



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA E
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
QUÍMICA



**“INFLUENCIA DEL *ASPERGILLUS NIGER* EN EL RENDIMIENTO DEL
PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SALVADO DE ARROZ
MEDIANTE EL MÉTODO SOXHLET”**

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTADO POR:
Bach. CARLOS CRISTIAN JOSÉ GIL ACEDO
Bach. YANPIER LUIGGY GUTIÉRREZ COTRINA

ASESOR
MSc. ARCE CRUZADO CARLOS REINERIO

LAMBAYEQUE – PERU

2018

**“INFLUENCIA DEL *ASPERGILLUS NIGER* EN EL RENDIMIENTO DEL
PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SALVADO DE ARROZ
MEDIANTE EL MÉTODO SOXHLET”**

TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO

APROBADO POR:

Dra. CABRERA SALAZAR TARCILA

JURADO PRESIDENTE

MSc. VARGAS LINDO RUBÉN

JURADO SECRETARIO

MSc. HUANGAL SCHEINER SEBASTIAN

JURADO VOCAL

MSc. CARLOS REINERIO ARCE CRUZADO

ASESOR

DEDICATORIA

A nuestros padres:

*Gil Samillán Carlos Segundo
Acedo Rivas María Angélica*

y

*Gutiérrez Alarcón Tomás Adriano
Cotrina Cabrera Rita*

A nuestra familia y docentes.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darnos vida y salud para poder culminar este proyecto de investigación.

Agradecemos a nuestros padres, ya que ellos son el motivo de nuestros esfuerzos y objetivos.

Al Técnico de laboratorio Don Floriano Saucedo por su apoyo incondicional que siempre nos brindó.

A nuestro asesor el Ing. Carlos Arce Cruzado, por su colaboración en el desarrollo y la culminación de esta tesis.

A todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la realización del presente trabajo de Tesis.

ÍNDICE

	PÁG.
I. FUNDAMENTO TEORICO	01
1. ANTECEDENTES DE ESTUDIO	01
2. ACEITE VEGETAL	03
3. ARROZ	05
4. SALVADO DE ARROZ	08
5. MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET	12
6. DISOLVENTE ORGÁNICO	12
7. <i>Aspergillus niger</i>	13
II. MATERIALES Y METODOS	14
1. MATERIAL DE ORIGEN BIOLÓGICO	14
2. MATERIAL DE LABORATORIO	14
3. EQUIPOS	14
4. REACTIVOS	15
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	15
6. MÉTODOS	16
III. RESULTADOS	20
1. TRATAMIENTOS	20
2. TRATAMIENTOS CON TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE 4 HRS	21
3. TRATAMIENTOS CON TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE 6 HRS	22
4. TRATAMIENTOS CON TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE 8 HRS	23
5. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	24
IV. DISCUSIÓN	28
V. CONCLUSIONES	29
VI. RECOMENDACIONES	30
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
VIII. ANEXOS	37
ANEXO A – OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Aspergillus niger</i> CON MEJOR ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA.....	37
ANEXO B – TÉCNICA PARA EL CONTEO DE ESPORAS	46
ANEXO C – DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACEITE	47
ANEXO D – IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO	53

RESUMEN

Los procesos microbiológicos en la industria química han adquirido mucha importancia debido al aumento de rendimientos y la considerable reducción del impacto ambiental que conlleva su uso. Es así que el objetivo principal de la presente investigación fue evaluar la influencia de la adición del microorganismo *Aspergillus niger* y el tiempo de extracción en el rendimiento del proceso de extracción de aceite de salvado de arroz mediante el método soxhlet. En primer lugar, se tuvo que hacer una caracterización del *Aspergillus niger* para seleccionar al microorganismo con las mejores propiedades lignocelulolíticas. Luego se hizo un pretratamiento al salvado de arroz, donde se incorporaron en cada tratamiento diferentes porcentajes (0%, 1%, 2%, 3%) de un inóculo que se preparó con 2 millones de esporas por mililitro, lo que hará que el aceite contenido dentro de las paredes celulares del salvado quede más expuesto. Finalmente se usó el método soxhlet con distintas horas de extracción (4, 6, 8) para cada tratamiento teniendo en cuenta un volumen de solvente constante (188 ml). Se concluyó que la incorporación de *Aspergillus niger* y el tiempo de extracción sí afectan en el rendimiento del proceso de extracción de aceite, incrementándolo notoriamente, llegándose a obtener un rendimiento medio de extracción de aceite crudo de 24,7% b.s. Siendo 3% (v/v) de inóculo y 8 horas de extracción continua los mejores parámetros de trabajo.

ABSTRACT

The microbiological processes are very important in the chemical industry due to the increase of yield and the considerable reduction of the environmental impact that their use implies. Thus, the main objective of the present investigation was to evaluate the influence of the addition of *Aspergillus niger* and the extraction time on the yield of the rice bran oil extraction process by soxhlet method. First, it is necessary to have a characterization of *Aspergillus niger* to select the microorganism with the best lignocellulolytic properties. Then a pre-treatment was made to the rice bran, where different percentages (0%, 1%, 2%, 3%) of an inoculum prepared with 2 million spores per milliliter were incorporated in each trial, which makes the oil content inside the cells of bran more exposed. Finally, the soxhlet method was used with different extraction times (4, 6, 8) for each assay taking into account a constant solvent volume (188 ml). It was concluded that the incorporation of *Aspergillus niger* does affect the efficiency of oil extraction process, increasing it markedly, reaching a crude oil extraction yield of 24,7% b.s. Being 3% (v/v) and 8 hours of continuous extraction the best parameters.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, a nivel mundial, la demanda de aceites es muy elevada y variada, según la materia prima a utilizar; ya sea en la cocina diaria, para un uso cosmético o en la obtención de biodiesel.

A nivel nacional, se encontró que para el año 2014, la producción de aceites vegetales comestibles fue de 270,300 TM (Diario GESTIÓN, 2014), dejando un mercado ampliamente abierto a los futuros productores e inversionistas; todo esto sin contar la producción de aceites vegetales dedicado al rubro cosmético.

En el norte peruano, haciendo un análisis de lo planteado previamente, se puede ingresar exitosamente al rubro aceitero, mediante el uso del subproducto (Salvado de arroz) de la *Oryza sativa*, lo que comúnmente se conoce como arroz; todo esto gracias a la vastedad de su cultivo. Según el MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO, su cultivo a nivel norte abarca los 272,6 miles de hectáreas, representando el 82,13 % de siembra a nivel nacional, todo esto de Agosto 2014 – Marzo 2015.

La industria Molinera, brinda datos bastante prometedores, teniendo así que el porcentaje de salvado de arroz obtenido del arroz cáscara, representa un 10%; del cual el 22% representa la cantidad de aceite del mismo.

Actualmente existen diversos métodos de extracción de aceite vegetal, entre los cuales se destaca el método por prensado y el método por solventes; e incluso una combinación de los mismos, con el fin de lograr un mayor rendimiento de extracción. La problemática radica siempre en la búsqueda de mejores resultados; ante todo esto existe una novedosa estrategia para la extracción de aceite, adicionando un pretratamiento con el uso de enzimas lignocelulolíticas.

En el Perú, Infantes (2014), en su trabajo “*Evaluación del tratamiento enzimático para la extracción mecánica del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (Passiflora edulis var. Flavicarpa Degener)*”, hace uso de este método para maximizar el rendimiento previo a la extracción con prensa hidráulica para obtener aceite de las semillas de maracuyá; logrando alcanzar un rendimiento experimental de 20,19 % (b.s.) a comparación del rendimiento obtenido con una extracción convencional (sin aplicación de enzimas) fue de 11,87 % (b.s.).

El método enzimático brindará un mejor rendimiento de extracción; además de no contaminar el medio ambiente ya que no produce componentes volátiles, el aceite obtenido conserva su composición y mantiene sus propiedades, sin embargo, existen las desventajas de que son costosas y no siempre son comercialmente disponibles, justificando así el estudio de un nuevo método de extracción mediante la incorporación de un microorganismo productor de estas enzimas (*Aspergillus niger*).

El objetivo general del presente trabajo es evaluar la influencia de la adición de “*Aspergillus niger*” y el tiempo en el rendimiento del proceso de extracción continua de aceite de salvado de arroz. Como objetivos específicos se busca obtener y caracterizar el microorganismo utilizado para el tratamiento enzimático; establecer una nueva metodología para la extracción de aceite con la incorporación de un microorganismo y determinar las mejores condiciones del proceso.

I. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES DE ESTUDIO

No se han encontrado investigaciones sobre la adición de *Aspergillus niger*, como un tratamiento previo a la extracción de aceite; por esta razón se tomó como base de estudios, a los trabajos que usaron enzimas comerciales, dado que nuestro microorganismo será productora de estas mismas.

– Córdova, G, & Núñez A. (2015) en su trabajo *Determinación del perfil de ácidos grasos de un aceite extraído de la semilla de Vitis vinífera (uva negra criolla)* realizaron el método de extracción de aceites por prensado en frío, haciendo un previo tratamiento enzimático, en el cual aplicaron la enzima celulasa, obteniendo rendimientos del 60% para un tiempo de estudio de 24 horas; además concluyendo que la especie *Vitis vinífera* (uva negra criolla) contiene 12,32 y 18,12% de lípidos, presentando un alto porcentaje de ácidos poliinsaturados; siendo los más abundantes el ácido oleico y ácido linoleico; con porcentajes obtenidos de 17.36% y 68.75% respectivamente.

– Infantes, M. R. (2014) en su *Evaluación del tratamiento enzimático para la extracción mecánica del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (Passiflora edulis var, Flavicarpa Degener)* aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para maximizar el rendimiento, empleando un tratamiento enzimático, previo a la extracción con prensa hidráulica, para obtener aceite de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*).

Concluyó que los niveles óptimos fueron: concentración de enzima=1,95%, Relación MP: agua = 5,68:1 y Tiempo de hidrólisis = 22,8 horas; con los que lograron alcanzar un rendimiento experimental de $20,19 \pm 0,40$ % (b.s.) en comparación del rendimiento obtenido con una extracción convencional (sin aplicación de enzimas) de 11,87 % (p/p) (b.s.).

– Ciau-Solís, Gabriel Rosado-Rubio, Luis Chel Guerrero, David Betancur-Ancona (2016) en su investigación de la Aplicación de métodos enzimáticos para la extracción de aceite de chía (*Salvia hispánica* L) realizaron una extracción enzimática, tratando harina integral y harina desgomada de chía a diferentes condiciones de concentración de enzima, pH y temperatura. Las enzimas comerciales que emplearon fueron Viscozyme LMR (endo-1,3(4) betaglucanasa) derivada de *Aspergillus aculeatus*, con 100 FBG/g (Unidad Beta Glucanasa Fungal) y Neutralse 0.8LMR, proteasa neutra con actividad declarada de 0.8 UA-NH/g, derivada de *Bacillus amyloliquefaciens*; concluyendo que la extracción de aceite utilizando métodos enzimáticos no es un método viable ni aplicable para la semilla de chía.

1.2. BASE TEÓRICA

1.2.1. ACEITE VEGETAL

El aceite vegetal es un compuesto orgánico obtenido a partir de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía. Como todas las grasas está constituido por glicerina y tres ácidos grasos.

Cuadro 1

Perú - Producción Nacional de Aceites y Grasas Alimenticias (TM)

AÑO	ACEITES Y GRASAS						
	ACEITES Y GRASAS	ACEITES			GRASAS		
		ACEITES	Vegetal	Compuesto	GRASAS	Manteca	Margarina
1996	233,816	152,977	61,381	91,596	80,839	62,661	18,178
1997	235,238	157,142	66,422	90,720	78,096	60,212	17,884
1998	228,646	152,511	75,236	77,275	76,135	59,454	16,681
1999	239,334	168,300	77,569	90,731	71,034	53,786	17,248
2000	234,157	164,880	76,719	88,161	69,277	53,828	15,449
2001	233,889	163,385	80,765	82,620	70,504	56,207	14,297
2002	237,934	173,867	139,216	34,651	64,066	50,904	13,162
2003	245,659	188,016	146,321	41,695	57,644	47,320	10,324
2004	246,810	184,766	143,339	41,427	62,044	50,613	11,432
2005	253,639	186,694	171,069	15,625	66,945	50,751	16,194
2006	270,401	202,004	202,004		68,397	51,948	16,449
2007	282,709	204,227	204,227		78,482	62,054	16,428
2008	265,908	188,145	188,145		77,763	61,027	16,736
2009	285,319	204,996	204,996		80,322	62,206	18,116
2010	337,258	240,562	240,562		96,697	74,777	21,919
2011	268,855	186,706	186,706		82,148	63,840	18,309
2012	344,162	248,373	248,373		95,789	76,176	19,613
2013	352,985	256,910	256,910		96,075	76,786	19,289
2014p	361,953	262,808	262,808		99,145	80,972	18,172
2015*	250,748	182,761	182,761		67,988	53,879	14,109

Nota. Tomado del Ministerio de Agricultura y Riego - DGSEP -DE - Boletín Estadístico Agroindustrial: 1996 - 2015*. MINAGRI - DGPA – DEEIA

a) USOS DE LOS ACEITES

1. Industriales

Estos aceites por su poder secante poseen valor industrial por ser aptos para producir capas protectoras, debido a la posibilidad de secarse después de su aplicación como películas bien adheridas y resistentes. Tales son el caso del aceite de lino, ricino y tung.

2. Comestibles

Los aceites vegetales comestibles, son los que son aptos para su uso alimenticio; jugando un papel importante en la fijación del calcio, caroteno, tiamina, lactosa y con sus vitaminas A, D, y K, contribuyendo a proveer parcialmente a las necesidades de la alimentación humana.

Cuadro 2

Tabla de Contenido Nutricional de Aceites y Alimentos Ricos en grasas por 100 gr.

Aceite vegetal/ Alimento	Calorías (Kcal)	Grasas totales (g.)	Grasas saturadas (g.)	Grasas insaturadas			
				Monoinsaturadas (g.)	Poliinsaturadas (g.)		
					Totales	Omega 6	Omega 3
Aceite de girasol alto oleico	900	100	9,7	83,5	4	3,6	0,4
Aceite de oliva	900	100	13,5	73	8,4	7,9	0,6
Aceite de cacahuete	900	100	17	46	32	32	0
Aceite de sésamo	900	100	14,2	40	41,6	41,3	0,3
Aceite de maíz	900	100	14	30	51,3	50,3	1
Aceite de soya	900	100	14,4	23	58	51	6,8
Aceite de girasol	900	100	12	20	63,3	63,2	0,1
Avellanas, fruto	661	61,6	4 (7% respecto total de grasas del alimento)	46 (74%)	8,6 (14%)	8,5	0,11
Aguacate, fruto	161	16	2,4 (15%)	9,6 (60%)	1,9 (11%)	1,8	0,11
Almendras, fruto	610	54	4 (8%)	33 (60%)	13 (24%)	12,6	0,4
Nuez, fruto	649	62,5	6,8 (10%)	10,9 (18%)	41,7 (66%)	10,8	34,2

Nota. Recuperado de Botanical – Online.

Se desea que el aceite sea rico en grasas monoinsaturadas porque son más estables y no generan tantos radicales libres como las grasas poliinsaturadas.

3. Fines diversos

Se los utiliza en preparación de cosméticos, jabones, detergentes, etc., tales como por ejemplo los aceites de coco, jojoba, palma, entre otros.

El aceite vegetal también se puede utilizar como combustible(biodiésel) en vehículos híbridos o adaptados.

b) OBTENCIÓN

Mecánicos: trituración y prensado (en frío o en caliente) con el fin de romper las células vegetales, extraer el aceite y luego aislarlo de los otros componentes de las semillas o los frutos.

Químicos: extracción del aceite mediante solventes. Los solventes se eliminan del producto final por evaporación. Mediante el refinado se eliminan las impurezas que se forman durante la extracción y así se suaviza el sabor del aceite. Durante la refinación se pierden sustancias que protegen al aceite de la oxidación. Por eso, para la conservación del aceite se agregan sustancias antioxidantes permitidas.

1.2.2. ARROZ

El arroz se define como una gramínea anual de tallos redondos y huecos compuestos de nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas a los tallos por la vaina y su inflorescencia es una panícula (Tinoco y Acuña, 2009, p. 10)

Cuadro 3*Taxonomía del arroz.*

Clase	Monocotiledónea
Orden	Glumifora
Familia	Poaceae
Subfamilia	Panicoideas
Tribu	Oryzae
Subtribu	Oryzineas
Género	Oryza
Especie	Sativa

Nota. Tomado del Manual de Recomendaciones Técnicas- CULTIVO DE ARROZ (*Oryza sativa*): 2009.

a) EN EL PERÚ

En el Perú el arroz es el cultivo con mayor área instalada, actualmente ocupando importantes extensiones de los valles del norte y de la ceja de selva (Vásquez, 2015).

Socialmente ocupa 28 millones de jornales desde la siembra hasta la cosecha y constituye el 10% del valor bruto de la producción agropecuaria. Es un cereal de gran importancia en la alimentación diaria del poblador peruano (el consumo anual de este grano es de aproximadamente 60 Kg por persona) (Vásquez, 2015).

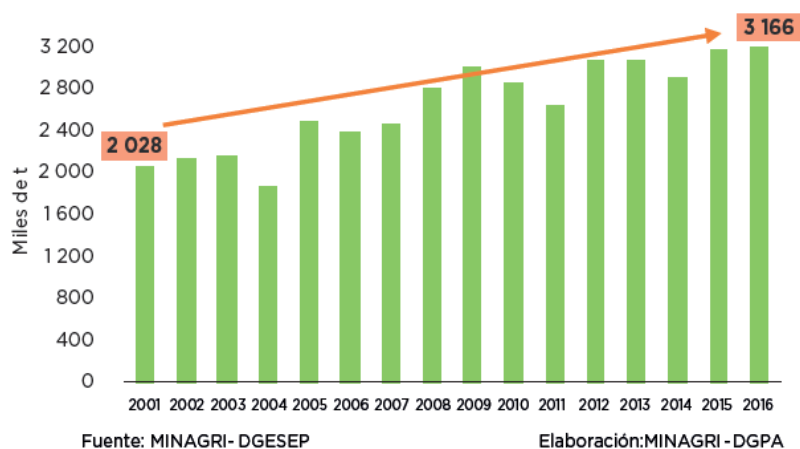


Figura 1: Producción Nacional de arroz en cáscara (2001-2016) (TM). Tomado del Ministerio de Agricultura y Riego - DGSEP -DE - Boletín INFORME DEL ARROZ: Mayo 2017. MINAGRI - DGPA – DEEIA

Cuadro 4

Siembra de arroz cáscara (AGO – MAR 2014 – 2015) (Miles de hectáreas)

REGIÓN	TOTAL
Amazonas	34,8
La Libertad	32,6
Lambayeque	50,7
Piura	59,0
San Martín	60,1

Nota. Tomado del MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO

b) EN LA REGIÓN LAMBAYEQUE

El volumen producido de arroz en la región de Lambayeque ha venido incrementándose ligeramente en el periodo del 2000 al 2015, de 429.6 a 441.4 toneladas, con una tasa de crecimiento promedio anual de 0.18%. En el año 2000, la producción de la región representó al nacional en 22.28% y 14.13% para el año 2015 (Altamirano, 2017, p. 38).

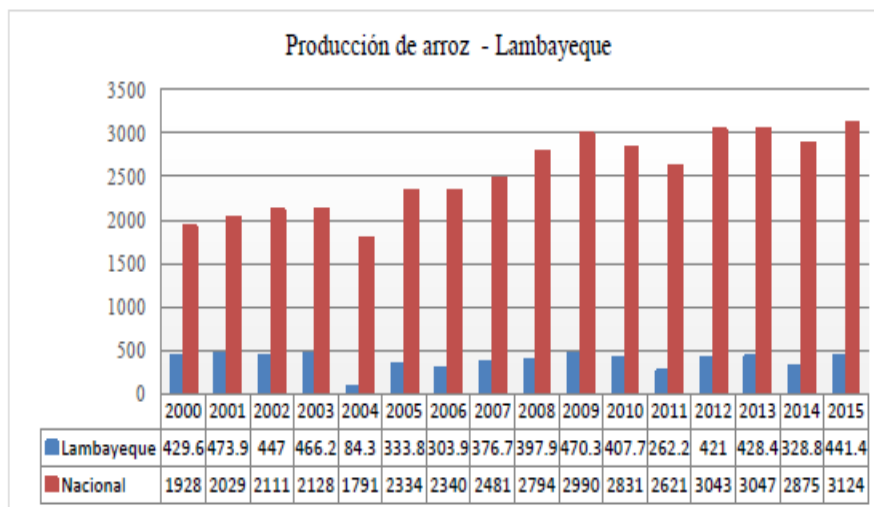


Figura 2: Lambayeque - Producción de arroz en cáscara (2000-2015) (TM). Tomado del Ministerio de Agricultura y Riego - DGSEP -DE - Boletín INFORME DEL ARROZ: Mayo 2017. MINAGRI - DGPA – DEEIA

1.2.3.SALVADO DE ARROZ

El término “salvado de arroz”, se refiere a la cutícula que se encuentra entre el arroz blanco y la cáscara. Se obtiene de raspar el grano en el proceso de blanqueo, quedando harina revuelto con trozos de arroz partido, germen y pedazos de cascarilla. Es aproximadamente el 10% del grano. (Romero y Del Carre Díaz, 2014).

a) OBTENCIÓN

El arroz con cáscara sin limpiar es recibido en una tolva alimentadora para ser pesado en una báscula para luego pasar a un pre limpiado con el fin de retirar sólidos de gran tamaño como piedras, palos, animales y elementos metálicos de gran tamaño que pueden dañar los equipos que siguen el proceso. Después de la limpieza, el arroz es transportado hacia la tolva del descascarillador en donde es dosificada hacia los cilindros en movimiento y donde por un proceso de abrasión entre la cascarilla del paddy y la superficie de caucho de los rodillos, es liberada la capa más externa del arroz (cascarilla), y por el desprendimiento de la misma otros productos como las puntas del grano (picas), y algunos fragmentos de aleurona o salvado.

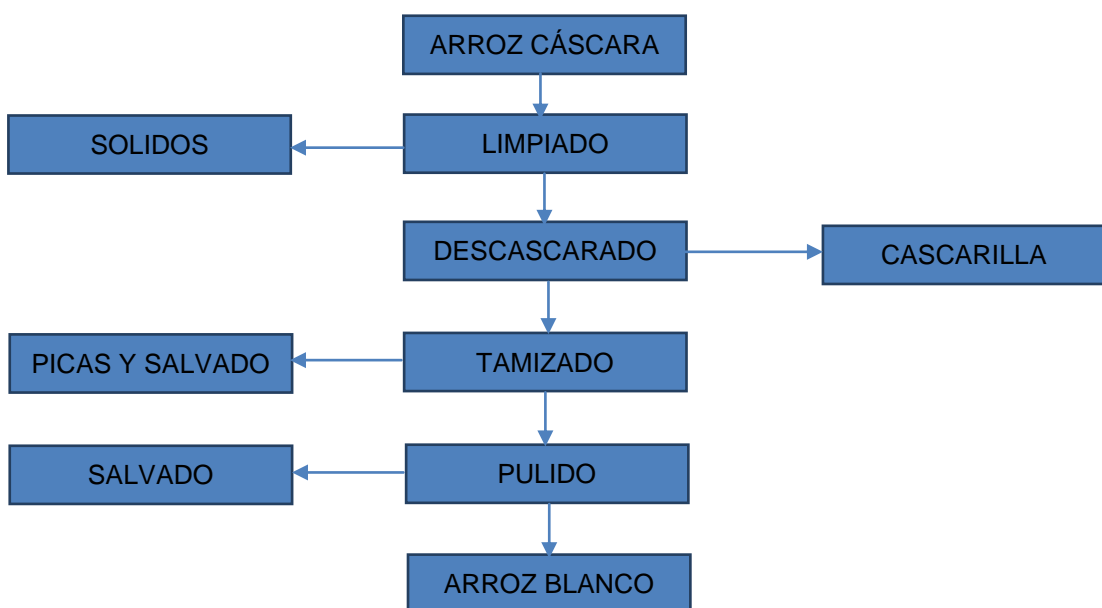
Efectuando una operación de tamizado se separa las partículas más pequeñas (picas y salvado), y después por aspiración la cascarilla retirada gracias a su mayor área de exposición al esfuerzo.

Como producto del descascarado se obtiene tanto arroz paddy como arroz integral siendo separados mediante una mesa densimétrica de la cual se envía el arroz integral hacia los conos de blanqueo que son aparatos que trabajan por fuerza centrífuga, donde, por un lado, es aspirado el salvado y por la parte inferior es evacuado el grano blanco. El número de blanqueadoras dependerá del grado de blancura que se desee en el grano y por ende la cantidad de salvado aumentará.

Pasando este arroz blanqueado al pulidor que funciona bajo el mismo principio del blanqueador, pero cambiando la superficie de contacto rústica por una más suave se da brillo y separa los polvos de salvado.

Luego de todo este proceso se obtienen dos productos principales: arroz blanco listo para la comercialización y las harinas de salvado de arroz.

DIAGRAMA DE FLUJO EN LA INDUSTRIA MOLINERA



Nota. Elaborado por los autores

b) CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-FÍSICA

El Salvado de arroz contiene de 17 a 22% de aceite que puede ser extraído (Franco, 2013), 9,6 a 14,7% de humedad (Hwang et al, 2005), 12 a 16% de proteínas, de 23 a 28% de fibra dietética y de 7 a 10% de cenizas; además presenta un alto contenido de vitaminas del complejo B y E como el alfa-tocoferol, tocotrienoles y gamma-orizanol (Kennedy & Burlingame, 2003; Nicolosi et al., 1993).

c) EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SALVADO DE ARROZ

El método racional de extracción es el que hace uso de los solventes, de entre los cuales el hexano es el que se emplea industrialmente. La extracción de aceite de los salvados y harinas bajas puede ser continua o discontinua. Tanto en uno como en otro caso se basa en el mismo principio y la pérdida de materia grasa no excede del 1 al 1.5%.

i) Extracción discontinua

Las harinas que se hacen ascender hasta lo alto de la instalación caen por gravedad en un recipiente rectangular en el que se las impregna con hexano durante 3 o 4 horas, utilizando 2 Kg. de solvente por kg de harina. Pasado el tiempo que se indica, la mezcla hexano aceite se somete a dos separaciones sucesivas: la primera a presión atmosférica y temperatura de 105°C; la segunda a presión reducida (menor a la presión atmosférica) y a 150° C. Esta separación dura de tres cuartos de hora a una hora; luego el aceite es enfriado a 20°C y filtrado. En cuanto a salvado, desprovisto ya de aceite, se hace secar por métodos industriales. La pérdida de hexano es aproximadamente de 45 l por tonelada de salvado.

ii) Extracción continua

El salvado que llega conducido directamente desde el molino arrocero por un tornillo de Arquímedes, se le hace ascender a la parte superior de una columna en cuyo interior penetra y cae, mientras que el hexano precalentado se introduce por la parte inferior y se eleva en sentido inverso al del salvado. Esta mezcla de hexano y aceite pasa y es extraída de la cima de la columna a una serie de secadores; el hexano sobrante que se extrae es vaporizado en unos secadores y después de condensado se hace decantar; de esta forma se separa el agua del hexano que se vuelve a utilizar.

La mezcla de solvente y aceite se hace pasar a una cubeta en la que se le bombea para dirigirlo a un filtro prensa que permite eliminar las minúsculas partículas de salvado. La mezcla filtrada pasa a otra cuba y de esta a un largo tubo de vaporización calentado al vapor a 110° C; el 95% del solvente vaporizado se separa de la mezcla en un dispositivo especial y después de condensado es introducido nuevamente en el circuito general de aportación del solvente.

El aceite y el solvente que quedan son separados al vacío; el solvente después de recuperado entra de nuevo en el circuito general. El aceite bruto es trasladado del separador a los depósitos de almacenamiento.

El aceite bruto obtenido por uno de estos dos sistemas pasa por un proceso de refinación efectuado en el mismo lugar de su obtención o en alguna instalación especializada. La refinación se efectúa utilizando sosa cáustica y por doble centrifugación se puede eliminar por una parte las ceras y las gomas y por la otra los ácidos grasos libres.

1.2.4. MÉTODO DE EXTRACCIÓN SOXHLET

El método soxhlet es el más utilizado en la extracción sólido-líquido, como ejemplo se pueden citar todas las obtenciones de principios activos de los tejidos vegetales.

Lo que hace el extractor Soxhlet es realizar un sinnúmero de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material.

La extracción Soxhlet se fundamenta en las siguientes etapas (Núñez, 2008, p. 2):

- 1) Colocación del solvente en un balón.
- 2) Ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.
- 3) El condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior.
- 4) Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón.
- 5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente.

1.2.5. DISOLVENTE ORGÁNICO

Son compuestos orgánicos volátiles que se utilizan solos o en combinación con otros agentes, sin sufrir ningún cambio químico, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, o se utilice como agente de limpieza para disolver la suciedad, o como disolvente, o como medio de dispersión, o como modificador de la viscosidad, o como agente tenso-activo. El uso de estos disolventes libera a la atmósfera compuestos orgánicos volátiles (COV), que tienen algunos problemas importantes para el entorno. Algunos COV causan la degradación de la capa de ozono como es el caso del 1, 1,1-tricloroetano, tetracloruro de carbono, CFC, HCFC.

Entre los solventes orgánicos más destacados se encuentran el metanol, etanol, acetona, cloroformo, tolueno o el xileno, entre otros.

El carácter volátil de los disolventes orgánicos hace que éstos se evaporen rápidamente en el aire, alcanzando concentraciones importantes en espacios confinados. Los riesgos mayores para el ser humano se producen por la absorción de éstos a través de la piel y por inhalación. El contacto directo con la piel permite que el disolvente pase a la sangre, causando efectos inmediatos y a más largo plazo.

1.2.6. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo que produce un moho negro en vegetales muy común en la lechuga, el tomate o la acelga y limón. Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus*.

a) APLICACIONES INDUSTRIALES

Produce diversos compuestos de gran interés para las industrias farmacéutica y de alimentos (enzimas, ácidos orgánicos), y es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial por cultivo líquido.

Se usa en la producción de ácido glucónico, en la fermentación del té (té chino llamado Pu-erh) y en los conservadores de comida.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL DE ORIGEN BIOLÓGICO

Hongo *Aspergillus niger*, éste es uno de los microorganismos con mayor actividad lignocelulolítica además de ser de fácil obtención. Se encontró en el mismo ambiente de la ciudad de Lambayeque. Su aislamiento y caracterización se realizó en el laboratorio de Investigación de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la “Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo”.

2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Crisol
- Cuchara metálica
- Mortero
- Papel filtro
- Probeta
- Soporte universal
- Tela tocuyo
- Vaso de precipitación

3. EQUIPOS

- Balanza electrónica
- Equipo Soxhlet
- Estufa
- Desecador

4. REACTIVOS

- Agua destilada
- Etanol (96%)

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Las variables utilizadas (concentración de inóculo y tiempo de extracción) y los resultados obtenidos en cada tratamiento se analizaron haciendo uso del programa Microsoft Excel mediante tablas y gráficos estadísticos, facilitando así su interpretación.

Además, el análisis se realizó tomando en cuenta los niveles de medición de las variables, haciendo uso de estadística descriptiva como son las medidas de tendencia central y medidas de variabilidad, posteriormente se efectuó el ANOVA, cómo análisis fundamental de los resultados, mediante el programa estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.II, evaluándose así las siguientes premisas:

H_{01} = El factor concentración de inóculo añadido, no influye sobre el rendimiento de extracción de aceite.

H_{a1} = El factor concentración de inóculo añadido, sí influye sobre el rendimiento de extracción de aceite.

H_{02} = El factor tiempo de extracción, no influye sobre el rendimiento de extracción de aceite.

H_{a2} = El factor tiempo de extracción, sí influye sobre el rendimiento de extracción de aceite.

H_{03} = No hay interacción entre el factor concentración de inóculo añadido y el factor tiempo de extracción.

H_{a3} = Sí hay interacción entre el factor concentración de inóculo añadido y el factor tiempo de extracción.

6. MÉTODOS

ETAPA 1

Obtención de la materia prima

La muestra de estudio fue 1 Kg de salvado de arroz obtenido de la Empresa MOLINOR S.A.C. (Lambayeque). La materia prima se almacenó en una bolsa de plástico cerrada herméticamente y se mantuvo en refrigeración con el fin de evitar su deterioro.

Pretratamiento de la materia prima

Existen algunas enzimas nativas (lipasas) que pueden generar reacciones de hidrólisis lipídica deteriorando así el aceite contenido en el salvado. Debido a esto se realizó un tratamiento hidrotérmico para inactivar las lipasas, llevando el salvado de arroz en envases de vidrio a la autoclave.

ETAPA 2

Selección y caracterización del microorganismo

Esta etapa consiste en la selección de la especie de microorganismo con las mejores características, en este caso lo que se busca es que el microorganismo degrade las paredes celulares del salvado de arroz para que así el aceite quede más libre, por lo tanto, las características deseadas fueron: ser lignolítico y celulolítico. Con la asesoría brindada se determinó que el microorganismo idóneo para este proyecto es el *Aspergillus niger*, el cual reúne todas las características mencionadas, además de ser de fácil obtención. Se tomaron varias muestras de este hongo y se procedió a realizar la selección y caracterización para encontrar el mejor hongo dentro de ese grupo de muestras. El estudio realizado por un biólogo de la UNPRG se detalla en el Anexo A.

ETAPA 3

Incubación con *Aspergillus niger*

Es un proceso aeróbico en medio acuoso. El medio se preparó en base al Agar Czapek Dox ($\text{pH} = 7.0 \pm 0.2$), con la diferencia de la fuente de carbono, que fue reemplazada por el salvado de arroz. El medio se detalla a continuación:

Cuadro 5

*Medio acuoso para incubación de *Aspergillus niger**

Componente	Cantidad
Salvado de arroz	30.0 gr.
Nitrato de Sodio	2.0 gr.
Fosfato Dipotásico	1.0 gr.
Sulfato de Magnesio	0.5 gr.
Cloruro de potasio	0.5 gr.
Sulfato Ferroso	0.01 gr.
Agar	15.0 gr.
Agua	c.s.p. 1L

Nota. Elaborado por los autores

Una vez preparado el medio, se agregaron 1000 ml en cada una de las 4 muestras y se procedió a adicionar a cada muestra un inóculo preparado con 2 millones de esporas por mililitro, del cual se agregaron a cada muestra los siguientes porcentajes en base al volumen de medio: 0%, 1%, 2%, 3%. El conteo de esporas fue realizado por un biólogo de la UNPRG con una cámara Neubauer (Anexo B).

La incubación se realizó a temperatura ambiente por un periodo de 144 horas según lo propuesto por Tirado (2005).

ETAPA 4

Extracción del aceite

Una vez concluido el proceso de incubación se filtraron las muestras con tela tocuyo. Posteriormente se sometieron a secado en una estufa a 55°C por 24 horas según lo propuesto por Tirado (2005).

Pasado ese tiempo, previa tritución de la muestra seca en un mortero, se armó el equipo Soxhlet y se procedió a la extracción a diferentes horas (4, 6, 8) habiendo en cada extracción un peso de muestra de 5 gramos. Para el desarrollo del proceso se trabajó con una temperatura de 80°C y se utilizó una cantidad de solvente equivalente al 75% de la capacidad del balón utilizado es decir 188ml, lo suficiente para evitar que el balón se seque y/o el material extraído se sobrecaliente.

ETAPA 5

Determinación del contenido de aceite

El contenido de aceite se determinó como “grasa cruda” y se incluyen en la determinación los triglicéridos, que constituyen cerca del 99%, y el 1% restante constituido por diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, pigmentos liposolubles, vitaminas liposolubles, esteroides, alcoholes de alto peso molecular, etc. Los métodos de referencia implican la determinación por pesada de la materia grasa. Se desarmó el equipo y se procedió a la eliminación del solvente contenido en el balón en estufa a 100 °C hasta peso constante (4 h). Se enfrió en desecador y se pesó. El contenido graso se calculó según (Hernández y Mieres, 2005):

$$\% \text{ Contenido graso} = (P_2 - P_1) * 100 / P_m$$

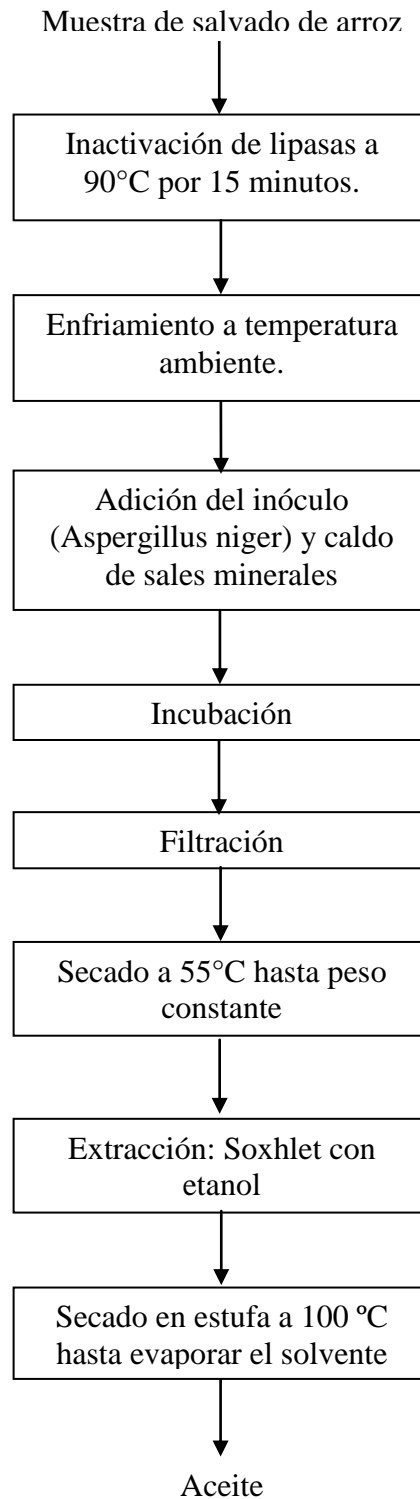
Donde

P1 = peso en gramos del balón de destilación empleado

P2 = peso del balón en gramos conteniendo el extracto

Pm = peso en gramos de la muestra seca.

Diagrama de flujo para un tratamiento estándar de extracción de aceite con etanol y pretratamiento con adición de microorganismo.



Nota. Elaborado por los autores

III. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante las diversas experimentaciones realizadas en laboratorio. Se realizaron 12 tratamientos iniciales dado el diseño factorial, más dos repeticiones a cada uno de dichos tratamientos, es decir un total de 36 unidades experimentales, con la finalidad de obtener mayor confiabilidad de los resultados (Anexo C).

1. TRATAMIENTOS

Tabla 1

Condiciones de las variables en cada tratamiento

	N° de tratamiento	Horas de extracción	Concentración del inóculo
Bloque 1	01	4	0%
	02	4	1%
	03	4	2%
	04	4	3%
	05	6	0%
	06	6	1%
	07	6	2%
	08	6	3%
	09	8	0%
	10	8	1%
	11	8	2%
	12	8	3%
Bloque 2	13	4	0%
	14	4	1%
	15	4	2%
	16	4	3%
	17	6	0%
	18	6	1%
	19	6	2%

Bloque 3	20	6	3%
	21	8	0%
	22	8	1%
	23	8	2%
	24	8	3%
	25	4	0%
	26	4	1%
	27	4	2%
	28	4	3%
	29	6	0%
	30	6	1%
	31	6	2%
	32	6	3%
	33	8	0%
	34	8	1%
	35	8	2%
	36	8	3%

Nota. Elaborado por los autores

2. TRATAMIENTOS CON TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE 4 HORAS

Tabla 2

Rendimiento de extracción de aceite con 4 horas de extracción

Concentración de inóculo	Nº de tratamiento	Rendimiento
0%	1	12,2%
	13	11,8%
	25	12,0%
1%	2	15,4%
	14	15,6%
	26	15,8%
2%	3	20,4%
	15	18,8%
	27	18,2%

	4	20,4%
3%	16	21,0%
	28	20,8%

Nota. Elaborado por los autores

3. TRATAMIENTOS CON TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE 6 HORAS

Tabla 3

Rendimiento de extracción de aceite con 6 horas de extracción

Concentración de inóculo	Nº de tratamiento	Rendimiento
	5	14,6%
0%	17	14,0%
	29	15,2%
	6	18,8%
1%	18	18,8%
	30	18,2%
	7	22,0%
2%	19	22,0%
	31	22,2%
	8	24,0%
3%	20	24,2%
	32	24,6%

Nota. Elaborado por los autores

4. TRATAMIENTOS CON TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE 8 HORAS

Tabla 4

Rendimiento de extracción de aceite con 8 horas de extracción

Concentración de inóculo	N° de tratamiento	Rendimiento
0%	9	15,2%
	21	15,8%
	33	15,4%
1%	10	21,6%
	22	19,6%
	34	19,8%
2%	11	22,2%
	23	23,0%
	35	23,4%
3%	12	24,4%
	24	24,8%
	36	24,8%

Nota. Elaborado por los autores

5. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

En primer lugar, se muestran en forma tabular las medias asociadas a cada una de las 12 combinaciones posibles. Esto permitió analizar el efecto promedio de cada factor:

Tabla 5

Rendimiento medio según concentración de inóculo y tiempo de extracción.

Conc. (%)	Tiempo (h)	4	6	8	Promedio
0		12,0%	14,6%	15,5%	14,0%
1		15,5%	18,6%	20,3%	18,2%
2		19,1%	22,1%	22,9%	21,4%
3		20,7%	24,3%	24,7%	23,2%
Promedio		16,9%	19,9%	20,8%	

Nota. Elaborado por los autores

Interpretación

- El rendimiento de extracción de aceite tendió a incrementarse conforme lo hizo el nivel de tiempo empleado: los cuatro experimentos diseñados para 4 horas tuvieron un rendimiento medio de 16,9%; los cuatro diseñados para 6 horas mostraron un rendimiento medio de 19,9% y los diseñados para 8 horas tuvieron un rendimiento medio de 20,8%. Es necesario mencionar que la diferencia de rendimientos medios entre 6 y 8 horas no es tan significativa en comparación a la mostrada entre 6 y 4 horas.
- Por lo que se refiere a la concentración, se pudo ver de igual manera una diferencia notoria entre los valores promedio obtenidos: el rendimiento medio para los tres experimentos diseñados con 0% de concentración de inóculo fue 14,0%; los tres diseñados con 1% de inóculo mostraron un rendimiento medio de 18,2%; los tres diseñados con 2% tuvieron un rendimiento medio de 21,4% y los diseñados con 3% tuvieron un rendimiento medio de 23,2%.

- Se evidenció que el rendimiento de extracción va aumentando a medida que la concentración de inóculo es mayor, aunque este aumento resultó ser cada vez menor.

En el siguiente gráfico se muestra la evolución del rendimiento medio en función del factor tiempo (descompuesto por niveles de la concentración de inóculo empleado) y la interacción entre ambos factores.

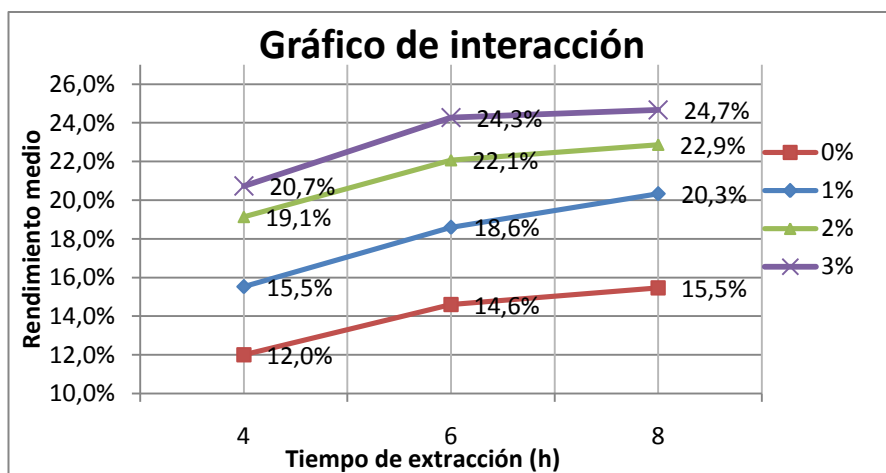


Figura 3: Gráfico de interacción de factores. Elaborado por los autores.

Interpretación

- Según lo apreciado, el nivel de concentración de inóculo adicionado incrementó el rendimiento medio de extracción de aceite en cada uno de los niveles del factor tiempo (4, 6 y 8 horas). Por tanto, la influencia de la concentración de inóculo añadido sobre el rendimiento de extracción de aceite no dependió del tiempo que el proceso duró. Esto significa que ambos factores no interactuaron. Se pudo comprobar en el gráfico debido a que las líneas no se cruzaron en ningún punto, es decir son (aproximadamente) paralelas.
- Se observó que el mayor rendimiento medio se alcanzó con una concentración de inóculo añadido de 3% (v/v) para un tiempo de extracción de 8 horas, obteniéndose un 24,7% (b.s.) de extracción de aceite crudo.

Finalmente se aplicó la técnica ANOVA usando el modelo de análisis doble con interacción.

Tabla 6

Análisis de varianza (análisis doble con interacción)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: TIEMPO	102,949	2	51,474	163,120	0,000
B: CONCENTRACIÓN	438,110	3	146,037	462,790	0,000
INTERACCIONES					
AB	2,287	6	0,381	1,210	0,336
RESIDUOS	7,573	24	0,316		
TOTAL (CORREGIDO)	550,919	35			

Nota. Recuperado del programa STATGRAPHICS CENTURION XVI. II.

Interpretación

- Se analizaron los resultados de los tres contrastes (H01: El factor concentración de inóculo añadido, no influye sobre el rendimiento de extracción de aceite, H02: El factor tiempo de extracción, no influye sobre el rendimiento de extracción de aceite, H03: No hay interacción entre el factor concentración de inóculo añadido y el factor tiempo de extracción).
- Lo primero fue comprobar si existe interacción, en este caso el p-valor fue igual a 0,336 que es mayor a 0,05. Por tanto, se evidencia que no existe interacción entre ambos factores. Notar que el rendimiento de extracción medio del salvado de arroz fue mayor a medida que aumenta la concentración de inóculo añadido. Esto es consistente con el resultado del test. Además, según lo observado anteriormente, el nivel de concentración de inóculo tendió a aumentar el rendimiento medio independientemente del tiempo de extracción.

- Por otro lado, se obtuvieron p-valores significativos en los otros dos contrastes (puesto que sus p-valores son menores que 0,05); es decir, tanto el nivel de concentración de inóculo añadido como el nivel de tiempo de extracción fueron determinantes para el rendimiento de extracción de aceite del salvado de arroz.

IV. DISCUSIÓN

- Respecto al inóculo utilizado que contenía 2 millones de esporas/mL; se encontraron similitudes con Tirado (2005), que también trabajó con un inóculo de 2 millones de esporas/mL. Esto se debe a la capacidad de la cámara Neubauer, dada que su máxima capacidad sin cometer errores en el conteo es de 2,5 millones de esporas/mL, creyéndose así por conveniente escoger esta concentración (2 millones esporas/mL), que nos permitirá obtener los valores más altos en nuestra extracción.
- De acuerdo con los resultados de la Tabla 5, para un tiempo de extracción de 8 horas y una concentración de inóculo añadido al 3%, el rendimiento medio para la extracción de aceite en el salvado de arroz fue de 24,7 %, en comparación al 60% logrado por Córdova y Núñez (2015) en un lapso de 24 horas, todo esto en la *Vitis vinífera*.
- Según el Análisis de Varianza (ANOVA), la concentración de inóculo es una variable que sí influye en el rendimiento; todo esto se puede corroborar con Infantes (2014), cuyo máximo rendimiento de extracción logrado fue 20,19%, para una concentración de enzima añadida al 1,95%, en comparación al rendimiento obtenido de 11,87 % con una extracción convencional (sin aplicación de enzimas).

V. CONCLUSIONES

- Se demostró que la adición *del Aspergillus niger* para un tratamiento previo a la extracción soxhlet y las horas de extracción, sí influyen en el rendimiento de extracción de aceite, al notarse un incremento en éste; en comparación a los rendimientos obtenidos en los experimentos sin la incorporación del microorganismo y menores tiempos de extracción. Además, la influencia se verifica en el análisis ANOVA, al obtener un p-valor menor que 0,05 en ambos casos; lo cual significa que el nivel de concentración de inóculo añadido y las horas de extracción son determinantes para el rendimiento de extracción de aceite esperado del salvado de arroz.
- En el proceso de obtención y caracterización, se seleccionaron las muestras productoras de las enzimas amilasa y proteasa, de las cuales se escogió la cepa que presentó las mejores características lignocelulolíticas.
- Se logró establecer una nueva metodología para la extracción de aceite, basado en un tratamiento enzimático a la muestra, incorporando un microorganismo lignocelulolítico como paso previo al método Soxhlet, lo que proporcionará un aumento del rendimiento.
- De los 4 niveles de concentración de inóculo añadido evaluados, la concentración óptima para obtener el mayor rendimiento de extracción de aceite crudo fue de 3% (v/v).
- El mayor rendimiento de extracción de aceite crudo se obtuvo cuando se trabajó con un tiempo de extracción de 8 horas.

VI. RECOMENDACIONES

- Durante la preparación del inóculo, para cada etapa, es necesario esterilizar los materiales a utilizar.
- En la etapa del desarrollo de la cepa de *Aspergillus niger*, se recomienda observar el crecimiento durante los primeros 15 y 25 días respectivamente; clasificándolos en una escala convencional, según el porcentaje existente del hongo en el medio de cultivo.
- En la selección de la cepa de *Aspergillus niger*, se opta por aquel que no sea productora de enzima lipasa.
- Se requiere realizar un tratamiento hidrotérmico a la muestra problema, para lograr la inactivación de la enzima lipasa.
- Estimar la variación de rendimientos con la incorporación de *Aspergillus niger*, en los distintos métodos de extracción de aceites.
- Estimar la variación de rendimientos en la extracción soxhlet y otros métodos de extracción de aceites, con la incorporación de distintos microorganismos lignocelulolíticos.
- El presente trabajo se basó en la determinación de la influencia del *Aspergillus niger* en la extracción de aceite del salvado de arroz, se recomienda realizar un estudio de optimización para determinar el mayor rendimiento de aceite que se podría obtener.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar, C. (2001). Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulolíticos. *Rev. Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3 (2): 117-121.
2. Ahammed, S., Prema, P. (2002). Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus* sp. *Rev. Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1 (6): 102-103.
3. Altamirano, E. (2017). “Niveles de productividad y rentabilidad del cultivo de arroz en la región norte del Perú: caso Lambayeque y La libertad - 2000-2015” (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
4. Bárzana, G. (2002). Biocatálisis en medios no acuoso: una historia de 20 años, desde los fundamentos a las aplicaciones industriales. *Rev. Academia de Ingeniería*, 4 (1): 2-5.
5. Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(1), 355-383.
6. 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. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
7. Carreño, C., Flores, C. (2003). Capacidad celulolítica de mohos aislados de suelos agrícolas de la comunidad de San José, Lambayeque, 2002 (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

8. Ccolqqe, M., Flores, M. (2014). Determinación de los parámetros para la elaboración de un embutido funcional tipo chorizo, con sustitución parcial de grasa animal por pasta de palta (*Persea americana* Mill) y uso de salvado de arroz como extensor cárnico (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de San Agustín, Perú.
9. Chamy R., Lema Juan M, A. Moure, D. Franco, R. Santamaría, C. Soto, J. Sineiro, H. Domínguez, E. Zúñiga, M.J. Núñez, A. López-Munguía (2001). Enzyme-aided alternative processes for the extraction of oil from *Rosa rubiginosa*. J. Am. Oils Chem. Soc., 78, 437- 439.
10. Chen M., Bergman, C., (2005). A rapid procedure for analyzing rice bran tocopherol, tocotrienol and γ -orizanol contents. Journal of Food Composition and Analysis, 18, 139- 151.
11. Ciau-Solís, Gabriel Rosado-Rubio, Luis Chel Guerrero, David Betancur-Ancona (2016). Aplicación de métodos enzimáticos para la extracción de aceite de chía (*Salvia hispánica* L). Journal of Negative & No Positive Results, 1(2) ,50-55.
12. CODEX STAN 210-1999 (Rev. 2009). Norma del Codex Alimentario para Aceite Vegetales Especificados.17 p.
13. Córdova, G, & Núñez A. (2015). Determinación del perfil de ácidos grasos de un aceite extraído de la semilla de *Vitis vinífera* (uva negra criolla) (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
14. Cuervo, L., Folch, J. y Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. Biotecnología, 13(3), 11-25.

15. Domínguez, H., Nukiez, M.J., Lema, J.M. (1995). Procesado acuoso de soja con tecnología enzimática: extracción de aceite y producción de aislados. *Grasas y Aceites*, 46(1), 11-20.
16. Dongowki (2002) Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. *Nahrung/ Food*, 46(1), 105-111.
17. Escamilla, C., Varela, R., Sánchez, S., Solís, A. y Durán, C. (2005) Extrusion deactivation of rice bran enzymes by pH modification. *Lipid Science and Technology*, 107(12), 871-876.
18. Gaitán, D., Pérez, L. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
19. Grasso, V. (2013). Diseño del Proceso: Pre tratamiento Enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
20. Gretty, K., Marcel, G.C. (2003) Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev. peru. biol*, 10 (1): 78-87.
21. Hernández, C. y Mieres, A. (2005) Extracción y cuantificación de lípidos presentes en el mesocarpo y almendra del fruto de la palma corozo (*Acrocomia aculeata*). [PDF file]. Venezuela. Recuperado de: http://www.ciiq.org/varios/peru_2005/Trabajos/IV/4/4.4.01.pdf

22. Hwang, D., Huang, S., Shiau, C., Liu, T., Chu, C. (2005). Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. *Meat Sci.*, 70(1), 613-619.

23. Infantes, M. R. (2014). Evaluación del tratamiento enzimático para la extracción mecánica del aceite vegetal de las semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* var, *Flavicarpa Degener*) (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agrario La Molina, Perú.

24. Izarra, M., Santayana, M., Villena, G. y Gutiérrez, M. (2010) – Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger*. *Rev. Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 139-150.

25. Kennedy, G. y Burlingame, B. (2003). Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry*, 80, 589-596.

26. Llacza, H. (2012). Evaluación de la actividad celulolítica del complejo enzimático celulasa en cepas fúngicas de los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín, Huánuco. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

27. Monroy, C., Vargas, A (2001) Estudio de caracterización, proceso de obtención y usos del salvado de arroz [versión electrónica]. Colombia: Universidad de Tolima. Recuperado de: <http://www.monografias.com/trabajos15/salvado-arroz/salvado-arroz.shtml>

28. Nicolosi, R., Rogers, E., Ausmann, L. y Orthoefer, F. (1993). Rice bran oil and its health benefits. *Rice science and technology*, 1, 421- 431.

29. Núñez, C. (2007) Extracciones con equipo soxhlet [PDF file]. Argentina. Recuperado de: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequipo-soxhlet.pdf>

30. Ong, J.T.L. (2002) – El impacto de las condiciones de preparación de las semillas de soja sobre la calidad y el rendimiento del aceite. *Aceites y Grasas*, 47(1), 237.
31. Orellana, M. (2014). Selección de hongos lignocelulolíticos para obtener jarabes glucosados en la producción de bioetanol a partir de bagazo de *Saccharum officinarum* L., “caña de azúcar”. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
32. Ortiz, F. (2005). Determinación de la calidad molinera de 4 variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.) en las zonas arroceras del país. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
33. Pacheco E, Peña J. y Ortiz, A. (2002). Composición físico-química del aceite de salvado de arroz estabilizado por calor. *Agronomía Tropical*, 52(2), 173-185.
34. Prato, C. (2011). Estudio técnico económico para implementar la extracción de aceite vegetal del afrecho de arroz en las principales industrias molineras de arroz ubicadas en el estado Guárico. (Tesis de pregrado). Universidad Nueva Esparta, Venezuela.
35. Romero, C y Del Carre Días, A. (2015). Patente N°. 2 527 886. España, Madrid: Oficina Española de Patentes y Marcas.
36. Rosenthal A, Pyle D. L., Nijaran K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microb Tech.*, 19 (1), 402-420.
37. Tinoco, R. y Acuña, A. (2009). Manual de recomendaciones técnicas – Cultivo de arroz, San José, Costa Rica, INTA.

- 38.** Tirado, J. (2005). Obtención del colorante de la semilla de achiote (*Bixa orellana*) utilizando microorganismos celulolíticos. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, México.
- 39.** Vásquez, V. (2015). Evaluación de dos métodos de consumo de agua en la producción de *Oryza sativa* L. VAR. IR 43 en Guadalupe, La Libertad. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

VIII. ANEXOS

ANEXO A

OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Aspergillus niger* CON MEJOR ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA

a. Selección cualitativa de hongos de la especie *Aspergillus niger* productoras de amilasas.

- ✓ Se cultivó el hongo en agar almidón 1%.
- ✓ Luego de incubar por 72 horas, se cubrió la superficie de agar almidón 1% con solución de yodo, dejar reposar 1 minuto y después eliminar el exceso del reactivo. Observar la aparición de zonas transparentes, no coloreadas de azul alrededor del hongo cultivado.
- ✓ La prueba cualitativa para el almidón se basa en la aparición del color azul cuando se agrega la solución de yodo por la presencia de este en el medio de cultivo, cuando los hongos producen la enzima amilasa degrada el almidón alrededor del hongo cultivado.

Resultado: El 100% de los hongos son productoras de amilasa.

b. Selección cualitativa de hongos de la especie *Aspergillus niger* productoras de proteasas.

- ✓ Se cultivó el hongo en agar leche 1%.
- ✓ Luego de incubar por 72 horas, se deja en refrigeración por 24 horas y se observan zonas claras alrededor de los hongos cultivados.

- ✓ La caseína es la proteína de la leche y se presenta como una solución coloidal responsable del aspecto blanco y opaco. Cuando los hongos producen caseinasa, hidrolizan la proteína produciendo derivados solubles cristaloides, observándose un halo transparente alrededor del hongo cultivado.

Resultado: El 30% de los hongos son productoras de proteasas y el 70% no son productoras de proteasas.

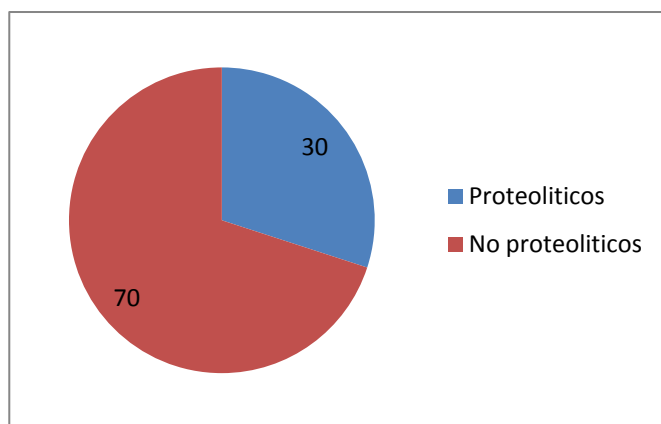


Figura 4: % Hongos productores de proteasas. Elaborado por el autor.

c. Reconocimiento de hongos de la especie *Aspergillus niger* productoras de lipasas.

- ✓ Se cultivó el hongo en agar aceite de oliva 2%.
- ✓ Luego de incubar por 72 horas, se cubrió la superficie del agar con una solución de sulfato de cobre 5% dejar en reposo 5 minutos y después eliminar el exceso del reactivo.
- ✓ Examinar por el microscopio (menor aumento) los glóbulos de grasa alrededor del hongo cultivado. Si estos son de color azul verdoso es evidente que las moléculas de grasa han sido hidrolizadas por acción de lipasas (ácidos grasos más glicerina).

Resultado: El 70% de los hongos son productoras de lipasas y 30% no son productoras de lipasas.

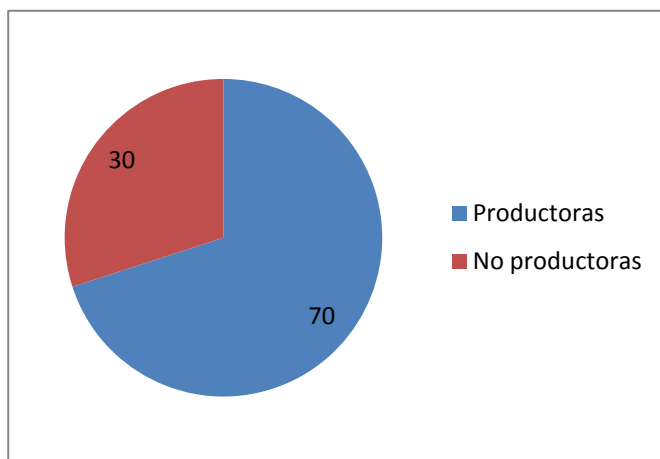


Figura 5: % Hongos productores de lipasas. Elaborado por el autor.

d. Desarrollo de hongos filamentosos en bloques de madera

Para calificar el desarrollo micelial, bloques de madera, se esterilizaron en autoclave 121 °C, 15 libras de presión por 20 minutos. Para la obtención del inóculo, cada hongo lignolítico se sembró en agar papa dextrosa (PDA) a 30 °C, por 72 horas y luego se obtuvo una suspensión de conidios.

A continuación, los bloques de madera se depositaron independientemente en placas de Petri esterilizadas, sobre ellos se vertieron 2,5 mL del inóculo y luego se llevaron a frascos de vidrio conteniendo 20 mL de agua inclinado. Después de incubar a 30 °C, se realizó la valoración del desarrollo micelial sobre el bloque de madera, a los 15 y 30 días calificándolo según una escala convencional donde 0-25% del aérea colonizada correspondió a desarrollo escaso, 26-50% a desarrollo regular y 51-100% a desarrollo bueno.

Resultado: El desarrollo micelial en bloques de maderas fue calificado de bueno en el 10% de los hongos lignolíticos; regular en el 60% y escaso en el 30% después de 15 días de incubación. A su vez, el desarrollo fue bueno en 20%; regular en el 50% y escaso en 30% de los hongos lignolíticos después de 30 días.

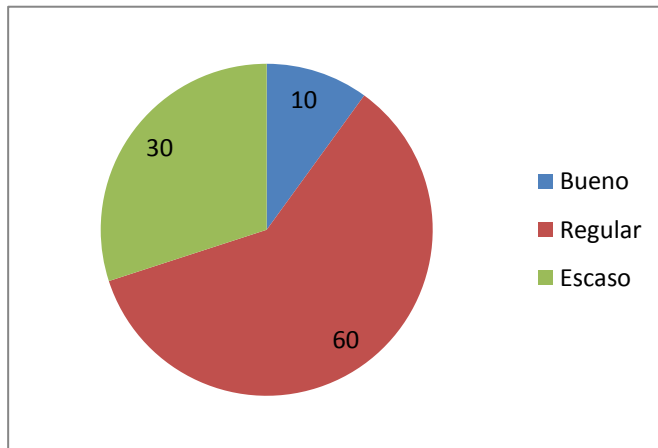


Figura 6: Hongos lignolíticos nativos según el desarrollo micelial en bloques de madera después de 15 días. Elaborado por el autor.

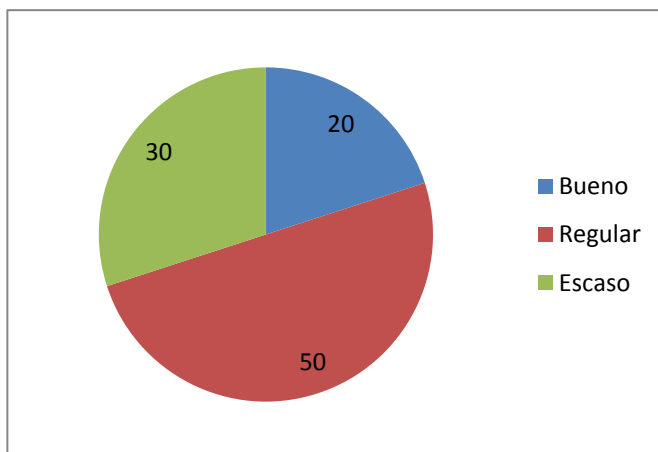


Figura 7: Hongos lignolíticos nativos según el desarrollo micelial en bloques de madera después de 30 días. Elaborado por el autor.

e. Desarrollo de hongos filamentosos en papel filtro

En tubos de ensayo de 20 mL de capacidad, conteniendo 2 mL de caldo Sales Minerales, se depositaron verticalmente tiras de papel filtro Whatman N° 1, de 6 x 1 cm, previamente esterilizado. Cada hongo celulítico se sembró en PDA a 30 °C, por 72 horas y luego se obtuvo la suspensión de conidios. Después, cuidadosamente, se inocularon 0,2 mL de la suspensión de conidios, tratando que se distribuya uniformemente en el papel filtro y los tubos fueron incubados a 30 °C, agitándolos cada semana, por 25 días.

Después de 15 y 25 días de incubación se observó el desarrollo del micelio sobre el papel filtro y se calificó con una escala convencional, donde 0-50% del aérea colonizada correspondió a desarrollo escaso, 51-80% a desarrollo regular y 81-100% a desarrollo bueno.

Resultado: El desarrollo micelial en papel filtro fue calificado de bueno en el 30% de los hongos celulíticos; regular en el 30% y escaso en el 40% después de 15 días de incubación. A su vez, el desarrollo fue bueno en 40%; regular en el 20% y escaso en 40% de los hongos celulíticos después de 25 días.

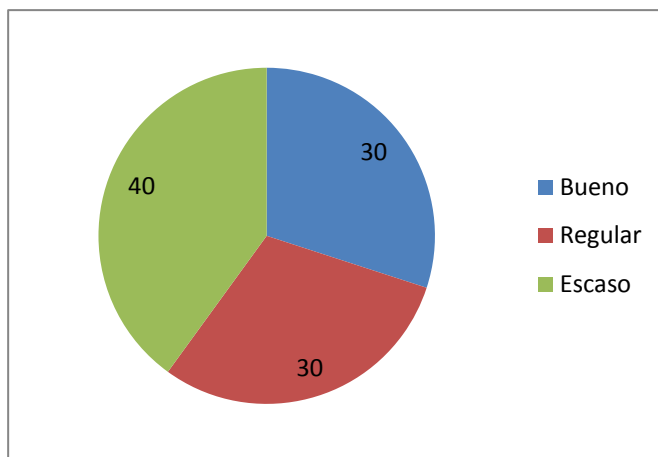


Figura 8: Hongos celulíticos nativos según el desarrollo micelial en papel filtro a los 15 días.

Elaborado por el autor.

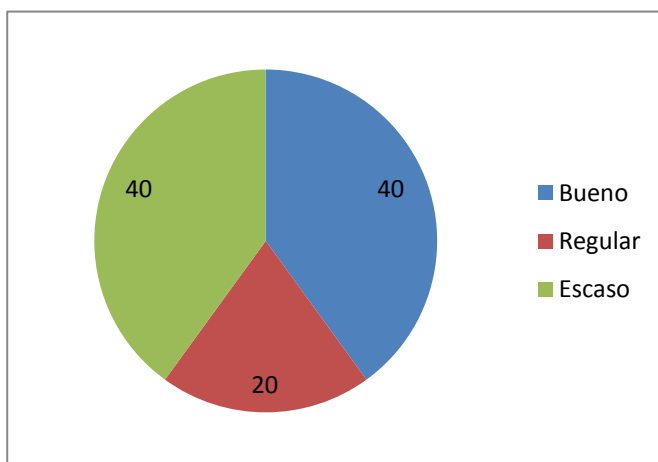


Figura 9: Hongos celulíticos nativos según el desarrollo micelial en papel filtro a los 25 días.

Elaborado por el autor.

Tabla 7*Caracterización de los hongos de la especie Aspergillus niger*

<i>Aspergillus niger</i>			
Código UNPRG	Amilasa	Proteolíticos	Lipasas
1	+	-	-
3	+	+	+
4	+	-	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	-	+
9	+	-	+
11	+	-	+
1 ^a	+	+	+
12	+	+	-

Nota. Elaborado por el autor**Tabla 8***Selección de los hongos de la especie Aspergillus niger*

<i>Aspergillus niger</i>				
Código UNPRG	Lignolítico		Celulíticos	
	15 días	30 días	15 días	25 días
1	26% (R)	36% (R)	59% (R)	71% (R)
3	16% (E)	25% (E)	10% (E)	25% (E)
4	28% (R)	58% (B)	87% (B)	93% (B)
5	60% (B)	70% (B)	84% (B)	91% (B)
6	30% (R)	49% (R)	62% (R)	73% (R)
7	18% (E)	24% (E)	22% (E)	43% (E)
9	26% (R)	42% (R)	81% (B)	90% (B)
11	27% (R)	45% (R)	16% (E)	37% (E)
1 ^a	20% (E)	23% (E)	63% (R)	83% (B)
12	27% (R)	47% (R)	12% (E)	29% (E)

Nota. Elaborado por el autor

Medio de Cultivos utilizados

Tabla 9

Composición química Agar papa dextrosa (PDA)

Componentes	g/L
Papa	2,00
Dextrosa	2,00
Agar agar	15,0
Agua destilada	1 000 mL

Nota. Elaborado por el autor

Tabla 10

Composición química Agar Sales Minerales

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
Agua destilada	1 000 mL
pH	7,0

Nota. Elaborado por el autor

Tabla 11*Composición química Agar Almidón*

Componentes	g/L
Almidón	10,00
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
Agua destilada	1 000 mL
pH	7,0

Nota. Elaborado por el autor**Tabla 12***Composición química Agar Leche*

Componentes	g/L
Leche	10 mL
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
Agua destilada	1 000 mL
pH	7,0

Nota. Elaborado por el autor

Tabla 13*Composición química Agar Aceite de Oliva*

Componentes	g/L
Aceite de Oliva	20 mL
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
Agua destilada	1 000 mL
pH	7,0

Nota. Elaborado por el autor**Tabla 14***Composición química Caldo Sales Minerales*

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agua destilada	1 000 mL
pH	7,0

Nota. Elaborado por el autor

ANEXO B

TECNICA PARA EL CONTEO DE ESPORAS

El procedimiento fue realizado en una cámara de Neubauer, siguiendo los siguientes pasos:

1. Adicionar 50 ml de una solución salina estéril a la placa de Petri que contiene el hongo.
2. Agitar durante dos minutos mediante movimientos circulares; todo esto con la finalidad de lograr el arrastre de las esporas.
3. Decantar la suspensión, recuperando el filtrado en un matraz estéril.
4. Colectar 0,5 ml de la suspensión en una pipeta, y llevar a la cámara de Neubauer.
5. Llenar el área de contaje y dejar reposar, con la finalidad de que sedimente nuestra suspensión que contiene las esporas.
6. Observar y empezar el conteo en un microscopio.
7. Realizar diluciones en caso sea necesario.

La concentración se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10\,000}{\text{número de cuadros}}$$

Donde:

Número de células = Suma de todas las células contadas.

Número de cuadros = 4

ANEXO C
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACEITE CRUDO

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(P_2 - P_1) * 100}{P_m}$$

Donde

P1 = peso en gramos del balón de destilación empleado

P2 = peso del balón en gramos conteniendo el extracto

Pm = peso en gramos de la muestra seca.

Bloque 1

Rendimiento de extracción de aceite con 4 horas de extracción

- Tratamiento 1 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.74 - 108.13) * 100}{5} = 12,2$$

- Tratamiento 2 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.90 - 108.13) * 100}{5} = 15,4$$

- Tratamiento 3 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.15 - 108.13) * 100}{5} = 20,4$$

- Tratamiento 4 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.15 - 108.13) * 100}{5} = 20,4$$

Rendimiento de extracción de aceite con 6 horas de extracción

- Tratamiento 5 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.86 - 108.13) * 100}{5} = 14,6$$

- Tratamiento 6 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.07 - 108.13) * 100}{5} = 18,8$$

- Tratamiento 7 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.23 - 108.13) * 100}{5} = 22,0$$

- Tratamiento 8 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.33 - 108.13) * 100}{5} = 24,0$$

Rendimiento de extracción de aceite con 8 horas de extracción

- Tratamiento 9 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.89 - 108.13) * 100}{5} = 15,2$$

- Tratamiento 10 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.21 - 108.13) * 100}{5} = 21,6$$

- Tratamiento 11 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.24 - 108.13) * 100}{5} = 22,2$$

- Tratamiento 12 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.35 - 108.13) * 100}{5} = 24,4$$

Bloque 2

Rendimiento de extracción de aceite con 4 horas de extracción

- Tratamiento 13 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.72 - 108.13) * 100}{5} = 11,8$$

- Tratamiento 14 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.91 - 108.13) * 100}{5} = 15,6$$

- Tratamiento 15 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.07 - 108.13) * 100}{5} = 18,8$$

- Tratamiento 16 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.18 - 108.13) * 100}{5} = 21,0$$

Rendimiento de extracción de aceite con 6 horas de extracción

- Tratamiento 17 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.83 - 108.13) * 100}{5} = 14,0$$

- Tratamiento 18 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.07 - 108.13) * 100}{5} = 18,8$$

- Tratamiento 19 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.23 - 108.13) * 100}{5} = 22,0$$

- Tratamiento 20 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.34 - 108.13) * 100}{5} = 24,2$$

Rendimiento de extracción de aceite con 8 horas de extracción

- Tratamiento 21 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.92 - 108.13) * 100}{5} = 15,8$$

- Tratamiento 22 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.11 - 108.13) * 100}{5} = 19,6$$

- Tratamiento 23 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.28 - 108.13) * 100}{5} = 23,0$$

- Tratamiento 24 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.37 - 108.13) * 100}{5} = 24,8$$

Bloque 3

Rendimiento de extracción de aceite con 4 horas de extracción

- Tratamiento 25 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.73 - 108.13) * 100}{5} = 12,0$$

- Tratamiento 26 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.92 - 108.13) * 100}{5} = 15,8$$

- Tratamiento 27 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.04 - 108.13) * 100}{5} = 18,2$$

- Tratamiento 28 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.17 - 108.13) * 100}{5} = 20,8$$

Rendimiento de extracción de aceite con 6 horas de extracción

- Tratamiento 29 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.89 - 108.13) * 100}{5} = 15,2$$

- Tratamiento 30 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.04 - 108.13) * 100}{5} = 18,2$$

- Tratamiento 31 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.24 - 108.13) * 100}{5} = 22,2$$

- Tratamiento 32 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.36 - 108.13) * 100}{5} = 24,6$$

Rendimiento de extracción de aceite con 8 horas de extracción

- Tratamiento 33 (Concentración del Inóculo 0%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(108.90 - 108.13) * 100}{5} = 15,4$$

- Tratamiento 34 (Concentración del Inóculo 1%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.12 - 108.13) * 100}{5} = 19,8$$

- Tratamiento 35 (Concentración del Inóculo 2%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.30 - 108.13) * 100}{5} = 23,4$$

- Tratamiento 36 (Concentración del Inóculo 3%)

$$\% \text{ Contenido graso} = \frac{(109.37 - 108.13) * 100}{5} = 24,8$$

ANEXO D
IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO



Figura 10: Hongos de la especie *Aspergillus niger*. Elaborado por los autores.

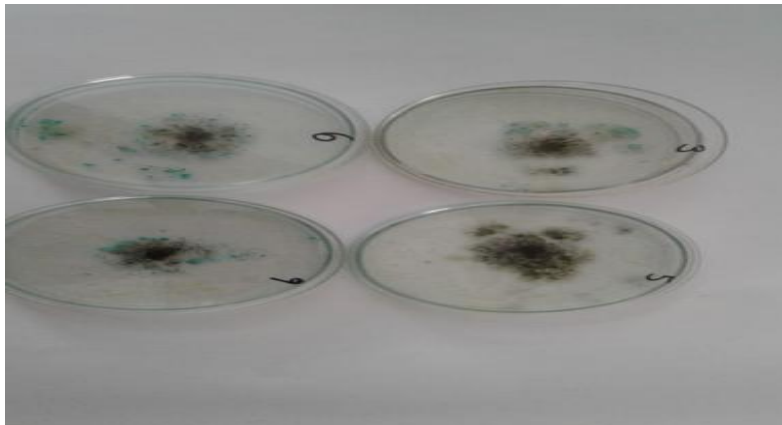


Figura 11: Selección cualitativa de hongos de la especie *Aspergillus niger* productoras de amilasas. Elaborado por los autores.



Figura 12: Selección cualitativa de hongos de la especie *Aspergillus niger* productoras de proteasas. Elaborado por los autores.

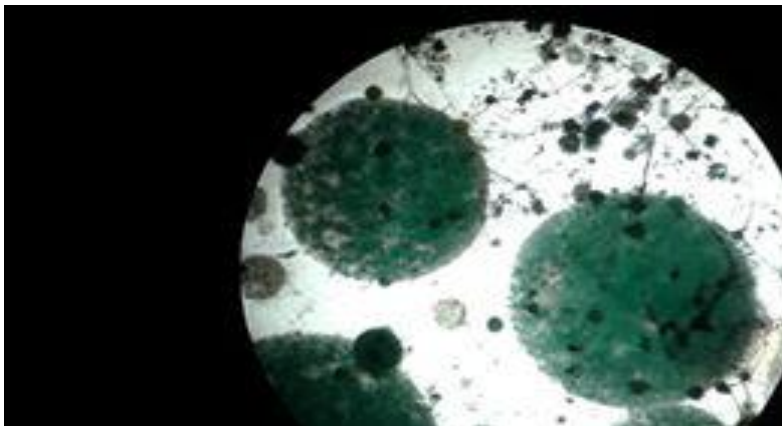


Figura 13: Reconocimiento de hongos de la especie *Aspergillus niger* productoras de lipasas. Elaborado por los autores.



Figura 14: Desarrollo de hongos filamentosos en bloques de madera. Elaborado por los autores.



Figura 15: Desarrollo de hongos filamentosos en papel filtro. Elaborado por los autores.



Figura 16: Inoculo de *Aspergillus niger*. Elaborado por los autores.



Figura 17: Muestra inoculada al 1%. Elaborado por los autores.



Figura 18: Muestra inoculada al 2%. Elaborado por los autores.



Figura 19: Muestra inoculada al 3%. Elaborado por los autores.



Figura 20: Filtrado. Elaborado por los autores.



Figura 21: Muestra seca. Elaborado por los autores.



Figura 22: Muestra triturada. Elaborado por los autores.



Figura 23: Cartucho para extracción soxhlet. Elaborado por los autores.



Figura 24: Extracción soxhlet. Elaborado por los autores.



Figura 25: Aceite crudo. Elaborado por los autores.

