nivel de confianza de 95%; por lo que se puede concluir que las medianas de los valores observados de esta característica son estadísticamente iguales (no se ven afectadas por los factores evaluados).

Shahidi (2005) menciona que la densidad de los aceites líquidos depende de su composición de ácidos grasos, de menor importancia componentes y la temperatura. Además indica que los valores de gravedad específica de aceites líquidos en general se encuentran en el intervalo de 0,911 - 0,923. Todas las gravedades específicas de los aceites obtenidos (con y sin tratamiento enzimático) se encuentran en el rango establecido por Shahidi (2005).

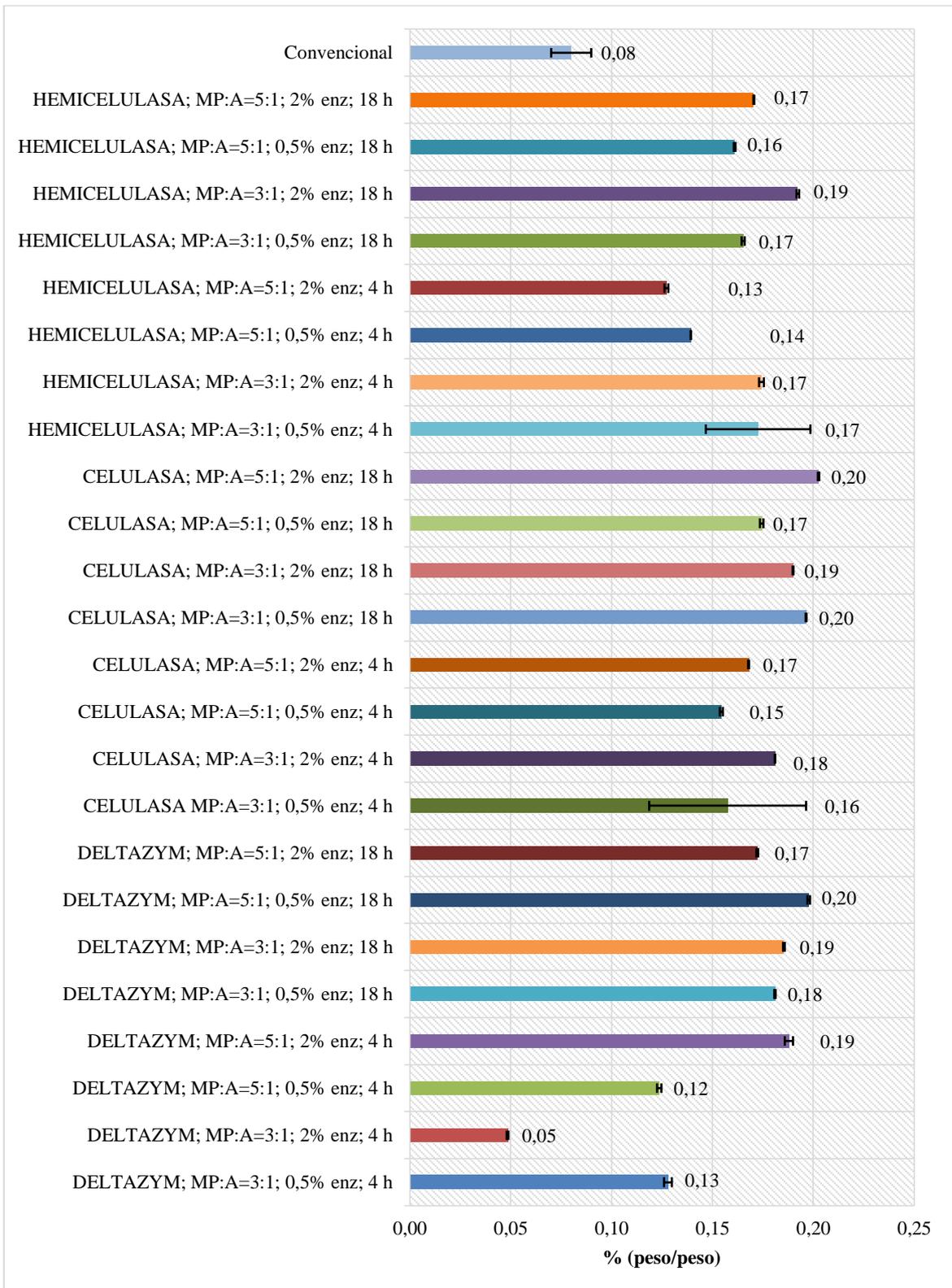


Figura 8: Humedad y compuestos volátiles (% peso/peso) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas

Según el Anexo 19a, el promedio general para la gravedad específica de los aceites obtenidos con el tratamiento enzimático es de $0,922 \pm 0,000$ y el promedio para el tratamiento convencional es de $0,921 \pm 0,003$. Al aplicar la prueba Student-Newman-Keuls (Anexo 19b) para comparar estos promedios, con un nivel de confianza del 95%, existe suficiente evidencia estadística para establecer que no hay diferencias significativas (p -valor $> 0,05$) entre estos promedios, por lo que se puede concluir que el tratamiento enzimático no tiene influencia sobre esta característica.

Ferrari *et al.* (2004) y Alvarado (1995) obtuvieron una gravedad específica de 0,908 y 0,923 respectivamente para aceites de las semillas de maracuyá extraídos mediante solventes, valores muy cercanos a los obtenidos experimentalmente.

4.3.3 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL COLOR FOTOMÉTRICO

En el Anexo 20a y 20b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $< 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) respectivamente confirman que no es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica) ya que esta variable no se ajusta a una distribución normal, razón por la que será necesario aplicar un análisis estadístico no paramétrico.

En el Anexo 20c se muestra la Prueba de Kruskal-Wallis realizada para el color, donde se aprecia que no existen diferencias significativas (p -valor $> 0,05$) entre las medianas de esta variable con un nivel de confianza de 95%, por lo que se puede concluir que las medianas de los valores observados de esta característica son estadísticamente iguales (no se ven afectadas por los factores evaluados).

La mayoría de aceites son amarillo-rojos o líquidos de color ámbar. Estos colores se deben fundamentalmente a la presencia de clorofilas y carotenoides. Los carotenoides están presentes en los aceites en diferentes niveles y se ven afectados por temperaturas superiores a 150°C , cuya degradación puede llevar a una decoloración del aceite. Otro factor que afecta el color de los aceites es la presencia de aldehídos y otros productos del enranciamiento lipídico (Shahidi, 2005).

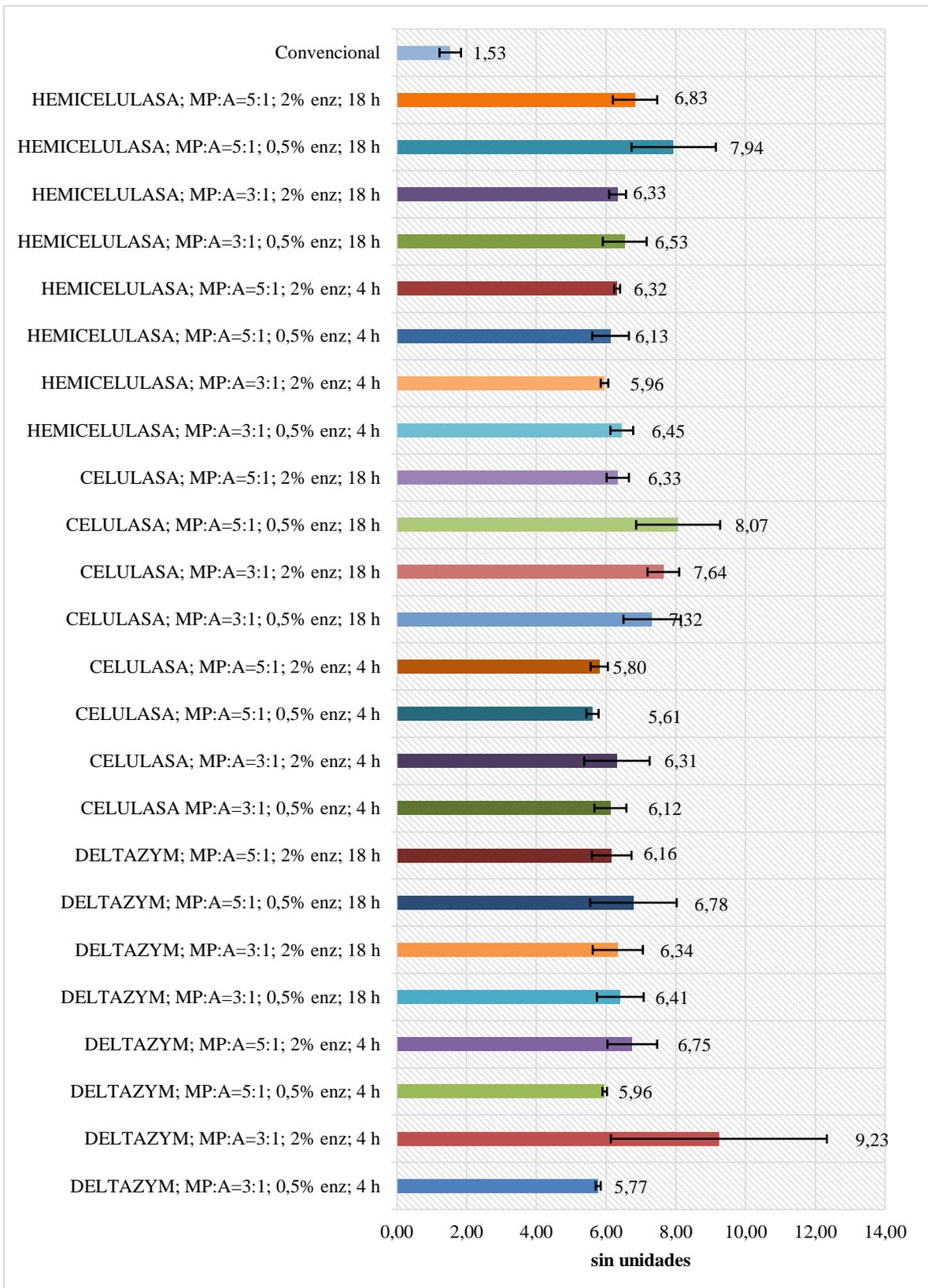


Figura 9: Color fotométrico del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas

En el Anexo 21a y Figura 9, se observa el color fotométrico promedio para los tratamientos convencional y enzimático ($1,53 \pm 0,64$ y $6,63 \pm 0,13$). Estos valores se interpretan dentro de los rangos de índices de color que van de +2 a +40, se relaciona con los colores que van desde el amarillo pálido al naranja intenso: en el caso de los aceites procedentes de los tratamientos enzimáticos, estos presentaron una ligera tendencia hacia el naranja. De acuerdo a la prueba Student-Newman-Keuls del Anexo 21b, con un 95% de confianza existe suficiente evidencia estadística para afirmar que existen diferencias significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos enzimático y convencional, por lo que se puede decir que la aplicación de enzimas causa un cambio en el color, esto probablemente se debe a la producción de aldehídos y otros derivados de la oxidación lipídica que este tipo de tratamiento provoca. (Shahidi, 2005)

4.3.4 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

En el Anexo 22a y 22b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $> 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) respectivamente confirman que es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica).

El índice de refracción de los aceites depende de su peso molecular, cadena de ácido graso la longitud, el grado de insaturación, y el grado de conjugación. Los triacilgliceroles tienen altos índices de refracción que hacen sus ácidos libres constituyentes. Los valores de refracción para diferentes aceites varían generalmente entre 1,447 y 1,482 (Shahidi, 2005). Todos los valores promedio de índice de refracción obtenidos experimentalmente se encuentran en el rango establecido por este autor.

Se evaluó el efecto de los factores: tipo de enzima, concentración de enzima, MP: agua y tiempo de hidrólisis sobre el índice de refracción. En el Análisis de Varianza mostrado en el Anexo 22c; con un nivel de confianza de 95%, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que los factores “tipo de enzima” y “tiempo de hidrólisis” tienen un efecto significativo sobre el índice de refracción (p -valor $< 0,05$); sin embargo, los factores “concentración de enzima” y “relación mp:agua” no tienen un efecto significativo sobre esta característica (p -valor $> 0,05$).

En el Anexo 23, se puede apreciar que la diferencia entre el “tipo de enzima”: “Celulasa” y “Deltazym VRAC-100” es muy pequeña (0,000542); no obstante, el paquete estadístico arrojó que existen diferencias significativas. Algo similar ocurre con el factor “tiempo de hidrólisis” (Anexo 24), cuya diferencia entre sus niveles (4 y 18 horas) es de 0,000472. Esto se debe a que muchos de los valores de desviación estándar son cero y cualquier pequeña variación en los valores de IR, causarán diferencias significativas.

Si se compara el valor promedio de los tratamientos enzimáticos y el convencional (Anexo 25b); con un nivel de confianza del 95%, se puede afirmar que existe una diferencia significativa (0,000472) entre ambos tratamientos (Prueba Student-Newman-Keuls). Esta diferencia (aunque muy pequeña) puede deberse a que el tratamiento enzimático pudo haber provocado una ligero enranciamiento que genera compuestos oxigenados, los cuales modifican el IR (Shahidi, 2005).

4.3.5 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE ACIDEZ (IA)

En el Anexo 26a y 26b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $> 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) confirman que es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica).

En la Figura 10, se pueden apreciar los valores promedio de índice de acidez (IA) para los aceites obtenidos convencionalmente y mediante aplicación de un tratamiento enzimático previo. Según el Análisis de Varianza presentado en el Anexo 26c, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que los factores “tipo de enzima” y “tiempo de hidrólisis” tienen un efecto significativo (p -valor $< 0,05$) sobre la variable respuesta índice de acidez, con un nivel de confianza de 95%.

Shahidi (2005) menciona que esta característica química de los aceites mide la formación de ácidos grasos libres a partir de los triglicéridos que conforman el aceite. Este mismo autor asevera que la generación de los ácidos grasos puede deberse a la presencia de humedad en el aceite y la temperatura a la que es expuesto.

Respecto al factor “tipo de enzima”, la aplicación de Deltazym VRAC-100 provocó valores de IA significativamente mayores que la enzima Celulasa y esta valores mayores al

de Hemicelulasa (ver Anexo 27). Esta diferencia podría deberse a que la Deltazym fue capaz de degradar en mayor medida los polímeros de la semilla y por lo tanto dejó al aceite más expuesto a la humedad, por lo que se produjo una mayor hidrólisis de triglicéridos durante el tratamiento enzimático donde se adiciona agua y se trabaja a temperaturas relativamente altas (55°C). Esta mayor degradación se correlaciona también con un mayor rendimiento; sin embargo, se expone más al aceite. Algo similar pudo haber ocurrido entre la aplicación de Celulasa y Hemicelulasa, ya que al haber una mayor cantidad de celulosa en la semilla (Figura 4), existe una mayor degradación de la semilla y por ende una mayor exposición del aceite al medio, tal como lo señala Shahidi (2005).

En referencia al factor “tiempo de hidrólisis”, según el Anexo 28, a un nivel de significancia de 95%, el nivel 18 horas presenta mayores valores de IA que el nivel 4 horas. Esto se debe al tiempo de exposición mayor a la humedad y temperatura por parte del nivel 18 horas.

Si se comparan los valores de IA de aceites procedentes de la aplicación de un tratamiento convencional y uno enzimático, se puede observar en el Anexo 29b que los valores de IA del tratamiento enzimático son significativamente mayores que los que vienen de la extracción convencional (nivel de confianza de 95%). Esta variación se explica porque la aplicación de enzimas requiere de un aumento de la humedad del medio y de la temperatura, lo que causa la hidrólisis de los triglicéridos (Shahidi, 2005), tal como se explicó anteriormente.

Malacrida y Jorge (2012) y Ferrari *et al.* (2004) reportan valores de IA para aceite de las semillas de maracuyá de 2,35 y 1,34 mg KOH/g aceite, ambos extraídos con solventes. Así mismo el CÓDEX STAN – 19 (1981), establece un límite máximo de 4 mg KOH/g aceite para aceites crudos extraídos por prensado en frío. Tal como se aprecia en la Figura 10, solo el aceite obtenido convencionalmente (2,7 mg KOH/g aceite) cumple con el requisito del CÓDEX ALIMENTARIUS y es comparable a los valores reportados por los autores mencionados anteriormente, por lo que los aceites provenientes del tratamiento enzimático no serían aptos para el consumo humano y requerirían de un proceso de neutralización para poder ser consumidos sin causar daño en las personas que lo ingieran (Shahidi, 2005).

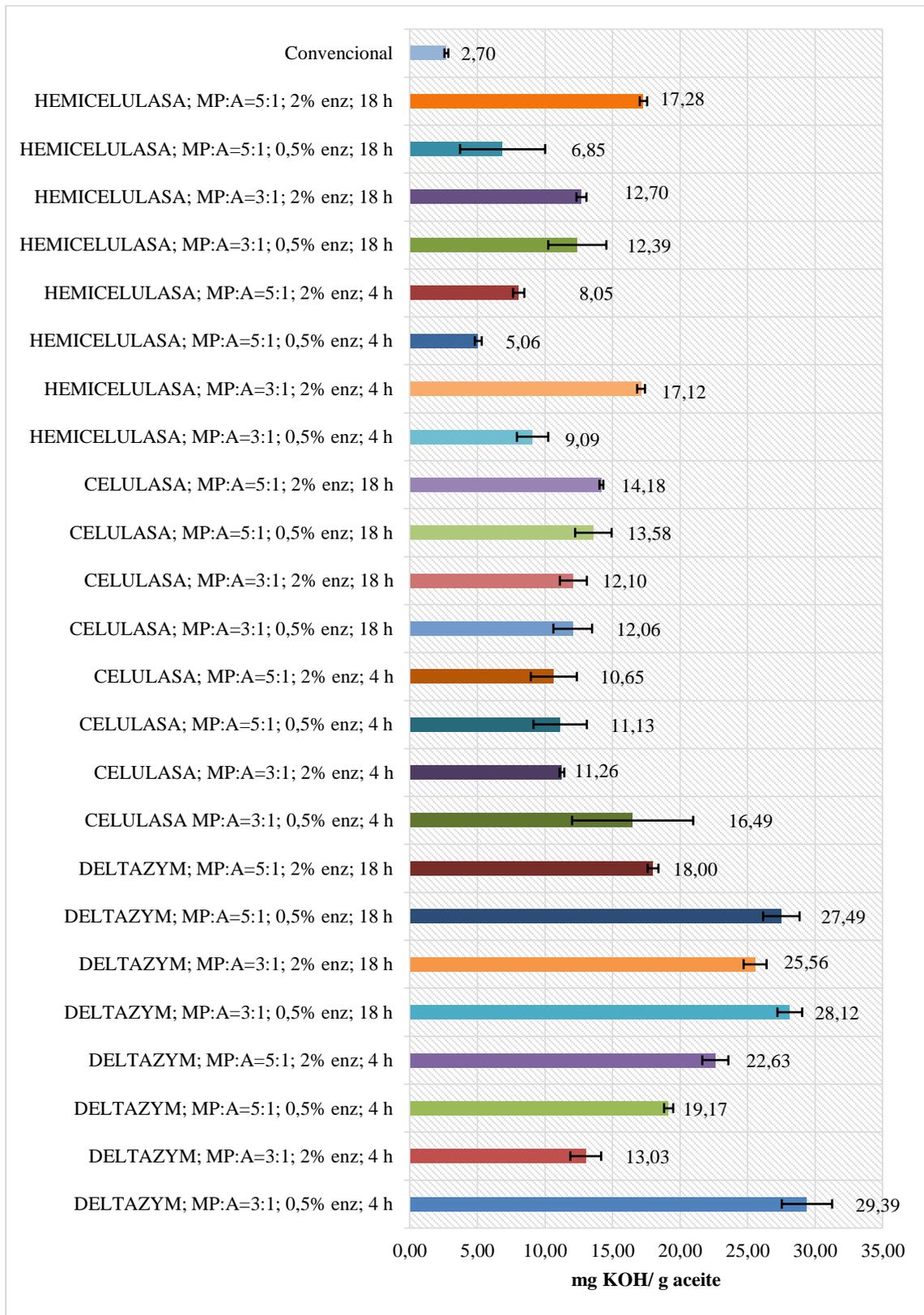


Figura 10: Índice de acidez (mg KOH/ g aceite) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas

4.3.6 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE PERÓXIDOS (IP)

En el Anexo 30a y 30b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $> 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) confirman que es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica).

El índice de peróxidos (IP) es la medida más común para oxidación lipídica. Este índice mide los hidroperóxidos formados en la fase primaria de la autooxidación de ácidos grasos debido a que los aceites son expuestos a factores ambientales como oxígeno, luz, radiación UV, metales, etc (Shahidi, 2005).

En la Figura 10 se puede apreciar los valores promedio de índices de peróxidos. Según el Anexo 30c, con un nivel de confianza de 95%, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el factor “tipo de enzima” tiene un efecto significativo (p -valor $< 0,05$) sobre el Índice de peróxido.

El tipo de enzima que es significativamente diferente es la Hemicelulasa, cuyos valores de IP son estadísticamente mayores a los de las otras dos enzimas con un nivel de confianza de 95% (ver Anexo 31). Una posible explicación para estos resultados es que las semillas de maracuyá contienen un bajo contenido de hemicelulosa, por lo que la semilla fue ligeramente degradada por esta enzima y por lo tanto hubo una menor liberación de compuestos antioxidantes en el aceite, por lo que los aceites procedentes de la aplicación de la hemicelulasa no tuvieron la misma protección que los de las otras enzimas. Esta acción enzimática también fue reportada por Meyer *et al.* (1998), el cual afirma que las enzimas hidrolíticas actúan sobre las paredes celulares de la semilla, pudiendo provocar una mejora en la extracción de compuestos con actividad antioxidante en el aceite, es por ello que probablemente el contenido de compuestos antioxidantes aumentó tras la aplicación de dicho tratamiento. Este hecho también es corroborado por Wiesman (2009), quien reporta un aumento considerable de compuestos antioxidantes en el aceite de oliva cuya extracción fue previamente asistida por enzimas. Además Siger *et al.* (2008) citados por Malacrida y Jorge (2012) reportan valores de eficiencia antiradicalaria en el aceite de las semillas de maracuyá superiores a aceites de soya, girasol, maíz y uva; debido a un considerable contenido de polifenoles y tocoferoles; por lo que a pesar que el tratamiento enzimático expone más al aceite, también libera una mayor cantidad de compuestos anti-

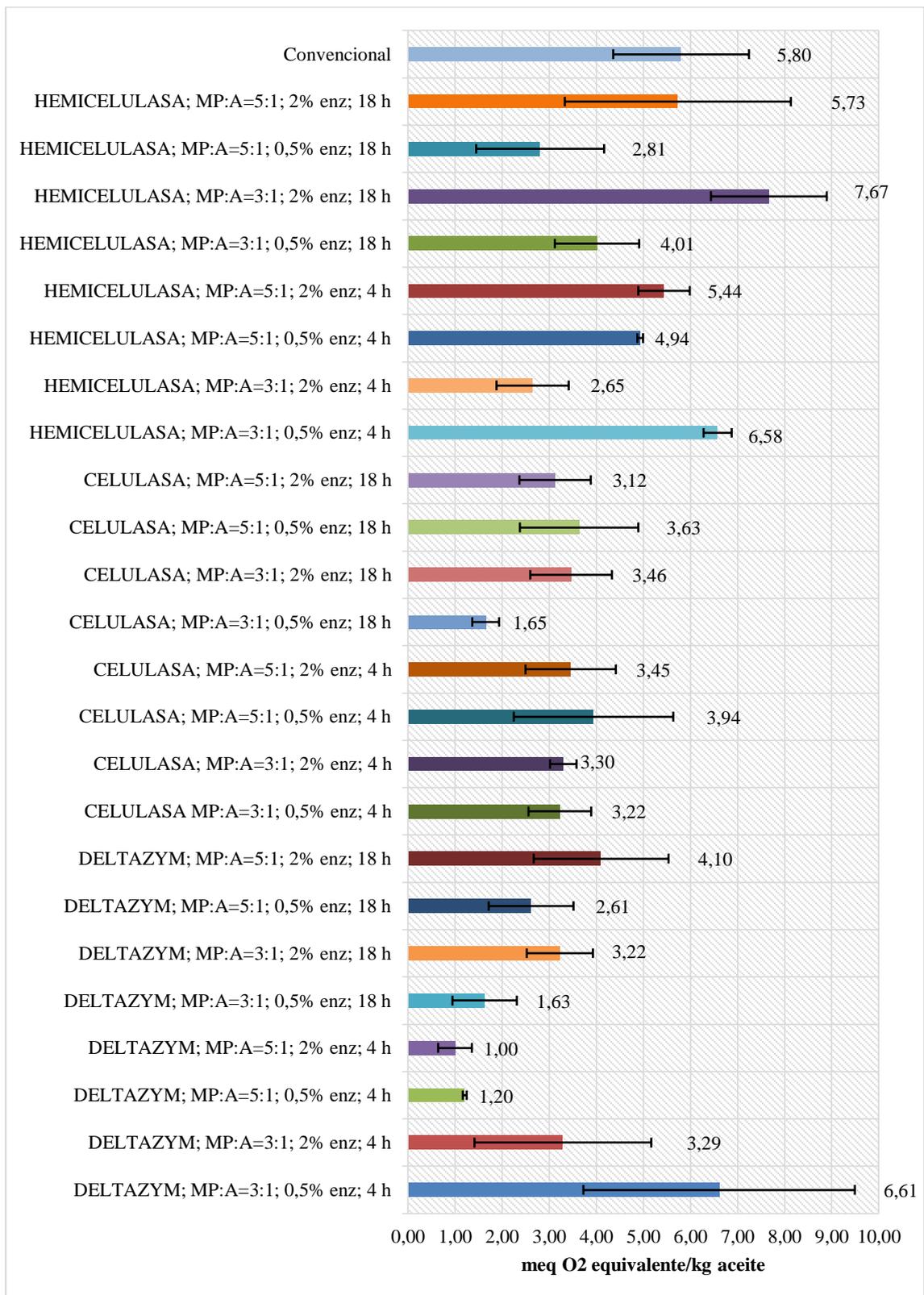


Figura 11: Índice de peróxidos (meq de O₂ equivalente/kg aceite) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas

oxidantes que durante el almacenamiento protegen a los ácidos grasos del enranciamiento.

En el Anexo 32, se puede visualizar que para un nivel de confianza de 95%, no existen diferencias significativas entre los valores de IP derivados de la extracción procedente de los tratamientos convencional y enzimática; por lo que se puede afirmar que el tratamiento enzimático no afecta significativamente esta característica. Anwar *et al.* (2013) también evaluaron el IP en aceites procedentes de tratamientos convencionales y enzimáticos en aceite de linaza; y concluyeron que la aplicación de enzimas no influye significativamente en este factor de calidad de aceites.

El CÓDEX STAN – 19 (1981) plantea un límite máximo de 15 miliequivalentes de oxígeno activo/kg de aceite para aceites crudo. Todos los tratamientos mostrados en la Figura 11 cumplen con este requisito.

4.3.7 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE YODO (II)

En el Anexo 33a y 33b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $> 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) confirman que es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica).

O'Brien (2009) define al índice de yodo (II) como la medida del grado de insaturación de los aceites, el cual es constante en cada tipo de aceite. Este análisis es generalmente certero a excepción de que en el ácido graso exista un doble enlace conjugado o la insaturación este cerca de un grupo carboxilo.

Los resultados promedio de estas determinaciones se muestran en la Figura 12, tanto para los aceites que vienen de la extracción convencional y de aquellos que se derivan de las extracciones con asistencia de enzimas.

En el Análisis de Varianza presentado en el Anexo 33c, se puede observar que existe suficiente evidencia estadística para aseverar que el factor “tipo de enzima” tiene un efecto significativo sobre la variable respuesta II (p -valor $< 0,05$), con un nivel de confianza de 95%. Tal como se aprecia en el Anexo 34, la enzima Hemicelulasa presenta un valor promedio ligeramente menor al de las otras enzimas (136 contra 139 y 142

respectivamente). Esto significa que se ha extraído una cantidad sutilmente menor de ácidos grasos insaturados mediante la aplicación de un tratamiento enzimático empleando Hemicelulasa. Los demás factores no presentan un efecto significativo (p -valor $> 0,05$).

Y si se busca comparar el efecto del tratamiento enzimático sobre el II en comparación con la extracción convencional, se debe hacer alusión al Anexo 35b para afirmar que no existe un efecto significativo sobre esta característica ya que los grupos correspondientes al tratamiento enzimático y convencional son homogéneos, con un nivel de confianza de 95%. Esta comparación también es realizada por Anwar *et al.* (2013), quienes reportan que no existen diferencias entre los valores de II en aceites de semillas de linaza cuando se les aplica una asistencia de enzimas o no.

Malacrida y Jorge (2012), Ferrari *et al.* (2004) y López y Morales (1982) reportaron valores promedio de II de 128,0; 136,5 y 139,8 respectivamente. Estos promedios son ligeramente inferiores (menor insaturación) a los obtenidos experimentalmente con aplicación de enzimas (144) y extracción convencional (139).

4.3.8 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL ÍNDICE DE P-ANISIDINA (IAN)

En el Anexo 36a y 36b se muestra que las pruebas de Normalidad (p -valor $> 0,05$) y Homogeneidad de Varianzas (p -valor $> 0,05$) respectivamente confirman que es posible aplicar el Análisis de Varianza (estadística paramétrica) ya que los valores promedios obtenidos se distribuyen normalmente y sus varianzas son homogéneas.

Se evaluó el efecto de los factores: tipo de enzima, concentración de enzima, relación mp:agua y tiempo de hidrólisis sobre el valor del índice de p-anisidina. Los resultados de los tratamientos se muestran en la Figura 13.

Grompone (1991) menciona que este análisis mide a los compuestos aldehídos, formados durante la fase secundaria del enranciamiento oxidativo mediante la reacción del reactivo p-anisidina con estos aldehídos para formar un compuesto amarillento cuya concentración es medida espectrofotométricamente a 350 nm.

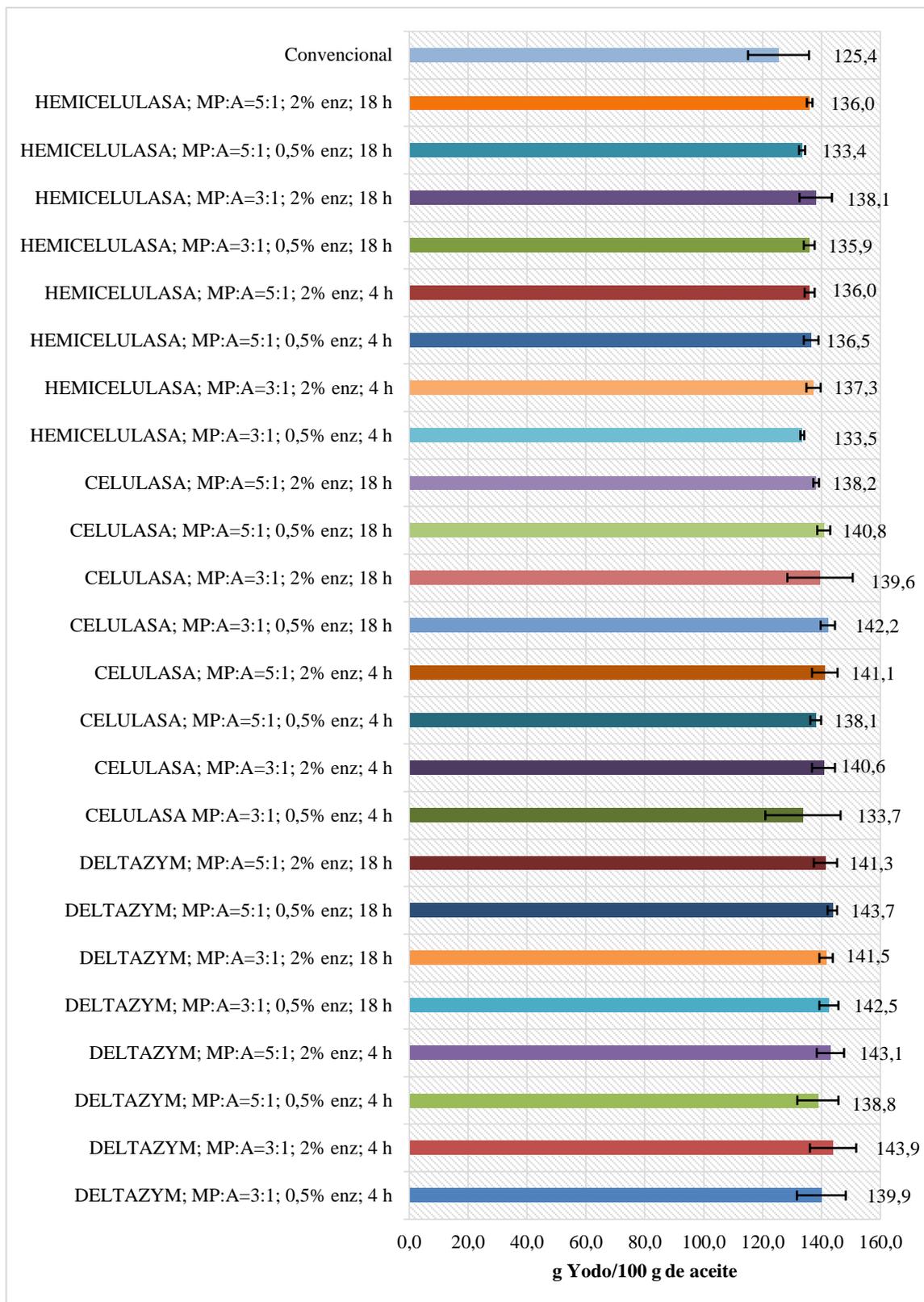


Figura 12: Índice de yodo (g yodo/100 g aceite) del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas

Se puede observar en Análisis de Varianza del Anexo 36c que existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el factor “tipo de enzima” tiene un efecto significativo (p -valor $< 0,05$) sobre el valor de p-anisidina, con un nivel de confianza de 95%; mientras que los factores “concentración de enzima”, “tiempo de hidrólisis” y “relación mp: agua” no tienen un efecto significativo (p -valor $> 0,05$).

Respecto al efecto significativo del tipo de enzima, en el Anexo 37 se puede apreciar que los aceites que provienen de la aplicación de Deltazym VRAC-100 tienen un valor promedio mayor que el de las otras dos enzimas con un nivel de confianza de 95%. Esta diferencia se puede deber a que al ser la semilla más degradada por el complejo, esta se deja expuesta ante el oxígeno y demás condiciones ambientales durante el tratamiento enzimático, por lo que se generará un enranciamiento más pronunciado en este caso. Estos mayores valores de índice de p-anisidina provenientes de Deltazym se relacionan con los de índice de acidez (Anexo 27); debido a que primero debe darse un enranciamiento hidrolítico de los triglicéridos para luego dar lugar al enranciamiento oxidativo (Grompone, 1991).

Al comparar el efecto del tratamiento enzimático respecto al convencional (Anexo 35), se puede apreciar que el valor de IA originado por el tratamiento enzimático es significativamente superior al del convencional con un nivel de confianza de 95%. Esta diferencia se da porque en el tratamiento enzimático se genera un medio húmedo que provoca una hidrólisis de triglicéridos; y la alta temperatura y exposición al oxígeno produce un enranciamiento oxidativo.

En el Anexo 32, se muestra el valor promedio general de IP para los aceites procedentes del tratamiento enzimático y convencional, el cual es 3,72 y 5,80 mequiv. de O₂ activo/g aceite y en el Anexo 38, se muestra el valor de la p-anisidina para ambos tratamientos: convencional 0,40 y con aplicación de enzimas 1,71. Al ser el valor de IP mayor al del IAN, se puede decir que los aceites evaluados se encuentran en la fase lenta de inducción, lo que significa que estos no se encuentran en una etapa avanzada de rancidez.

Anwar *et al.* (2013) evaluó el valor de la p-anisidina comparando el tratamiento control y extracciones de aceite de linaza por prensado en frío con asistencia de enzimas. Estos

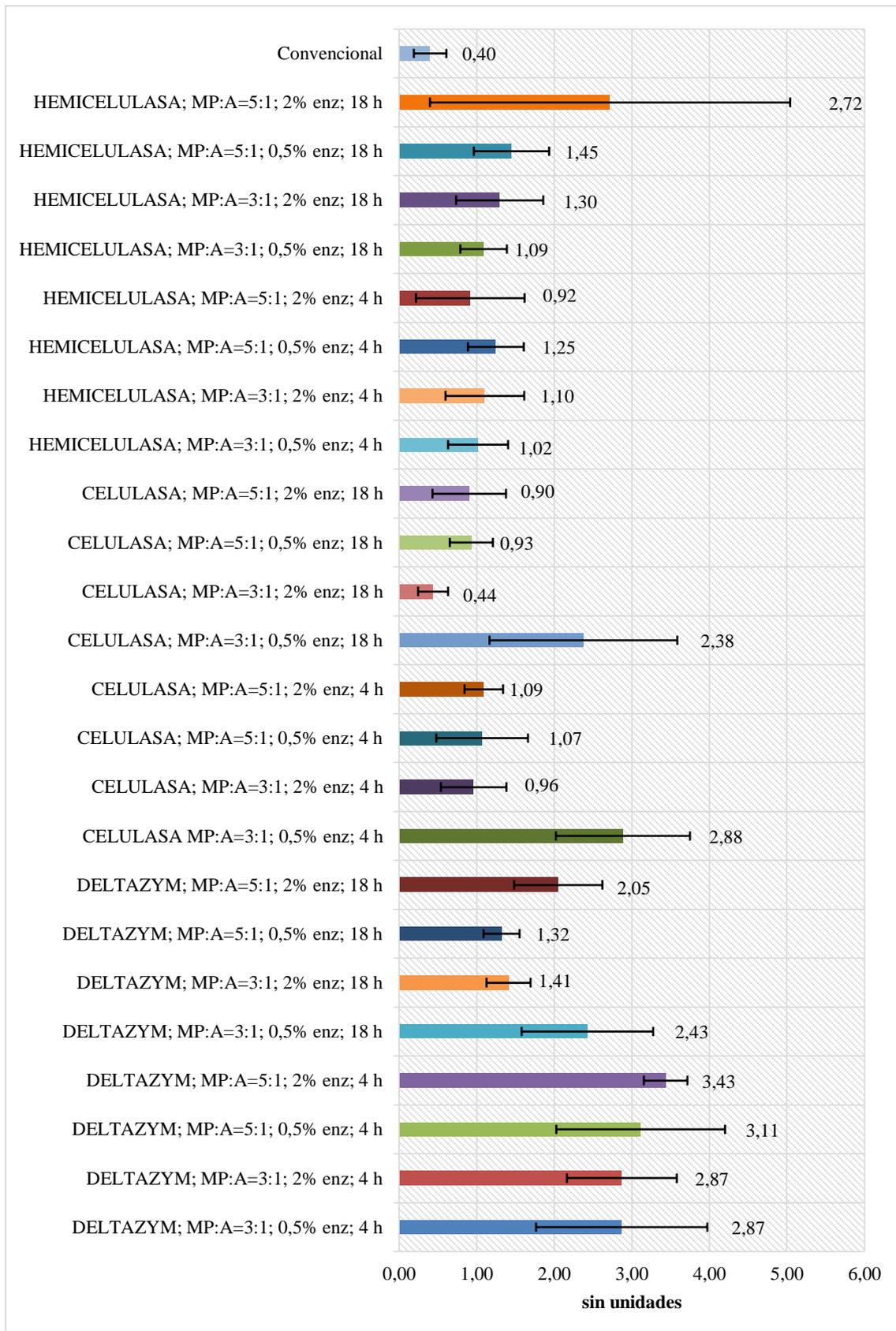


Figura 13: Índice de p-anisidina del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*) obtenido convencionalmente y con asistencia de enzimas

autores reportan que no existen diferencias significativas entre los valores evaluados al aplicar tratamientos enzimáticos. Se debe tener en cuenta que los parámetros con los que trabajaron fueron: 50% de humedad, 40°C y 6 horas; donde el tiempo aplicado no fue tan elevado como el de la presente investigación.

4.3.9 COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS ACEITES

Se puede apreciar en la Figura 14 y Anexos 39, 40 y 41; que los ácidos grasos poliinsaturados representan el 73,27% y 73,14% de los aceites extraídos con y sin tratamiento enzimático respectivamente, de los cuales el ácido graso linoleico fue el predominante en el aceite de semilla de maracuyá obtenido con y sin tratamiento enzimático (estadísticamente iguales según Anexo 45), (72,89% y 72,72%), valor similar a los obtenidos por otros autores: Malacrida y Jorge (2012) 73,14%; Liu *et al.* (2008) 72,69% y Ferrari *et al.* (2004) 68,79%. Otros ácidos grasos importantes como los ácidos linolénico (18:3 ω -3) y ácido vaccénico (18:1 ω -7) en aceites extraídos con y sin tratamiento enzimático; 0,44%; 0,42% y 0,55% 0,54% fueron estadísticamente iguales (Anexo 44 y 46) respectivamente. Malacrida y Jorge (2012) y Ferrari *et al.* (2004) reportaron un valor de ácido linolénico (18:3 ω -3) de 0,41 y 0,69 % respectivamente, valores similares a los obtenidos. El ácido oleico (18:1 ω -9) se encuentra en importante concentración y los aceites extraídos con (13,8 y 13,61%) y sin tratamiento son estadísticamente homogéneos (Anexo 43).

Los ácidos grasos saturados representan el 11,93% y 12,57% con y sin tratamiento enzimático de los cuales el ácido palmítico es el mayoritario con 9,52% y 10,00% para los aceites extraídos con y sin tratamiento enzimático respectivamente y estos son estadísticamente equivalentes. (Anexo 42)

Ribeiro (2006) cuantificó los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de las semillas de maracuyá. Esta autora encontró que el contenido de ácido palmítico fue de 15,30%, ácido esteárico 1,98%, ácido oleico 14,54% y ácido linoleico 67,99%. Estos valores son similares a los reportados en la presente investigación. Además se encontró una pequeña cantidad de ácido vaccénico (0,54 y 0,55%), el cual es un ácido graso *trans* que pudo haberse formado por la isomerización del ácido oleico (O'Brien, 2009)

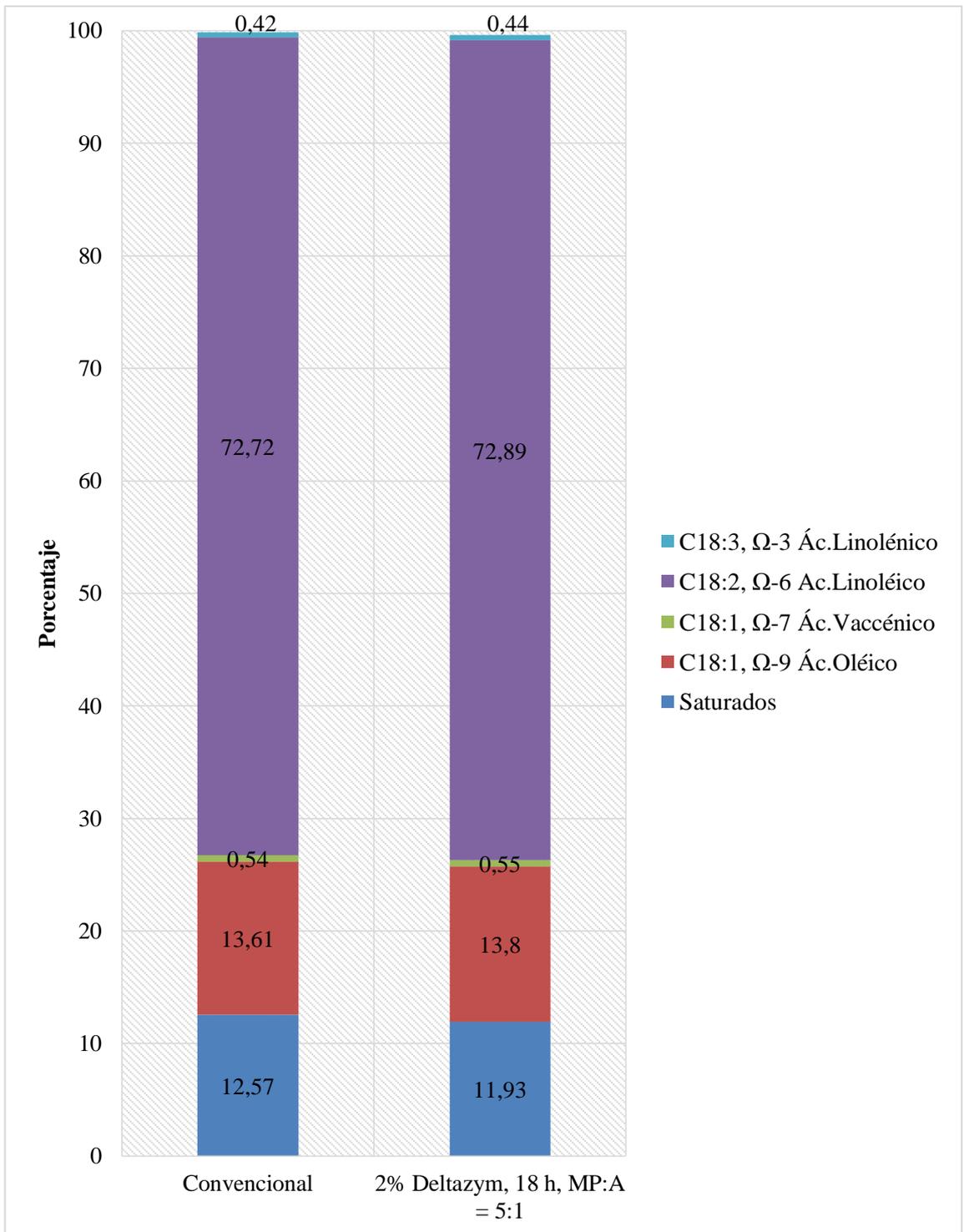


Figura 14: Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de maracuyá obtenido sin y con tratamiento enzimático

V. CONCLUSIONES

- En la fase de *Screening*, la variable evaluada significativa fue el tipo de enzima (Deltazym VRAC-100). La relación MP:agua, concentración de enzima y tiempo de hidrólisis no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción.
- No se logró optimizar el rendimiento de extracción, sino que se logró una maximización del mismo y al aplicar un Diseño Compuesto Central (DCC) para evaluar el tratamiento enzimático solo para el tipo de enzima Deltazym VRAC-100, siendo el punto óptimo: Concentración de enzima=1,95%, Relación MP: agua=5,68:1 y Tiempo de hidrólisis=22,8 horas; con los que se puede alcanzar un rendimiento predicho de 24,5 % (p/p) (b.s.), mientras que el rendimiento promedio obtenido con el tratamiento convencional fue de 11,87 % (p/p) (b.s.). Se obtuvo un rendimiento máximo experimental de $20,19 \pm 0,40\%$ (p/p) (b.s.).
- Las características fisicoquímicas cuyos efectos principales del tratamiento enzimático son significativos son: Humedad y compuestos volátiles (por el tiempo de hidrólisis), Índice de refracción (por el tipo de enzima y tiempo de hidrólisis), Índice de acidez (por el tipo de enzima y tiempo de hidrólisis), Índice de peróxidos (por el tipo de enzima), Índice de yodo (por el tipo de enzima), Índice de p-anisidina (por el tipo de enzima).
- Las características fisicoquímicas que son afectadas significativamente al comparar las extracciones convencionales y con aplicación de enzimas son: Humedad y compuestos volátiles, Color fotométrico, Índice de refracción, Índice de acidez e Índice de p-anisidina.
- La composición de ácidos grasos para los tratamientos convencional y enzimático es estadísticamente equivalente.

VI. RECOMENDACIONES

- Probar otros métodos de extracción (expeller, solventes, extracción acuosa, extracción supercrítica)
- Evaluar la eficiencia de la aplicación de otros tipos de enzima.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la torta de extracción.
- Evaluar el tiempo de vida en anaquel del aceite de las semillas de maracuyá.
- Realizar mayores pruebas para evaluar niveles diferentes a los evaluados y obtener un efecto significativo sobre el rendimiento.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMPEX (Asociación Macro regional de productores para la exportación). (2006). Perfil de mercado de la maracuyá fresca (*Passiflora edulis*).
- ANWAR, F.; ZREEN, Z.; SULTANA, B. & JAMIL, A. (2013). Enzyme-aided cold pressing of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.): Enhancement in yield, quality and phenolics of the oil. *Grasas y Aceites* 64 (5). Páginas 463 – 471.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemistry). (1995). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry, Washington D.C. EUA.
- AOAC. (Association of Official Analytical Chemistry). (2007). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemistry, Washington D.C. EUA.
- AOCS. (2008). Official Methods and Recommended Practices. Sixth Edition. American Oil Chemists Society. Champaign, IL. EUA.
- ARELLANO, P. (2003). Utilización de enzimas en la extracción del aceite de semilla de Sacha Inchi (*Plukenetia volúbilis* L.). Tesis para optar al título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM. Lima, Perú.
- BADUI, S. (1990). Química de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Alhambra Mexicana. México.
- BADR, F y SITOHY, M. (1992). Optimizing conditions for enzymatic extraction of sunflower oil. *Revista Grasas y Aceites* Vol. 43 Fasc. 5. Páginas 281 – 283.
- BAILEY, A. (1984). Aceites y grasas industriales. Primera edición. Editorial Reverté S.A. Zaragoza, España.
- BERNHARD, S. (1977). Estructura y función de las enzimas. Primera Edición en español. Editorial H. Blume. Madrid, España. 312 páginas.
- BERNARDINI, E. (1981). Tecnología de aceites y grasas. Primera edición. Editorial Alambra S.A. Madrid, España.
- BRUCHMANN, E. (1980). Bioquímica técnica. Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

- CHAU, C. y HUANG, Y. (2004). Characterization of passion fruit seed fibers, a potential fiber source. *Revista Food Chemistry* 85. Páginas 189 – 194.
- CODEX ALIMENTARIUS. (1981). Norma del Códex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales (CODEX STAN 19-1981).
- COLLAO, C.; CURETTO, E. & ZÚÑIGA, M. (2007). Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites* 58 (1) p. 10 – 14.
- DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. y LEMA, J. (1994). Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Revista Food Chemistry* 49. Páginas 271 – 286.
- DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. y LEMA, J. (1995). Procesado acuoso de soya con tecnología enzimática: extracción de aceites y producción de aislados. *Revista Grasas y Aceites* Vol.46 Fasc. 1. P. 11 – 20.
- FENNEMA, O. (2000). *Química de los alimentos*. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- FEUILLET, C. Y J. MACDOUGAL. (2003). A new infrageneric classification of *Passiflora L. (Passifloraceae)*. *Passiflora*. 13 (2), 34–38.
- FERRARI, R.; COLUSSI, F. & AYUB, R. (2004). Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá- aproveitamento das sementes. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. 26, n. 1, p. 101-102.
- GROMPONE, M. (1991). El índice de anisidina como medida del deterioro latente de un material graso. *Revista Grasas y Aceites*. Vol. 42 Fase. 1, p. 8-13.
- GUERRA, E. y ZÚÑIGA, M. (2003). Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva (*Vitis vinifera*) por prensado en frío. *Revista Grasas y Aceites* Vol. 54 Fasc. 1. Páginas 53 – 57.
- JIMÉNEZ, V. (1972). Ensayo de extracción de aceite de la semilla de maracuyá. Tesis para optar al título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM. Lima, Perú.
- KOBORI, C.N. & JORGE, N. (2005). Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v.9, n.5, p.1008-1014.

- LATIF, S y ANWAR, F. (2008). Quality assessment of *Moringa concanensis* seed oil extracted through solvent and aqueous – enzymatic techniques. *Grasas y Aceites* Vol. 59 Fasc. 1. Páginas 69 – 75.
- LÓPEZ , L. & MORALES , L. (1982). Estudio sobre almacenamiento de la semilla de maracuyá, extracción de aceite y establecimiento de su calidad. Ambato – Ecuador, 82p.
- LIMA, S.; RIBEIRO, N. & SANTOS, M. (2010). Aproveitamento da farinha de casca de maracujá na alimentação humana. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Ceres.
- LIU, S.; YANG, F.; LI, J.; ZHANG, C.; JI, H. & HONG P. (2008). Physical and chemical analysis of *Passiflora* seeds and seed oil from China. *Int J Food Sci Nutr.* 59 (7-8), 706-15.
- MALACRIDA, C. & JORGE, N. (2012). Yellow Passion Fruit Seed Oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. *Brazilian archives of Biology and Technology.* Vol.55, n. 1: pp.127-134.
- MEYER, A.S; JEPSEN, S.M; SORENSEN, N.S. (1998). Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *Journal Agric. Food Chem.* 46, 2439–2446.
- MONTGOMERY, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. Editorial Limusa S.A. México D.F., México.
- NELSON, D. y COX, M. (2005). Lehninger. Principios de Bioquímica. Cuarta Edición. Editorial Omega. 1152 páginas.
- O'BRIEN, R. (2009). *Fats and Oils. Formulating and processing for applications.* Tercera Edición. Editorial CRC Press. USA.
- ORTIZ, D. (2010). Estudio de la variabilidad genética en materiales comerciales de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis Sims*) en Colombia. Tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- OTTONE, G. (2001). Procesamiento y exportación de frutas tropicales. Trabajo profesional para optar al título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM. Lima, Perú.

- PINTO, J. (1995). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en la optimización del proceso de clarificación de jugo de manzana. Tesis para optar al título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM. Lima, Perú.
- PRUTHI, J. (1962). Physico-chemical composition of passion fruit (*P. edulis*). *Himachal Hort.* (India) 3, 227.
- RANALLI, A. y SERRAIOCCO, A. (1996). Quantitative and qualitative effects of a pectolytic enzyme in olive oil production. *Revista Grasas y Aceites* Vol. 47, Fasc. 4. Páginas 227 – 236.
- REED, G. (1975). *Enzymes in food processing*. Segunda Edición. Editorial Academic Press. 573 páginas.
- RIBEIRO, M. (2006). Caracterização dos ácidos graxos das sementes e compostos voláteis dos frutos de espécies do gênero *Passiflora*. Tesis para optar al título de Maestro en Agronomía. Universidad Estatal Paulista Julio de Mesquita Filho. San Pablo, Brasil.
- SIGER, A.; NOGALA-KALUCKA, M. & LAMPART-SZCZAPA, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J Food Lipids*; 15 (2): 137-49.
- SCHWARTZ, M.; OLAETA, J.; UNDURRAGA, P. & COSTA, V. (2007). Mejoramiento del rendimiento de extracción del aceite de aguacate (*Persea americana*). Actas VI Congreso Mundial de Aguacate. Viña del Mar, Chile.
- SCRAGG, A. (1996). *Biología para ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Primera Edición. Editorial Limusa. México D.F. 410 páginas.
- SHAHIDI, F. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat products*. Sexta Edición. Editorial Wiley Interscience. New Jersey, EUA.
- SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H. & NÚÑEZ, M. (1998). Influencia del tratamiento enzimático en la calidad de aceites vegetales. *Revista Grasas y Aceites*. Vol. 49. Fasc. 2. Páginas 191 – 202.
- SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H., NÚÑEZ, M. & LEMA, J. (1998). Microstructural Features of Enzymatically Treated Oilseeds. *Science Food Agriculture*, 78, P. 491 – 497.
- SOTO, C.; CHAMY, R. & ZÚÑIGA, M. (2007). Enzymatic hydrolysis and pressing conditions effect on borage oil extraction by cold pressing. *Revista Food Chemistry* 102. P. 834 – 840.

- TAHA, F. y HASSANEIN, M. (2007). Pretreatment of cottonseed flakes with proteases and an amylase for higher oil yields. *Revista Grasas y Aceites* 58 (3). Páginas 297 – 306.
- TIVIZAY, M. (1995). *Terapéutica Nutricional*. Natura Medicatrix. Revista Profesional para el Estudio de la Difusión de las alternativas sanitarias. Editorial Barna Impres. N° 40. Barcelona, España.
- WIESMAN, Z. (2009). *Desert Olive Oil Cultivation: Advanced Bio Technologies*. Editorial Hardbound. Primera Edición. Estados Unidos de Norteamérica. 416 páginas.
- WISEMAN, A. (1991). *Manual de biotecnología de los enzimas*. Traducción de la Segunda Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- ZULUETA, R. y CALATAYUD, L. (1997). Notas botánicas y biológico-florales del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* Sims. variedad *Flavicarpa Degener*). *Revista La Ciencia y el Hombre* No 26. Páginas 123 – 131.
- ZÚÑIGA, M.; SOTO, C.; MORA, A.; CHAMY, R. y LEMA, J. (2003). Enzymatic pre-treatment of *Guevina avellana mol* oil extraction by pressing. *Revista Process Biochemistry* 39. Páginas 51 – 57.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica Deltazym VRAC-100

WeissBioTech
your partner in white biotechnology

DELTAZYM[®] VR AC-100

Application Data Sheet

Date of issue: 22 Aug 2011 | Printing date: 01 Sep. 11 | Page 1 of 1

Cellulase-complex for processing of corn, barley and other cereals.

Description: DELTAZYM[®] VR AC-100 is an active cellulase (IUB 3.2.1.4) enzyme derived by fermentation from specially selected microorganisms. DELTAZYM[®] VR AC-100 contains a cellulase-complex including significant β -glucanase activity and hemicellulase. It is used for the hydrolysis of cellulose sources in the processing of corn, barley and other cereals. The product has been especially developed to be used to degrade plant & cereal biomass to help the viscosity reduction of syrup in the production of bioethanol, like in other applications where the breakdown of different, complex and non-standardised cellulose raw materials is required during processing.

Purity; regulatory aspects: The enzyme in DELTAZYM[®] VR AC-100 is manufactured to comply with current purity specifications of JECFA (FAO/WHO) and conforms to FCC's recommended specifications for food enzymes. These specifications also encompass heavy metals as well as the microbiological characteristics.

Utilisation: DELTAZYM[®] VR AC-100 with an activity of not less than 100.000 CXU/g has shown to best perform when used under the conditions given in the table below. For assessing the right dosage of DELTAZYM[®] VR AC-100 required to achieve the desired results, it is recommended to perform initial trials at pilot scale to improve the dosage accuracy.

Application	Dosage level	Recommendation
Processing of corn cereals and in bio-ethanol production	10–100 g per ton of cereal raw material.	Range: pH 3.0-7.0 and T: 40-70°C. Optimum conditions of use: pH 4.5 and T: 50-60°C.

Packaging and storage: DELTAZYM[®] VR AC-100 is available in 25 kg polyethylene drums and 1000 kg IBC containers. DELTAZYM[®] VR AC-100 is best stored in the original packaging under refrigerated conditions at 4–8 °C in order to retain maximum activity during storage.

Safety aspects and caution: Enzyme products need to be handled with care. Please consult the separately available Material Safety Data Sheet for further information.

Made by **WeissBioTech GmbH**, Germany

To the best of our knowledge, the information contained herein is accurate and complete. However, nothing contained herein shall be construed to imply any warranty or guarantee.

WeissBioTech GmbH • An der Hansalinie 48 - 50 • D-59387 Ascheberg • Germany
Phone +49-2593 919 386 • Fax +49-2593 919 393 • info@weissbiotech.com • www.weissbiotech.com

Anexo 2: Ficha técnica Celulasa (Sigma-Aldrich)

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

Cellulase from *Aspergillus niger* - powder, ≥ 0.3 units/mg solid

Product Number:

C1184

CAS Number:

9012-54-8

MDL:

MFCD00081510

Storage Temperature:

2 - 8 °C

TEST

Specification

units/mg solid

≥ 0.3

Cellulase Activity

Unit Definition: One unit will liberate 1.0 micromole of Glucose from Cellulose in 1 hr at pH 5.0 at 37 deg C (2 hr incubation time).

Specification: PRD.0.ZQ5.10000039029

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1

Anexo 3: Ficha técnica Hemicelulasa (Sigma-Aldrich)

SIGMA-ALDRICH[®]

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

Hemicellulase from *Aspergillus niger* – powder, 0.3–3.0 unit/mg solid (using a β -galactose dehydrogenase system and locust bean gum as substrate)

Product Number: H2125
CAS Number: 9025-56-3
MDL: MFCD00131279

Storage Temperature: -20 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	White to Faint Yellow and Faint Brown to Brown
Appearance (Form)	Powder
units/mg solid	0.3 - 3.0
Hemicellulase Activity	
One unit will produce a relative fluidity change of 1 per 5 min using locust bean gum as substrate at pH 4.5 at 40 deg C.	
units/mg solid	\geq 0.01
Cellulase Activity	
One unit will liberate 1.0 micromole of D-glucose from cellulose per hour at pH 5.0 at 37 deg C (2 hour assay)	

Specification: PRD.0.ZQ5.10000038339

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1

ANEXO 4: Composición químico-proximal y fibra detergente ácido (FDA) y fibra detergente neutro (FDN) de las semillas de maracuyá

%	Base seca		Base húmeda	
Humedad	6,16	± 0,20	5,80	± 0,20
Proteína bruta	13,98	± 0,04	13,17	± 0,04
Extracto etéreo	26,36	± 0,13	24,83	± 0,12
Fibra bruta	44,12	± 0,03	41,56	± 0,03
Cenizas	2,59	± 0,09	2,44	± 0,09
Carbohidratos	8,98	± 0,14	53,70	± 0,13
Fibra detergente ácido	51,75	± 0,42	48,75	± 0,42
Fibra detergente neutro	53,59	± 0,38	50,48	± 0,38

ANEXO 5: Rendimientos extracción del aceite de las semillas de maracuyá – Screening

Enzima	Tiempo (h)	MP:A	% enzima	% Rendimiento (v/p)	% Rendimiento (p/p)
COMPLEJO DELTAZYM VRAC-100	4	3	0,5	19,48 ± 1,69	16,92 ± 1,93
			2	16,30 ± 3,20	13,14 ± 2,67
		5	0,5	13,21 ± 1,46	10,80 ± 1,27
			2	18,80 ± 3,68	15,36 ± 2,75
	11	4	1,25	19,73 ± 0,81	17,26 ± 0,76
	18	3	0,5	17,76 ± 2,04	14,06 ± 1,36
			2	17,75 ± 1,73	13,53 ± 1,43
		5	0,5	18,79 ± 1,69	14,69 ± 2,84
			2	21,92 ± 3,32	18,75 ± 3,02
	CELULASA	4	3	0,5	17,36 ± 0,95
2				16,29 ± 1,34	12,97 ± 1,36
5			0,5	14,22 ± 0,74	11,06 ± 1,60
			2	15,36 ± 1,23	12,23 ± 1,24
11		4	1,25	19,80 ± 1,40	16,50 ± 1,21
18		3	0,5	15,34 ± 0,31	11,81 ± 0,40
			2	18,96 ± 0,90	12,59 ± 0,89
		5	0,5	17,59 ± 0,35	14,78 ± 0,41
			2	15,60 ± 0,12	12,47 ± 0,25

Continuación

HEMICELULASA	4	3	0,5	14,82	± 1,77	12,61	± 1,53
			2	15,72	± 1,14	13,01	± 1,07
		5	0,5	16,84	± 0,47	13,35	± 0,62
			2	16,03	± 0,62	13,13	± 0,69
	11	4	1,25	18,29	1,43	16,39	1,81
	18	3	0,5	16,58	± 0,60	13,18	± 1,00
			2	13,24	± 1,47	10,57	± 0,96
		5	0,5	16,16	± 0,97	12,86	± 0,74
			2	17,44	± 1,07	14,35	± 1,48
	CONVENCIONAL				13,89	± 0,55	11,87

ANEXO 6: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas, Análisis de Varianza Multifactorial para los factores que afectan el “Rendimiento” y Tabla de promedios para el “Rendimiento”

a. Tests for Normality for Rendimiento (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	21,3	0,263

b. ANOVA Table for Rendimiento by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas - Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	334,	70	4,77	99,23	0,0486
Within groups	0,048	1	0,048		
Total (Corr.)	334,	71			

c. Analysis of Variance for Rendimiento - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Conc enzima	0,311	1	0,311	0,08	0,7839
B:MP:agua	3,92	1	3,92	0,96	0,3319
C:Tiempo Hid.	3,51	1	3,51	0,86	0,3583
D:Tipo enzima	55,6	2	27,8	6,79	0,0021
RESIDUAL	270,0	66	4,1		
TOTAL (CORRECTED)	334,0	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

d. Table of Least Squares Means for Rendimiento with 95,0% Confidence Intervals

			<i>Std. Error</i>	<i>Lower Limit</i>	<i>Upper Limit</i>
<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Error</i>	<i>Limit</i>	<i>Limit</i>
GRAND MEAN	72	13,4			
conc enzima					
0,5	36	13,4	0,337	12,7	14,0
2	36	13,5	0,337	12,8	14,2
ENZIMA					
Celulasa	24	12,7	0,413	11,9	13,5
Deltazim	24	14,7	0,413	13,8	15,5
Hemicelulasa	24	12,9	0,413	12,1	13,7
MP: AGUA					
Cinco:uno	36	13,6	0,337	13,0	14,3
Tres:uno	36	13,2	0,337	12,5	13,9
TIEMPO					
4	36	13,2	0,337	12,5	13,9
18	36	13,6	0,337	13,0	14,3

ANEXO 7: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el factor “tipo de enzima”

Multiple Range Tests for Rendimiento by Tipo enzima

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Tipo enzima</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Celulasa	24	12,7	0,413	X
Hemicelulasa	24	12,9	0,413	X
Deltazym VRAC-100	24	14,7	0,413	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
celulasa - deltazym	*	-1,95	1,4
celulasa - hemicelulasa		-0,173	1,4
deltazym - hemicelulasa	*	1,77	1,4

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 8: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple entre los tratamientos aplicados

Multiple Range Tests for Rendimiento by Tratamiento

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	10,6	X
Deltazym/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	10,8	X
Celulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	11,1	XX
Celulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18 h	3	11,8	XX
Convencional	3	11,9	XX
Celulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	12,2	XX
Celulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	12,5	XXX
Celulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	12,6	XXX
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	12,6	XXX
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18	3	12,9	XXX
Celulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	13,0	XXX
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	13,0	XXX
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	13,1	XXX
Deltazym/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	13,1	XXX
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18	3	13,2	XXX
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	13,3	XXX
Deltazym/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	13,5	XXX
Deltazym/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18 h	3	14,1	XXX
Celulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	14,1	XXX
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	14,4	XXXX
Deltazym/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18 h	3	14,7	XXXX
Celulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18 h	3	14,8	XXXX
Deltazym/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	15,4	XXX
Deltazym/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	16,9	XX
Deltazym/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	18,7	X

ANEXO 9: Características del Diseño Experimental aplicado en la Optimización

Response Surface Design Attributes

Design class: Response Surface

Design name: Central composite design: $2^3 + \text{star}$

Design characteristic: Rotatable and orthogonal

Base Design

Number of experimental factors: 3

Number of blocks: 1

Number of responses: 1

Number of runs: 23, including 9 centerpoints per block

Error degrees of freedom: 13

Randomized: Yes

<i>Factors</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Units</i>	<i>Continuous</i>
Conc. enzima	0,5	2,0		Yes
Relación MP:agua	3,0	5,0		Yes
Tiempo	4,0	18,0		Yes

ANEXO 10: Resultados de las corridas de maximización del tratamiento enzimático

Corrida	% enzima	MP:A	Tiempo hid. (h)	% Rendimiento (p/p)
1	1,25	4	11	16,99
2	1,25	4	11	16,66
3	1,25	4	11	18,12
4	1,25	4	11	16,82
5	1,25	4	11	17,39
6	1,25	4	11	17,01
7	1,25	4	11	17,26
8	1,25	4	11	17,40
9	1,25	4	11	17,21
10	1,25	2,32	11	15,98
11	0,5	5	18	18,75
12	2	5	4	15,36
13	0,5	3	4	16,92
14	2	3	4	13,14
15	-0,0113	4	11	11,87
16	2,51	4	11	16,33
17	1,25	4	22,8	18,97
18	0,5	3	18	14,06
19	0,5	5	4	10,80
20	2	5	18	18,75
21	2	3	18	13,53
22	1,25	5,68	11	17,95
23	1,25	4	-0,773	11,87

ANEXO 11: Análisis de Varianza – Maximización del Rendimiento de extracción
Analysis of Variance for Rendimiento

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
A:Conc. Enzima	4,37	1	4,37	3,13	0,1005
B:Relacion MP:agua	6,36	1	6,36	4,55	0,0525
C:Tiempo Hidrólisis	31,8	1	31,8	22,74	0,0004
AA	20,9	1	20,9	14,94	0,0020
AB	9,83	1	9,83	7,03	0,0199
AC	0,215	1	0,215	0,15	0,7011
BB	0,283	1	0,283	0,20	0,6603
BC	23,9	1	23,9	17,07	0,0012
CC	7,31	1	7,31	5,23	0,0396
Total error	18,2	13	1,4		
Total (corr.)	123,	22			

R-squared = **85,2** percent/R-squared (adjusted for d.f.) = **75,0** percent
 Standard Error of Est. = **1,18**/Mean absolute error = **0,678**

ANEXO 12: Niveles máximos, rendimiento máximo, modelo matemático arrojados por software estadístico y Comparación de rendimientos máximos teórico y experimental

a. Optimize Response (Respuesta máxima)

Goal: maximize Rendimiento

Optimum value = 24,5

<i>Factor</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Optimum</i>
Concentración de enzima	-0,0113	2,51	1,95
Relación MP:agua	2,32	5,68	5,68
Tiempo de hidrólisis	-0,773	22,8	22,8

b. Modelo matemático

$$\text{Rendimiento} = 22,0 + 0,284 * \text{Conc enzima} - 2,81 * \text{MP:agua} - 0,426 * \text{Tiempo} - 2,04 * \text{Conc enzima}^2 + 1,48 * \text{Conc enzima} * \text{MP:agua} - 0,0312 * \text{Conc enzima} * \text{Tiempo} - 0,134 * \text{MP:agua}^2 + 0,247 * \text{MP:agua} * \text{Tiempo} - 0,0138 * \text{Tiempo}^2$$

c. Comparación de rendimientos máximos teóricos y experimentales

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Tipo dato</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Experimental	3	20,2	X
Teórico	1	24,5	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
Experimental - Teórico	*	-4,31

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 13: Resultados resumidos de la caracterización física de los aceites obtenidos

Enzima	Tiem. (h)	MP:A	% enz.	% Humedad	Gravedad Específica	Color fotométrico	Índice de Refracción	
COMPLEJO DELTAZYM VRAC-100	4	3	0,5	0,13 ± 0,00	0,915 ± 0,013	5,77 ± 0,07	1,472 ± 0,000	
			2	0,05 ± 0,00	0,921 ± 0,005	9,23 ± 3,10	1,472 ± 0,000	
		5	0,5	0,12 ± 0,00	0,922 ± 0,001	5,96 ± 0,07	1,472 ± 0,000	
			2	0,19 ± 0,00	0,922 ± 0,000	6,75 ± 0,72	1,472 ± 0,000	
	18	3	0,5	0,18 ± 0,00	0,922 ± 0,001	6,41 ± 0,67	1,473 ± 0,002	
			2	0,19 ± 0,00	0,922 ± 0,002	6,34 ± 0,72	1,472 ± 0,000	
		5	0,5	0,20 ± 0,00	0,922 ± 0,001	6,78 ± 1,24	1,472 ± 0,000	
			2	0,17 ± 0,00	0,922 ± 0,000	6,16 ± 0,57	1,475 ± 0,000	
	CELULASA	4	3	0,5	0,16 ± 0,04	0,922 ± 0,000	6,12 ± 0,46	1,472 ± 0,000
				2	0,18 ± 0,00	0,922 ± 0,002	6,31 ± 0,94	1,472 ± 0,001
			5	0,5	0,15 ± 0,00	0,922 ± 0,000	5,61 ± 0,17	1,472 ± 0,000
				2	0,17 ± 0,00	0,921 ± 0,000	5,80 ± 0,24	1,472 ± 0,000
18		3	0,5	0,20 ± 0,00	0,923 ± 0,001	7,32 ± 0,83	1,472 ± 0,000	
			2	0,19 ± 0,00	0,922 ± 0,001	7,64 ± 0,45	1,472 ± 0,000	
		5	0,5	0,17 ± 0,00	0,922 ± 0,000	8,07 ± 1,21	1,472 ± 0,000	
			2	0,20 ± 0,00	0,921 ± 0,002	6,33 ± 0,32	1,472 ± 0,000	
HEMICELULASA		4	3	0,5	0,17 ± 0,03	0,921 ± 0,001	6,45 ± 0,33	1,472 ± 0,000
				2	0,17 ± 0,00	0,910 ± 0,023	5,96 ± 0,11	1,472 ± 0,000
			5	0,5	0,14 ± 0,00	0,922 ± 0,000	6,13 ± 0,53	1,472 ± 0,000
				2	0,13 ± 0,00	0,923 ± 0,001	6,32 ± 0,09	1,472 ± 0,000
	18	3	0,5	0,17 ± 0,00	0,921 ± 0,000	6,53 ± 0,63	1,472 ± 0,000	
			2	0,19 ± 0,00	0,923 ± 0,001	6,33 ± 0,24	1,472 ± 0,000	
		5	0,5	0,16 ± 0,00	0,921 ± 0,001	7,94 ± 1,21	1,473 ± 0,002	
			2	0,17 ± 0,00	0,924 ± 0,002	6,83 ± 0,63	1,472 ± 0,000	
	CONVENCIONAL				0,08 ± 0,01	0,922 ± 0,000	1,53 ± 0,31	1,475 ± 0,001

ANEXO 14: Resultados resumidos de la caracterización química de los aceites obtenidos

Enzima	Tiem. (h)	MP:A	% enz.	Índice de acidez	Índice de peróxidos	Índice de Yodo	Valor de p-anisidina	
COMPLEJO DELTAZYM VRAC-100	4	3	0,5	29,39 ± 1,86	6,61 ± 2,88	139,9 ± 8,3	2,87 ± 1,10	
			2	13,03 ± 1,13	3,29 ± 1,88	143,9 ± 7,9	2,87 ± 0,71	
		5	0,5	19,17 ± 0,34	1,20 ± 0,04	138,8 ± 6,9	3,11 ± 1,09	
			2	22,63 ± 0,96	1,00 ± 0,36	143,1 ± 4,6	3,43 ± 0,28	
	18	3	0,5	28,12 ± 0,92	1,63 ± 0,68	142,5 ± 3,2	2,43 ± 0,85	
			2	25,56 ± 0,85	3,22 ± 0,70	141,5 ± 2,3	1,41 ± 0,28	
		5	0,5	27,49 ± 1,35	2,61 ± 0,90	143,7 ± 1,7	1,32 ± 0,23	
			2	18,00 ± 0,39	4,10 ± 1,43	141,3 ± 4,0	2,05 ± 0,57	
	CELULASA	4	3	0,5	16,49 ± 4,50	3,22 ± 0,67	133,7 ± 12,8	2,88 ± 0,86
				2	11,26 ± 0,17	3,30 ± 0,28	140,6 ± 3,9	0,96 ± 0,42
			5	0,5	11,13 ± 1,98	3,94 ± 1,69	138,1 ± 1,9	1,07 ± 0,59
				2	10,65 ± 1,69	3,45 ± 0,96	141,1 ± 4,3	1,09 ± 0,25
18		3	0,5	12,06 ± 1,42	1,65 ± 0,28	142,2 ± 2,4	2,38 ± 1,21	
			2	12,10 ± 0,99	3,46 ± 0,87	139,6 ± 11,1	0,44 ± 0,19	
		5	0,5	13,58 ± 1,34	3,63 ± 1,26	140,8 ± 2,2	0,93 ± 0,28	
			2	14,18 ± 0,15	3,12 ± 0,75	138,2 ± 0,9	0,90 ± 0,48	
HEMICELULASA		4	3	0,5	9,09 ± 1,15	6,58 ± 0,30	133,5 ± 0,6	1,02 ± 0,39
				2	17,12 ± 0,28	2,65 ± 0,77	137,3 ± 2,4	1,10 ± 0,51
			5	0,5	5,06 ± 0,26	4,94 ± 0,06	136,5 ± 2,5	1,25 ± 0,36
				2	8,05 ± 0,42	5,44 ± 0,55	136,0 ± 1,7	0,92 ± 0,70
	18	3	0,5	12,39 ± 2,15	4,01 ± 0,90	135,9 ± 1,8	1,09 ± 0,30	
			2	12,70 ± 0,36	7,67 ± 1,23	138,1 ± 5,5	1,30 ± 0,56	
		5	0,5	6,85 ± 3,15	2,81 ± 1,36	133,4 ± 1,0	1,45 ± 0,49	
			2	17,28 ± 0,28	5,73 ± 2,40	136,0 ± 1,0	2,72 ± 2,32	
CONVENCIONAL				2,70 ± 0,14	5,80 ± 1,44	125,4 ± 10,4	0,40 ± 0,21	

ANEXO 15: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas, Análisis de Varianza para el “Porcentaje de humedad y compuestos volátiles”

a. Tests for Normality for % HUM (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	20,8	0,292

b. ANOVA Table for % HUM by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas-Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,305	70	0,00436	91,85	0,0817
Within groups	0,0000475	1	0,0000475		
Total (Corr.)	0,306	71			

c. Analysis of Variance for % HUM - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Enzima	0,00482	2	0,00241	0,56	0,5714
B:Conc enzima	0,000124	1	0,000124	0,03	0,8654
C:mp:agua	0,000138	1	0,000138	0,03	0,8578
D:Tiempo Hid	0,0187	1	0,0187	4,38	0,0402
RESIDUAL	0,282	66	0,00427		
TOTAL (CORRECTED)	0,306	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

ANEXO 16: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el “Porcentaje de humedad y compuestos volátiles” por el factor “tiempo de hidrólisis”

Multiple Range Tests for % HUM by Tiempo Hid

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Tiempo Hid</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
4	36	0,147	0,0109	X
18	36	0,179	0,0109	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
4 - 18	*	-0,0322	0,0307

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 17: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Porcentaje de humedad y compuestos volátiles” por “Tipo de Tratamiento”

a. Table of Means for % HUM by Tipo Tratamiento with 95,0 percent LSD intervals

			<i>Std. error</i>		
<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>(pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	0,0789	0,0374	0,0263	0,132
Tratamiento enzimático	72	0,163	0,00763	0,152	0,174
Total	75	0,16			

b. Multiple Range Tests for % HUM by Tipo Tratamiento

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Convencional	3	0,0789	X
Tratamiento enzimático	72	0,163	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
Convencional - Tratamiento enzimático	*	-0,084

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 18: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Prueba de Kruskal-Wallis para la “Gravedad Específica (GE)”

a. Tests for Normality for GE (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	227,	0,0

b. ANOVA Table for GE by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas-Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,00201	70	0,0000288	120,12	0,0715
Within groups	2,39E-7	1	2,39E-7		
Total (Corr.)	0,00201	71			

c. Prueba de Kruskal-Wallis para la Gravedad Específica

Kruskal-Wallis Test for GE by Tipo Tratamiento

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Sample Size</i>	<i>Average Rank</i>
Celulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18 h	3	60,0
Celulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	48,0
Celulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	47,7
Celulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	33,7
Celulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18 h	3	32,3
Celulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	27,7
Celulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	22,7
Celulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	17,8
Deltazym/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18 h	3	39,3
Deltazym/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	39,0
Deltazym/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	34,5
Deltazym/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	45,3
Deltazym/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18 h	3	45,0
Deltazym/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	32,0
Deltazym/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	31,7
Deltazym/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	36,7
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18 h	3	11,0
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	19,3
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	49,7
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	29,2
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18 h	3	24,3
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	35,3
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	63,2
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	50,7

Test statistic = 26,7 P-Value = 0,269

ANEXO 19: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Gravedad Específica (GE)” por “Tipo de Tratamiento”

a. Table of Means for GE by Tipo Tratamiento with 95,0 percent

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. error (pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	0,922	0,00303	0,918	0,926
Tratamiento enzimático	72	0,921	0,000619	0,92	0,922
Total	75	0,921			

b. Multiple Range Tests for GE by Tipo Tratamiento

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Tratamiento enzimático	72	0,921	X
Convencional	3	0,922	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
Convencional - Tratamiento enzimático		0,000806

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 20: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Prueba de Kruskal-Wallis para el Color Fotométrico

a. Tests for Normality for COLOR FOT (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	50,5	0,0000634

b. ANOVA Table for COLOR FOT by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas-Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	88,8	70	1,27	16,31	0,1922
Within groups	0,0777	1	0,0777		
Total (Corr.)	88,8	71			

c. Prueba de Kruskal-Wallis para el Color Fotométrico

Kruskal-Wallis Test for COLOR FOT by Tipo Tratamiento

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Sample Size</i>	<i>Average Rank</i>
Celulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18 h	3	56,3
Celulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	25,7
Celulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	62,0
Celulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	30,7
Celulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18 h	3	63,7
Celulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	5,67
Celulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	34,3
Celulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	14,0
Deltazym/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18 h	3	35,7
Deltazym/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	11,7
Deltazym/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	32,0
Deltazym/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	64,3
Deltazym/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18 h	3	39,7
Deltazym/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	19,7
Deltazym/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	26,3
Deltazym/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	45,7
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/18	3	38,7
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/0,5 % enz/4 h	3	40,7
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/18 h	3	35,7
Hemicelulasa/MP:agua = 3:1/2 % enz/4 h	3	20,0
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/18	3	61,3
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/0,5 % enz/4 h	3	27,3
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/18 h	3	48,3
Hemicelulasa/MP:agua = 5:1/2 % enz/4 h	3	36,7

Test statistic = 44,0 P-Value = 0,0526

ANEXO 21: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Color Fotométrico” por “Tipo de Tratamiento”

a. Table of Means for COLOR FOT by Tipo Tratamiento with 95,0 percent LSD intervals

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. error (pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	1,53	0,638	0,631	2,43
Tratamiento enzimático	72	6,63	0,13	6,45	6,81
Total	75	6,43			

b. Multiple Range Tests for COLOR FOT by Tipo Tratamiento

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Convencional	3	1,53	X
Tratamiento enzimático	72	6,63	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
Convencional - Tratamiento enzimático	*	-5,1

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 22: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el “Índice de Refracción (IR)”

a. Tests for Normality for IR (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	1,17E3	0,06

b. ANOVA Table for IR by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas – Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,0000447	70	6,38	5,31	0,0622
Within groups	0,0	1	0,0		
Total (Corr.)	0,0000447	71			

c. Analysis of Variance for IR - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Enzima	0,00000386	2	0,00000193	3,63	0,0319
B:Conc enzima	1,39E-8	1	1,39E-8	0,03	0,8721
C:mp:agua	0,00000168	1	0,00000168	3,16	0,0800
D:Tiempo Hid	0,00000401	1	0,00000401	7,55	0,0077
RESIDUAL	0,0000351	66	5,32E-7		
TOTAL (CORRECTED)	0,0000447	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

ANEXO 23: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de Refracción (IR) por el factor “tipo de enzima”

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Enzima</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Celulasa	24	1,47	0,000149	X
Hemicelulasa	24	1,47	0,000149	XX
Deltazym	24	1,47	0,000149	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Celulasa - Deltazym	*	-0,000542	0,000505
Celulasa - Hemicelulasa		-0,000125	0,000505
Deltazym - Hemicelulasa		0,000417	0,000505

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 24: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el “Índice de Refracción (IR)” por el factor “tiempo de hidrólisis”

Multiple Range Tests for IR by Tiempo Hid

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Tiempo Hid</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
4	36	1,47	0,000122	X
18	36	1,47	0,000122	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
4 - 18	*	-0,000472	0,000343

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 25: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Refracción (IR)” por “Tipo de Tratamiento”

a. Table of Means for IR by Tipo Tratamiento with 95,0 percent

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. error (pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	1,48	0,000455	1,47	1,48
Tratamiento enzimático	72	1,47	0,0000929	1,47	1,47
Total	75	1,47			

b. Multiple Range Tests for IR by Tipo Tratamiento

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Tratamiento enzimático	72	1,47	X
Convencional	3	1,48	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Convencional - Tratamiento enzimático	*	0,00315	0,000925

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 26: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el “Índice de Acidez” (IA)

a. Tests for Normality for IA (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	39,4	0,085

b. ANOVA Table for IA by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas – Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	4,53E3	70	64,7	0,48	0,8457
Within groups	134,	1	134,		
Total (Corr.)	4,66E3	71			

c. Analysis of Variance for IA - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Enzima	3,7E3	2	1,85E3	150,02	0,0000
B:Conc enzima	41,4	1	41,4	3,36	0,0714
C:mp:agua	37,7	1	37,7	3,06	0,0850
D:Tiempo Hid	67,2	1	67,2	5,45	0,0226
RESIDUAL	814,	66	12,3		
TOTAL (CORRECTED)	4,66E3	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

ANEXO 27: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de acidez por el factor “tipo de enzima”

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Enzima</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Hemicelulasa	24	5,56	0,717	X
Celulasa	24	12,7	0,717	X
Deltazym	24	23,0	0,717	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Celulasa - Deltazym	*	-10,4	2,43
Celulasa - Hemicelulasa	*	7,12	2,43
Deltazym - Hemicelulasa	*	17,5	2,43

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 28: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de acidez por el factor “tiempo de hidrólisis”

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Tiempo Hid</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
4	36	12,8	0,585	X
18	36	14,7	0,585	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
4 - 18	*	-1,93	1,65

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 29: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Acidez (IA)” por “Tipo de Tratamiento”

a. Table of Means for IA by Tipo Tratamiento with 95,0 percent

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. error (pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	2,66	4,61	-3,85	9,16
Tratamiento enzimático	72	13,8	0,942	12,4	15,1
Total	75	13,3			

b. Multiple Range Tests for IA by Tipo Tratamiento

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Convencional	3	2,66	X
Tratamiento enzimático	72	13,8	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>
Convencional - Tratamiento enzimático	*	-11,1

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 30: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el Índice de Peróxidos (IP)

a. Tests for Normality for IP (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	89,0	2,18

b. ANOVA Table for IP by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas-Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	264,	70	3,78	0,53	0,8280
Within groups	7,19	1	7,19		
Total (Corr.)	272,	71			

c. Analysis of Variance for IP - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Enzima	57,6	2	28,8	9,12	0,0003
B:Conc enzima	1,65	1	1,65	0,52	0,4728
C:mp:agua	3,48	1	3,48	1,10	0,2977
D:Tiempo Hid	0,463	1	0,463	0,15	0,7031
RESIDUAL	208,	66	3,16		
TOTAL (CORRECTED)	272,	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

ANEXO 31: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de Peróxidos (IP) por el factor “tipo de enzima”

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Enzima</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Deltazym	24	2,96	0,363	X
Celulasa	24	3,22	0,363	X
Hemicelulasa	24	4,98	0,363	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Celulasa - Deltazym		0,26	1,23
Celulasa - Hemicelulasa	*	-1,75	1,23
Deltazym - Hemicelulasa	*	-2,01	1,23

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 32: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Peróxidos (IP)” por “Tipo de Tratamiento”

a. Table of Means for IP by Tipo Tratamiento with 95,0 percent

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. error (pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	5,8	1,12	4,22	7,38
Tratamiento enzimático	72	3,72	0,229	3,4	4,04
Total	75	3,8			

b. Multiple Range Tests for IP by Tipo Tratamiento

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Tratamiento enzimático	72	3,72	X
Convencional	3	5,8	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Convencional - Tratamiento enzimático		2,08	2,28

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 33: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el “Índice de Yodo (II)”

a. Tests for Normality for II (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	18,4	0,429

b. ANOVA Table for II by RESIDUALS (Prueba de Homogeneidad de Varianzas-Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	1,96E3	70	28,0	5590,09	0,0505
Within groups	0,00501	1	0,00501		
Total (Corr.)	1,96E3	71			

c. Analysis of Variance for II - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Enzima	438,	2	219,	9,85	0,0002
B:Conc enzima	38,9	1	38,9	1,75	0,1902
C:mp:agua	0,417	1	0,417	0,02	0,8915
D:Tiempo Hid	14,3	1	14,3	0,64	0,4261
RESIDUAL	1,47E3	66	22,2		
TOTAL (CORRECTED)	1,96E3	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

ANEXO 34: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el “Índice de Yodo (II)” por el factor “tipo de enzima”

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Enzima</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Hemicelulasa	24	136,	0,962	X
Celulasa	24	139,	0,962	X
Deltazym	24	142,	0,962	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Celulasa - Deltazym		-2,56	3,26
Celulasa - Hemicelulasa	*	3,46	3,26
Deltazym - Hemicelulasa	*	6,02	3,26

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 35: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de Yodo (II)” por “Tipo de Tratamiento”

a. Table of Means for II by Tipo Tratamiento with 95,0 percent

			<i>Std. error</i>		
<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>(pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	144,	3,1	139,	148,
Tratamiento enzimático	72	139,	0,633	138,	140,
Total	75	139,			

b. Multiple Range Tests for II by Tipo Tratamiento

Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Tratamiento enzimático	72	139,	X
Convencional	3	144,	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Convencional - Tratamiento enzimático		4,72	6,31

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 36: Prueba de Normalidad, Prueba de Homogeneidad de Varianzas y Análisis de Varianza para el Índice de p-anisidina (IAN)

a. Tests for Normality for IAN (Prueba de Normalidad)

<i>Test</i>	<i>Statistic</i>	<i>P-Value</i>
Chi-Squared	37,7	0,06429

b. Analysis of Variance for IAN - Type III Sums of Squares (Prueba de Homogeneidad de Varianzas – Levene)

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Enzima	19,0	2	9,51	10,43	0,0001
B:Conc enzima	0,862	1	0,862	0,94	0,3347
C:mp:agua	0,0342	1	0,0342	0,04	0,8471
D:Tiempo Hid	2,21	1	2,21	2,42	0,1247
RESIDUAL	60,2	66	0,912		
TOTAL (CORRECTED)	82,3	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

ANEXO 37: Prueba Tukey HSD de comparación múltiple para el Índice de p-anisidina (IAN) por el factor “tipo de enzima”

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Enzima</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Celulasa	24	1,33	0,195	X
Hemicelulasa	24	1,36	0,195	X
Deltazym	24	2,43	0,195	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Celulasa - Deltazym	*	-1,1	0,661
Celulasa - Hemicelulasa		-0,0241	0,661
Deltazym - Hemicelulasa	*	1,08	0,661

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 38: Tabla de promedios y Prueba de Student-Newman-Keuls para “Índice de p-anisidina (IAN)” por “Tipo de Tratamiento”

Table of Means for IAN by Tipo Tratamiento with 95,0 percent LSD intervals

<i>Tipo Tratamiento</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Std. error (pooled s)</i>	<i>Lower limit</i>	<i>Upper limit</i>
Convencional	3	0,404	0,614	-0,46	1,27
Tratamiento enzimático	72	1,71	0,125	1,53	1,88
Total	75	1,65			

Multiple Range Tests for IAN by Tipo Tratamiento

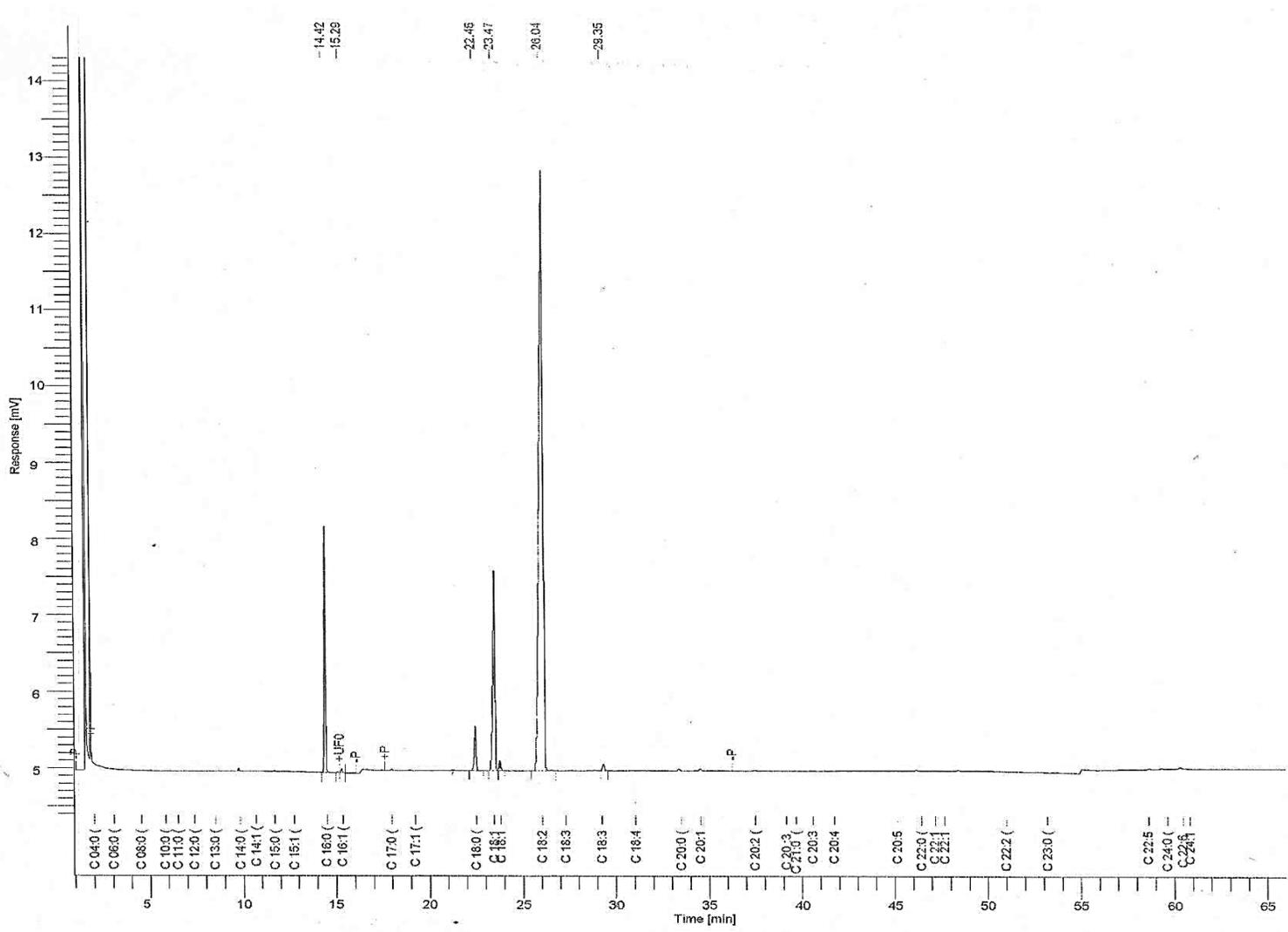
Method: 95,0 percent Student-Newman-Keuls

<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Convencional	3	0,404	X
Tratamiento enzimático	72	1,71	X

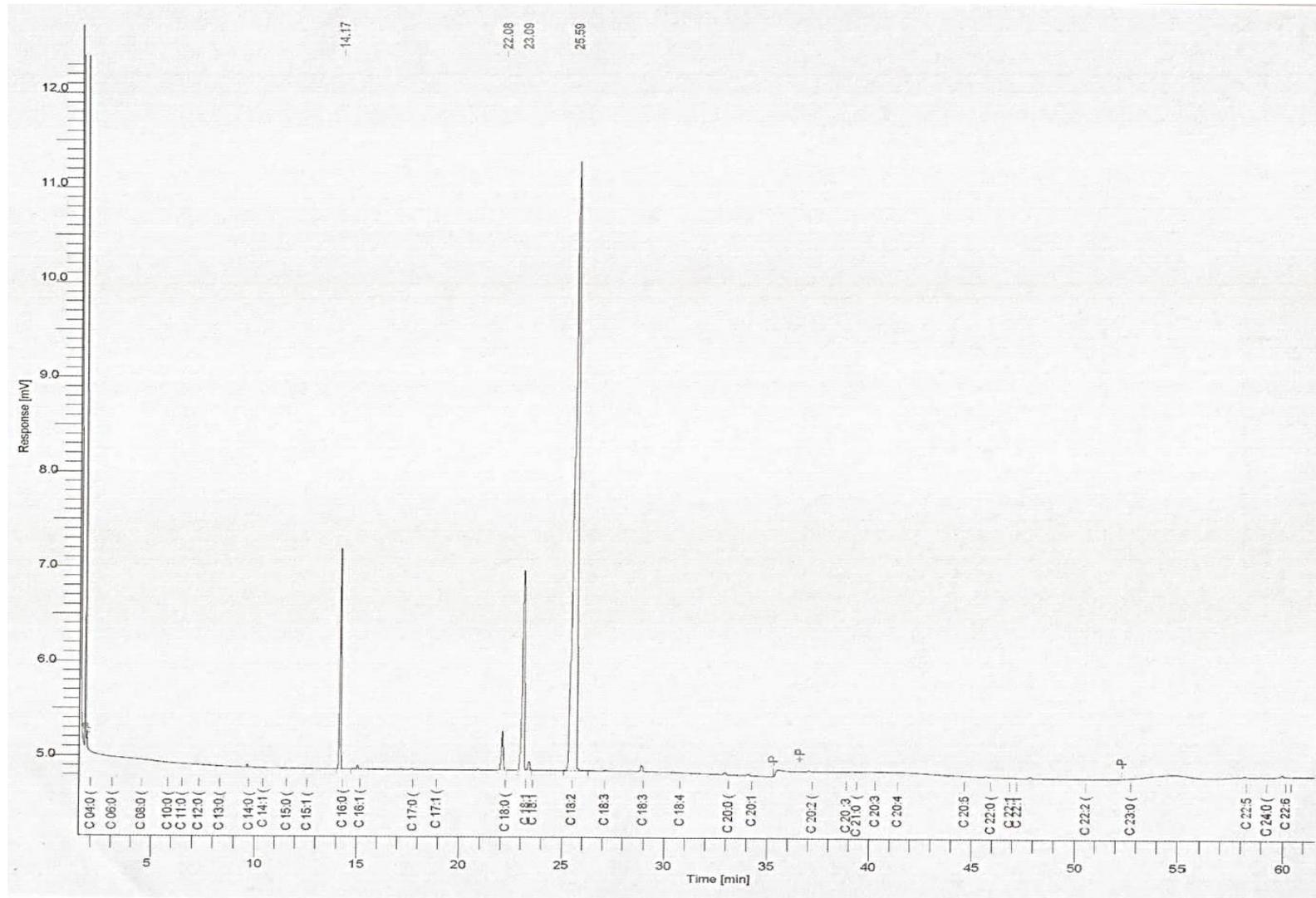
<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Convencional - Tratamiento enzimático	*	-1,3	1,25

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO 39: Cromatograma de ácidos grasos correspondientes al aceite extraído convencionalmente



ANEXO 40: Cromatograma de ácidos grasos correspondiente al aceite extraído con asistencia de enzimas (Deltazym VRAC-100, relación MP:agua = 5:1, concentración de enzima 2% y tiempo de hidrólisis de 18 horas)



ANEXO 41: Composición de ácidos grasos del aceite de semilla de maracuyá obtenido sin y con tratamiento enzimático.

Ácidos Grasos (%)*	16:00	16:01	18:00	18:1 ω-9	18:1 ω-7	18:2 ω-6	18:3 ω-3	SAT.	MON.	POL.	TOTAL
Sin tratamiento Enzimático	10,00 ±0,10	0,14 ±0,00	2,57 ±0,01	13,61 ±0,03	0,54 ±0,00	72,72 ±0,08	0,42 ±0,00	12,57 ±0,11	14,29 ±0,03	73,14 ±0,13	100,00 ±0,11
Con tratamiento Enzimático	9,52 ±0,28	---- ----	2,41 ±0,03	13,80 ±0,09	0,55 ±0,01	72,89 ±0,16	0,44 ±0,01	11,93 ±0,25	14,33 ±0,08	73,27 ±0,24	99,53 ±0,078

*Las evaluaciones se realizaron por duplicado

*Sat: Saturados, Mon: Mono insaturados, Pol: Poliinsaturados.

ANEXO 42: Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de ácidos grasos saturados”

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,41	1	0,41	11,30	0,0783
Within groups	0,0725	2	0,0362		
Total (Corr.)	0,482	3			

ANEXO 43: Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:1 ω -9”

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,0342	1	0,0342	7,40	0,1127
Within groups	0,00925	2	0,00462		
Total (Corr.)	0,0435	3			

ANEXO 44: Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:1 ω -7”

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,000025	1	0,000025	1,00	0,4226
Within groups	0,00005	2	0,000025		
Total (Corr.)	0,000075	3			

ANEXO 45: Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:2 ω -6”

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	8,01	1	8,01	0,86	0,4523
Within groups	18,7	2	9,35		
Total (Corr.)	26,7	3			

ANEXO 46: Prueba de Student-Newman-Keuls para el “contenido de C18:3 ω -3”

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,000225	1	0,000225	9,00	0,0955
Within groups	0,00005	2	0,000025		
Total (Corr.)	0,000275	3			