

PREPARATIVOS DE CELULASAS COMERCIALES Y APLICACIONES EN PROCESOS EXTRACTIVOS

Commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes

SL Ovando-Chacón ✉, KN Waliszewski

(SLOC) (KNW) Instituto Tecnológico de Veracruz
 Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos
 Laboratorio de Enzimología. Miguel Ángel de Quevedo 2779
 Veracruz, Ver. 91700. México
 ovansandy@hotmail.com

Ensayo recibido: 26 de junio de 2005

Ensayo aceptado: 26 de septiembre de 2005

RESUMEN La industria extractiva de compuestos de interés, tales como, la extracción de aceites esenciales y comestibles, la producción de jugos de fruta o de vegetales, la extracción de pigmentos, saborizantes y aromas, enfrenta problemas (el consumo de tiempo del proceso y la eficiencia de la extracción) debido a la naturaleza química compleja de los vegetales. La importancia y la demanda de estos productos naturales alimenticios ha propiciado el desarrollo de nuevas propuestas biotecnológicas, siendo una de ellas la aplicación de enzimas, como una alternativa para minimizar estos problemas. Las hidrolasas que tienen la capacidad de degradar los polisacáridos que constituyen la pared celular de los tejidos vegetales tales como la celulosa, la hemicelulosa y la pectina, reciben en la actualidad mayor atención principalmente en la industria alimentaria. Por lo que en las últimas décadas, en particular los preparados celulolíticos comerciales y los preparados con actividad múltiple, se han aplicado con éxito para facilitar y aumentar la liberación de productos de interés y para mejorar el proceso tecnológico mediante la predigestión enzimática de la pared celular de los tejidos vegetales. La presente aportación es una revisión bibliográfica sobre la potencialidad de los preparados enzimáticos celulolíticos o con actividad múltiple sobre diferentes procesos de extracción.

Palabras clave: celulosa, predigestión enzimática, celulasas comerciales, preparados enzimáticos con actividad múltiple, extracción

ABSTRACT The extractive industry of compounds of interest such as essential and edible oils, production of fruit or vegetable juices, the extraction of pigments, flavoring and aroma, faces problems, as they are the process of time consumption and low extraction efficiency, due to the complex chemical nature of food compounds. The importance and demand of these food natural products has caused the development of new biotechnological treatments, as the application of enzymes as an alternative to diminish these problems. The hydrolases that have the capacity to degradate the polysaccharides that constitute the cell wall of the plant tissues such as the cellulose, the hemicellulose and the pectin, receive actually a major attention mainly in the food industry. Reason why in the last few decades, in particular the commercial cellulolytic and the multiple activity preparations have been applied successfully to facilitate and to increase the release of interest compounds or for improving the technological process by means of the enzymatic predigestion of the cell wall of the plant tissues. The present contribution is an overview of the potentiality of the cellulolytic enzymatic preparations or multiple activity preparations on different processes of extraction.

Key words: cellulose, enzymatic predigestion, commercial cellulases, multiple activity enzymatic preparations, extraction

INTRODUCCIÓN

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 de sabor o de interés para la industria alimentaria (Rastogi *et al.* 1998; Sarker *et al.* 1999; Lee *et al.* 2005). La celulosa es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa, las cuales

se mantienen unidas mediante enlaces β -1,4 glucosídicos. Pero además, la configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno intramolecular formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chou *et al.* 1981; Fan *et al.* 1982; Ljungdahl & Eriksson 1985). extracción de compuestos de interés, es la aplicación de enzimas

celulasas o preparados con actividad enzimática múltiple (celulasa, hemicelulasa y pectinasa) debido a su efecto sinérgico, por el potencial que tienen sobre la hidrólisis de los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales (Sreenath *et al.* 1987; Sreenath *et al.* 1995; Chauhan *et al.* 2004).

Tipos de celulasas

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Lee 1997). El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa (C_x) (1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), la exo- β -1,4-glucanasa (C_1) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y la β -1,4-glucosidasa (celobiasa) (C_b) (β -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21) (Ladisich *et al.* 1983; Bataille & Toussaint 1985; Marsden & Gray 1986; Lee 1997; Hahn-Hägerdal & Palmqvist 2000).

Mecanismo de hidrólisis enzimática

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de C_1 (Ryu & Mandels 1980; Chou *et al.* 1981; Philippidis & Smith 1995; Lee 1997).

En la segunda etapa actúa la exo β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de

unidades de celobiosa o glucosa (Ryu & Mandels 1980; Marsden & Gray 1986; Philippidis & Smith 1995; Bhat & Bhat 1997; Lee 1997). Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis (Lee 1997; Hahn-Hägerdal & Palmqvist 2000).

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa (Beldman *et al.* 1988). Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa C_b , porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Ladisich *et al.* 1983; Ljungdahl & Eriksson 1985; Philippidis & Smith 1995; Lee 1997).

Microorganismos productores de celulasas

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen enzima celulasa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa (Ljungdahl & Eriksson 1985; Marsden & Gray 1986; Bhat & Bhat 1997; Dongowski *et al.* 2002).

A partir de los hongos aeróbicos, tales como: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, se han obtenido los complejos celulolíticos utilizados en la mayoría de los estudios (Eriksson & Wood 1985), debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa (Ryu & Mandels 1980). Entre estos microorganismos, el hongo filamentoso *T. reesei* se caracteriza por la efectividad que tiene en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con el complejo celulolítico que produce y secreta, el cual presenta las tres actividades necesarias para la hidrólisis de la celulosa (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa) (Ben-Ghedalia

& Miron 1981). También, las celulasas de *T. reesei* tienen la ventaja de que estas son resistentes a inhibidores químicos y estables en reactores agitados bajo condiciones de pH 4.8 a 50 °C durante 48 h (Ryu & Mandels 1980).

Otros microorganismos productores de celulasas incluyen a los hongos aeróbicos termofílicos (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* y *Humicola insolens*), los hongos anaeróbicos mesofílicos (*Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*), las bacterias aeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Cellulomonas* sp., *Cellvibrio* sp., *Microbispora bispora* y *Thermomonospora* sp.), y las bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*) (Forsberg & Groleau 1982; Beguin & Aubert 1993). Entre éstos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas de hasta 90 °C (Lamed & Bayer 1988; Sugden & Bhat 1994).

Las enzimas celulolíticas producidas por las bacterias del género *Bacillus* presentan básicamente actividad endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa; pero tienen una característica particular, en especial las enzimas producidas por *Bacillus subtilis* y es la resistencia a ser inhibida por la glucosa o celobiosa (Ljungdahl & Eriksson 1985).

Preparados celulolíticos comerciales

En la actualidad existen disponible numerosos preparados enzimáticos comerciales grado alimenticio que contienen principalmente actividad celulolítica (endo- β -1,4-glucanasa E.C.3.2.1.4, exo- β -1,4-glucanasa E.C.3.2.1.91, β -1,4-glucosidasa E.C.3.2.1.21). Estos preparados enzimáticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, que principalmente provienen de los microorganismos *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* (Bhat 2000). Algunos de estos preparados enzimáticos son: Crystalzyme PML-MX de Valley Research Inc.,

Biocellulase A de Quest Intl., Celluclast 1.5 L de Novo Nordisk, Econase Ce-S de Enzyme Development Co., Cellulase AP30K de Amano Enzyme, Stonenzyme Plus, Zymafilt L-300 y Macerex de Enmex S.A. de C.V., Novozym 342 de Novo Industries, Cellubrix L de Novo Nordisk y Cellulase de Bio-Cat Inc. Todos son solubles en agua y su presentación es en estado líquido, excepto el preparado Cellulase que es en polvo. Así también, Crystalzyme PML-MX, Macerex y Cellulase son preparados enzimáticos con actividad mixta porque además de actividad celulasa contienen actividad pectinasa y hemicelulasa. Estos solamente son algunos de los preparados enzimáticos comercialmente disponibles en el mercado, ya que existen muchos de ellos, dado a la amplia gama de aplicaciones que tienen las celulasas en las diferentes industrias tales como de alimentos para consumo humano, alimentos para animales, en textiles y combustibles (Mandels 1985; Beguin & Aubert 1993).

Aplicación de enzimas sobre la obtención de componentes alimenticios

El interés sobre el estudio de la aplicación de enzimas en la industria de la extracción de productos vegetales se ha incrementado de manera importante en las últimas dos décadas, debido a que ha mostrado ser una herramienta factible facilitando la liberación de los componentes de las células del tejido además de liberar el compuesto extra que se encuentra encerrado dentro de las células incrementando la producción.

Extracción de jugo. En la extracción de jugo los preparados enzimáticos tienen un enorme potencial de aplicación por dos razones: por un lado se incrementa el porcentaje de extracción de los jugos; y por otro lado, el jugo presenta un mejor sabor agradable. Das *et al.* (1994) registraron el efecto de la adición individual de dos preparados enzimáticos comerciales: Celluclast (con actividad celulasa) y Ultrazyme (con actividad pectinasa); así como la mezcla de ellos sobre la extracción del jugo de naranja a partir de la pulpa del fruto. Ellos observaron que el pretratamiento de la pulpa de naranja en una relación de pulpa/agua de 1:1 a una temperatura de incubación de 45 °C durante 1 h con

la enzima Ultrazyme a una concentración de 0.32 IU/30 g de pulpa, provocó un aumento en el contenido de los sólidos solubles de 1.4 °Bx comparado con la muestra testigo (sin enzima). El aumento de los sólidos solubles fue atribuido a que las enzimas pectinasas solubilizaron la pectina y las membranas de la pared de las células que contienen el jugo, lo cual provocó un ablandamiento del tejido de la pulpa, y aumentó la producción de jugo. Sin embargo, cuando ellos evaluaron el efecto de la mezcla de las enzimas comerciales (Cellulast y Ultrazyme) en la extracción del jugo de naranja, observaron un incremento de 1.8 °Bx en el contenido de los sólidos solubles comparado con el tratamiento testigo, lo que fue atribuido a la sinergia que ejerció el uso combinado de las enzimas. La enzima celulasa adicionada sola, en las condiciones de estudio, no presentó un efecto significativo ($p > 0.05$) con respecto al tratamiento testigo (sin enzima). Por lo tanto, los autores concluyeron que la efectividad de las enzimas dependerá de la naturaleza química del sustrato analizado. Adicionalmente, estos autores detectaron que durante la predigestión enzimática de la pulpa de naranja se liberaron otros componentes importantes de la fruta como son los aceites esenciales, además de los azúcares que juntos le imparten un mejor sabor agradable al jugo.

La maceración enzimática de la zanahoria; así como de otras frutas y vegetales, es una etapa importante previa, en cualquier proceso industrial en donde se utiliza el tratamiento térmico, por dos razones: primero, para evitar o disminuir la pérdida de los componentes nutricionales presentes en el tejido vegetal y segundo, para evitar la deterioración de las propiedades sensoriales del producto como son la textura y el sabor. Por ejemplo, durante el procesamiento industrial de jugo de zanahoria se recomienda una temperatura menor a 55 °C, para evitar la inactivación de las enzimas endógenas de la zanahoria. Por lo tanto, la ventaja de la maceración enzimática de la zanahoria, radica en que las enzimas pectinasas solubilizan la pectina y las membranas de la pared de las células que contienen el jugo provocando así un ablandamiento del tejido; de tal manera, que se facilita la extracción del jugo durante el proceso industrial, además de

que permite disminuir la temperatura mejorando la palatabilidad del jugo (Dinnella *et al.* 1998).

El efecto de la mezcla de dos preparados enzimáticos comerciales con actividad mixta: Rohament Max (pectinasa, hemicelulasa y celulasa) y Rohament PL (poligalacturonasa) producidos por Enzymes Australia Pty. Ltd., fue estudiado para la producción de jugo de zanahoria a partir de la pulpa (Vora *et al.* 1999). Los resultados indicaron que la mezcla de los preparados enzimáticos en una proporción de 25:75 (Rohament PL:Rohament Max), provocó un incremento marcado en el porcentaje de jugo de zanahoria extraído comparado con el porcentaje de jugo obtenido de la pulpa de zanahoria no tratada con la enzima. También, estos autores observaron que el porcentaje de jugo de zanahoria obtenido de la pulpa tratada enzimáticamente, varió con la concentración de enzima analizada (75, 150, 300 y 500 ppm) y el tiempo de tratamiento enzimático (30, 60, 90, 180 y 300 min). Las condiciones óptimas, para la extracción del jugo de zanahoria, registradas fueron una concentración de enzima de 150 ppm y un tiempo de incubación de 90 min, donde el porcentaje de jugo extraído fue de 77.6 % y además presentó un bajo contenido de sólidos (< 0.2 %) (límite permitido de sólidos en el jugo). Adicionalmente, ellos observaron un incremento marcado en la extracción de α -carotenos (3.6 veces mayor) y β -carotenos (4.4 veces mayor) en el jugo de zanahoria tratado enzimáticamente en comparación con el jugo no tratado (testigo), donde el contenido de α -carotenos fue de 3.0 ppm y de β -caroteno fue de 3.2 ppm respectivamente. A manera de referencia, el porcentaje de jugo de zanahoria extraído de la pulpa no tratada con la mezcla enzimática fue de sólo 36.0 %. Por lo tanto, los investigadores concluyeron que la maceración enzimática de la pulpa de zanahoria, además de mejorar la extracción del jugo, tuvo un efecto positivo sobre la calidad del jugo; ya que obtuvieron una mejor extracción de carotenoides sin alterar significativamente ($p = 0.05$) el color del jugo comparado con el jugo obtenido de zanahoria no tratada con la mezcla enzimática.

Extracción de leche. Mediante la degradación de los polisacáridos presentes en el

coco es posible liberar la leche de coco extra, que se encuentra retenida en el residuo del fruto extraído (Rastogi *et al.* 1998). La degradación enzimática en un 93 % del coco extraído, predigerido con el preparado Trizyme P50 de Triton Chemicals conteniendo una mezcla de actividades pectinasa, celulasa, α -amilasa, amiloglicosidasa, proteasa y hemicelulasa, ha mostrado la extracción total de la leche de coco. Además, ellos observaron que los azúcares, principalmente la glucosa que es producto de la degradación enzimática de los polisacáridos, permitieron obtener una leche de coco con un mejor sabor, debido a que le imparten mayor dulzura a la leche.

Extracción de almidón. La extracción enzimática del almidón a partir del residuo de desecho de sago, con los preparados comerciales Pectinex Ultra SP-L y Ultrazyme 100G, de Novo Nordisk y ambas con actividad pectolítica principalmente, ha sido motivo de estudio por Dos-Mohd *et al.* (2001). Los resultados indicaron una mayor cantidad de almidón liberado (42.3 ± 0.4 % en base seca) del residuo de sago sometido a incubación durante 1 h con la enzima Pectinex Ultra SP-L comparado con el tratamiento sin enzima, donde la máxima cantidad de almidón obtenida fue de 36.2 ± 0.4 % en base seca y en un tiempo de reacción de 3 h. Por lo tanto, el uso de ciertos preparados enzimáticos que degradaron la pared celular, particularmente Pectinex, contribuyó a la desintegración parcial de los componentes de la pared celular, especialmente las sustancias pecticas, de esta forma la predigestión enzimática facilitó la liberación de los gránulos de almidón atrapados dentro de las células del parénquima o por las fibras del residuo de sago. Sin embargo, la máxima cantidad de almidón extraída (28.4 ± 0.7 % en base seca) fue obtenida con el preparado Ultrazyme 100G, a las 2 h de incubación enzimática y, éste fue menor comparado con el tratamiento de la muestra tratada con Pectinex Ultra SP-L. La diferencia, fue atribuida a una extracción limitada y selectiva de los gránulos de almidón durante las primeras 2 h de incubación enzimática, debido a una distribución unimodal de los gránulos.

Extracción de aceite. El uso de algunos preparados celulolíticos en el proceso de extracción ha tenido un efecto positivo sobre el rendimiento de

la extractabilidad del aceite. El rendimiento en la extracción del aceite de aguacate fue hasta un 30 % mayor, después de someter la pulpa de aguacate a un proceso de extracción acuosa enzimática con los preparados comerciales Ultra-SP-L y Olivex, comparado con el proceso de extracción térmico tradicional (Freitas *et al.* 1993). Ambos preparados mostraron actividades de poligalacturonasa, pectinesterasa y hemicelulasa. Además, la enzima Olivex presentó actividad galactomanasa y xilanasas.

El efecto de un preparado enzimático producido por *Aspergillus fumigatus* NCIM 902 fue evaluado sobre la extracción del aceite de soya (Agrawal *et al.* 1997). En condiciones óptimas, el contenido de aceite de soya extraíble (24.9 % en base seca) y el porcentaje de recuperación del aceite de soya (99 %), después de extraer con hexano durante 15 h las hojuelas de soya hidrolizadas, fueron altos comparados con el obtenido a partir de las hojuelas no tratadas enzimáticamente, donde el máximo contenido de aceite extraíble fue de 22.9 % y el porcentaje de aceite recuperado fue de 82.2 % después de someter por 27 h a extracción con hexano las hojuelas no hidrolizadas. Los autores concluyeron que la hidrólisis enzimática de las hojuelas de soya no sólo provocó un incremento en el contenido de aceite extraído; sino aumentó la velocidad de extracción del aceite, de tal manera que el tiempo de extracción del aceite de soya se redujo hasta un 44.4 %.

Otra investigación sobre la extracción acuosa enzimática de aceite fue realizada por Sarker *et al.* (1999). Ellos 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, de cacahuete y de girasol. El porcentaje de aceite extraído se incrementó con el tratamiento enzimático de las semillas oleaginosas y dependió de las condiciones de predigestión (contenido de humedad de la semilla, concentración de enzima y tiempo de hidrólisis enzimática). Los niveles de porcentaje de aceite extraído fueron de 51.4 a 56.7 % para el aceite de ajonjolí, de 51.0 a 53.2 % en el caso del aceite de cacahuete y de 55.3 a 57.1 %

para el aceite de las semillas de girasol, que correspondió a un incremento en el rendimiento de aceite extraído de 0.2 a 5.5 % en ajonjolí, de 1.1 a 3.3 % en cacahuate y de 0.4 a 2.2 % en las semillas de girasol comparando con su tratamiento testigo (muestras no hidrolizadas). El efecto benéfico de la predigestión enzimática de las semillas sobre la extracción del aceite fue atribuido a la mezcla de actividades enzimáticas presentes en la enzima, principalmente a la acción de las carbohidrasas y de las proteasas. Por un lado, las carbohidrasas degradan los polisacáridos que constituyen la pared celular de los vegetales y los lipopolisacáridos y de esta forma facilitan la extracción y la recuperación del aceite. Por otro lado, las proteasas actuaron sobre las moléculas de lipoproteínas degradándolas a moléculas simples, de tal manera que se libera el aceite extra, ya que queda más accesible el aceite para su extracción. Según los autores, una consecuencia importante de la predigestión enzimática de las semillas oleaginosas fue la reducción de la rancidez del aceite, debido a que durante la extracción enzimática puede liberarse compuestos antioxidantes a través de la membrana semipermeable, los cuales impiden la oxidación del aceite.

El efecto de diferentes preparados enzimáticos sobre la extracción del aceite de soya ha sido también estudiado por Sosulski *et al.* (2000). Los preparados enzimáticos comerciales que utilizaron fueron Celluclast 150L de *Trichoderma reesei* (Novo Nordisk), Econase de *Trichoderma longibrachiantum* (Alco/EDC) y Cytolase CL de *Trichoderma longibrachiantum* (Genencor), todos con actividad celulasa Driselase de Basidomicetos (Kyowa Hakko), con actividad enzimática mixta (proteasa, celulasa y pectinasa) y una proteasa fungica de *Aspergillus oryzae* (Biocon U.S.). Los porcentajes de aceite extraído, de acuerdo al tratamiento al que sometieron las hojuelas de soya, fueron: testigo 56.0 ± 0.2 %, Celluclast 150-L 59.0 ± 0.9 %, Econase 58.8 ± 0.4 %, Cytolase CL 45.1 ± 0.5 %, Driselase 84.3 ± 0.3 % y proteasa fúngica 73.8 ± 0.4 %. La razón por lo cual, las hojuelas de soya tratadas con los preparados enzimáticos Driselase y proteasa fúngica presentaron el mayor porcentaje de aceite extraído fue atribuida a la

actividad proteasa presente en los preparados enzimáticos, ya que fue la responsable de hidrolizar las proteínas, principal constituyente presente en la soya (39.0 ± 0.2 % en base húmeda). Por otra parte, la predigestión sólo de la celulosa con los preparados enzimáticos Celluclast 150L, Econase y Cytolase CL impidió una notable extracción del aceite debido al bajo contenido de celulosa de la soya (13.0 ± 0.4 % en base húmeda). Sin embargo, mediante la acción combinada de las enzimas proteasa, celulasa y pectinasa presente en el preparado comercial Driselase fue posible obtener el mayor porcentaje de aceite extraído 84.3 ± 0.3 %. En la base a estos resultados, los autores concluyeron que la extracción de aceite de soya pudo incrementarse mediante la hidrólisis enzimática de la soya pero la efectividad del proceso de extracción dependerá de la composición química del sustrato utilizado.

Garrido *et al.* (2001) estudiaron la influencia de la adición de una mezcla de dos preparados enzimáticos: Olivex, un complejo con actividad pectolítica, celulasa y hemicelulasa, y Glucanex con actividad glucosidasa principalmente, ambos proporcionados por Novo Nordisk; sobre la extracción de aceite de oliva y sobre la composición de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. La adición de la mezcla enzimática, Olivex y Glucanex (en proporción 1:1 y una concentración enzimática final de 0.5 g/kg) a la pasta de olivo, presentó un efecto marcado sobre el contenido de compuestos fenólicos en el aceite de oliva, en particular en la cantidad de ortodifenoles producidos 319.2 ± 5.0 mg/kg de pasta tratada comparado con el valor obtenido en el tratamiento testigo 188.7 ± 12.6 mg/kg de pasta no tratada. Por otra parte, la concentración de no-ortodifenoles fue de 190.2 ± 2.1 mg/kg de pasta tratada; mientras que, en el tratamiento testigo fue de 181.4 ± 11.1 mg/kg de pasta no tratada. De estos resultados, los autores concluyeron que el efecto positivo de los preparados enzimáticos estudiados es atribuido a la capacidad de las enzimas en degradar los componentes de la pared celular del olivo, lo cual facilitó y mejoró la extracción de los compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos son importantes por sus propiedades nutricionales. Además, las enzimas

probablemente cambian la textura de la pasta previniendo las reacciones de oxidación que ocurren en el proceso de extracción tradicional, donde los compuestos fenólicos, particularmente los ortodifenoles, disminuyen su concentración en el aceite. Así, la estabilidad Rancimat de los aceites fue de 47.6 h en la muestra tratada con la mezcla enzimática; mientras que, en la muestra testigo fue de 40.1 h.

En la extracción acuosa enzimática del aceite de salvado de arroz, la selección apropiada del preparado enzimático y la optimización de las condiciones de extracción resultó benéfico para mejorar la recuperación del aceite de arroz (Khare *et al.* 2001). Los preparados enzimáticos comerciales sujetos a estudio en ésta investigación fueron: Protizyme™ de *Aspergillus flavus* con actividad proteasa adquirida de Jaysons Agritech Pvt. Ltd. (Mysore, India), Palkodex™ de *Aspergillus niger* con actividad α -amilasa adquirida de Maps India Ltd. (Ahmedabad, India) y Celulasa de *Aspergillus niger* con actividad celulolítica adquirida de Central Drug House (Delhi, India). El porcentaje de aceite que obtuvieron en los diferentes tratamientos enzimáticos fue: Celulasa 4.0 % (w/w), Protizyme 6.0 % (w/w), Celulasa - Protizyme 11.0 % (w/w), y Palkodex - Celulasa - Protizyme 67.0 % (w/w). Por lo tanto, estos resultados indicaron que para obtener un mayor porcentaje de aceite, es necesario el efecto sinérgico que presenta la combinación de las actividades enzimáticas de los preparados Palkodex, Celulasa y Protizyme, debido por un lado, a que la pared celular de las semillas oleaginosas está compuesta de celulosa, hemicelulosa y pectina. Por otro lado, las células de cotiledón de las semillas oleaginosas presentan organelos celulares conocidos como cuerpos de lípidos y de proteína que contienen parte del aceite extra y proteína del grano. Estos componentes de la pared celular son degradados por las hidrolasas tales como las celulasas, hemicelulasas y pectinasas; mientras que, los cuerpos de lípidos se encuentran cubiertos por una capa de lipoproteína, de tal manera que las proteasas permeabilizan la membrana del liposoma y facilitan la extracción y la liberación del aceite extra encerrado dentro de estos organelos (Rosenthal *et al.* 1996). Las condiciones óptimas de extracción del aceite con la mezcla enzimática de Palkodex -

Celulasa - Protizyme, en una proporción de 80, 380 y 368 U/10 g de salvado de arroz respectivamente, fueron pH 7.0 y un tiempo de incubación de 18 h, alcanzándose un máximo porcentaje de aceite liberado de 76.0 % (w/w).

Extracción de colorantes. La extracción de colorantes es otra aplicación atribuida a algunos preparados enzimáticos. Específicamente de la luteína a partir de las flores de caléndula (Delgado-Vargas & Paredes-López 1997). Cinco preparados comerciales con actividades mixtas principalmente celulasa, hemicelulasa y pectinasa fueron utilizados en este estudio: Econasa-Cep y Pectinasa-Cep suministradas por Enzyme Development Corp.; Cytolasa-0 y Cytolasa-M129 obtenidas de Genencor Internacional (Rochester, NY) y Rapidasa-Press de Gist Brocades (Seelin, Francia). El tratamiento de las flores de caléndula con cualquiera de éstos preparados enzimáticos permitió una mayor extracción de la luteína, comparado con el tratamiento testigo (sin enzima). Excepto con Rapidasa-Press, la cual no degradó las flores de caléndula en las condiciones estudiadas. El preparado comercial Econasa-Cep, que presentaba también actividad β -glucosidasa, fue el que provocó un mayor rendimiento en la extracción del carotenoide, a una concentración de 0.1 % w/w y un tiempo de incubación de 120 h, incrementando el contenido de luteína extraída de la caléndula de 1.7 a 7.4 g/kg en base seca.

El tratamiento enzimático es una alternativa viable para mejorar la producción de xantófilas extraídas de los pétalos de caléndula (Navarrete-Bolaños *et al.* 2005). El porcentaje obtenido de xantófilas representó un incremento del 53.9 % superior con respecto a la cantidad obtenida con el proceso comercial, debido a que la reacción enzimática conduce a la degradación de los componentes de la pared celular (principalmente celulosa y hemicelulosa), lo que provoca un incremento en la permeabilidad de las células que mejora la transferencia de masa de los componentes hidrosolubles presentes en el tejido de las flores de la caléndula hacia la fase líquida (extracto enzimático).

Extracción de antioxidantes. Otros investigadores han demostrado que ciertos preparados enzimáticos con actividades mixtas

también son factibles sobre la liberación de compuestos antioxidantes fenólicos (Meyer *et al.* 1998). Los resultados de estas investigaciones han mostrado, por ejemplo, que el preparado enzimático comercial Grindamyl pectinasa, con actividad mixta principalmente pectinasa, pero también celulasa y hemicelulasa, producido por *Aspergillus niger* (Danisco Ingredients), no sólo fue efectivo al aumentar la extracción de los fenoles debido a la degradación de los polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) que constituyen la pared celular de la cáscara de uva, sino que mejoró también la actividad antioxidante de los extractos fenólicos, ya que la oxidación de las lipoproteínas se retrasó por un mayor tiempo (62 min) comparado con el tratamiento sin enzima (47 min), lo cual fue atribuido a la liberación selectiva de los fenoles antioxidantes o a la conversión de los glucósidos fenólicos en compuestos antioxidantes potentes, por la presencia de otras actividades en el preparado enzimático.

CONCLUSIONES

La degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular de los vegetales juega un papel importante en la extracción de los compuestos presentes en los vegetales y frutas, porque los preparados enzimáticos, al degradar los polisacáridos presentes en el tejido, incrementan la formación de los poros, el tamaño del poro y la porosidad total del sustrato lo que permite una mejor difusión del solvente a través del tejido de las frutas o vegetales dando como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos. Pero la aplicación de algunos preparados enzimáticos no está limitado a facilitar la liberación de los componentes alimenticios, o a mejorar la eficiencia del proceso y el rendimiento de la

extracción, sino también la acción de las enzimas presenta un impacto importante sobre el aspecto nutricional, la calidad y la estabilidad de los productos extraídos.

Para obtener la máxima efectividad de un proceso de extracción acuoso enzimático se requiere de un estudio detallado por dos razones: Primero, la selección adecuada del preparado enzimático depende fuertemente de la naturaleza química del sustrato, debido a que las enzimas catalizan reacciones específicas. Segundo, el grado de hidrólisis y la efectividad del proceso está influido por las condiciones de reacción (pH, temperatura, concentración de enzima, concentración de sustrato, tiempo de reacción). Por lo tanto, la optimización de las condiciones del proceso es necesaria.

Dada la demanda creciente de los preparados enzimáticos por su efectividad en los procesos de extracción de productos alimenticios, un aspecto crucial el cual no ha sido explorado a profundidad pero que; sin embargo, es imprescindible para que tenga un impacto mayor el uso de enzimas en la biotecnología, es la economía de la extracción acuosa asistida con enzima comparado con la extracción con solventes. Al respecto es importante considerar, que una alternativa es el uso de enzimas inmovilizadas que pueden ser reutilizadas en varios procesos para reducir el costo general del proceso de extracción. Además, los resultados benéficos de la potencialidad de los preparados enzimáticos sobre la extracción de compuestos en la industria alimentaria da la pauta para que en futuras investigaciones y a corto plazo, el uso de preparados enzimáticos resulte ser una alternativa promisoría en la extracción de productos farmacéuticos y de metabolitos a partir de materias primas vegetales.

LITERATURA CITADA

- Agrawal YC, Kashyap MC, Sarkar BC, Singh BPN (1997) Response surface analysis of enzyme aided extraction of soybean. *Journal of Food Science and Technology*. 34: 386-390.
- Bataille PF, Toussaint P (1985) The effect of pretreatment on the enzymic hydrolysis of cellulosic industrial waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 35B: 205-215.
- Beguin P, Aubert JP (1993) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: 25-58.

- Beldman G, Voragen AGJ, Rombouts FM, Pilnik W (1988) Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*. 31: 173-178.
- Ben-Ghedalia D, Miron J (1981) The effect of combined chemical and enzyme treatments on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering*. XXIII: 823-831.
- Bhat MK, Bhat S (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 15: 583-601.
- Bhat MK (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18: 355-383.
- Chauhan AS, Afroze SG, Ramesh MNR, Avula RY, Rekha MN, Ramteke RS (2004) Optimization of enzymatic liquefaction of papaya (*Carica papaya* L.) and jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) pulp using response surface methodology. *Food, Agriculture and Environment*. 2: 108-113.
- Chou TYC, Chang MM, Tsao GT (1981) Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. *Advances in Biochemical Engineering*. 20: 16-42.
- Das K, Solehah A, Balaumani VT, Amiza MA (1994) Enzymes for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice. *Journal of Food Science and Technology*. 31: 508-510.
- Delgado-Vargas F, Paredes-López O (1997) Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagetes erecta*). *Food Chemistry*. 58: 255-258.
- Dinnella C, Lanzarini G, Monteleone E (1998) Enzymatic carrot tissue maceration: optimization by response surface analysis. *Sciences Des Aliments*. 18: 497-505.
- Dongowski G, Sembries S, Bauckhage K, Will F, Dietrich H (2002) Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. *Nahrung/Food*. 46: 105-111.
- Dos-Mohd AM, Islam MN, Noor BM (2001) Enzymic extraction of native starch from sago (*Metroxylon sagu*) waste residue. *Starch/Stärke*. 53: 639-643.
- Eriksson KE, Wood TM (1985) Biodegradation of cellulose: biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi T (ed). Academic Press, New York. 469-503 pp.
- Fan LT, Lee YH, Gharpuray MM (1982) The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*. 23: 158-187.
- Forsberg CW, Groleau D (1982) Stability of the endo- β -1,4-glucanase and β -1,4-glucosidase from *Bacteroides succinogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*. 28: 144-148.
- Freitas SP, Lago RCA, Jablonka FH, Hartman L (1993) Extraction aqueuse enzymatique de l'huile d'avocat á partir de la pulpe fraiche. *Revue Francaise des Corps Gras*. 2: 365-371.
- Garrido A, García A, Brenes M, Moyano MJ, Alba J, García P (2001) Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation. *Journal of Food Engineering*. 48: 189-194.
- Hahn-Hägerdal B, Palmqvist E (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74: 25-33.
- Khare SK, Sharma A, Gupta MN (2001) Enzyme-assisted aqueous extraction of rice bran oil. *Journal of American Oil Chemical Society*. 78: 949-951.
- Ladisich MR, Lin KW, Voloch M, Tsao GT (1983) Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 5: 82-102.
- Lamed R, Bayer EA (1988) The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Advances in Applied Microbiology*. 33: 1-46.
- Lee J (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56: 1-24. Lee *et al.* 2005
- Lee CH, Kim DH, Kim JH, Bae SE, Seo JH, Oh TK (2005) Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 2541-2545.
- Ljungdahl LG, Eriksson KE (1985) Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbiology and Ecology*. 8: 237-299.
- Mandels M (1985) Applications of cellulases. *Biochemical Society Trans*. 13: 414-415.

- Marsden WL, Gray PP (1986) Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*. 3: 235-274.
- Meyer AS, Jepsen SM, Sorensen NS (1998) Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2439-2446.
- Navarrete-Bolaños JL, Rangel-Cruz CL, Jiménez-Islas H, Botello-Alvarez E, Rico-Martínez R (2005) Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Research International*. 38: 159-165.
- Philippidis GP, Smith TK (1995) Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 51/52: 117-124.
- Rastogi NK, Rajesh G, Shamala TR (1998) Optimization of enzymatic degradation of coconut residue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 129-134.
- Rosenthal A, Pyle DL, Niranjana K (1996) Aqueous enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 402-420.
- Ryu DDY, Mandels M (1980) Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 2: 91-102.
- Sarker BC, Singh RK, Kumbhar BK, Agrawal YC, Kulshreshtha MK (1999) Response surface analysis of enzyme assisted oil extraction factors for sesame, groundnut and sunflower seeds. *Journal of Food Science and Technology*. 36: 511-514.
- Sosulski K, Bargale PC, Sosulski FW (2000) Enzymatic Hydrolysis of soybean for solvent and mechanical oil extraction. *Journal of Food Process Engineering*. 23: 321-327.
- Sreenath HK, Nanjundaswamy AM, Sreekantiah KR (1987) Effect of various cellulases and pectinases on viscosity reduction of mango pulp. *Journal of Food Science*. 52: 230-321.
- Sreenath HK, Sudarshana KR, Santhanam K (1995) Enzymatic liquefaction of some varieties of mango pulp. *Journal of Food Science*. 28: 196-200.
- Sugden C, Bhat MK (1994) Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10: 444-451.
- Vora HM, Kyle WSA, Small DM (1999) Effect of enzyme treatment of carrot pulp on juice yield and quality. *Food Australia*. 51: 146-147.