

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**Extracción de aceite de la semilla de calabacilla loca
(*Cucúrbita foetidissima*) mediante biolixiviación y prensado.**

POR:

BEATRIZ GONZÁLEZ PÉREZ

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS
POR:
BEATRIZ GONZÁLEZ PÉREZ**

**Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
Requisito
Parcial para Obtener el Título de:
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

APROBADA

**M.C. María Hernández González
Presidente**

**Dra. Ana Verónica Charles Rdz
Sinodal**

**Dr. Heliodoro de la Garza Toledo
Sinodal**

**M.P. Francisco Centeno Hernández
Suplente**

**Ing. José Rodolfo Peña Oranday.
Coordinador de la División de Ciencia Animal.
Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Mayo de 2008.**

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme vida cada día y por dejarme terminar satisfactoriamente este proyecto de vida.

A mi **Alma Terra Mater** por cobijarme en sus entrañas y hacer de mi un mujer profesionalista y de bien.

A mis abuelos paternos, Luís González Preciado y Eloisa Preciado Herrera, pero sobre todo a mí abuelo por darme ese apoyo incondicional para que yo siguiera estudiando, así como también a sus hijos que igualmente me brindaron su apoyo.

A mi esposo, Rolando López Vidal, por apoyarme en mis estudios para terminar así este proyecto.

A mis profesores por transmitirme sus conocimientos y sus experiencias.

A mí asesor MC. María Hernández González por brindarme sus conocimientos y su apoyo para que terminara este proyecto de vida.

A mis sinodales la Dr. Verónica, el Dr. Heliodoro y el MP. Francisco por brindarme su apoyo para llevar a cabo este trabajo, mediante sus conocimientos.

A mis compañeros, a los laboratoristas y a todas esas personas que me brindaron su apoyo durante mi estancia en esta escuela de sabiduría.

DEDICATORIAS

A mí hijo José Rolando López González por darme ese aliento en la vida para seguir luchando y por llenarme con tu carita de inocencia cada día demostrándome que vale pena estar aquí para disfrutar tus triunfos, te amo hijo.

A mí esposo Rolando López Vidal por brindarme su amor en cada momento y por hacerme sentir la mujer más especial del mundo, a ti mí vida, te amo.

A mis padres Beatriz Pérez Castro y José de Jesús González Preciado por darme la vida, su amor y por sacarme adelante en cada momento, haciendo de mí una mujer de bien, a ustedes mis padres les debo todo lo que soy ahora, los amo.

A mis hermanos José Ángel, Liseth y Mari por brindarme su cariño a cada instante, los quiero hermanos.

A mi abuelito Justino Pérez Jiménez que esta en el cielo le dedico este trabajo con todo mi amor, te quiero abuelito.

A abuelo Luís González por apoyarme en todo momento al brindarme su cariño incondicional, te quiero abuelito.

A la familia González y la familia Pérez por apoyarme en cada momento de mi vida.

ÍNDICE

Agradecimientos	iii
Dedicatorias	iv
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	x
Resumen	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
Capítulo 2. Revisión de literatura	4
2.1. Aceites y Grasas comestible	4
2.1.1. Definición.....	4
2.1.1.1. Ácidos grasos.....	5
2.1.1.2. Ácidos grasos esenciales.....	8
2.1.2. Fuentes de aceites y grasas.....	9
2.1.2.1. Funciones de los aceites y grasas.....	10
2.1.3. Métodos de extracción de grasas y aceites.....	10
2.1.3.1. Extracción por presión.....	10
2.1.3.2. Extracción por solventes.....	11
2.1.3.3. Procesos aplicados post-extracción.....	13
2.1.3.4. Métodos biotecnológicos.....	13
2.1.4. Biolixiviación.....	14
2.1.4.1. Microorganismos degradadores de celulosa.....	15
2.1.4.2. <i>Aspergillus</i> sp.....	16
2.1.5. Demanda de aceites y grasas.....	17
2.2. Calabacilla loca (<i>Cucúrbita foetidissima</i>)	18
2.2.1. Generalidades del cultivo.....	19
2.2.2. Descripción morfológica.....	20
2.2.3. Potencial alimenticio y/o agroindustrial.....	22

Capítulo 3. Materiales y Métodos	23
3.1. Etapa 1. Obtención y caracterización del hongo utilizado para el proceso de biolixiviación.....	23
3.1.1. Inducción del hongo en Agar Czapek modificado con CMC (carboximetilcelulosa).....	23
3.1.2. Caracterización del hongo.....	24
3.2. Etapa 2. Establecimiento de las condiciones óptimas de degradación de la pared celular.....	24
3.3. Etapa 3. Obtención de la semilla predigerida mediante el proceso de biolixiviación.....	25
3.4. Etapa 4. Evaluación de dos métodos de extracción de aceite, por prensado y por solventes, comparando rendimientos de extracción al aplicar un preproceso de biolixiviación.....	26
3.4.1. Extracción de aceite por el método Soxhlet (AOAC 1997).....	26
3.4.2. Extracción de aceite por método de prensado.....	27
Capítulo 4. Resultados y discusión	28
4.1. Etapa 1. Obtención y caracterización del hongo utilizado para el proceso de biolixiviación.....	28
4.1.1. Inducción del hongo en Agar Czapek modificado con CMC (carboximetilcelulosa).....	28
4.1.2. Caracterización del hongo.....	28
4.2. Etapa 2. Establecimiento de las condiciones óptimas de degradación de la pared celular.....	29
4.2.1. Monitoreo de azúcares totales.....	29
4.2.2. Monitoreo de azúcares reductores.....	32
4.3. Etapa 3. Obtención de la semilla predigerida mediante el proceso de biolixiviación.....	35
4.4. Etapa 4. Evaluación de dos métodos de extracción de aceite, por prensado y por solventes, comparando rendimientos de extracción al aplicar un preproceso de biolixiviación.....	35
4.4.1. Extracción de aceite por el método Soxhlet (AOAC 1997).....	35
4.4.2. Extracción de aceite por método de prensado.....	37
4.4.3. Comparación de los métodos de extracción utilizados.....	38

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones	39
5.1. Conclusiones.....	39
5.2. Recomendaciones.....	40
Capítulo 6	41
6.1. Bibliografía	41
6.2. Anexos	44

Índice de cuadros

Cuadro 1. Czapek dox.....	23
Cuadro 2. Medio acuso (líquido) para el proceso de biolixiviación.....	24

Índice de figuras

Figura 1. Estructura químicas de las grasas.....	5
Figura 2. Obtención de la semilla predigerida.....	26
Figura 3. Extracción de aceite por el método Soxleth.....	27
Figura 4. Prensa hidráulica Enerpac.....	27
Figura 5. Cultivo celular del hongo, <i>Aspergillus</i> sp., en una medio al 100% de CMC.....	28
Figura 6. Morfología de <i>Aspergillus</i> sp. A, B) Cabezas conidiales globosas y esporas en cadenas sobre conidióforos; y C) célula pie.....	29
Figura 7. Concertación de Azúcares Totales a pH 3 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.....	30
Figura 8. Concertación de Azúcares Totales a pH 5 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.....	31
Figura 9. Concertación de Azúcares Totales a pH 7 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.....	31
Figura 10. Concentración de Azucares reductores a pH 3 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.....	33
Figura 11. Concertación de Azúcares reductores a pH 5 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.....	33
Figura 12. Concertación de Azúcares reductores a pH 7 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.....	33
Figura 13. Extracción por Soxleth de aceite de la semilla de calabacilla loca biolixiviada en condiciones de pH 3, 5 y 7.....	34
Figura 14. Extracción por Soxleth de aceite en diferentes tiempos (72, 96 y168 h).....	35
Figura 15. Semilla sin digerir (A) y digerida (B).....	35
Figura 16. Porcentaje de aceite crudo obtenido de la semilla sin digerir por el método Soxleth.....	36
Figura 17. Porcentajes de extracción por el método Soxleth de aceite obtenido del material biolixiviado y sin biolixiviar.....	37
Figura 18. Porcentajes de extracción por prensado de aceite obtenido del material biolixiviado y sin biolixiviar.....	38

Índice de tablas

Tabla 1. Composición en porcentaje de ácidos grasos e índice de yodo.....	7
Tabla 2. Fuentes de ácidos grasos saturados y poliinsaturados.....	8
Tabla 3. Porcentaje de aceite en fuentes vegetales comerciales.....	9
Tabla 4. Importaciones, 2001-2003 (Valor en miles de dólares US\$).....	18
Tabla 5. Clasificación Taxonómica.....	20

Resumen

En la presente investigación se propuso, como objetivo primordial, la obtención del aceite presente en la semilla de calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*), mediante el uso de un proceso físico de prensado, sometiéndola a un pretratamiento, consistente en la degradación de la pared celular, de la semilla, con un hongo celulolítico, con la finalidad de obtener un mayor rendimiento del mismo durante dicho proceso.

El cultivo de la calabacilla loca tiene un amplio potencial alimenticio, ya que está contiene en sus semillas aceite y proteínas, de valor alimenticio. Además es un cultivo que no requiere de muchos cuidados y/o condiciones para su producción. Por lo que se propone como una alternativa para la extracción de aceite comestible.

El hongo utilizado en dicho proceso se indujo en carboximetil-celulosa (CMC) a diferentes concentraciones para la producción de celulasas. Este fue identificado como *Aspergillus* sp. clasificado como GRAS (Generalmente reconocido como seguro), el cual fue posteriormente reconocido como *Aspergillus niger*, uno de los hongos más utilizados para la producción de preparados celulolíticos.

El hongo en cuestión fue inoculado en un medio acuoso formulado con semilla de calabacilla loca, como única fuente de carbono, y micronutrientes. Los valores de pH trabajados fueron de 3, 5 y 7, a una temperatura de 25° C, por un periodo de incubación de 168 h, en el cual se monitoreo la formación y asimilación de azúcares simples y solubles cada 24 h.

El análisis del comportamiento del hongo en dicho proceso permitió establecer que el mejor pH de trabajo fue de 7, a una temperatura de 25° C, por un periodo de tiempo de 96 h, periodo de mayor costo beneficio al comprobarse que no hubo incrementos significativos en cuanto a los porcentajes de aceite obtenidos en tiempos posteriores, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$) realizada.

El aceite de la semilla de calabacilla loca se extrajo por dos métodos, por prensa hidráulica y por Soxhlet, en los cuales se valoró porcentajes de extracción, mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$), según el tipo de muestra: sin biolixiviar y biolixiviada. Por el método Soxhlet se obtuvieron mayores porcentajes de extracción 34% de rendimiento sin biolixiviación y 43.76% con preproceso de biolixiviación; por el método de prensado

se obtuvieron porcentajes de extracción de 24.44% sin tratamiento y 27.54% con tratamiento. Por lo cual se concluyó que el proceso de biolixiviación surtió efecto, mostrándose diferencias significativas en cuanto a rendimientos de extracción, además de que con este proceso se evita el calentamiento anterior al proceso, anulando la posibilidad de oxidación del aceite.

Los resultados anteriores reflejaron que el mejor proceso para la extracción de aceite fue por solventes, sin embargo el uso de estos compuestos tienen impacto toxicológico para medio ambiente así como para la salud por esto el proceso de extracción física (prensado) se establece como el mejor método ya que con este además de no dañar la salud ni el medio ambiente se extrae un aceite de mayor calidad.

Capítulo 1. Introducción

Los aceites y grasas ocupan un lugar muy importante en la alimentación humana. El uso de aceites comestibles, principalmente de origen vegetal, en la vida cotidiana se han vuelto indispensables para la preparación de los alimentos. Estos imparten características importantes relacionadas con la degustación de los mismos, como lo es el sabor y la textura en alimentos naturales y preparados (Kirk *et al.* 2004; Vaclavik 2002; Potter *et al.* 1995)

Los aceites de origen vegetal tienen una gran demanda en el mercado. Las principales fuentes de aceite son las semillas oleaginosas, como: el cártamo, algodón, ajonjolí, soya y girasol (Fox *et al.* 1999).

La producción de cultivos oleaginosos en México es baja por lo cual se importa de Costa Rica, Honduras, Malasia, Colombia, USA y de países bajos más del 80% del aceite que se consume internamente (Proexpot.-Colombia, 2004).

Por lo anterior, la calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) es una fuente alternativa para la producción de aceite, las semillas de este cultivo son ricas en aceite, oscilado entre 25 y 42.8%, y se compone principalmente por ácidos grasos no saturados como ácido linoleico (Curtís 1946). Además es una especie silvestre y perenne que crece en forma natural en zonas áridas y semiáridas de nuestro país y el sur de Estados Unidos (Chávez 1985)

La extracción de aceites se realiza mediante métodos físicos y químicos. Actualmente, se realiza mediante la combinación de los mismos para la obtención de un mayor rendimiento durante el proceso de extracción (FAO 1970; Fox *et al.* 1999)

La sociedad actual exige alimentos con una mayor calidad; dentro de estas exigencias una de las más importantes es la elaboración de alimentos por procesos físicos, donde no intervengan procesos químicos que puedan afectar a la salud del consumidor. Por ello los investigadores en la materia han buscado nuevos métodos

eficaces de producción. Uno de estos campos de investigación involucra a la biotecnología aplicada en el área de alimentos, la cual se ha desarrollado ampliamente en este ámbito en los últimos años.

En la presente investigación se aplicó un preproceso biotecnológico a la semilla de calabacilla loca con la finalidad de liberar de manera más eficiente el aceite presente en la misma durante el proceso de extracción. El proceso utilizado fue la biolixiviación, proceso en el cual se utilizó un hongo celulítico que degradó la pared celular, obteniendo mayores rendimientos de aceite durante el prensado.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Obtener aceite crudo a partir de la semilla de Calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) mediante la combinación de procesos de biolixiviación y prensado, evaluando rendimientos de extracción.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Obtención y caracterización del hongo utilizado para el proceso de biolixiviación.
2. Establecer las condiciones para la óptima degradación de la pared celular de la semilla de la calabacilla loca.
3. Obtención de la semilla predigerida mediante el proceso de biolixiviación.
4. Evaluación de dos métodos de extracción de aceite, por prensado y por solventes, comparando rendimientos de extracción al aplicar un preproceso de biolixiviación.

1.2. Hipótesis

Es posible obtener mayores rendimientos de extracción de aceite, mediante procesos de prensado, al utilizar semillas de calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) biolixiviadas mediante el uso de microorganismos celulíticos.

Capítulo 2. Revisión de literatura

2.1. Aceites y Grasas comestibles

Los aceites y grasas han formado parte importante de la dieta de los seres humanos y más del 90% de la producción de los mismos a nivel mundial, que proceden de fuentes vegetales, animales y marinas, se emplean como alimentos o ingredientes en productos alimenticios. Los aceites y grasas son fuente rica de energía en la dieta además de contener ácidos grasos que son nutrientes esenciales (FAO 1978) y sus características funcionales y de textura contribuyen al sabor y palatabilidad de diversos alimentos naturales y preparados (Kirk *et al.* 2004).

2.1.1. Definición

Los aceites vegetales comestibles son productos alimenticios constituidos principalmente por glicéridos de ácidos grasos obtenidos únicamente de fuentes vegetales. Podrán contener pequeñas cantidades de otros lípidos, tales como fosfátidos, de constituyentes insaponificables y de ácidos grasos libres naturalmente presentes en la grasa o el aceite (Codex Alimentarius 2005).

Los aceites vírgenes se obtienen, sin modificar el aceite, por procedimientos mecánicos y por aplicación únicamente de calor. Pueden ser purificados por lavado, sedimentación, filtración y centrifugación únicamente (Codex Alimentarius 2005).

Los aceites prensados en frío se obtienen por procedimientos mecánicos únicamente, sin la aplicación de calor. Pueden ser purificados por lavado, sedimentación, filtración y centrifugación únicamente (Codex Alimentarius 2005).

Los aceites y grasa, desde el punto de vista químico, pertenecen a una clase de sustancias conocidas como ésteres, los cuales se forman al reaccionar un ácido con un alcohol. Las grasas son ésteres de alcohol trihídrico glicerol. Cada uno de los tres grupos de hidroxilo de la molécula de glicerol tienen la capacidad de combinarse con

una molécula de un ácido graso y el éster resultante se denomina triglicérido (Figura 1) (Fox *et al.* 1999).

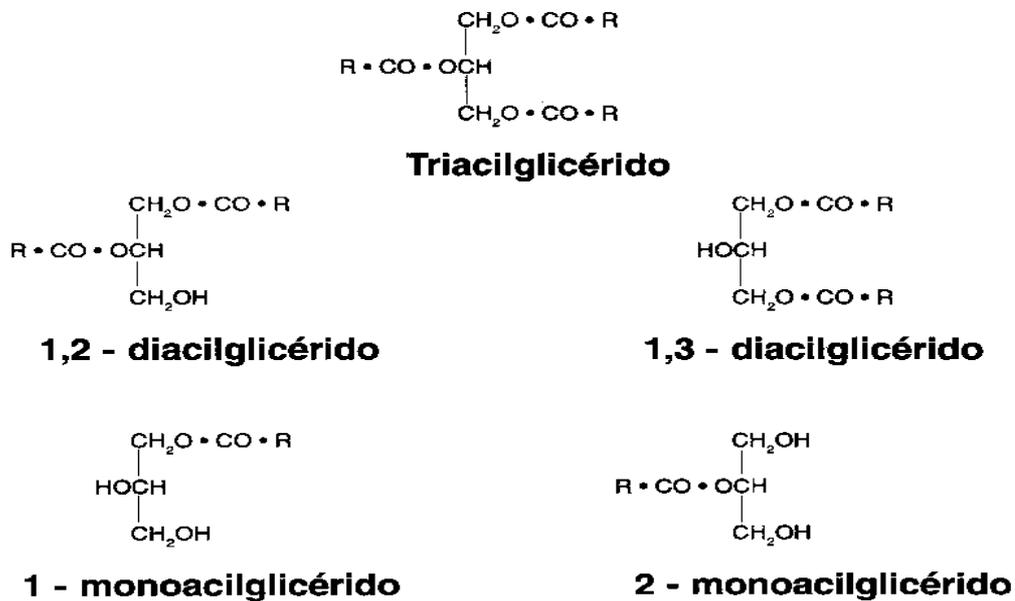


Figura 1. Estructura químicas de las grasas

2.1.1.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos orgánicos que se encuentran en las grasas y que se combinan químicamente con el glicerol; también son conocidos como ácidos carboxílicos ya que contienen el grupo carboxilo (Tabla 1) (Fox *et al.* 1999).

Existen tres tipos de ácidos grasos:

- a) Ácidos grasos saturados, en las que los átomos de carbono se mantienen juntos por enlaces simples.
- b) Ácidos moinsaturados, en los cuales hay un doble enlace en la cadena de carbono, cada uno unido a un átomo de carbono.
- c) Ácidos grasos poliinsaturados, en los cuales hay dos o más dobles enlaces en la cadena de carbono.

La naturaleza altamente insaturada de algunos aceites principalmente de origen marino, los hace propensos a descomponerse y resultan por consiguiente inapropiados para utilizarse hasta en tanto se procesen (Tabla 2).

Tabla 1. Composición en porcentaje de ácidos grasos e índice de yodo

Ácidos Grasos	Grasas y aceites vegetales											Grasas y aceites animales y de origen marino.		
	Átomos de carbono	Manteca cacao	Coco	Maíz	Algodón	Oliva	Palma	Colza	Cártamo	Soja	Girasol	Mantequilla	Manteca	Aceite de pescado
Butírico	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	
Caproico	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	
Caprílico	8	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	
Cáprico	10	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	
Laúrico	12	-	44	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	
Mirística	14	-	18	-	1	-	1	-	-	-	-	10	1	
Palmítico	16	24	11	13	24	13	48	4	8	12	8	26	25	5
Palmitoleico	16	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	2	15
Esteárico	18	35	6	4	3	2	4	2	3	2	5	15	13	3
Oleico	18	39	7	29	18	75	38	19	13	24	21	29	47	27
Linoleico	18	2	2	54	53	9	9	14	75	54	66	2	12	7
Linolénico	18	-	-	-	-	-	-	8	1	8	-	2	-	
Gadoleico	20	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	
Erúcico	22	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	
Índice de Yodo		37	9	127	109	84	51	104	146	134	134	35	63	

Fuente: T. J. Weiss (1983)

Tabla 2. Fuentes de ácidos grasos saturados y poliinsaturados

Composición	Origen	Fuente
Altas en grasas saturadas	Animales y algunos vegetales	Mantequilla, manteca de cerdo, aceite de coco, aceite de semilla de palmera, margarina dura.
Altas en grasas poliinsaturadas	Aceites vegetales	Aceite de maíz, de soya, de cártamo, de girasol.
	Nueces	La mayoría, excepto en la nuez de coco.
	Margarinas	Muchas variedades blandas, en particular la de soja y girasol.

Fuente: Fox *et al.* 1999

2.1.1.2. Ácidos grasos esenciales

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) revisten un particular interés en la nutrición del ser humano debido a que algunos de ellos, a pesar de ser esenciales para el cuerpo no pueden ser sintetizados en el organismo y tienen que ser suministrados. El ácido graso mas importante es el ácido linoleico, el cual se encuentra en grades cantidades en aceites de maíz, de soya y de girasol (Fox *et al.* 1999)

El ácido Linoleico se encuentra en dos formas, en omega 6 (ácido linoleico) y omega 3 (ácido alfa-linoleico). No obstante, el ácido alfa-linoleico también se considera poliinsaturado, posee un enlace ubicado a 3 y 6 carbonos del metilo terminal respectivamente, siendo una posición estratégica para la actividad de algunas enzimas (FAO y OMS 1993)

La cantidad de ácidos grasos esenciales requerida por el cuerpo es baja, y asciende solamente a alrededor de 10g por día y es rara su deficiencia en la nutrición del hombre.

2.1.2. Fuentes de aceites y grasas

Las grasas y aceites tienen origen vegetal, animal o marino. Entre las fuentes de origen vegetal se encuentra a la manteca de cacao y los aceites de maíz, girasol, soja, algodón, cacahuate, oliva, colza, entre otros (Tabla 3). De origen animal son la manteca de cerdo, el sebo de vacuno y la mantequilla de leche. Las procedentes de animales marinos son, el aceite de hígado de bacalao y el de ballena (Potter *et al.* 1995).

Algunos de estos aceites y grasas se usan en la alimentación, por su especial sabor y propiedades físicas. Por ejemplo la manteca da un sabor a carne, el aceite de oliva se usa como un ingrediente en ensaladas por su inigualable sabor, y la mantequilla se utiliza por su aroma y su sabor ligeramente lácteo (Potter *et al.* 1995).

Para la producción de grasas concretas, margarinas y grasas para fritura, se han empleado tanto métodos físicos como químicos. La hidrogenación y la separación por cristalización se emplean para convertir las grasas naturales a grasas con diferente textura y propiedades físicas (Potter *et al.* 1995).

Tabla 3. Porcentaje de aceite en fuentes vegetales comerciales

Fuente	% de aceite
Copra de Coco (<i>Cocos nucifera</i>)	66
Semilla de algodón (<i>Gossypium species</i>)	19
Maíz (<i>Zea mays</i> L)	5
Oliva (<i>Olea europea</i> L)	27
Palma (<i>Helaseis guineensis</i>)	47
Colza (<i>Brassica species</i>)	42
Cártamo (<i>Carthamus tinctorius</i>)	30
Soja (<i>Glycine max</i> L)	19
Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L)	40

Fuente: Robinsón, 1991

2.1.2.1. Funciones de los aceites y grasas

Las grasas y aceites tienen varias funciones en la preparación de los alimentos, dentro las cuales destacan las siguientes:

- Añadir o modificar el sabor.
- Incorporar aire a batidos y masas
- Contribuir a la textura hojaldrada.
- Contribuir a la ternura.
- Emulsionar.
- Transferir calor, como en la fritura.
- Proporcionar saciedad.

En conjunto, la grasa se disfruta en la dieta debido al sabor, textura, aroma y palatabilidad que le da a los alimentos. Además son el principal vehículo de vitaminas liposolubles A, D, E y K (Vaclavik 2002; Potter *et al.* 1995).

2.1.3. Métodos de extracción de grasas o aceites

Son muy pocos los métodos básicos existentes para la obtención de grasas y aceites de origen vegetal. Comprende la extracción por presión y la extracción por solventes, procesos que se complementan con el refinado y otros (Potter *et al.* 1995).

2.1.3.1. Extracción por presión

La extracción de aceite por prensado está creciendo a nivel mundial. Este proceso es aplicado en la extracción de aceites esenciales, aceites orgánicos, y para producción de biocombustibles con la finalidad de incrementar el valor de los mismos (Harald 2002).

Para obtener los aceites de las diferentes semillas se utilizan distintos tipos de prensas y extractores. Primeramente se cuecen las semillas, con el objeto de romper

parcialmente su estructura celular y permitir que suelte la grasa fundida, este propósito también puede alcanzarse triturándolas mediante molinos. Durante la cocción, el agua se evapora o se añade con el objeto de que el materia adquiera la humedad óptimo para la extracción. La temperatura y el contenido de humedad más indicados depende del sistema de extracción; las presas hidráulicas requieren mayor humedad que los extractores. La temperatura de cocción debe ser mínima para evitar el oscurecimiento del aceite. El aceite obtenido se limpia de los restos de semillas mediante filtración, impulsándolo por bombeo a través de filtros de tela o bien mediante centrifugación (Potter *et al.* 1995; FAO 1970).

El prensado en frío hace que el aceite guarde las mismas características biológicas que tenía cuando se encontraba en la semilla o fruto (Harald 2002).

La extracción de aceites prensados en frío se sigue realizando hoy en día en forma simple y artesanal. La semilla se descascara parcialmente y se limpia mediante ventilación y zarandeo para eliminar impurezas. La semilla limpia se lleva a la prensa: un extrusor a tornillo sin fin. Aquí se vigila especialmente que la temperatura generada por la presión no supere los 45° C para asegurar la estabilidad molecular de los ácidos grasos poliinsaturados. Se evita así también la disolución de ceras y otras sustancias (Harald 2002).

A partir de la revolución industrial, con una mecanización cada vez más eficiente, se fueron utilizando métodos de extracción de aceites más y más sofisticados: calentando las semillas y lavándolas con solventes derivados del petróleo se lograron altos niveles de rendimiento y un consiguiente abaratamiento del producto final. Estos métodos de extracción transformaron al aceite en un alimento esencial, nutritivo y multivitamínico a un alimento que solo aporta calorías a la dieta (Harald 2002).

2.1.3.2. Extracción con Solventes

Las semillas consideradas bajas en grasa (menor al 20%), se tratan directamente por el sistema de extracción con solvente. Este deja en la semilla extractada un contenido de grasa residual inferior al 0.5% (Berdanier *et al.* 1992).

En las operaciones a gran escala es común mezclar el aceite procedente de las semillas trituradas con un disolvente a baja temperatura que no sea tóxico, por ejemplo el Hexano. La extracción con disolventes da mejores rendimientos. Mientras las tortas de semillas prensadas mecánicamente todavía contienen de 4 a 5% de aceite el contenido de aceite en el residuo después de la extracción con disolventes es menor de 1% pudiendo descender hasta 0.5%. Los procesos combinados emplean primero la extracción mediante presión y después con disolventes para recuperar el aceite residual (Potter *et al.* 1995; FAO 1970).

Calvo (2003) y Monroy (2007) reportan hasta el 9% más de rendimiento en la extracción de aceite por solventes que la extracción mecánica de la semilla de calabacilla loca.

La extracción con solventes es el método más eficiente para obtener aceite y con menos impurezas que el obtenido mediante el empleo de la presión mecánica. Además, en la extracción con disolventes el calentamiento es mínimo y así el aceite producido es de mejor calidad. Este proceso ahorra energía comparado con la extracción mecánica (Swers 1982).

El hexano es el solvente más ampliamente utilizado debido a su elevado carácter volátil ya que después de la extracción del aceite queda un residuo de hexano mínimo de 0.01% o nulo (Lawson 1999; Código alimentario 1988).

Sin embargo el hexano presenta riesgos toxicológicos al estar expuesto al calor, lo cual causa su inestabilidad química favoreciendo su descomposición, desprendiéndose gases y vapores tóxicos como lo es el monóxido de carbono. Este puede reaccionar vivamente con agentes oxidantes fuertes, descomponiéndose y siendo causa de incendio y explosión. Además, causa daños severos a la salud como efectos narcóticos, atacando al sistema respiratorio y al sistema nervioso periférico, dando lugar a polineuritis más o menos graves según la duración de la exposición y actúa como desengrasante de la piel, dando lugar a dermatitis, cuando la exposición es muy prolongada (Raúl 1955).

2.1.3.3. Procesos aplicados post-extracción

Centrifugado

El centrifugado es realizado generalmente tras ser prensadas las semillas. Este separa los sólidos y el agua del aceite por fuerza centrífuga. Es el opuesto a la decantación natural o de reposo (Ramírez 1998).

Decantación y filtración

El aceite bruto se decanta en tanques de acero inoxidable durante varios días. Luego se bombea por un filtro de algodón descartable y se envasa en botellas de vidrio oscuro o envases de hojalata para evitar la oxidación del aceite por acción de la luz ultra violeta. El refinado se hace innecesario, y el aceite conserva el suave sabor propio de la semilla de la cual proviene (Harald 2002).

Filtración

Tras la extracción, el aceite crudo se filtra con productos como arcilla, papel o carbón de leña para remover las impurezas tales como fragmentos de semilla. Este proceso mejora la claridad y el olor del aceite (Ramírez 1998).

2.1.3.4. Métodos Biotecnológicos

La industria extractiva de compuestos de interés, tales como la extracción de aceites esenciales y comestibles, enfrentan diversos problemas (el consumo del tiempo de proceso y la eficiencia de extracción) debido a la compleja naturaleza química de los vegetales. La importancia y la demanda de estos productos alimenticios ha propiciado el desarrollo de nuevas propuestas biotecnológicas, siendo una de ellas la aplicación de enzimas microbianas como una alternativa para minimizar estos problemas. Por lo que en las últimas décadas, en particular los preparados celulíticos comerciales y los preparados con actividad múltiple se han aplicado con éxito para facilitar y aumentar la

liberación de productos de interés así como para mejorar los procesos tecnológicos mediante la predigestión enzimática de la pared celular de los tejidos vegetales (Ovando *et al.* 2005).

El principal componente estructural de los vegetales es la celulosa, la cual funciona en la mayoría de la materia prima vegetal como un secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de componentes del sabor o de interés para la industria alimentaria (Rastogi *et al.* 1998; Sarker *et al.* 1999; Lee *et al.* 2005).

2.1.4. Biolixiviación

Métodos biotecnológicos como la biolixiviación han sido utilizados durante años como una estrategia biológica, empleada principalmente para la recuperación de metales a partir de minerales y desechos de minas con niveles de metal muy bajos para la fundición. En ésta se realiza un conjunto de reacciones químicas que tienen como resultado la disolución de minerales por parte de bacterias, las cuales lixivian, es decir, disuelven las rocas o minerales, los solubiliza (por eso el proceso se llama Biolixiviación o Lixiviación Biológica) para obtener la energía que necesitan a expensas de sustancias inorgánicas. La cual permite por ejemplo recuperar hasta el 70% del cobre de los minerales de bajo grado (Prescott *et al.* 1999; CIMM 2005).

Sin embargo este proceso biotecnológico puede ser aplicado a cualquier otra área de extracción. Puesto que los microorganismos pueden transformar los sustratos con los que hacen contacto, para obtener energía, mediante la participación de enzimas lo cual propicia la degradación de mismo, dejando libres compuestos interés (Prescott *et al.* 1999; Ovando *et al.* 2005).

El Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología define a la biolixiviación como el “Uso de microorganismos para solubilizar compuestos, de manera que sus elementos puedan ser extraídos a partir de un material, cuando el agua u otro solvente son filtrados a través de éstos.”

Actualmente el proceso de biolixiviación ya no se utiliza solamente para extracción metales, éste ha tomado una gran importancia en diferentes ámbitos, en la industria del papel (Malabadi et al. 2007; Bindu et al. 2007), en agricultura (Henry et al. 2006), en alimentos (La Granje *et al.* 1996; Hang *et al.* 1997; Ashok 2002) , para la obtención de gas (Ghosh 1983), entre otros, con la finalidad de optimizar los procesos de producción.

2.1.4.1. Microorganismos degradadores de celulosa

La hidrólisis enzimática de la celulosa ha sido intensamente investigada ya que ofrece las ventajas de su alta especificidad y actividad catalítica bajo condiciones ambientales moderadas, por lo que se requiere de organismos altamente productores de celulasas (Vialches 2002)

Las celulasas son producidas por una gran variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo solo algunos de ellos producen la enzima celulasa extracelular capaz de degradar la celulosa (Ljungdahl *et al.* 1985; Marsden *et al.* 1986; Bhat *et al.* 1997; Dongowki *et al.* 2002).

Las celulasas son sintetizadas por una gran variedad de microorganismos que se encuentran entre las bacterias (Han et al. 1974; Crawford et al. 1972; Stutzenberger 1972; Okeke et al. 1992) y hongos (Ceroni et al. 1988; Barbosa et al., 1996; Castellanos et al., 1999), cuando crecen en estratos celulósicos. Sin embargo, relativamente pocos microorganismos pueden producir el grupo de enzimas necesario para la degradación de celulosa y producción de celulasas. Ramos y Forchiassin (1996) mencionan que los hongos son responsables de la mayor proporción de celulosis en la naturaleza y que su primacía no es solamente consecuencia de la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, sino que también tienen ventajas adaptativas que son: la rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de la hidrólisis; estas características los distinguen de los demás organismos como los principales descomponedores de materiales celulósicos (Vilches 2002).

Los hongos filamentosos se caracterizan por ser un grupo de gran interés para la industria, ya que se utilizan principalmente en la producción de algunas enzimas, entre

éstas es posible citar a un gran número de glucanasas, capaces de degradar totalmente a la celulosa (Gretty *et al.* 2003).

Entre los hongos filamentosos de más fácil adaptación, y que se caracterizan por su alta producción de enzimas se encuentra los del genero *Aspergillus*.

2.1.4.2. *Aspergillus* sp.

Algunas especies de *Aspergillus* sp., son reconocidas como cepas GRAS (Generalmente reconocidas como seguras). Debido a su alta capacidad de producir y secretar enzimas extracelulares, *Aspergillus* desempeña un papel importante en la producción industrial de enzimas (de Vries *et al.*, 1999a,b; Lockington *et al.*, 2002). Estas enzimas son las amilasas, glucoamilasas, celulasas, pectinasas, xilanasas, y proteasas, entre otras (Ward *et al.* 2006).

Los preparados celulíticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano. Los cuales se obtienen principalmente de *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* (Bhat 2000).

El uso de algunos preparados celulíticos en el proceso de extracción de aceite ha tenido un efecto positivo sobre el rendimiento de extracción del mismo. Sarker *et al.* (1999) evaluaron el efecto de una enzima cruda obtenida de *Aspergillus fumigatus* nCIM 902, con actividad mixta principalmente celulasa, hemicelulasa, quitinasa, xilanasas, pectinasa y proteasa sobre el rendimiento en la extracción de aceite a partir de las semillas de ajonjolí, cacahuete y de girasol. El porcentaje de aceite extraído de las semillas oleaginosas se incremento con el tratamiento enzimático, este incremento dependió de las condiciones de predigestión. Según los autores además de aumentar el rendimiento de extracción de aceite de las semillas, una de las consecuencias importantes de la predigestión enzimática de las semillas oleaginosas fue la reducción de la rancidez del aceite, debido a que durante la predigestión pueden liberarse compuestos antioxidantes a través de la membrana semipermeable, los cuales impiden la oxidación del aceite (Ovando *et al.* 2005).

La principal característica morfológica de estos hongos es su color, posee distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las mas grades suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato (Carrillo 2003).

La mayoría de las especies crecen sobre Czapek-Levadura pero los *Aspergillus* osmófilos, particularmente los miembros de las secciones *Aspergilli* y *Restricti*, se desarrollan sobre el Czapek-20% sacarosa. La temperatura óptima de crecimiento es de 25°C pero algunos miembros de la sección *Fumigati* es conveniente incubarlos a de 37° C. La ornamentación de conidios cambia con la edad y en dos semanas las esporas están totalmente maduras (Carrillo 2003).

2.1.5. Demanda de aceites y grasas

La demanda mundial de aceites y grasas, destinados al consumo humano y a fines no alimentarios aumenta constantemente, con incrementos anuales del 5%, según la FAO. Este impulso extraordinario se debe al creciente uso de aceites y grasas tanto como combustibles como materia prima para la producción biodiesel. Tal utilización continúa aumentando la demanda en varios países a nivel mundial. Los principales aceites interesados son los de soja y colza, aunque están cobrando importancia los de palma y coco, así como las grasas animales y los aceites para cocina (FAO 2005).

En la actualidad México cuenta con una importante capacidad para procesar industrialmente semillas de soja, no obstante sólo alrededor del 8 % de las semillas de oleaginosas es producido en territorio nacional y tiene que importar el 80% de los insumos básicos, lo que hace de la industria aceitera una industria básicamente importadora y dependiente de los mercados internacionales, tanto de oleaginosas como de aceites en bruto. Las importaciones de Aceites Vegetales Comestibles representan el 33% del consumo total (Proexport-Colombia, 2004).

En las importaciones totales de aceite, el 49 % se refiere a aceite en bruto de soja, girasol y cártamo. Con respecto a las posiciones arancelarias que se han seleccionado, los principales países de origen son: Costa Rica, Honduras y Malasia (Tabla 4) (Proexport-Colombia, 2004).

Tabla 4. Importaciones, 2001-2003 (Valor en miles de dólares US\$)

POSICION ARANCELARIA	IMPORTACIONES DE MÉXICO			VARIACION	PRINCIPALES PAISES
	2001	2002	2003		
15111001 Aceite de palma en bruto	49,972	61,984	86,541	32,66%	Costa Rica, Honduras
15162001 Grasas y aceites, vegetales y sus fracciones	12,684	26,030	38,805	67,47%	USA y Países bajos
15119099 Aceite de palma entre otros	1,418	1,485	6,549	176,75%	Costa Rica, Malasia y Colombia
15171001 Margarina, excepto la margarina líquida	8,569	7,017	9,078	3,27%	USA y Colombia
Total de Importaciones de México.	72,643	96,516	140,973		

Fuente: SIAVI: Servicio de información Arancelaria vía Internet.

Se calcula que el 25 por ciento de las importaciones de aceite corresponden al aceite de palma y sus derivados. Debido a que bajo la denominación de aceites vegetales y margarinas se importan productos de distintas oleaginosas (aceite de palma), los países de origen no son representativos para el estudio (Proexport-Colombia, 2004).

Por ello se han buscado fuentes alternativas de extracción de aceite para mitigar la alta demanda plantando a la calabacilla loca como fuente valiosa para la extracción de aceite comestible, por el alto contenido de este, además de contener ácidos grasos esenciales para el ser humano como son el linoleico y oleico (Khoury *et al.* 1982; Calvo 2003; Monroy 2007; entre otros).

2.2. Calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*)

Al transcurso de los años se acentúa la falta de alimentación en el mundo, lo que es más grave en las regiones áridas y semiáridas por razón natural de su ecología;

estas consideraciones, hacen que el hombre trate de aprovechar los recursos nativos y el investigador compruebe la potencialidad de algunas especies vegetales como fuente de productos alimenticios; al respecto la calabacilla silvestre tiene grandes posibilidades de aprovechamiento (Robles 1982).

La calabacilla loca es una especie silvestre y perenne que se encuentra creciendo en forma natural en zonas áridas y semiáridas de México y al sur de los Estados Unidos. Ha sido estudiada por diversos investigadores quienes la consideran como un cultivo de amplio potencial agroindustrial; tal como lo presentan los estudios realizados por Curtís 1946 quien reporta cantidades de hasta un 33% de aceite y un 34% de proteínas en sus semillas. Sus resultados dan clara evidencia del potencial nutritivo que posee esta planta (Chávez 1985).

2.2.1. Generalidades del cultivo

El nombre de *Cucúrbita foetidissima* otorgado a esta planta fue propuesto por Humbolt, Bonpland y Kunth en 1817. Esta misma planta fue descrita en 1825 por Seringe como *Cucúrbita foetidissima Kunth*. Sin embargo esta especie fue nombrada equivocadamente *Cucumis perennis* por Jemes en 1820. También se le dio el nombre de *Pepo foetidissima Britt*, posteriormente, Asa Gray en 1852 transfirió el nombre de *Cucumis perennis* a *Cucúrbita perennis* y con este nombre permaneció hasta 1881 cuando Cogniaux redescubrió el nombre *Cucúrbita foetidissima* propuesto por Humbolt, Bonpland y Kunth (Bailey 1943).

La calabacilla loca presenta una amplia distribución geográfica, desde los Estados Unidos (Nebraska, Missouri, Kansas, Colorado, Utah, Nevada, Texas, Nuevo México y California) hasta el centro de México (desde Sonora a Tamaulipas y hasta Guanajuato, Querétaro y alrededores de la ciudad de México) (Lira *et al.* 1995).

En cuanto a su fenología es posible tenerla durante todo el año, con poblaciones de esta especie con flores y frutos. La calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) se le conoce también con los siguientes nombres comunes: como ad en Pápago, Arizona, Estados Unidos y en México, como aala en Pima y Chihuahua, como alidimai en

Tepehuan y Chihuahua, como arichiki, arisi, arisiki en Tarahumara y Chihuahua, como calabacilla, calabacillo en Chihuahua, Hidalgo, Querétaro y Zacatecas, como calabaza en Chihuahua y San Luis Potosí y como calabacilla silvestre en Guanajuato, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas (Lira *et al.* 1995).

Tabla 5. Clasificación Taxonómica	
Clase:	Angiosperma
Subclase:	Dicotiledónea
Orden:	Cucurbitales
Familia:	Cucurbitaceae
Genero:	<i>Cucúrbita</i>
Especie:	<i>Foetidissima</i>

2.2.2. Descripción morfológica

La calabacilla loca ha sido descrita por varios autores entre ellos: Dittmer y Talley 1964, Shreve y Wiggins 1964, ellos la describen como: una planta perenne, herbácea, tosca, áspera al tacto, crece durante los meses de abril y octubre en México, posee numerosos tallos rastreros de 4-6 m de longitud, cuando las condiciones son propicias estos son débiles, delgados y escabrosos, nacen de una raíz principal extendiéndose a todos los lados en forma circular, la mayoría de ellos producen ramificaciones secundarias las cuales también producen frutos.

La raíz principal es de considerable tamaño por lo que posee gran capacidad de almacenamiento de reservas, es pivotante (napiforme) y en algunos casos con ramificaciones horizontales. El peso de la raíz es variable, habiéndose reportado pesos frescos de: 72 kg (Dittmer y Talley, 1964), 45kg para una raíz de 3 años (Curtís, 1972), pero más comúnmente se han encontrado raíces de 4-6 kg de 2 años (Berry *et al.* 1978 y Bemis *et al.* 1978); sin embargo, Witaker y Bemis 1975, encontraron una raíz de 30kg de 2 años. Las anteriores diferencias en crecimiento y peso, se atribuyen principalmente a la textura, profundidad y humedad del suelo.

Las hojas son típicamente enteras, lanceoladas- triangulares de 10-13 cm de base y de largo de 20-30 cm, dispuestas individualmente a lo largo de los tallos, los cuales nacen de los nudos en forma alterna cuyo espaciamiento es de 10-20 aproximadamente, son de color verde grisáceo pubescente en el haz y escabrosas en el envés, con tricomas cónicos a lo largo de las venas. Presentan pecíolos gruesos y escabrosos; zarcillos gruesos y cortos enrollados sobre tallos y pecíolos.

Las flores son monoicas unisexuales (masculinas y femeninas) sobre las misma planta, gamopétala de color amarillo anaranjado, de 10-12 cm de longitud, emergen individualmente al igual que las hojas de los nudos de las guías, y se insertan a éstas por pedúnculos cortos.

La mayoría de las plantas en condiciones silvestres son monóicas presentándose por lo tanto, un bajo porcentaje de flores femeninas que son las que dan origen al fruto. La polinización entre flores cruzada no obstante que están sobre la misma planta; siendo a la vez necesaria la polinización para el desarrollo del fruto y semilla.

Los frutos son por lo general redondos y periformes de diferentes tamaños, 5-8 cm, el tamaño varia debido a las fluctuaciones de la estación de crecimiento de las mismas (Curtís 1974, Bemis *et al.* 1975 y Scheerens *et al.* 1978); son de color verde con franjas blancas con pulpa muy filamentosa y amarga de color blanca. La producción de fruto es variable, por ejemplo Whitaker y Bemis 1975 citan una producción máxima de 250 frutos por planta: Chavez y Gomez 1978 señalan rangos de 2-3 frutos por planta a 2 años y 46-156 frutos con medias de 48.5 frutos por planta. Sin embargo, Curtís en 1974, encontró rangos 0-300 frutos por planta para 3 cosechas.

El fruto generalmente es tricarpelar, aunque puede presentarse de hasta 4-5 carpelos. Las semillas son pequeñas, de forma oblonga-ovalada de aproximadamente 12mm de largo y 6-7 mm de ancho con márgenes obtusos. El número de semillas por frutos es otra de las características mas variables entre las poblaciones de la calabacilla, por ejemplo Whitaker y Bemis (1975) encontraron plantas de 2 años con 222.5 semillas y un rango de 115-300 frutos.

2.2.3. Potencial alimenticio y/o agroindustrial

Las semillas de calabacilla loca son ricas en aceite (28%) y en proteínas (29%). El alto contenido de proteína cruda y aceite crudo, indica que dicho cultivo podría ser utilizado con doble propósito, similar al frijol de soja y otras oleaginosas. Sin embargo, debido a la ceniza y alto contenido de fibra cruda, las semillas tendrían que ser descascarilladas antes del proceso de extracción (Khoury *et al.* 1982).

La factibilidad de utilizar a la semilla de calabacilla loca para la obtención de aceite y proteína puede justificarse al compararla con otras fuentes de extracción de aceite, pues esta tiene cualidades para competir ya que únicamente es superada por la semilla de soja (37.9%) y ajonjolí (41.3%) en cuanto a contenido de proteína. Por lo tanto, esta especie compite por sus contenidos de aceite y proteína sobre las oleaginosas en explotación actual y además de que esta planta requiere de mínima humedad, de suelos no muy especializados y de mínimos cuidados (Curtis 1946-1974; Bemis *et al.* 1967-1978; Berry *et al.* 1974-1978; Bolley *et al.* 1950)

El aceite crudo es rico en ácido linoleico (63%) y tiene un alto número de ácidos grasos insaturados en relación con los ácidos grasos saturados. El alto porcentaje de ácido linoleico y bajo contenido del ácido linolénico, indican que aceite obtenido de este cultivo podría ser una fuente valiosa como aceite comestible, puesto que tiene una buena estabilidad (Khoury *et al.* 1982).

Calvo (2003) estableció en su trabajo experimental que la calabacilla loca presenta porcentajes de aceite crudo de más de 30%, conteniendo ácidos grasos como el oleico, linoleico y palmítico, además definió que el mismo presenta buena estabilidad, al obtener índices de acidez por debajo de lo establecido en Normas y Asistencia técnica Industrial, así como en peróxidos e índices de saponificación y yodo. También realizó pruebas sensoriales, en las cuales demostró que el aceite tiene buenas características organolépticas para el consumo humano, siendo aceptada por el panel de jueces consumidores, encontrando diferencias no significativas en comparación con el aceite comercial de canola.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. Etapa 1. Obtención y caracterización del hongo utilizado para el proceso de biolixiviación

Para la realización del proceso de biolixiviación de la semilla de calabacilla loca se aisló el hongo, de una muestra de agar contaminada, del laboratorio de fitomejoramiento de la UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila en el mes de agosto del 2007.

4.1.1. Inducción del hongo en Agar Czapek modificado con CMC (carbiximetilcelulosa)

Se empleó caldo czapeck dox para el cultivo del hongo. Se incubó por un periodo de 7 a 9 días a una temperatura de 25° C, la formula del medio se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Czapek dox

Componente	Gramos
Sacarosa	30.0
Nitrato de Sodio	3.0
Fosfato Dipotasico	1.0
Sulfato de Magnesio	0.5
Cloruro de potasio	0.5
Sulfato Ferroso	15.0

Nota: Aforado a un litro

Posteriormente se procedió a sembrar en Agar Czapek, medio utilizado generalmente para hongos, modificando la fuente de carbono por carboxilmetilcelulosa (CMC) con la finalidad de inducir al hongo a formar celulasas. Se realizó la sustitución de la sacarosa por CMC como fuente de carbono en proporciones de 25:75, 50:50, 75:25, y 100:0.

4.1.2. Caracterización del hongo

Por último se procedió a realizar un micro cultivo (Anexo 6.2.1.) para la caracterización del hongo con el objetivo de determinar su tipo y factibilidad de uso, ya que para este tipo de trabajos es necesario usar hongos del genero GRAS (Generally Recognized as Safe), debido a que será utilizado con fines de obtención de un producto alimenticio.

Observado el crecimiento se analizó microscópicamente con la finalidad de verificar la morfología fúngica e identificarlo, esto se realizo de acuerdo a los lineamientos propuestos por Barnett y Hunter (1987), evaluación que fue realizada por el Centro de Investigación para los Recursos Renovables de Salaises, Villa López, Chihuahua (CIRENA).

La subespecie se analizó de acuerdo a las claves de identificación de *Aspergillus* sp. de Raper y Fennell (1965).

3.2. Etapa 2. Establecimiento de las condiciones óptimas de degradación de la pared celular

Esta etapa se llevó a cabo en un medio acuoso (líquido) en el cual se sustituyó a la sacarosa, fuente de carbono, por la semilla de la calabacilla loca, según la formulación que se muestra en el cuadro 2. El medio acuso se mantuvo a valores de pH correspondientes a 3, 5 y 7.

Cuadro 2. Medio acuso (líquido) para el proceso de Biolixiviación.

Componente	Gramos
Semilla Molida	30.0
Nitrato de Sodio	3.0
Fosfato Dipotásico	1.0
Sulfato de Magnesio	0.5
Cloruro de potasio	0.5
Sulfato Ferroso	15.0

Nota: Aforar todo a un litro

La semilla de calabacilla loca, previamente seca, utilizada en esta etapa, fue molida en un molino Willey con una malla de descarga de 1.0 mm.

Una vez preparado el medio se procedió a adicionar a cada muestra un inóculo que contenía 2 millones de esporas por litro, del cual se le agrega 1ml por cada 100ml del medio acuoso. El conteo de esporas se realizó de acuerdo a los lineamientos propuestos por Illiná (Anexo 6.2.2.) (2002).

Posteriormente las muestras se sometieron a baño María a una temperatura de 25° C, siguiendo lo propuesto por Tirado (2005) en su trabajo experimental sobre el empleo de microorganismos celulolíticos, por 168 h.

Durante este tiempo se monitoreo azúcares totales presentes en el medio cada 24 h, los cuales fueron determinados por la técnica propuesta por Dubois *et al.* (1956) con fenol sulfúrico, y azúcares reductores analizados de acuerdo a la técnica descrita por Miller (1959) con ácido 3, 5-dinitro-salicílico (DNS).

Una vez terminado lo anterior, con el propósito de comprobar los datos obtenidos de dicha etapa, al material biolixiviado se le retiro el micelio y se filtro el tela de lino sometiendo cada muestra a desecado en una estufa Robertshaw por 24 h, a una temperatura de 55° C, con la finalidad de someter las mismas a lavados con solventes y obtener cantidades de aceite liberado en dicho proceso de degradación de la pared celular, efectuado en cada uno de los pH's antes mencionados.

3.3. Etapa 3. Obtención de la semilla predigerida mediante el proceso de biolixiviación

Para la obtención de la semilla predigerida se inculó con una muestra que contenía 2 millones de esporas/ L, agregando 1ml por cada 100ml del medio acuoso, a pH 7.0, incubando por 96 h, pH y tiempo óptimo para la hidrólisis de los polímeros de celulosa. Dicho proceso se llevo a cabo a una temperatura de 25° C en agitación constante (Figura 2)

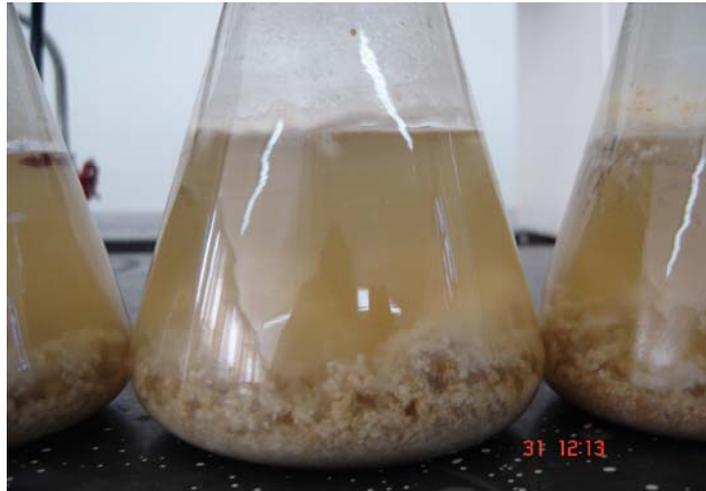


Figura 2. Obtención de la semilla predigerida.

Una vez concluida la digestión de la semilla se procedió a eliminar el micelio y a filtrar las muestras con tela de lino durante 15 min., posterior a esto se sometieron a secado en una estufa desecadora Robertshaw a una temperatura de 55° C por 24 horas.

3.4. Etapa 4. Evaluación de dos métodos de extracción de aceite, por prensado y por solventes, comparando rendimientos de extracción al aplicar un preproceso de biolixiviación

En esta etapa para la evaluación de los métodos de extracción se utilizaron dos tipos de muestra de semilla de calabacilla loca, biolixiviada y sin biolixiviar.

3.4.1. Extracción de aceite por el método Soxhlet (AOAC 1997)

Se extrajo aceite de la semilla de la calabacilla loca, previamente molida en un molino Willey con una malla de descarga de 1.0 mm, mediante el método de Soxhlet (AOAC 1997). Para el desarrollo de la técnica se utilizaron 250 ml de hexano y dos gramos (2 g) de la semilla, en cada una de las muestras. Posteriormente se sometieron a lavados, a 60° C, para la extracción del aceite de la semilla por diferentes tiempos (4, 6, 8, 10 y 12 horas).



Figura 3. Extracción de aceite por el método Soxhlet

3.4.2. Extracción de aceite por método de prensado

La extracción de aceite por el método de prensado se llevó a cabo en una prensa hidráulica Enerpac modelo puji401B a 3,000 lbs de presión (figura 4), siguiendo la técnica de Monroy (2007), el cual aplicó un tiempo de tres segundos de presión por tres veces consecutivas, para este proceso se utilizó dos gramos (2 g) de semilla por muestra.

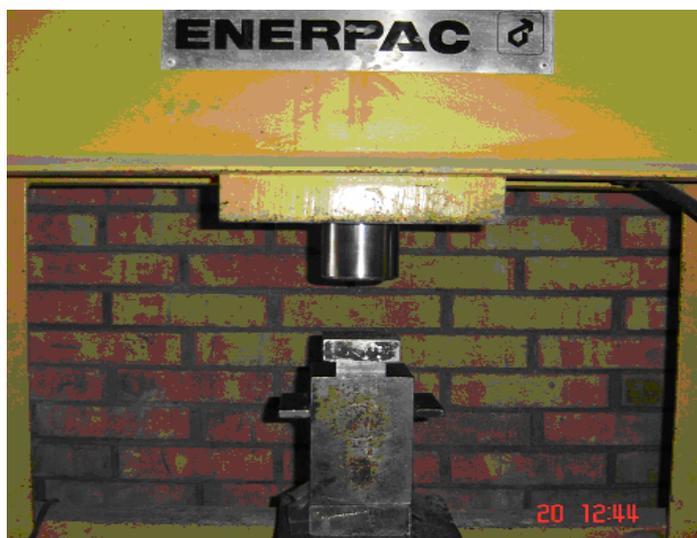


Figura 4. Prensa hidráulica Enerpac

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1. Etapa 1. Obtención y caracterización del hongo utilizado para el proceso de biolixiviación

4.1.1. Inducción del hongo en Agar Czapek modificado con CMC (carboximetilcelulosa)

El hongo obtenido, *Aspergillus* sp., tuvo un crecimiento notable en las diferentes concentraciones aplicadas de CMC, en la figura 5 se observa crecimiento del mismo en un medio compuesto al 100 % de CMC, por lo cual la inducción del hongo a diferentes concentraciones, para la producción de la enzima celulasa, fue exitosa. Singh *et al.* (1990) establece que hongos del género *Aspergillus* produce las cuatro enzimas esenciales, endoglucanasas, celobiohidrolasas, exoglucanasas, y b-glucosidasas, que participan en la biodegradación de la celulosa. Dicha actividad fúngica de *Aspergillus* sp. en CMC fue igualmente probada en los estudios realizados por Tirado (2005) el cual realizó una prueba de rojo congo que revelaba claramente dicha actividad celulolítica.

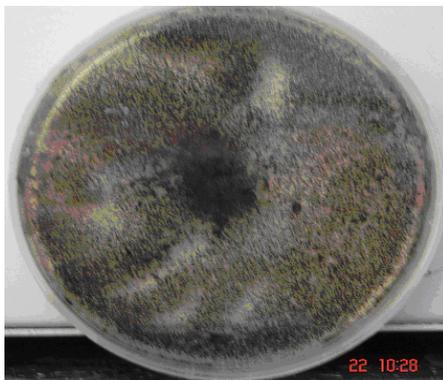


Figura 5. Cultivo celular del hongo, *Aspergillus* sp., en un medio al 100% de CMC.

4.1.2. Caracterización del hongo

El hongo analizado por CIRENA fue reconocido como *Aspergillus* sp. y caracterizado como cepa GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), por lo cual se procedió a ser utilizada en el presente trabajo.

En el micro cultivo realizado fue posible observar la morfología del hongo en cuestión, en la figura 6 es posible apreciar en las muestras A y B las cabezuelas conidiales globosas y esporas en cadenas sobre conidióforos; y en la C la célula pie. Estas descripciones morfológicas observadas permite saber que la especie es *Aspergillus* ya que estos generalmente presenta, lo anteriormente descrito (Raper y Fennell 1965). Según Tuite (1982), la especie *Aspergillus* presenta esporas en cadenas producidas sobre los conidióforos en la punta y célula pie. Estas descripciones mencionadas por los diferentes autores coinciden con las observadas en el micro cultivo realizado en la presente investigación.

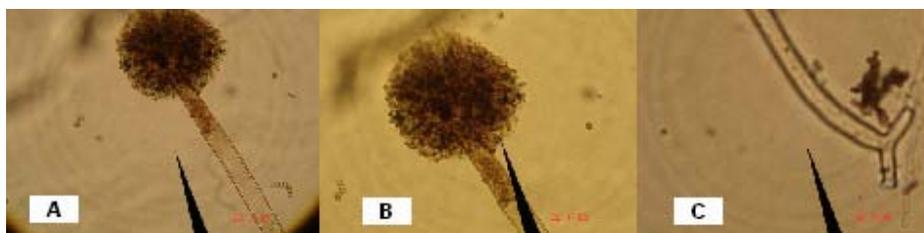


Figura 6. Morfología de *Aspergillus* sp. A,B) Cabezas conidiales globosas y esporas en cadenas sobre conidióforos; y C) célula pie.

El color presentado en las colonias de *Aspergillus* fue negrusco lo cual indica que la subespecie trabajada es *niger*, pues de acuerdo con Raper y Fennell (1965) *Aspergillus niger* presentan cabezuelas color negro o café oscuro y conidióforos lisos e incoloros o bien pigmentados debajo de la vesícula. Por lo que se concreta que este hongo es seguro para realizar este trabajo de acuerdo con Bigelis y Lasure (1987).

4.2. Etapa 2. Establecimiento de las condiciones óptimas de degradación de la pared celular

4.2.1. Monitoreo de azúcares totales

El monitoreo de azúcares totales se llevó a cabo durante 168 h cada 24 h, esta prueba se aplicó con la finalidad de probar la actividad celulolítica del hongo, *Aspergillus* sp., bajo las condiciones aplicadas al proceso.

El proceso de formación y asimilación, por el hongo en cuestión, de azúcares totales se puede observar claramente en las figuras 7, 8, y 9, este proceso se debe al propio metabolismo de los microorganismos inoculados, que dan lugar a la hidrólisis de los polímeros de celulosa, presentes como principal constituyente de la pared celular de la semilla de calabacilla loca, como lo muestran los estudios realizados por Monroy (2007) los cuales arrojan datos de 7.19% de celulosa presente en la misma, mediante la secreción al medio de enzimas extracelulares, que dan como resultado dicha hidrólisis a carbohidratos diméricos y monoméricos, que el hongo utilizará posteriormente para su desarrollo. Deacon (1988) establece que durante la actividad del hongo se absorben los nutrientes simples y solubles, para su propio desarrollo, que obtiene de la degradación de polímeros complejos con enzimas extracelulares que liberan al medio, por lo que la síntesis del complejo celulasa es reprimida por los altos niveles de glucosa u otro azúcares fácilmente metabolizables.

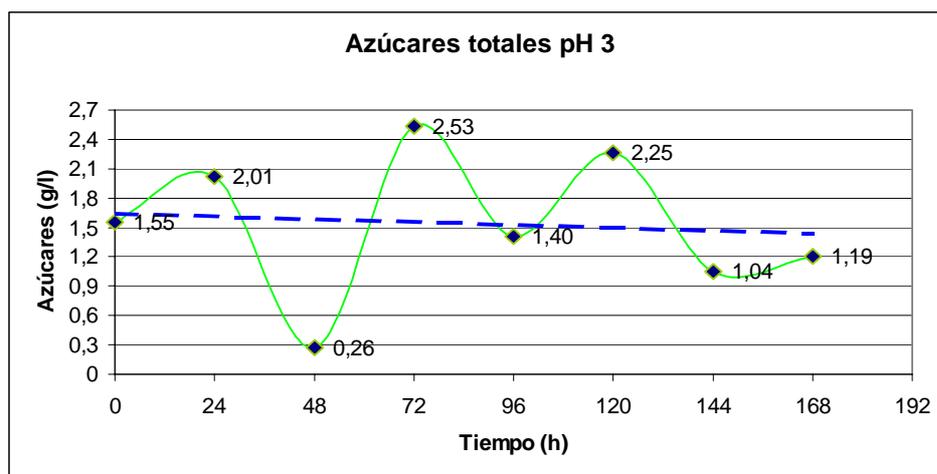


Figura 7. Concertación de Azúcares totales a pH 3 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.

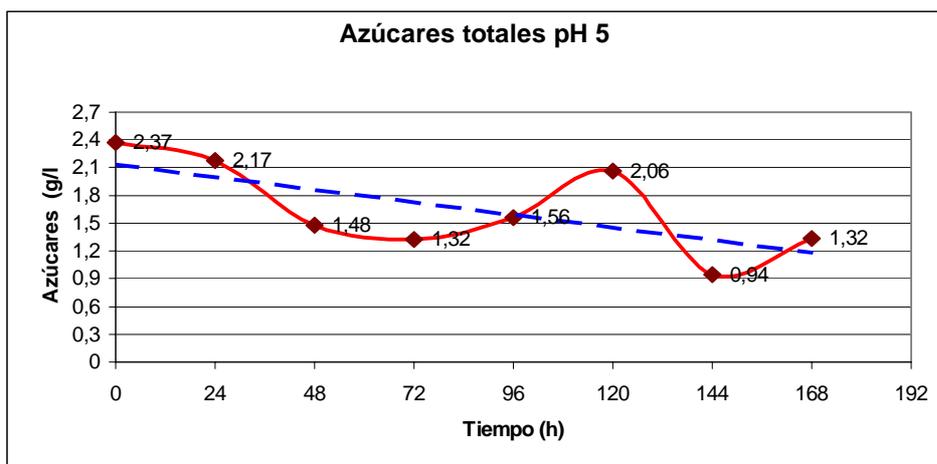


Figura 8. Concertación de Azúcares Totales a pH 5 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.

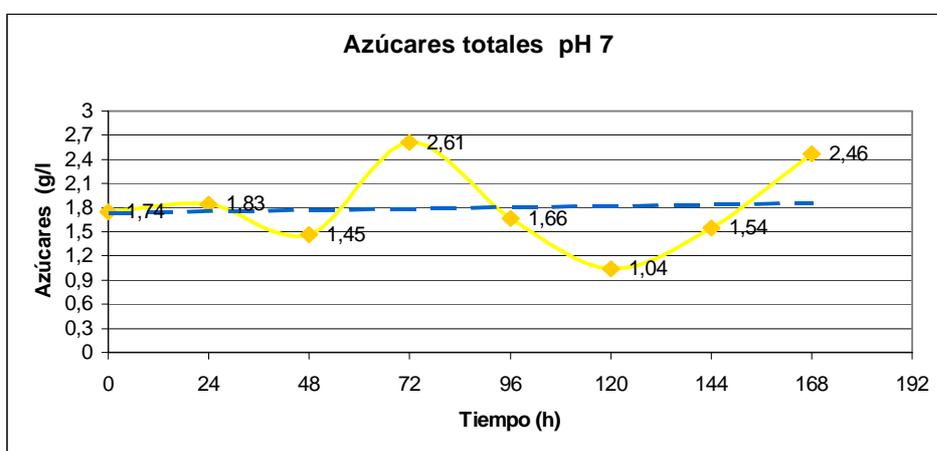


Figura 9. Concertación de Azúcares Totales a pH 7 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.

El resultado del monitoreo de la formación y asimilación de azúcares presentado en las graficas 7, 8 y 9 permitió enunciar que en la condición de pH 7 el hongo tiene un mejor desarrollo, a una temperatura de 25° C. El comportamiento del mismo en el medio, con las anteriores condiciones, tiende a ser equilibrado a partir de las 72 h con un intervalo de 48 h entre la asimilación y la formación de azúcares totales y por lo tanto su actividad celulolítica es más eficiente, degradando de manera constante la pared celular, objetivo primordial de la presente investigación, y por lo tanto hay una mayor liberación del aceite de la semilla de calabacilla loca (figura 9). Tirado (2005) estableció que tanto el desarrollo como la actividad fúngica se dan con mayor eficiencia en un

medio con las siguientes condiciones: a un pH 7 y a una temperatura de 25° a 35° C. Para un estudio similar empleando semillas de achiote como sustrato.

En cuanto a los medios a pH's 3 y 5 la actividad de *Aspergillus* sp. no presenta un comportamiento similar entre la formación y asimilación de azúcares totales durante su desarrollo. En el medio a pH 3 el hongo posiblemente presentó estrés debido a la baja concentración inicial de azúcares totales, donde el posterior incremento está directamente relacionado con el nivel de acidez del medio ya que esto puede actuar sobre los carbohidratos presentes descomponiéndolos en carbohidratos simples, de acuerdo a Owen *et al.* (2000). Y en el medio a pH 5 el desarrollo fúngico fue tardado, asimilando de manera lenta debió a la alta concentración inicial de azúcares, relacionada igualmente a la aplicación de una menor cantidad de ácido que actuó sobre los carbohidratos complejos dando lugar a CHO's simples, por lo cual el hongo en cuestión no excreta enzimas extracelulares para la formación azúcares totales, tardándose un periodo de 72 h para la excreción de las mismas, por lo que también fue desechado para el proceso de degradación de la pared celular, además de que se desarrolló un olor extraño durante dicho proceso, debido probablemente, a contaminación con otro microorganismo cuyas condiciones de trabajo optimas son estas, y el cual las aprovecha para su desarrollo, Tirado (2005) reportó el mismo olor extraño en su trabajo experimental sobre la degradación de la semilla de achiote con *Aspergillus* sp.

4.1.2. Monitoreo de azúcares reductores

Las lecturas sobre los azúcares reductores muestran la presencia de sustancias simples obtenidas de la degradación de la pared celular de la semilla de calabacilla loca.

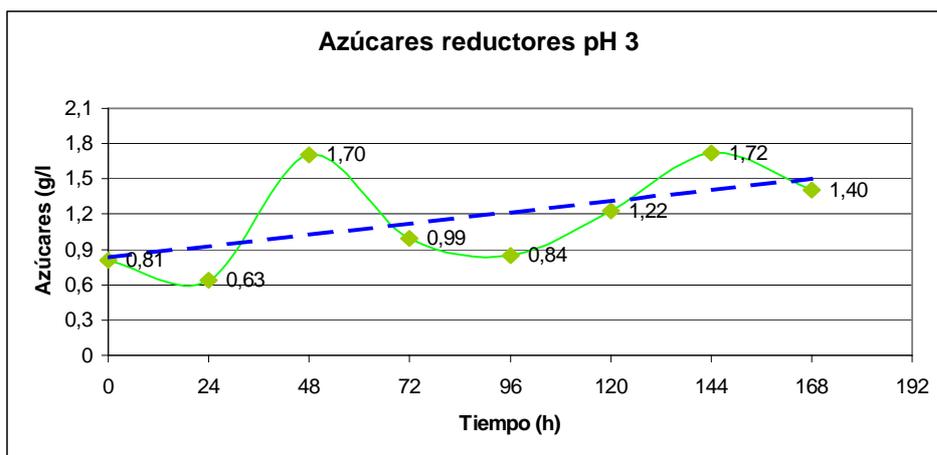


Figura 10. Concentración de Azúcares reductores a pH 3 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.

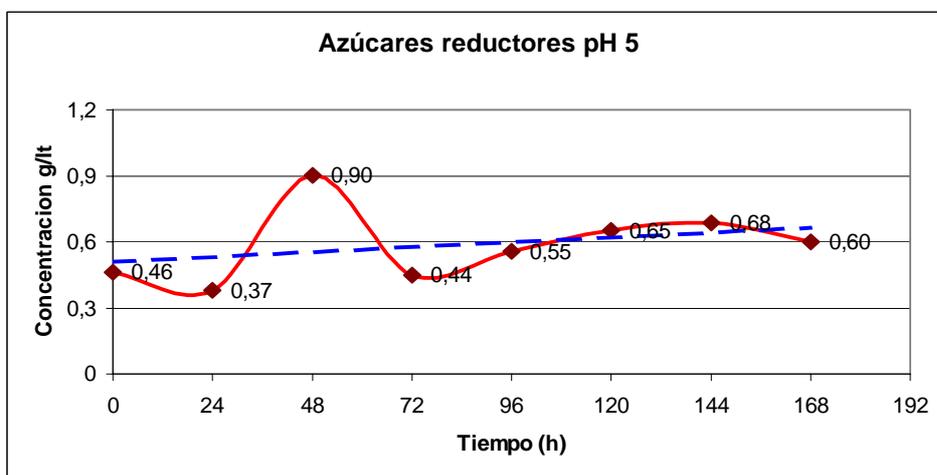


Figura 11. Concentración de Azúcares reductores a pH 5 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.

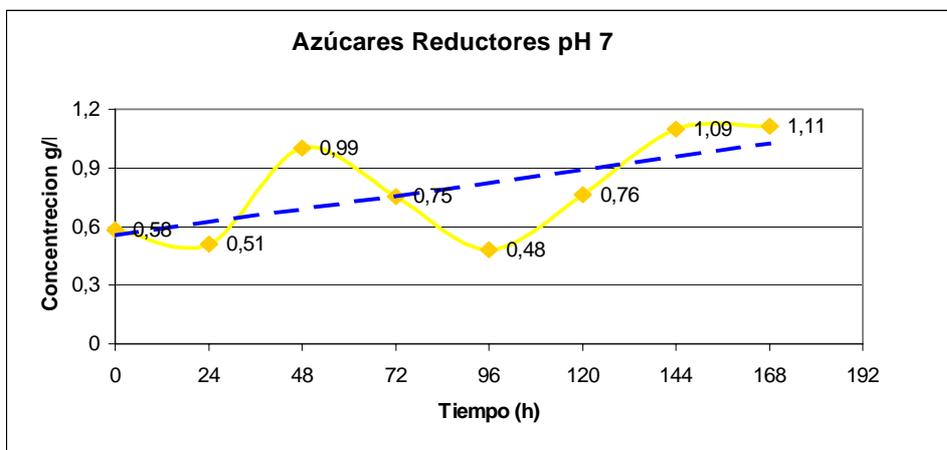


Figura 12. Concentración de Azúcares reductores a pH 7 a una temperatura de 25° C por un periodo de tiempo de 168 h.

El análisis realizado de los azúcares reductores indica igualmente que el medio a pH 7 se destaca un comportamiento constante a partir de las 48 h con un intervalo de tiempo de 48 h entre la asimilación y formación de los mismos, a una temperatura de 25° C (figura 12). Esto permite establecer como adecuado el tiempo de 96 h para el proceso de biolixiviación en función costo beneficio, ya que a pesar de que en tiempos posteriores se alcanzan niveles más elevados de azúcares, el propósito fundamental del estudio es la máxima liberación de aceite, la cual no se incrementa después de este tiempo.

La comprobación de lo anteriormente concluido indica que efectivamente la condición a pH 7, a una temperatura de 25° C, es la adecuada para el proceso de biolixiviación, ya que se observó diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$) en cuanto al porcentaje de aceite crudo obtenido por método Soxleth en comparación a las condiciones de pH's 3 y 5 (figura 13).

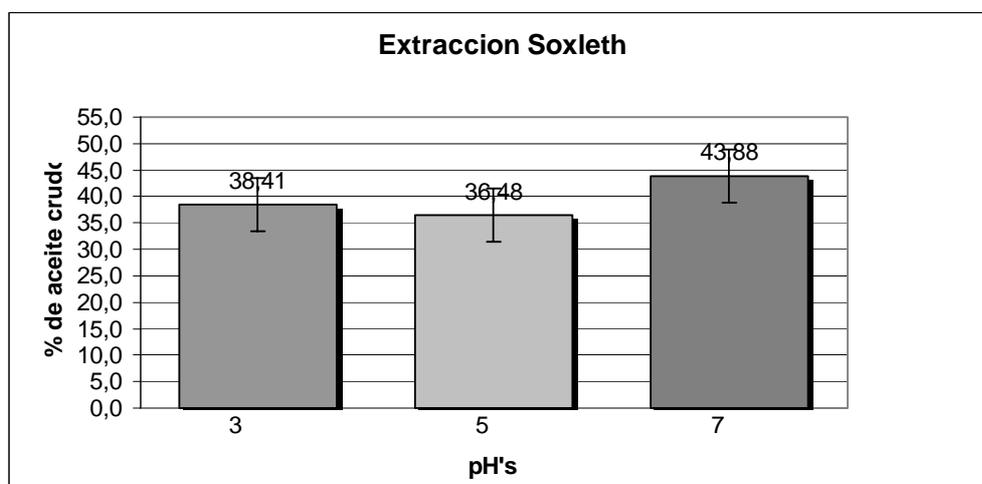


Figura 13. Extracción por Soxleth de aceite de la semilla de calabacilla loca biolixiviada en condiciones de pH 3, 5 y 7.

Así como también se comprobó el periodo de tiempo establecido de 96 h comparando los rendimientos de extracción aceite con los obtenidos a las 72 h y 168 h, lo cual se analizó por la prueba de Tukey ($p < 0.05$) indicando diferencias significativas entre 96 h y 72 h y no significativas entre 96 h y 168 h, por lo cual se aprueba que en el periodo de 96 h se obtiene un mayor beneficio-costo (figura 14).

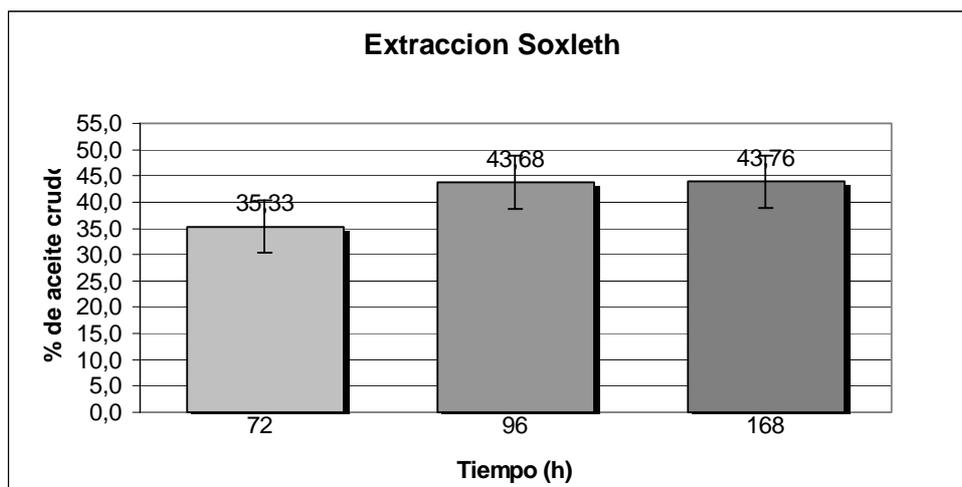


Figura 14. Extracción por Soxleth de aceite en diferentes tiempos (72, 96 y 168 h)

4.3. Etapa 3. Obtención de la semilla predigerida mediante el proceso de biolixiviación

La semilla obtenida del proceso de biolixiviación, en un medio a pH 7, por un periodo de 96 h modificó notablemente su color, debido al proceso de degradación de la pared celular, ya que el compuesto de interés, aceite queda más disponible (figura 15). Cabe mencionar que los aceites son intensificadores de sabores, aromas y colores (Charley 1987), por lo tanto al estar disponibles, como en este caso, presentan esta apreciación del color, lo cual concuerda con las observaciones realizadas por Monroy (2007) en un estudio similar utilizando celulasa fúngicas, y por Tirado (2005) en un estudio para obtención de bixina mediante tratamiento fúngico, donde el incremento de la coloración después de la digestión es evidente.

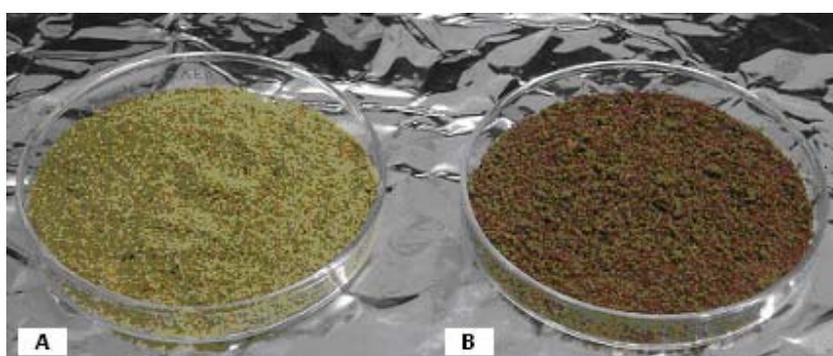


Figura 15. Semilla sin digerir (A) y digerida (B).

4.4. Etapa 4. Evaluación dos métodos de extracción de aceite, por solventes y por prensado, comparando rendimientos de extracción al aplicar un preproceso de biolixiviación.

4.4.1. Extracción de aceite por el método Soxleth (AOAC 1997)

El análisis de los datos arrojados de la metodología correspondiente fue realizada mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Se analizaron los porcentajes de aceite en función al tiempo y al tipo de muestra.

Los resultados arrojados por el estadístico indican que el mejor tiempo de extracción fue de 12 h, sin embargo durante es periodo de tiempo no se extrae realmente aceite puesto que el prologado lavado con solventes arrastra otros componentes como son los pigmentos presentes en la semilla, ya que se observó un color más oscuro que en tiempos extracción atrás, además de que no se encontraron diferencias significativas al comparar con 6 h y 4 h, por lo cual se estableció que el tiempo de mayor impacto en cuanto a costo beneficio fue a las 4 h (Figura 16). Este resultado también fue establecido por Monroy (2007) en su trabajo experimental sobre la extracción de aceite de mismo material.

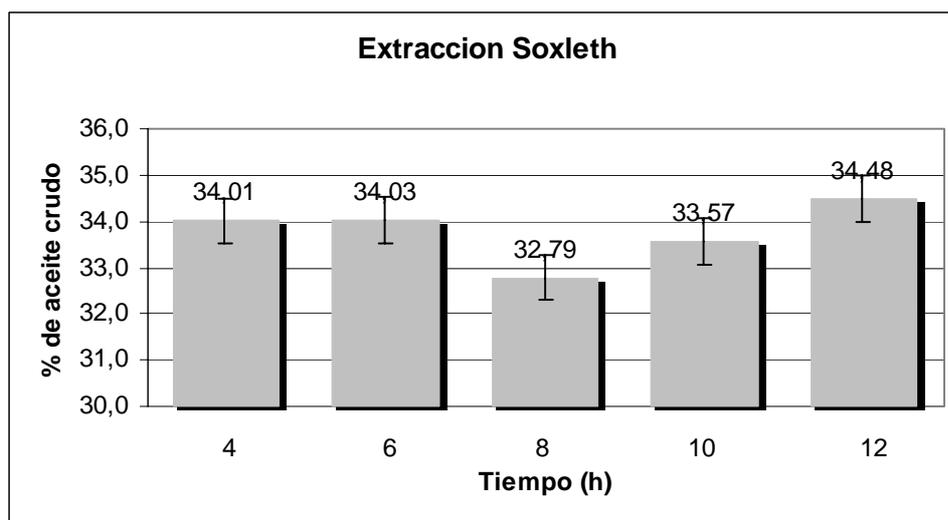


Figura 16. Porcentaje de aceite crudo obtenido de la semilla sin digerir por el método Soxleth.

El decremento en el porcentaje de aceite extraído a las 8 h se debe a que la micela que se formó durante la extracción en el solvente llegó casi a la saturación ya que de acuerdo con Giménez (2007) la concentración de aceite en función al tiempo baja hasta hacerse asíntota, aplicándose el efecto contracorriente en el cual la semilla o producto avanza en un sentido y el solvente en otro.

El rendimiento de extracción de aceite por este método, sin biolixiviación a las 4 h fue de 34%, porcentaje similar a los obtenidos por Calvo (2003) y Monroy (2007), mientras que del material biolixiviado se obtuvo un porcentaje de 43.76% indicando una diferencia altamente significativa entre ambas muestras (figura 17). Superando el rendimiento de extracción de aceite que obtuvo Monroy (2007) de 38.4 % de la semilla de calabacilla loca tratada enzimáticamente con celulasas.

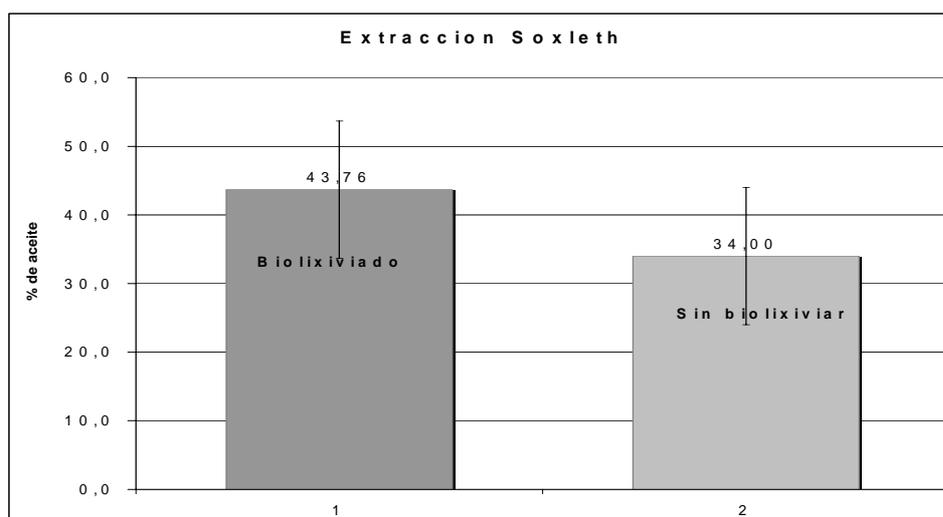


Figura 17. Porcentajes de extracción por el método Soxhlet de aceite obtenido del material biolixiviado y sin biolixiviar.

4.4.2. Extracción de aceite por el método de Prensado

Los resultados obtenidos por la metodología seguida fueron igualmente analizados por la Prueba de Tukey ($p < 0.05$) los cuales indicaron una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de aceite extraído entre la semilla biolixiviada y sin biolixiviar (figura 18). Los resultados obtenidos por este método fueron similares a los obtenidos por Monroy (2007) en la extracción de aceite de la semilla de calabacilla loca,

sin tratamiento enzimático y con tratamiento enzimático con celulasas, lo cual indica que dicho proceso podría ser igual de factible al utilizar el hongo productor de las enzimas extracelulares del complejo celulasa.

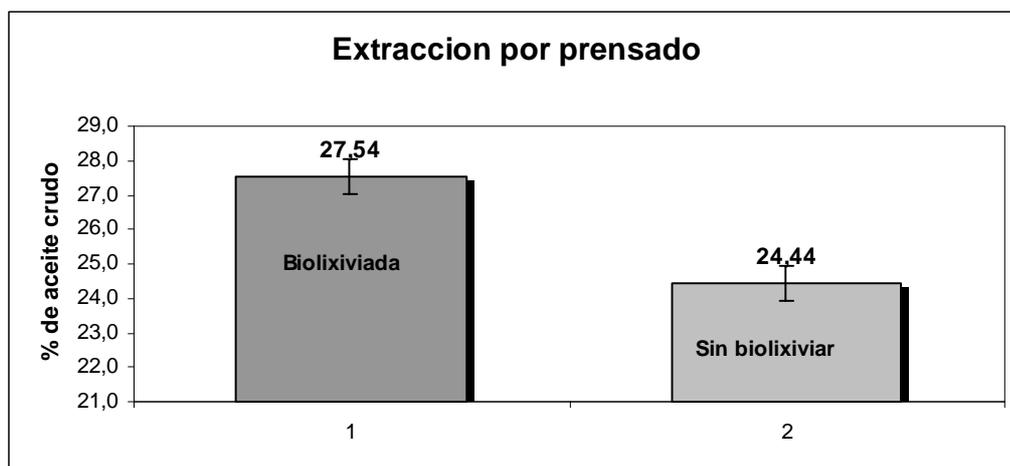


Figura 18. Porcentajes de extracción por prensado de aceite obtenido del material biolixiviado y sin biolixiviar.

4.4.3. Comparación de los métodos de extracción utilizados

Los porcentajes obtenidos de aceite crudo de los diferentes procesos y de las muestras con y sin predigestión marcaron diferencias significativas en el análisis realizado por la prueba de Tukey ($p < 0.05$); los extraídos por el método Soxhlet fueron de 34% de aceite crudo, sin biolixiviar, y 43,76%, con biolixiviación; y los obtenidos por prensado fueron de 24,44%, sin biolixiviar, y 27,54%, con biolixiviación. Con esto se observa claramente que el proceso de predegradación surtió efecto en ambos procesos extractivos al aumentarse los rendimientos de extracción de aceite.

Sin embargo el hexano utilizado en el proceso de extracción por solventes es un material tóxico puesto que al ser expuesto a altas temperaturas tiende a descomponerse generando compuestos con efecto tóxico para el medio ambiente así como para la salud (Raúl 1955). Por ello el método de prensado para extracción de aceite se postula como un método con menos impacto ambiental además de obtener un producto final de mayor valor agregado y que con un proceso de predegradación de la pared celular de la semilla aumentaría factiblemente el rendimiento de extracción.

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

El proceso de biolixiviación surtió efecto al aumentar los rendimientos de extracción de aceite de la semilla de calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*).

El hongo utilizado en dicho proceso, *Aspergillus niger*, fue inducido de manera exitosa en carboximetilcelulosa (CMC). Lo que posteriormente se confirmó por el comportamiento que tomo durante la formación y asimilación de azúcares totales y reductores, mismo que es presentado por hongos productores de celulasas, los cuales excretan estas enzimas al medio para obtener carbohidratos simples y solubles asimilándolos de manera constante.

La condición de pH tienen efecto directo sobre el desarrollo y actividad fúngica del hongo reflejándose en la liberación de aceite de la semilla de calabacilla loca.

El proceso de biolixiviación por el hongo en cuestión se llevó a cabo con mayor eficiencia a un pH 7, a una temperatura de 25° C, formando y asimilando de manera constante los azúcares simples y solubles, liberado con ello una mayor cantidad de aceite de la semilla en cuestión.

El periodo de tiempo de mayor costo/benéfico utilizado para el preproceso de biolixiviación fue de 96 h puesto que en los tiempos posteriores ya no hubo una liberación de aceite significativa.

Los rendimientos de extracción de aceite por el método Soxhlet fueron de 9.66% más que por el método de prensado, mientras que de la semilla con preproceso de biolixiviación se obtuvo un 16.3% más, siendo el método Soxhlet el más adecuado para la extracción de aceite, sin embargo existe la limitante del uso de hexano el cual tiene impacto tóxico para el medio ambiente así como para la salud, por ello el proceso de extracción por prensado se postula como el mejor.

5.2. Recomendaciones

Evaluar diferentes microorganismos capaces de degradación de la pared celular de la semilla de calabacilla loca para mejorar eficiencia.

Evaluar y establecer condiciones para el mismo proceso, mediado por microorganismos inmovilizados con el fin de mejorar eficiencia.

Evaluar por Cromatografía de gas líquido los ácidos grasos observado la variabilidad con preproceso de biolixiviación.

Capítulo 6.

6.1 Bibliografía

- ANON** (1997). Official methods and recommended practice of the American Oil Chemists' Society, in Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes, AOCS Press, Champaign, IL.
- ASHOK, P.** (2002). Solid-state fermentation. *Biochemical engineering Journal* 13(2/3): 81-84
- BAILEY, L. H.** (1943). Species of *Cucúrbita* genetics. *Herb.* 6:265-322.
- BERDANIER et al.** (1992). Life span is shortened in BHE/cdb rast fed a diet containing 9% menhaden oil and 1% corn oil. *Journal of Nutrition* 122: 1309-1317
- BARNETT, H. L.** and Hunter, B. B. (1987). *Illustrated general of imperfect fungi.* 4th edition. Mc Millan Publishing Company. pp 70-85.
- BEMIS, W.P.,** W.P. Berry and C.W. Weber 1978. The Buffalo Gourd, a potential crop for arid lands. *Arid Lands Newsletter, University of arid zona* 8:1.
- BEMIS, W.P.,** Curtis L.C., Weber, C.W., Berry, J.W. and Nelson (1975). The Bufalo gourd(*Cucúrbita foetidissima* (hbk). Apotecial Crop for the production of protein, oil and starch on Arid Lands. U.S. AID Technical Series Bulletin. 15: 20 paginas.
- BERRY, J.W.,** Sheerens J. C. and Bemis, W. P. (1978). Buffalo gourd roots: chemical composition and seasonal changes in starch content. *Jour. Of Agric Food Chem.* 26(2): 354-356
- BHAT, M. K.** (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances.* 18: 355-383
- BINDU, B.,** Jitender, S., Dhiman, S. S. and Kuhad, R. C. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology* 41(6/7): 733-739
- Biolixivación, la nueva minera. Centro de Investigación Minera y Metalúrgica (CIMM) 2005.
- BROCK, D. T.** (1978). *Biología de los microorganismos,* ed. Barcelona, España p. 703-707
- CALVO G. A.** (2003) Extracción y Purificación de Aceite a partir de Semilla de Calabacilla loca (*Cucúrbita foetidissima*) para su aplicación en la industria alimentaria. UAAAN. Coahuila, México 138 paginas
- CHARLEY, H.** (1987). *Tecnología de alimentos: Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos.* ed. Limusa México 767paginas.
- CHAVEZ J. L,** y Fernandez, G. (1985). La calabacilla loca (*Cucurbita foetidissima* HBK) especies con potencial. UAAAN.
- CHAVEZ J. L,** y Gómez, H. (1978). La calabacilla loca (*Cucurbita foetidissima* HBK) aportaciones a su domesticación U.A.A.A.N.
- CURTIS, L.C.** (1946). The possibilities of using species of perennial cucurbits as source of vegetable fats and protein. *The chemburgic ddigest* 5:221-224.
- CURTIS, L.C.** (1972). An a ttempt to domestic a wild, perennial, xerophytic gourd, *Cucurbita foetidissima*. Progress Reprt IV. Arid lands Agriculture developmente program. Beirrut libano.
- CURTIS, L.C** (1974). The domestication of a wild perennial xerophytic gourd, *Cucurbita foetidissima*, the buffalo gourd.
- DE VRIES, R. P.,** Faulds, C. B., and Visser, J. (1999a). The faeA gene from *Aspergillus níger* encoding a feruloyl esterase with activity on xylan and pectin is subject to a complex system of regulation. *J. Sci. Food Agri.* 79: 443–446.
- DE VRIES, R. P.,** Visser, J., and de Graaff, L. H. (1999b). creA modulates the xlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus níger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* 150: 281–285.
- DITTMER, H.J.** and B.P. Talley 1964. A gross morphology of tap Roots of desert cucurbits. *Bot gaz.* 121-126.
- DONGOWKI, et al.** (2002) Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. *Nahrung/ Food* 46: 105-111.
- DEACON, J. W.** (1988). *Introducción a la Micología Moderna,* ed. D.F., México pp. 120-122.
- Fats and Oils in human Nutrition. Report of a joint expert consolation of FAO and OMS. ed. Roma 1993
- FAO y OMS** (1978). *Dietary Fasts and oils in Human Nutrition.* Food and Nutrition Paper, Rome: FAO
- FAO y OMS** (2008). Norma para aceites vegetales especificados (enmendada en el 2003, 2005). Codex Alimentarius
- FOX, A. B.** y Cameron, G. A. (1999). *Ciencia de los Alimentos, Nutrición y Salud,* ed. D.F. México, pp. 57-67.
- GRETTY, K.,** Marcel, G.C. (2003) Biopelículas de *Aspergillus níger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Nombre de la revista* (1): 78-87. ed. Perú

- HANAG**, V. D. and Woodams, E. E. (1997). Xylanolytic activity of commercial juice-processing enzyme preparations. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 389-392.
- GHOSH**; Sambhunath (1983). Gas production by accelerated bioleaching of organic materials. Institute of Gas Technology (Chicago, IL)
- HENRY**, J. G. and Prasad, D. (2006). Biosolids from two-stage bioleaching could produce compost for unrestricted use. *Environmental Technology* 27(6): 665-672
- ILINÁ**, A. (2002). Manual de prácticas del curso de crédito 1. Introducción a la biotecnología U. A. de C. 38 páginas
- KHOURY**, *et al.* (1982). Chemical and physical characteristics, fatty acid composition and toxicity of buffalo gourd oil, *Cucurbita Foetidissima*. *Journal Fd. Tecnology* 17: 19-26.
- KIRK**, S. R. Sawyer, R. and Egan, H. (2004). *Composición y análisis de los alimentos de person*, ed, D.F. México, 777 paginas.
- La industria del aceite del coco. FAO, Roma, 1970.
- LA GRANJE**, D., Pretonus, I. S. and Van Zyl, W. H. (1996) Expresión of a *Trichoderma reesei B-xylanase gene* (XYNZ) *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1036-1044.
- LAWSON**, H. (1999). *Food Oils and Fats. Technology, Utilization, and Nutrition*, Zaragoza, España pp. 50.
- LEE**, C. H. *et al.* (2005). Enhancement of natural pigment extraction using basillus species xylanase. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53: 2541-2545.
- LJUNGDAHI**, L. G. and Eriksson, K. E. (1985). Ecology of microbial cellulose degradation, *Advances in Microbiology and Ecology* 8: 237-299.
- LOCKINGTON**, R. A., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J., and Kelly, J. M. (2002). Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 37: 190–196.
- MALABADI**, R. B. , Raghvendra, S. and Kumar, S. V. (2007). Production of cellulase-free xylanase from a novel yeast strain used for bioleaching in paper industry. *Research Journal of Microbiology* 2(1): 24-33
- MARSDEN**, W. L., and Gray, P. P. (1986). Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 3: 235-274
- OVANDO**, S. L. y Waliszewski, K. (2005). *Preparativos de Celulosas Comerciales y Aplicaciones en Procesos Extractivos*. Universidad y Ciencia. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, México 21(42): 113-122.
- POTTER**, N. N. y Hotchkiss, H. J. (1995). *Ciencia de los alimentos*. Zaragoza, España. pp. 399-404.
- PRESCOTT**, M. L., Harley, P. J. y Klein, A. D. (1999). *Microbiología* 4ª ed. Madrid, España. pp. 998.
- Proexport Colombia** (2004). *Estudio de Mercado México – Sector Aceites y Grasas*. Convenio ATN/MT-7253-CO. Programa de Información al Exportador por Internet. Bogotá, Colombia, 80 páginas.
- RAPER**, K. B. and Fenell, D. I. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- RASTOGI**, N. K. *et al* (1998). Optimization of Enzymatic Degradation of Coconut Residue, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76:129-134.
- ROBINSON**, D. S. 1991 *Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos*. Ed. acribia, S. A.
- ROBLES**, S. R. (1982) *Producción de Oleaginosas y Textiles*. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Moterrey. D.F., México pp. 325-329.
- SAADE**, L. R. *et al.* (1995). *Estudios Taxonómicos y Ecogeograficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de Importancia Económica*. UNAM. México pp. 89-91.
- SARKER**, *et al.* (1999). Response Surface Analysis of Enzyme Assisted al Extraction for Sesame, Groundnut and Sunflower Seeds. *Jurnal of Food Science and Technology* 36: 511-514.
- SHHEREENS**, J.C., Bemis W.P., Dreher, M. I. and Berry J.W. (1978). Phenotypic variation in fruit and seed characteristics of buffalo gourd. *Jour. Of tehe Am Oil Chem. Soc.* 28: 90:95.
- SHEREVE**, F. and I. Wiggins (1964). *Vegetation and flora of Sonoran Desrt*. Stanford University of Kansas Press. USA. 263 paginas.
- SINGH**, A., Agrawal, A. K., Abidi, A. B., and Darmwal, N. S. (1990). General and kinetic properties of endoglucanase from *Aspergillus níger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 71, 221–224.
- SWERS**, D. (1982). *Bailey's Industrial oil and fat products*, vol. 2, 4th ed. New york: wiley-interscience pp.178 and 18-191
- TIRADO**, J. M. G. (2005). Obtención del colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) utilizado microorganismos celulolíticos. UAAAN. Saltillo, Coahuila 72 paginas.
- TUITE**, J. F. (1982). Examining and identifying fungal cultures growing out from corn kernels. Dept. of Plant Pant, Univ. Purdue, Indiana. (mimeógrafo).

VACLAVIK, A. V. (2002). Fundamentos de Ciencia de los Alimentos, ed. Zaragoza España, 485 páginas.

VILCHES, P. L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de huaylas y Huaraz. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad De Ciencias Biológica, Lima, Perú pp. 1-7.

WARD, O. P., Qin, W. M., Dhanjoon, J., Ye, J. and Singh, A. (2006). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology* 58: 43-46.

WEISS, T. J. (1983). *Food Oils and Their Uses*. 3rd ed. AVI Publishing Co., Westport, CT.

WHITAKER, T.W., Bemis W.P. (1975). Origen and evolution of the cultivated *Cucúrbita*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 102(106): 362-368.

Sitios Web Consultados:

ARGENBIO. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología
<http://www.argenbio.org/h/glosario/index.php?letra=b> consultado el 28/04/2008; 21:55.

CARRILLO, L. (2003). Los hongos de alimentos y forrajes, Universidad Nacional De Salta, ed. Salta, Argentina. 126 pags.
Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>, Consultado 07/02/08 12:37 pm.

GIMÉNEZ, J. (2007). Obtención de aceite comestible. Disponible en: www.monografias.com consultado el 21/04/2008 1:31 p.m.

HARALD, W. T. (2002). disponible en: <http://www.uva.org.ar/Aceite1.html> consultado el 06/02/08 12:36pm.

Bigelis and Lasure (1987). Diponible en: www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1471-8286.2005.00932.x

RAMÍREZ, 1998, disponible en <http://www.ramirez.8m.net/aceite.htm>, consultado 5 de febrero de 2008 a las 11:40

RAÚL,1955 disponible en:
<http://ies21-carreradegestionambiental.blogspot.com/2007/12/hexano.html>. Consultado el 05/02/08 11:18 am.

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UNAM, México. Disponible en:
<http://organica1.org> consultado el 11/04/08 2:15 pm.

6.2. Anexos

6.2.1. Aplicación de la técnica de microcultivo para la caracterización microscópica de cepas.

Se preparan las cajas petri con un portaobjetos, cubreobjetos, papel filtro y una varilla de vidrio doblado. Todo debe ser totalmente esterilizado.

Posteriormente se coloca un pequeño cuadrado de agar sólido, ya antes preparado en el portaobjetos. Con la ayuda de una aguja de asa, se toma una muestra del hongo y se aplica a ambos lados del cuadrado de agar. Se coloca el cubreobjeto y por último se le agrega agua a la caja petri con el propósito de mantener la humedad dentro de la misma para permitir el rápido desarrollo de los hongos.

Durante todo el procedimiento se debe tener un mechero al lado para evitar que se contamine el cultivo a preparar y esterilizar con calor la asa microbiológica. Todo esto se maneja en la campana para evitar cualquier tipo de contaminación. Finalmente los micro cultivos se mantienen a temperatura ambiente de 2 a 5 días según el crecimiento observado. Después a la caja se agrega 5 ml de formaldehído por 24 horas.

Posteriormente se realiza una observación microscópica de los micro cultivos retirando el agar y pasando los hongos localizados en cubreobjetos en un nuevo portaobjetos. Al portaobjetos se le pone un nuevo cubreobjetos. Antes de tapar al portaobjetos se agrega 1 gota de AMAN (azul de algodón y lacto fenol). Así se realiza la identificación microscópica de hongos, utilizando para esto la información de referencia de catálogos y medios de información.

6.2.2. Técnica para el conteo de esporas (Iliná)

El hongo es sembrado en matraces Erlenmeyer con agar Sabouraud (o equivalente disponible), mediante el agregado de una solución de esporas seguido de agitación en forma de 8 ó en su defecto si se proporciona una cepa conservada del hongo, tome una asada e inocular por punción del agar. Estos se incuban por 7 días a 30° C.

Posteriormente se prepara una suspensión de esporas empleando una solución de elementos traza previamente esterilizada. La recolección de esporas se hace agregando 50 ml de una solución estéril de sales traza ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg/L) a cada uno de los matraces con cultivo. Estos se colocan en agitación a 250 rpm durante una hora, para lograr el arrastre de las esporas por la solución que se adiciona de manera aséptica a los matraces que contenían el cultivo. Finalmente la solución se filtra a través de lana de vidrio estéril, recuperando el filtrado en un matraz estéril de 100 ml. El número de esporas se determina por conteo en una cámara de Neubauer. La solución se almacena a 4°C.

Para determinar la cantidad de esporas por mililitro de las soluciones extraídas, se utiliza una cámara de Neubauer. El fondo de la cual, está constituido por un portaobjetos que tiene grabados cuadrados microscópicos de dimensiones conocidas; la tapa es un cubreobjetos que se halla separado del portaobjetos marcado mediante unas barras de elevación también conocida.

La distancia entre porta y cubre es de 0.1 mm. Cada zona de la cuadrícula corresponde a un cuadrado de 3 mm de lado, dividido en 9 cuadros grandes, cada uno de 1 mm². El cuadrado central se divide a su vez en 25 grupos de 16 limitados por líneas triples; cada uno de los 25 cuadros pequeños mide 0.04 mm² y cada uno de los 400 cuadros menores tiene 0.05 mm de lado.

Se pone el cubreobjetos sobre la cámara y con ayuda de una micropipeta se coloca una gota de solución de esporas (diluida en 10 veces) hasta que la plataforma de recuento quedó completamente cubierta. El líquido es atraído al interior por capilaridad. La camarilla se lleva a la platina del microscopio y se deja en reposo durante 2 minutos para que las esporas sedimenten y se utiliza el objetivo 10x para asegurarse que éstas se hayan distribuido homogéneamente. Con el seco fuerte (40x) se procede a contar las esporas en ochenta cuadros pequeños; 5 cuadros medianos, uno en el centro y 4 angulares del gran cuadrado central.

Para obtener la cantidad de esporas por mililitro se realizan las siguientes operaciones:

Área de cada cuadrado pequeño: $0.05 \text{ mm} \times 0.05 \text{ mm} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$

Volumen de los 80 cuadros pequeños: $(2.5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2) \times (0.1 \text{ mm}) \times 80 = 0.02 \text{ mm}^3$

(Total de esporas contadas) $\times (1/\text{dilución}) \times (1/0.02\text{mm}^3) = \text{Esporas} / \text{mm}^3$.

(Total de esporas contadas) $\times (1/\text{dilución}=1/10) \times (1/0.02) \times 1000 = \text{Esporas} / \text{mL}$

De donde se obtiene la siguiente fórmula:

$N \times (5 \times 10^5) = \text{Número de esporas por mililitro}$.

Donde N es igual a las esporas contadas en los 80 cuadros y el factor de dilución utilizado es de 10.

6.2.3. Efecto del tiempo por extracción soxleth, prueba Tukey ($p < 0.05$)

Tiempo h			% de aceite
12	A		34,62
6	A		34,03
4	A		34,00
10		B	33,57
8		B	32,79

6.2.4. Efecto del pH en el % de aceite extraído, prueba de Tukey ($p < 0.05$)

pH			% de aceite
7	A		43,76
3		B	38,41
5		B	36,48

6.2.5. Extracción por soxleth, prueba Tukey ($p < 0.05$)

Muestra			% de aceite
Biolixiviada	A		43,76
Sin biolixiviar		B	34,00

6.2.6. Extracción por prensado, prueba Tukey ($p < 0.05$)

Muestra			% de aceite
Bioliixiviada	A		27,54
Sin bioliixiviar		B	24,44

6.2.7. Efecto de tiempo de bioliixiviado en el % de aceite, prueba Tukey ($p < 0.05$)

Tiempo h			% de aceite
168	A		43,76
96	A		43,68
72		B	35,33