

**APLICACIÓN DE ENZIMAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE  
RESIDUAL DE LA TORTA DE PALMISTE**

**JUAN FERNANDO DURÁN ORTEGA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2010**

**APLICACIÓN DE ENZIMAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE  
RESIDUAL DE LA TORTA DE PALMISTE**

**JUAN FERNANDO DURÁN ORTEGA**

**Trabajo de grado para optar el título de Químico**

**Directora**

**Janneth Aidé Perea Villamil**

**Química, Magíster en Química, Doctora en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2010**



NOTA DEL PROYECTO DE GRADO

NOMBRE DEL ESTUDIANTE JUAN FERNANDO DURÁN ORTEGA		CODIGO 2022141
TITULO DEL PROYECTO APLICACIÓN DE ENZIMAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA TORTA DE PALMASTE		
REGISTRO No	FACULTAD CIENCIAS	CARRERA QUÍMICA
CALIFICACION (letra y número)* Informe Final (70%): Sustentación (30%):  Nota Final: <u>CUATRO, SIETE (4.7)</u>		CREDITOS 8

DIRECTOR DEL PROYECTO	CODIRECTOR DEL PROYECTO
 JANETH AIDE PEREA VILLAMIL	

CALIFICADORES		FECHA						
 F. ELENA STASHENKO	 F. JORGE SAÚL RAMÍREZ AGÓN	<table border="1"> <tr> <td>A</td> <td>M</td> <td>D</td> </tr> <tr> <td>2010</td> <td>05</td> <td>11</td> </tr> </table>	A	M	D	2010	05	11
A	M	D						
2010	05	11						

Original: Oficina de Admisiones y Contabilidad Académica.  
 Copias: Coordinación de Carrera.  
 F 1000-24

\* Reglamento Académico - Estudiantil de Pregrado - compilación de normas vigentes, octubre de 2007  
 Capítulo IX - Del Trabajo de Grado - Artículo 44:

"Para la evaluación del Trabajo de Grado II, el Comité de trabajos de Grado designará dos (2) calificadores, los cuales dispondrán de dos (2) semanas para analizar y calificar el informe. Una vez cumplido este proceso, el Comité de Trabajos de Grado citará al (los) estudiante (s) para sustentación pública de resultados. La nota final del Trabajo de Grado se obtendrá de la sumatoria del 70% correspondiente al informe final del trabajo y el 30% de la sustentación."



**ENTREGA DE TRABAJOS DE GRADO, TRABAJOS DE INVESTIGACION O TESIS Y AUTORIZACIÓN DE SU USO A FAVOR DE LA UIS**

Yo, Juan Fernando Durán Ortega, mayor de edad, vecino de Bucaramanga, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 91.540.596 de Bucaramanga, actuando en nombre propio, en mi calidad de autor del trabajo de grado, del trabajo de investigación, o de la tesis denominada(o):

Aplicación de enzimas en el proceso de extracción del aceite residual en la torta de palmiste,

hago entrega del ejemplar respectivo y de sus anexos de ser el caso, en formato digital o electrónico (CD o DVD) y autorizo a LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, utilice y use en todas sus formas, los derechos patrimoniales de reproducción, comunicación pública, transformación y distribución (alquiler, préstamo público e importación) que me corresponden como creador de la obra objeto del presente documento.

PARÁGRAFO: La presente autorización se hace extensiva no sólo a las facultades y derechos de uso sobre la obra en formato o soporte material, sino también para formato virtual, electrónico, digital, óptico, uso en red, Internet, extranet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

EL AUTOR – ESTUDIANTE, manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y la realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es de su exclusiva autoría y detenta la titularidad sobre la misma. PARÁGRAFO: En caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, EL AUTOR / ESTUDIANTE, asumirá toda la responsabilidad, y saldrá en defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia se firma el presente documento en dos (02) ejemplares del mismo valor y tenor, en Bucaramanga, a los veinticuatro días del mes de mayo de Dos Mil Diez 2010

**EL AUTOR / ESTUDIANTE:**

**JUAN FERNANDO DURÁN ORTEGA**

## DEDICATORIA

*A mis padres Martha y Juan a quienes amo y admiro, por sus sabios consejos y apoyo incondicional, a mis hermanas Diana y Carolina que las quiero mucho y al amor de mi vida Tatiana.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por todas las bendiciones que han llenado y alegrado mi vida,

A la empresa Palmeras de Puerto Wilches S.A. por contribuir a la investigación y permitirme conocer sus procesos.

Al CICTA, por brindarme los recursos físicos y económicos necesarios para la realización de este proyecto.

A la Doctora Aidé Perea, que me guió desde la construcción del proyecto hasta su exitoso final y quién es un ejemplo claro de vida por sus valiosas enseñanzas para mi formación como profesional y como persona.

A mis padres, por los sacrificios que hicieron por mí, por su amor y comprensión, porque me hacen sentir muy orgulloso de ser su hijo, a mis hermanas que siempre me apoyaron y estuvieron a mi lado.

A el amor de mi vida Tatiana, por darle alegría, felicidad y más sentido a mi vida, por su apoyo incondicional estos años en mi carrera y en mi vida personal.

A mis compañeros y amigos de la universidad, Daisy, Karen, Natalia, Edward y otros, que hicieron más amenas las largas jornadas de estudio.

A mis compañeros del centro de investigación CICTA, LuisK, Jeremy, Gloria, Jennifer, Sandra, Erick y Jesús, por toda la colaboración recibida y por los momentos de alegría después del trabajo.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	15
1.1 LA PALMA AFRICANA DE ACEITE	15
1.2 EL ACEITE DE PALMISTE Y SU PROCESO DE EXTRACCIÓN	16
1.3 ESTRUCTURA DE LAS OLEAGINOSAS	18
1.4 REACCIONES DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LAS CÉLULAS OLEAGINOSAS	20
1.5 PROCESOS ENZIMÁTICOS USADOS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES COMESTIBLES.	22
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	27
2.1 MATERIALES Y REACTIVOS	27
2.1.1 Reactivos	27
2.1.2 Equipos y material de laboratorio	27
2.1.3 Muestras	27
2.2 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS	28
2.2.1 Selección de la metodología de extracción del aceite	29
2.2.2 Selección de la enzima	31
2.2.3 Selección de las condiciones de reacción	31
2.2.4 Cinética de la eficiencia de extracción	32
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS	33
2.3.1 Análisis de humedad	33
2.3.2. Determinación del contenido de cenizas	33
2.3.3. Análisis de grasa	33

2.3.4. Determinación del contenido de proteína total	33
2.3.5. Determinación del contenido de fibra	33
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL PALMISTE Y LA TORTA DE PALMISTE	35
3.2 SELECCIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE	35
3.3 SELECCIÓN DE LA ENZIMA	37
3.4 SELECCIÓN DE CONDICIONES DE REACCIÓN	37
3.5 CINÉTICA DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE	43
4. CONCLUSIONES	46
5. RECOMENDACIONES	47
6. BIBLIOGRAFÍA	48



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Enzimas comerciales evaluadas y condiciones de reacción.	32
Tabla 2. Variables independientes.	32
Tabla 3. Composición química del palmiste, palmiste sin cuesco, cuesco y torta de palmiste.	36
Tabla 4. Efecto de la metodología aplicada sobre la eficiencia de extracción.	36
Tabla 5. Resultados del diseño experimental	38
Tabla 6. Análisis de varianza para la eficiencia de extracción de aceite de palmiste.	41
Tabla 7. Coeficientes de regresión para la eficiencia de extracción.	42

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Fruto de la palma de aceite	16
Figura 2. Estructura del cotiledón y la endosperma de los granos de semillas oleaginosas. (Rosenthal <i>et al.</i> , 1996) Tomado de: página 403.	19
Figura 3. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa. (Nidetsky <i>et al.</i> , 1993).	21
Figura 4. Montaje de reacción de la hidrólisis enzimática.	28
Figura 5. Metodología de extracción por centrifugación (EC).	30
Figura 6. Metodología de extracción por prensado (EP).	31
Figura 7. Diagrama de efectos principales sobre la variable respuesta.	39
Figura 8. Diagrama de Pareto.	40
Figura 9. Superficie de respuesta estimada para la eficiencia de extracción	43
Figura 10. Cinética de la eficiencia de extracción.	44

## RESUMEN

### TÍTULO

**APLICACIÓN DE ENZIMAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA TORTA DE PALMISTE\***

### AUTOR

JUAN FERNANDO DURÁN ORTEGA\*\*

### PALABRAS CLAVE

Aceite de palmiste, torta de palmiste, celulasas, proteasas, eficiencia de extracción.

### DESCRIPCIÓN

El proceso de extracción del aceite de palmiste se lleva a cabo por presión o por solventes. En Colombia el proceso de extracción más utilizado es el de prensado o expeler, del que se obtiene un 40% de extracción. Las pérdidas asociadas a este proceso, se deben a que parte del aceite (13%) es retenido por la pared celular de la torta de palmiste, que es el principal residuo de la extracción por expeler.

En este trabajo, se evaluó el uso de enzimas celulolíticas (Celuclast<sup>®</sup>, Celubrix<sup>®</sup> y Viscozyme<sup>®</sup>) y proteolíticas (Flavourzyme<sup>®</sup>), en el proceso de extracción del aceite residual de la torta de palmiste, con el fin de incrementar el rendimiento de extracción del proceso de palmistería de la empresa Palmeras de Puerto Wilches S.A. Las condiciones de la reacción de hidrólisis enzimática (concentración de enzima y concentración de sustrato) fueron seleccionadas mediante un diseño experimental de tipo factorial 3<sup>2</sup>, usando la metodología de superficie de respuesta. El tiempo de reacción se seleccionó mediante el estudio de la cinética de la eficiencia de extracción.

Se encontró que el uso de la enzima Flavourzyme<sup>®</sup> en el proceso de extracción del aceite de la torta de palmiste, permitió aumentar el rendimiento de extracción en un 6,33%, lo que equivale a aumentar la eficiencia del proceso de palmistería en un 12,04%. La máxima eficiencia de extracción con Flavourzyme<sup>®</sup> (76,66%) se alcanzó usando una concentración de sustrato de 34%, de enzima 10% en un tiempo de 4h.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Janeth Aide Perea Villamil.

## SUMMARY

### TITLE

**ENZYME APPLICATION IN THE EXTRACTION PROCESS OF THE PALM KERNEL CAKE OIL\***

### AUTHOR

JUAN FERNANDO DURÁN ORTEGA\*\*

### KEY WORDS

Palm kernel oil, palm kernel cake, cellulase, protease, extraction yield.

### DESCRIPTION

The extraction process of palm kernel oil could be carried out by pressure or by solvents. In Colombia, expelling pressing method is the most frequently used, with an extraction efficiency of 40%, approximately. The losses, associated with this process, are due to the oil (13%) retained by the cells walls in the palm kernel cake, the main residue from the expelling process.

In this work, the use of cellulolytic (Celuclast ®, Celubrix ® and Viscozyme ®) and protease enzymes (Flavourzyme ®) were evaluated in the extraction process of the residual oil from the palm kernel cake, in order to increase extraction efficiency in Palmeras de Puerto Wilches SA company. The enzymatic hydrolysis reaction conditions (enzyme concentration and substrate concentration) were selected by a factorial experimental design type 3<sup>2</sup>, using a response surface methodology. The reaction time was selected studying the kinetics of the oil extraction efficiency.

It was found the enzyme Flavourzyme® increased the extraction yield in a 6,33%, which is equivalent to enlarge extraction efficiency in the palm kernel oil process in a 12,04%. The highest extraction efficiency whit Flavourzyme® (76.66%), was achieved using a substrate concentration of 34%, 10% of enzyme and a reaction time of 4h.

---

\* Research Work, Chemistry Thesis

\*\* Faculty of Science. Department of Chemistry. Directed by Janeth Aide Perea Villamil.

## INTRODUCCIÓN

La agroindustria del aceite de palma y de palmiste abarca el 30% de la producción mundial de aceites vegetales con más de 47,91 millones de toneladas de aceite producidas en el año 2008 (ISTA, 2009). A nivel mundial Colombia es el quinto productor de aceite de palma, después de Indonesia, Malasia, Tailandia y Nigeria; mientras que a nivel de Latinoamérica es el mayor productor con 777,548 toneladas de aceite producidas en 2008 y más de 350 mil Ha sembradas (Silva, 2009), lo que ha convertido a esta industria en una de las principales opciones de crecimiento económico para el país, debido no solo al amplio mercado de los aceites vegetales como productos de consumo en la canasta familiar sino a su uso como biocombustibles.

En Colombia el proceso de extracción del aceite crudo de palma se realiza mediante métodos mecánicos y el del aceite de palmiste se lleva a cabo por presión o por solventes, procesos en los cuales se alcanza una extracción de 40 y 50% respectivamente, lo que se traduce en pérdidas económicas para las plantas extractoras en el caso de la extracción por prensado y problemas ambientales en la extracción por solventes. Gran parte de las pérdidas asociadas al proceso de extracción se deben a la cantidad de aceite retenido por la pared celular de las fibras residuales obtenidas en diferentes etapas del proceso, como son las tusas, la fibra de torta de prensas y la torta de palmiste (Fedepalma, 2008).

Para aumentar el rendimiento de extracción de aceites, en la última década se ha incrementado la utilización de enzimas como alternativa para mejorar la eficiencia de los procesos. De este modo la tecnología enzimática se ha utilizado en procesos de extracción de aceites vegetales de girasol, de pipas de uva, de coco (Freitas *et al.* 2003), de soya (Khashyap *et al.* 2007), de maíz (Lin Nyam *et al.* (2009) y de

oliva (Kashyap, 2006, Guerra, 2003, Najafian *et al.* 2009). Esta tecnología también es una alternativa como pretratamiento en la extracción con solventes, reduciendo los requerimientos en cuanto al uso de estos compuestos.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de enzimas celulolíticas y proteasas, sobre la extracción del aceite que queda retenido en la torta de palmiste. La torta de palmiste utilizada se obtuvo del proceso de extracción mecánica por expeler aplicado por la empresa Palmeras de Puerto Wilches en la línea de palmistería. El uso de las enzimas permitió la extracción del 71% del aceite presente en la torta, lo que equivale a aumentar la eficiencia de del proceso al pasar de 38 a 46% de aceite de palmiste extraído.

Para el desarrollo de este proyecto, se contó con recursos propios provenientes del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos adscrito a la Escuela de Química de la UIS y con el apoyo de la empresa Palmeras de Puerto Wilches que suministró las muestras de torta de palmiste, las enzimas celulolíticas y permitió conocer sus procesos de extracción.

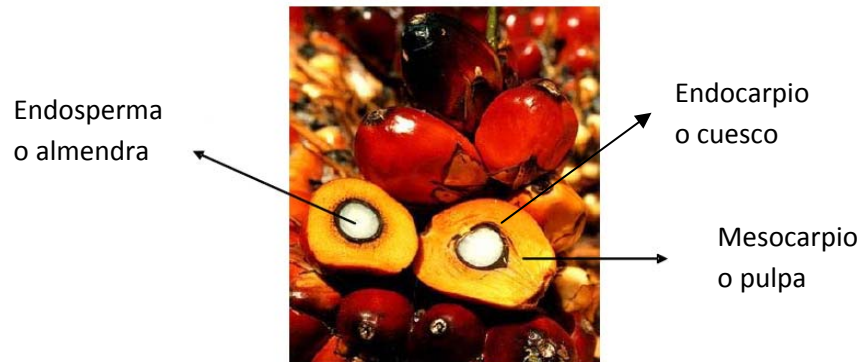
## 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 1.1 LA PALMA AFRICANA DE ACEITE

La palma de aceite es una monocotiledónea, incluida en el orden *Palmales*, familia *Palmaceae*, género *Elaeis* y especie *E. guineensis*. Además de la especie *Elaeis guineensis* de origen africano, se encuentra la especie *oleifera* de origen americano, comúnmente conocida como nolí o palma americana de aceite, nativa de Colombia, Panamá y Costa Rica. De la especie *Elaeis guineensis* se presentan seis variedades entre las que se encuentran la *albescens*, la *dura*, la *pisifera*, la *nigrescens*, la *tenera* y la *virescens*. La variedad cultivada en casi todas las plantaciones del mundo desde 1961 es el híbrido *tenera* (cruce entre *dura* y *pisifera*) del cual se obtiene el más alto rendimiento de aceite por Hectárea de todos los cultivos de oleaginosas (4,5 t de aceite/ Ha) (Evans, 2000; Sambanthanmurthi *et al.*, 1991).

El fruto de la palma de aceite está constituido por una capa delgada llamada exocarpio que rodea el mesocarpio o pulpa de la cual se obtiene el aceite crudo de palma el cual es de color rojizo y por el endocarpio o cuesco que encierra el endosperma o almendra de la que se obtiene el aceite de palmiste (Figura 1).

El palmiste o almendra representa aproximadamente entre el 4 y 6% del peso del racimo de fruta fresca y tiene un contenido total de aceite que varía entre 47 y 50%; razón por la cual se considera como un producto importante del proceso de extracción del fruto de la palma (Wambeck, 2003).



**Figura 1.** Fruto de la palma de aceite

## **1.2 EL ACEITE DE PALMISTE Y SU PROCESO DE EXTRACCIÓN**

El aceite de palmiste tiene características diferentes a las del aceite rojo de palma y se asemeja a las características del aceite de coco, presentando ácidos grasos de cadena media (C:8-C:14), que lo hacen atractivo para la industria de detergentes y emulsificantes así como para la industria de alimentos y biocombustibles (Young, 1983; Thin, 1985).

En el caso de la industria de alimentos, el aceite de palmiste posee una amplia variedad de aplicaciones debido a sus propiedades especiales de fusión por ser una grasa láurica y a que es altamente saturado en comparación con otros aceites, razón por la que no requiere de hidrogenación. Esta grasa especial, es de amplio uso en la fabricación de productos alimenticios como helados y margarinas, además de usarse como sustituto de la manteca de cacao en los productos de confitería.

El proceso de extracción del aceite de palmiste se lleva a cabo de forma separada a la del aceite de palma y se desarrolla en varias etapas que comprenden: la molienda de las nueces en pequeñas partículas, el calentamiento de las nueces y



finalmente la extracción. Actualmente existen tres procesos de extracción diferentes, el proceso de extracción mecánica por expeler, la extracción directa por solventes como el éter de petróleo y el hexano y por último la extracción por pre-prensado seguida de la extracción por solventes. La extracción por solventes puede a su vez dividirse en tres procesos unitarios que consisten en el pretratamiento del palmiste, la extracción del aceite y por último la recuperación del solvente del aceite y de la torta. Este método de extracción, aunque es muy efectivo y permite obtener eficiencias de hasta 98 %, es utilizado únicamente por las grandes plantas extractoras debido a su alto costo y al complicado manejo de estos solventes (Tang y Teoh, 1985).

Por otro lado, el proceso de extracción por prensado que es el más utilizado a nivel de pequeñas plantas extractoras y a su vez el más utilizado en Colombia, consta de las siguientes etapas: (Wambek, 2003)

- **Preparación de la materia prima:** Esta etapa inicial del proceso se lleva a cabo en un silo secador de almendras. El palmiste es recibido y acondicionado a una temperatura entre 60 y 70 °C, con humedad entre 4 y 5% e impurezas en un nivel inferior al 10%.
- **Prensado:** Las almendras son conducidas a unas prensas monotornillo a través de recipientes o tolvas que sirven para asegurar una alimentación permanente y homogénea. Por medio de este prensado se obtiene un residual de aceite de alrededor del 10% en la torta, pero si se utiliza doble prensado se pueden obtener residuales entre 7 y 8%.
- **Acondicionamiento de residuos fibrosos:** El material prensado de almendras de palma se descarga en forma de trozos de torta dura y compacta, con el fin de ser usado para alimento de animales, haciendo una reducción previa del tamaño y convirtiéndolo en una harina fácilmente digerible.

- **Limpieza o purificación del aceite:** el aceite obtenido en las prensas contiene una cantidad relativamente alta de sólidos que deben ser retirados; estos sólidos se retiran inicialmente con un tamiz giratorio con una malla de retención de 40 mesh.

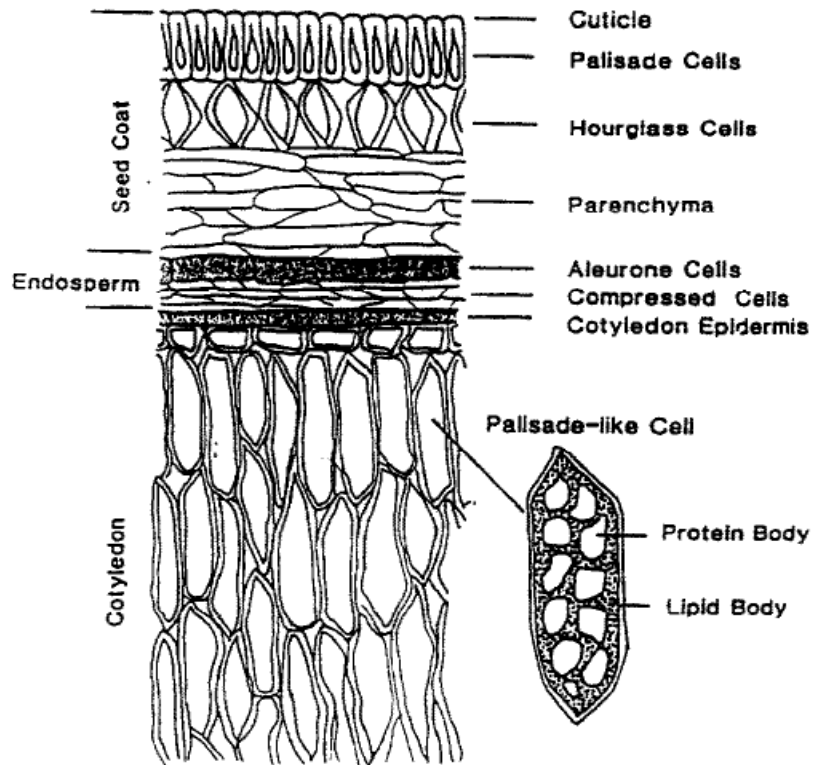
La torta de palmiste es el principal residuo de la extracción del aceite de palmiste y su composición varía de acuerdo con el proceso de extracción a partir del cual haya sido obtenida. La torta de palmiste obtenida del proceso de extracción mecánico contiene aproximadamente un 30% de fibra, ente 10 y 13% de aceite, aproximadamente 14 -15% de proteína y un alto contenido de minerales como calcio, fosforo, magnesio, cobre y cinc. Debido a su composición nutricional, la torta de palmiste es muy utilizada como alimento animal, principalmente de ganado vacuno en donde se ha encontrado que una dieta basada en este producto puede aumentar los niveles de productividad de leche (Hishamuddin, 2001).

### **1.3 ESTRUCTURA DE LAS OLEAGINOSAS**

La principal característica de las células de las semillas oleaginosas es la presencia de organelos celulares llamados cuerpos lipídicos y cuerpos proteicos, los cuales contienen respectivamente la mayoría del aceite y proteína presentes en el grano, como se observa en la Figura 2, que muestra la estructura microscópica de la semilla de soya, que es muy similar a la estructura de la mayoría de semillas oleaginosas.

Los cuerpos proteicos o granos aleurónicos varían en tamaño dependiendo de la semilla oleaginosa (entre 2 y 20  $\mu\text{m}$ ) y contienen entre 60-70% de toda la proteína contenida en las semillas, en tanto, que los cuerpos lipídicos o también conocidos como oleosomas que son el principal deposito celular de los lípidos varían en

tamaño en un rango de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro para la mayoría de semillas oleaginosas.



**Figura 2.** Estructura del cotiledón y la endosperma de los granos de semillas oleaginosas. (Rosenthal *et al.*, 1996) Tomado de: página 403.

A partir de estudios de microscopía se ha demostrado además que los cuerpos lipídicos en las semillas oleaginosas, están inmersos en un entorno citoplasmático presumiblemente compuesto por proteínas, de manera que los espacios entre los cuerpos proteicos presentes en las células son llenados posteriormente por los cuerpos lipídicos y el entorno citoplasmático.

Las células de las semillas oleaginosas están rodeadas por una pared celular conformada principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. La celulosa es un polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa que se

mantienen unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. Su configuración  $\beta$  le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales se unen 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 y Eriksson 1985).

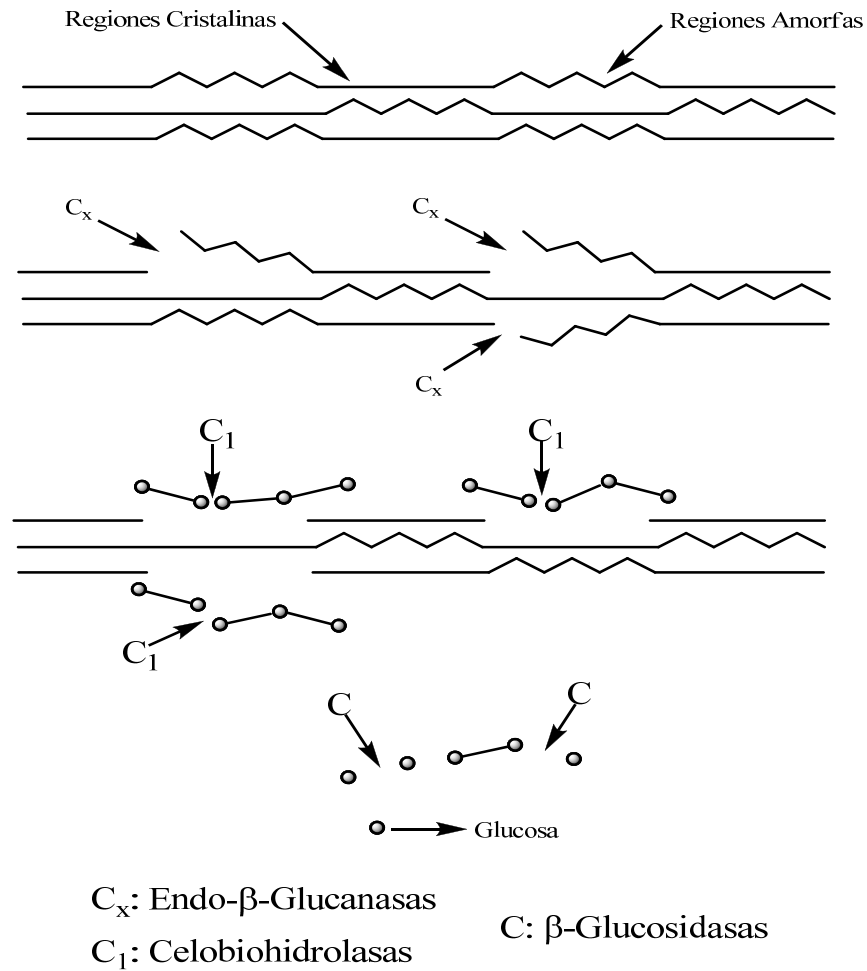
#### **1.4 REACCIONES DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LAS CÉLULAS OLEAGINOSAS**

Las celulasas son proteínas obtenidas de procesos naturales de fermentación capaces de degradar la celulosa. Se encuentran formado un complejo enzimático que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa y que está conformado por tres tipos de enzimas: endoglucanasa o endocelulasa (1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa E.C.3.2.1.4), exoglucanasa o celobiohidrolasa (1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasa E.C.3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa o celobiasa ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasa E.C.3.2.1.21) (Bhat y Bhat, 1997; Mani *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2003).

El mecanismo de hidrólisis catalítica mediante el cual ocurre la reacción de degradación de la celulosa a glucosa por parte de los componentes de las celulasas que producen la ruptura del enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico del polímero celulósico, se presenta en la Figura 3.

Durante la primera etapa de la reacción, las endoglucanasas hidrolizan los enlaces internos del polímero de celulosa específicamente en las regiones amorfas o en la superficie de las microfibras, produciendo oligosacáridos de menor peso molecular, celodextrinas y celobiosa. Posteriormente las exoglucanasas inician la hidrólisis en los extremos no reductores de la cadena, presentando una alta

actividad por la celulosa amorfa para producir celobiosa y finalmente las  $\beta$ -glucosidasas completan la degradación de la celulosa catalizando la hidrólisis de celobiosa a glucosa (Wood, 1989; Irwin *et al.*, 1993; Heikinheimo, 2002).



**Figura 3.** Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa. (Nidetsky *et al.*, 1993).

En cuanto a las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por las enzimas proteolíticas en las células de semillas oleaginosas están relacionadas con la hidrólisis de la membrana de los cuerpos lipídicos, los cuales están conformados

por un tipo de proteínas de bajo peso molecular (1500-2600 Da) llamadas oleosimas que son las principales responsables de mantener la integridad de los cuerpos lipídicos durante el proceso de maduración de las semillas oleaginosas.

## **1.5 PROCESOS ENZIMÁTICOS USADOS EN LA EXTRACCIÓN DE ACEITES COMESTIBLES.**

La extracción de aceites vegetales provenientes de semillas oleaginosas se ha caracterizado principalmente por incluir procesos térmicos y mecánicos que facilitan la extracción del aceite mediante la degradación de las paredes celulares de las semillas; sin embargo, los procesos de extracción de aceite pueden verse favorecidos por la hidrólisis parcial de las paredes de las células del cotiledón haciendo permeable su estructura y facilitando la extracción del aceite mediante el uso de las enzimas hidrolíticas apropiadas como celulasas, hemicelulasas y pectinasas. El uso de enzimas proteolíticas también ha tenido gran importancia en estos procesos ya que éstas se encargan de hidrolizar principalmente las proteínas de las membranas celulares así como las del interior del citoplasma y las membranas de los cuerpos lipídicos.

En los últimos años el uso de enzimas de tipo celulolíticas y proteolíticas para mejorar la extractabilidad del aceite en diferentes semillas ha incrementado notoriamente, aplicándose este tipo de tecnología a la extracción de aceite en varias semillas y frutos oleaginosos como el maní (Sharma *et al.*, 2002), las semillas de girasol (Sineiro *et al.*, 1998), el germen de maíz (Bocevaska *et al.*, 1993), semillas de colza (Zhang *et al.*, 2007), entre otras.

Los procesos enzimáticos son de gran interés en las industrias de extracción de aceites debido a su alta especificidad y bajas temperaturas de operación, razón

por la cual, se han implementado para mejorar la extracción por prensado, aumentar los rendimientos de la extracción por solventes y en la optimización de la extracción acuosa (Ranalli y Ferrante, 1996; Ranalli y Lazzari, 1996; Ranalli y De Mattia, 1997).

Uno de los procesos de extracción sobre el cual se han reportado más trabajos en los últimos años es el de extracción enzimática acuosa que se caracteriza por ser un proceso libre de solvente que además permite recuperar las proteínas producto de las reacciones de hidrólisis. Rosenthal *et al.* (2001) implementaron la extracción acuosa enzimática de aceite y proteína de soya, para este fin, evaluaron diferentes celulasas y proteasas comerciales, encontrando que las proteasas son las únicas que muestran un incremento significativo en la eficiencia de extracción del aceite de 48,5 a 58,7%. Posteriormente, Freitas *et al.* (2003) implementaron este mismo método para la extracción del aceite de coco, usando diferentes enzimas comerciales de tipo: Celluclast, Cellubrix, Termamyl, Viscozyme, Neutrasa y Proteasa y alcanzaron en todos los casos un incremento en la eficiencia de extracción de aceite en comparación con los procesos acuosos convencionales.

Por otro lado, Najafian *et al.* (2009) emplearon las enzimas industriales Pectinex Ultra SP-L y Pectinase-16021 para incrementar la eficiencia en el proceso de extracción acuosa de aceite de oliva virgen de 0,9 a 2,4%; mientras que Jiang *et al.* (2009) publicaron el uso de una proteasa alcalina en la extracción de aceite de maní para mejorar la eficiencia de la extracción y obtener un hidrolizado rico en proteínas que son de gran interés en la industria de alimentos.

En este mismo año, Moreau *et al.* (2009) optimizaron la extracción acuosa del aceite de germen de maíz utilizando enzimas celulasas acídicas y proteasas alcalinas para obtener eficiencias de 80-90% para germen de maíz molido; mientras que Lin *et al.* (2009) optimizaron la extracción de aceite de semillas de

melón *Kalahari* usando separadamente las lipasas comerciales de Neutrasa y Flavourzyme, para obtener eficiencias de 58,7 y 71,6% respectivamente.

Otro novedoso proceso de extracción en el que se ha implementado la tecnología enzimática es el de fraccionamiento en tres fases (TTP), una técnica muy usada para la purificación de proteínas y que fue evaluada por Gaur *et al.* (2007) para la extracción de aceite de semillas de mango, soya y aceite. Este proceso consiste en la extracción simultánea con butanol y sulfato de amonio para obtener tres fases: Una fase que contiene el aceite en el butanol, una fase acuosa y una fase intermedia entre estas dos fases que contiene la proteína. El proceso fue optimizado mediante el pretratamiento de las muestras con preparaciones comerciales de proteasas y permitió obtener eficiencias de extracción de aceite de 98% para soya, 86% para el arroz y 79% para la semilla de mango. Esta misma técnica de extracción también había sido publicada previamente por Shah *et al.* (2004) en la obtención de aceite de semillas de jatrofa, reportando eficiencias del 97% mediante el uso de proteasas fúngicas.

A pesar del desarrollo de estos nuevos procesos libres de solventes, la optimización del proceso de extracción con hexano también ha sido objeto de estudio, debido a que es un proceso más eficiente y a que un gran número de industrias disponen de esta tecnología. La optimización del proceso de extracción con hexano del aceite de soya, mediante pretratamiento con diferentes enzimas celulolíticas comerciales, fue desarrollada por Sineiro *et al.* (1998), quienes reportaron un incremento en la extractibilidad del aceite entre 8-10%. Más recientemente, Khashyap *et al.* (2007) reportaron para la extracción de aceite de soya con hexano una eficiencia superior al 99% después de usar el pretratamiento enzimático y una disminución apreciable en el tiempo de extracción (de 28 a 14 h). De igual manera, este procedimiento ya había sido implementado en la extracción de semillas de canola obteniendo resultados similares (Sosulski *et al.*, 1988).



Finalmente, las aplicaciones de la hidrólisis enzimática al convencional proceso de prensado han sido reportadas por varios autores quienes han encontrado un incremento notable en el rendimiento de extracción. Uno de estos trabajos fue el realizado por Domínguez *et al.* (1993), quienes investigaron el uso de enzimas con actividad celulasa, hemicelulasa, pectinasa,  $\beta$ -glucanasa y xilanasas como pretratamiento en la extracción por prensado del aceite de girasol. En este estudio se empleó la metodología de superficie de respuesta tomando como variables independientes la relación enzima sustrato y el tiempo de tratamiento enzimático. Evaluaron el efecto de estas variables sobre la eficiencia del prensado, la digestibilidad de la proteína, la fibra y el color de la harina y encontraron que la eficiencia de extracción por prensado fue superior para las semillas de girasol con tratamiento enzimático obteniéndose un 13% de aceite más que en el prensado sin tratamiento.

Coil *et al.* (1996) también exploraron el uso de enzimas como tratamiento previo al prensado en frío, pero en su caso la materia prima fue la cascara de limón para extraer el aceite esencial, logrando una eficiencia del 61% en la extracción. Otros autores que usaron la tecnología enzimática para mejorar el proceso extractivo por prensado de aceites vegetales, fueron Zúñiga *et al.* (2003), quienes utilizaron enzimas comerciales con actividad celulasa, hemicelulasa y pectinasa para mejorar la eficiencia de la extracción por prensado, debido a que la torta residual del proceso contiene entre un 10% y 12% de aceite en base seca. Evaluaron el efecto de la relación enzima/sustrato, temperatura y mezcla durante la hidrólisis usando dos mezclas de enzimas comerciales. Los autores encontraron que hubo un incremento en la eficiencia de la extracción para ambas mezclas, sin embargo una de estas mostró un incremento por encima del 98% de aceite extraído, dejando un porcentaje de aceite residual en la torta de un 1,5%, estos resultados se evaluaron en una planta a escala industrial. Todas las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a una temperatura de 40 °C, durante 6 h, con una concentración de sustrato al 35% en peso, bajo estas condiciones evaluaron la

variable relación enzima/sustrato, encontrando que la máxima eficiencia de extracción fue del 72% y se alcanzó a una concentración del 1% (p/p) de enzima sobre el contenido de sustrato.

Aunque en Colombia no se han reportado estudios sobre la implementación de tecnología enzimática en la extracción de aceites vegetales, si se han realizado algunas investigaciones encaminadas a obtener hidrolizados de celulosa para la obtención de biocombustibles además de otros componentes útiles del tejido de las plantas y en el procesamiento de cereales y materiales vegetales. Uno de los estudios que ha tenido más auge debido a la necesidad de combustibles no fósiles es la obtención de etanol a partir de la biomasa, como la caña de azúcar, el almidón de yuca, y residuos orgánicos. La hidrólisis enzimática del bagazo de caña (González, 2007; Cuadros y Celis, 2007) y del parénquima de la hoja de palma africana (Espítatela y Rodríguez, 2004) son algunos de los estudios que se han hecho en la Universidad Industrial de Santander para la obtención de bioetanol, y demuestran que la hidrólisis enzimática es eficiente con las condiciones adecuadas de pH, temperatura y relación enzima sustrato. Esto confirma que la hidrólisis enzimática es una alternativa verde a la extracción por solventes y por prensado.

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 MATERIALES Y REACTIVOS

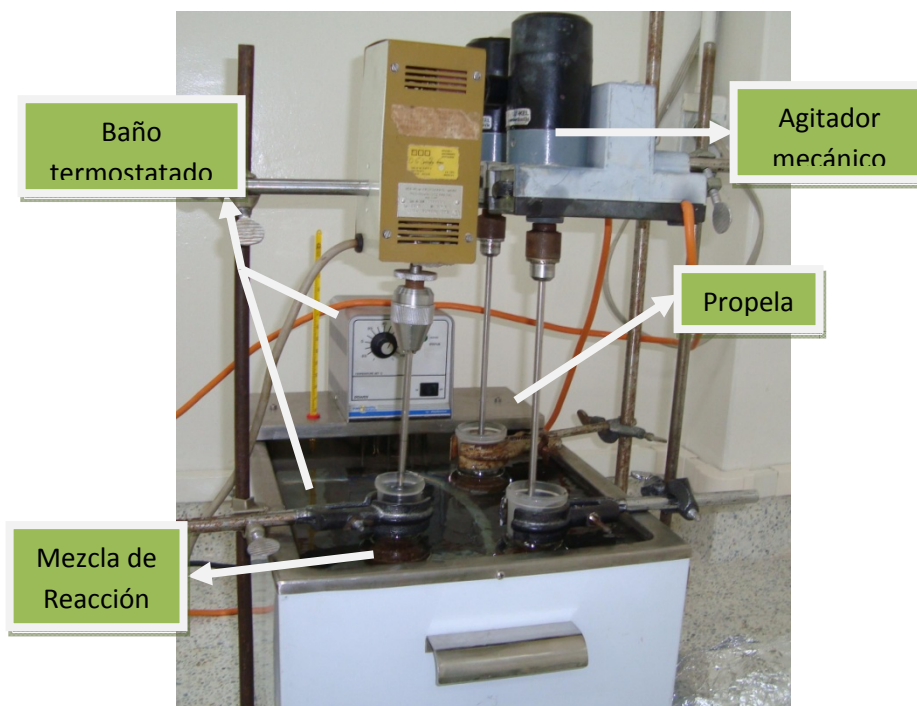
**2.1.1 Reactivos.** Los reactivos empleados hexano, ácido cítrico, hidrógeno fosfato de sodio, fueron grado analítico; las enzimas Celluclast 1.5 L ®, Cellubrix L ®, Viscozyme L ® y Flavourzyme ® fueron suministradas por Coldanzimas LTDA y Palmeras de Puerto Wilches S.A.

**2.1.2 Equipos y material de laboratorio.** Los equipos usados fueron: centrífuga *Rottotfix 32* marca *Hettich*, equipo Soxhlet E&Q, balanza analítica Mettler-Toledo AJ150, estufa *Binder*, baño termostático VWR, medidor de pH HI 223 marca *Hanna Instruments*, placa de calentamiento MR Hei-Tec marca *Heidolph*, prensa vulcanizadora marca *Berstorf*.

**2.1.3 Muestras.** Las muestras de torta de palmiste fueron tomadas en la planta extractora de aceite en Palmeras de Puerto Wilches en el proceso de palmistería de la planta de beneficio. Se realizó un muestreo hasta tener una muestra representativa de 5 kg. La muestra obtenida fue trasladada al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA y almacenada a 10 °C. Una vez en el laboratorio la muestra fue molida hasta reducir el tamaño de partícula a 0,3 mm y pasada a través de un tamiz malla 50 de 0,3 mm de diámetro.

## 2.2 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en un reactor por lotes con capacidad de 100 mL, el cual consiste en un baño termostataado que permitió mantener la temperatura constante sobre la masa reaccionante con un margen de error de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ , un sistema de agitación de propela marina con un diámetro de 3,5 cm (Figura 4).



**Figura 4.** Montaje de reacción de la hidrólisis enzimática.

En todas las reacciones se empleó como sustrato torta de palmiste previamente tratada como se describe en el Numeral 2.1.3, mezclada con solución tampón citrato 0.1 M y de pH 5.0 La mezcla de reacción se ajustó a un volumen de 60 mL, se incubó a la temperatura requerida, con una agitación de 200 rpm durante el tiempo establecido en cada experimento. Finalizado este tiempo se procedió a

realizar la extracción del producto de reacción usando la metodología seleccionada.

**2.2.1 Selección de la metodología de extracción del aceite.** Se emplearon dos metodologías que tuvieron en común el tratamiento con la enzima, pero que se diferenciaron entre sí en el método de extracción del aceite, después del proceso enzimático. En la primera metodología se usó centrifugación para separar el aceite de la mezcla de reacción, a ésta se le denominó en adelante extracción por centrifugación (EC) y en la segunda metodología se usó extracción por prensado y se le denominó EP.

Las enzimas utilizadas fueron las celulasas Celluclast, Celubrix y Viscozyme. El tratamiento enzimático se llevó a cabo tal como se describe en el Apartado 2.3.1, a 50°C, 200 rpm durante 3 h. Con el primer método, la mezcla obtenida se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min, se separó el sobrenadante y el residuo sólido se secó a 105 °C durante 2 h, para luego extraer por Soxhlet el aceite contenido en él.

Con el segundo método la mezcla obtenida después del tratamiento enzimático, se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min, se separó el sobrenadante y el residuo sólido se secó a 105 °C durante 2 h. El residuo seco se prensó a 60°C y 1500 psi, para luego extraer por Soxhlet el aceite remanente contenido en el residuo sólido.

La eficiencia de extracción se midió por diferencia entre el contenido total de aceite en la torta de palmiste y el aceite contenido en los residuos sólidos finales, y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de extracción} = \frac{13,31\% - \left( \frac{W_{\text{Aceite residual}}}{W_{\text{Muestra}}} * 100 \right)}{13,31\%} * 100$$

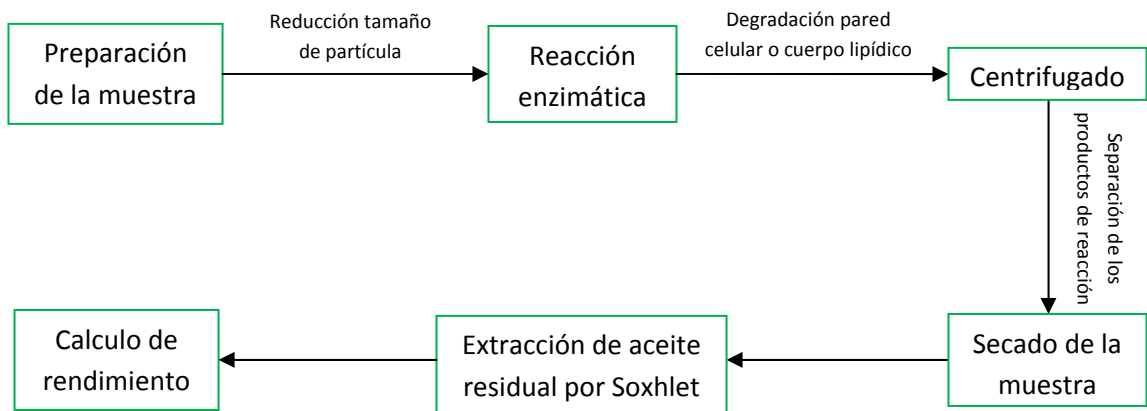
Donde:

13,31% es el porcentaje en peso de aceite contenido en la torta de palmiste sin tratamiento enzimático.

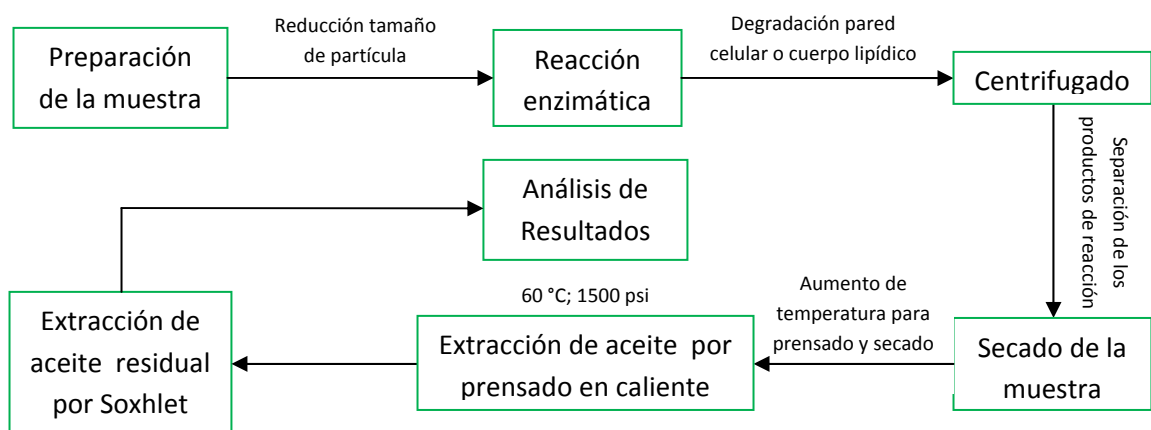
$W_{\text{Aceite residual}}$ : Es el peso en gramos del aceite que contiene el residuo sólido de la reacción obtenido después de realizar el tratamiento enzimático a la muestra.

$W_{\text{Muestra}}$ : Es el peso en gramos de la muestra.

Se seleccionó el método con el cual se logró la mayor eficiencia en la extracción de aceite. En las Figuras 5 y 6 se relacionan las metodologías utilizadas en los dos casos.



**Figura 5.** Metodología de extracción por centrifugación (EC).



**Figura 6.** Metodología de extracción por prensado (EP).

**2.2.2 Selección de la enzima.** Se ensayaron cuatro enzimas comerciales con diferente actividad enzimática en las condiciones de pH y temperatura propuestas por el proveedor, tal como se señala en la Tabla 1. En todos los casos la concentración de sustrato fue 25% y la de enzima 10%. El tiempo de reacción fue de 3 h. Se seleccionó la enzima con la cual se obtuvo la mayor eficiencia en la extracción del aceite de la torta de palmiste.

**2.2.3 Selección de las condiciones de reacción.** Con la enzima seleccionada se realizó un diseño experimental de tipo *Factorial de nivel 3<sup>2</sup>* para evaluar el efecto de concentración de sustrato, y de la concentración de enzima, usando como variable respuesta la eficiencia de extracción del aceite. Los datos obtenidos se analizaron usando la metodología de superficie de respuesta procesada por el software StatGraphics Centurion XV<sup>®</sup>. En la Tabla 2 se presentan las variables independientes con los códigos de los niveles correspondientes al diseño experimental.

**Tabla 1.** Enzimas comerciales evaluadas y condiciones de reacción.

Enzima	Actividad	pH	Temperatura, (°C)
<b>Celluclast</b>	Celulasa, celobiohidrolasa	5.0	55
<b>Cellubrix</b>	Celulasa y celobiohidrolasa	4.8	40
<b>Viscozyme</b>	Arabanasa, Celulasa, $\beta$ -glucanasa, Hemicelulasa, Xilanasas y Pectinasa	5.0	50
<b>Flavourzyme</b>	Proteasa	5.0	50
<b>Viscozyme y Flavourzyme 50:50</b>	Arabanasa, Celulasa, $\beta$ -glucanasa, Hemicelulasa, Xilanasas y Pectinasa Proteasa	5.0	50

**Tabla 2.** Variables independientes.

Variables independientes	Símbolo	Códigos de los niveles		
		1	0	-1
<b>Concentración de sustrato</b>	[S]*	25%	17%	10%
<b>Concentración de enzima</b>	[E]*	10%	5%	1%

**2.2.4 Cinética de la eficiencia de extracción.** Con la enzima y en las condiciones seleccionadas previamente, se desarrolló la reacción a tiempos de 3, 6, 9, 12 y 15 h. En todos los casos se midió la eficiencia de la extracción.



## **2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

**2.3.1 Análisis de humedad.** Para la medición de la humedad se siguió el método A.O.A.C. 7.003/84 y 930.15/90 adaptados. Se pesaron entre 1 y 2 g de muestra, se calentaron a 105°C hasta lograr peso constante. La muestra se dejó enfriar en el desecador y finalmente se pesó para calcular el contenido de humedad.

**2.3.2. Determinación del contenido de cenizas.** Se determinó por el método estandarizado AOAC 972.15.

**2.3.3. Análisis de grasa.** La grasa total se midió mediante el método estandarizado A.O.A.C 7.060/84. Se pesaron 2 g de muestra de torta de palmiste, los cuales fueron sometidos a un proceso de hidrólisis química utilizando HCl 1:1. La mezcla obtenida se lavó hasta eliminar cloruros y posteriormente se secó a 105°C. La muestra seca se sometió a un proceso de extracción con Soxhlet durante 8 h usando hexano como solvente. El aceite obtenido de la extracción, se pesó para calcular el porcentaje de aceite de la muestra.

**2.3.4. Determinación del contenido de proteína total.** Se cuantificó por el método Kjeldahl siguiendo el procedimiento estandarizado AOAC 970.22. Una muestra de 0,5 g de palmiste se llevó a digestión durante 3 h usando una tableta de catalizador Kjeldahl y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. A la solución obtenida se agregaron 30 mL de NaOH 32% y 50 mL de agua destilada y se llevó a destilación por arrastre de vapor. El hidróxido de amonio liberado de la destilación, se disolvió en 50 mL de ácido bórico hasta completar 200 mL. El destilado se tituló con HCl 0,1 N. El contenido de proteína se calculó usando el factor de conversión de 6,25.

**2.3.5. Determinación del contenido de fibra.** Se determinó de acuerdo con el método de fibra cruda estandarizado de la AOAC 930.20. Una muestra desengrasada se llevó a digestión durante 3 min, usando 100 mL de HCl (1,3%) y

5 gotas de alcohol isoamílico. La muestra obtenida se filtró, se lavó, se llevó a pH neutro y finalmente se llevó a la estufa por 2 h y posteriormente se pesó ( $W_A$ ). Posteriormente el residuo obtenido se calcinó a 550 °C y finalmente se pesó ( $W_B$ ). El porcentaje de fibra se calculó utilizando la siguiente relación, donde  $W_{mi}$  es el peso de muestra inicial:

$$\%Fibra = \frac{W_A - W_B}{W_{mi}} * 100$$

### **3. RESULTADOS Y ANÁLISIS**

#### **3.1 CARACTERIZACIÓN DEL PALMISTE Y LA TORTA DE PALMISTE**

El palmiste, la torta de palmiste y sus partes constituyentes (cuesco y esdosperma), fueron caracterizados en cuanto a su composición química (tabla 3), observándose que el palmiste contiene 52,25% de aceite y 10,10% de proteína, mientras que en el cuesco se encuentra el mayor porcentaje de fibra (68,93%). La torta de palmiste presentó un 13,31% de aceite remanente del proceso de extracción por expeler. Estos resultados permiten establecer que en las fracciones de cuesco presentes en la torta de palmiste se encuentra la mayor cantidad de fibra a hidrolizar por las enzimas celulolíticas y en las fracciones de endospermo la mayor cantidad de proteína a hidrolizar por la proteasa.

#### **3.2 SELECCIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE**

Para seleccionar la metodología más adecuada para la extracción del aceite de la torta de palmiste, se emplearon las tres celulasas comerciales mencionadas en la metodología. En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que al usar el método de extracción por centrifugado (EC), la eficiencia en todos los casos es similar independiente de la enzima utilizada y varía entre 29 y 32%. En la extracción por prensado los valores de extracción son mayores y alcanzan niveles de eficiencia del 70%, sin embargo, salvo para la enzima Cellubrix los valores obtenidos son similares.

**Tabla 3.** Composición química del palmiste, palmiste sin cuesco, cuesco y torta de palmiste.

	<b>Palmiste (%)</b>	<b>Palmiste sin cuesco (%)</b>	<b>Cuesco (%)</b>	<b>Torta de palmiste (%)</b>
<b>Aceite</b>	52,55±0,47	52,20±0,33	4,43±0,04	13,31±0,04
<b>Fibra</b>	14,25±0,08	10,86±0,08	68,93±0,25	29,02±0,11
<b>Humedad</b>	5,87±0,04	6,07±0,06	9,33±0,05	5,23±0,03
<b>Proteína</b>	11,42±0,05	10,00±0,04	2,20±0,08	13,43±0,06
<b>Cenizas</b>	1,92±0,04	1,79±0,04	1,23±0,01	3,08±0,06

Los resultados se presentan como el promedio ± la desviación estándar, para n=3.

**Tabla 4.** Efecto de la metodología aplicada sobre la eficiencia de extracción.

<b>Enzima</b>	<b>Extracción por centrifugado (% Aceite)</b>	<b>Extracción por prensado (%Aceite)</b>
<b>Celluclast®</b>	30,8±0,41	71,3±0,33
<b>Cellubrix®</b>	29±1	65±0,9
<b>Viscozyme®</b>	32,2±0,23	69±2

Los resultados se expresan cómo la media ± desviación estándar, para n=3.

La eficiencia de la extracción por prensado es 3,5 veces mayor que la obtenida al usar extracción por centrifugado. La baja eficiencia de la EC puede deberse a que el aceite liberado se queda adherido a las paredes de la fibra o dentro de la célula y no es posible liberarlo con la fuerza centrífuga aplicada. En el caso de la extracción por prensado la presión ejercida permite la liberación del aceite por difusión hacia la región extracelular. Por lo anterior, en adelante los experimentos realizados se llevaron a cabo usando la metodología EP, que incluye una etapa de prensado en caliente en las condiciones de presión y temperatura empleadas en la empresa Palmeras de Puerto Wilches.

### **3.3 SELECCIÓN DE LA ENZIMA**

Se evaluaron inicialmente de forma independiente las celulasas Celluclast, Viscozyme y la proteasa Flavourzyme que tienen actividades diferentes, y en todos los casos se obtuvieron resultados similares, es decir, eficiencia de extracción del orden del 69,92 - 71,31%. Por lo anterior, se ensayó una mezcla de celulasa-proteasa, en este caso, Viscozyme/Flavourzyme en proporción 50:50, se obtuvo una eficiencia de extracción de 71,34%, similar a la obtenida con las enzimas usadas en forma independiente.

Por lo anterior y teniendo en cuenta que el aceite está contenido en los cuerpos lipídicos cuya membrana está compuesta principalmente por proteínas, se seleccionó la proteasa Flavourzyme y con ésta se evaluaron las condiciones de reacción.

### **3.4 SELECCIÓN DE CONDICIONES DE REACCIÓN**

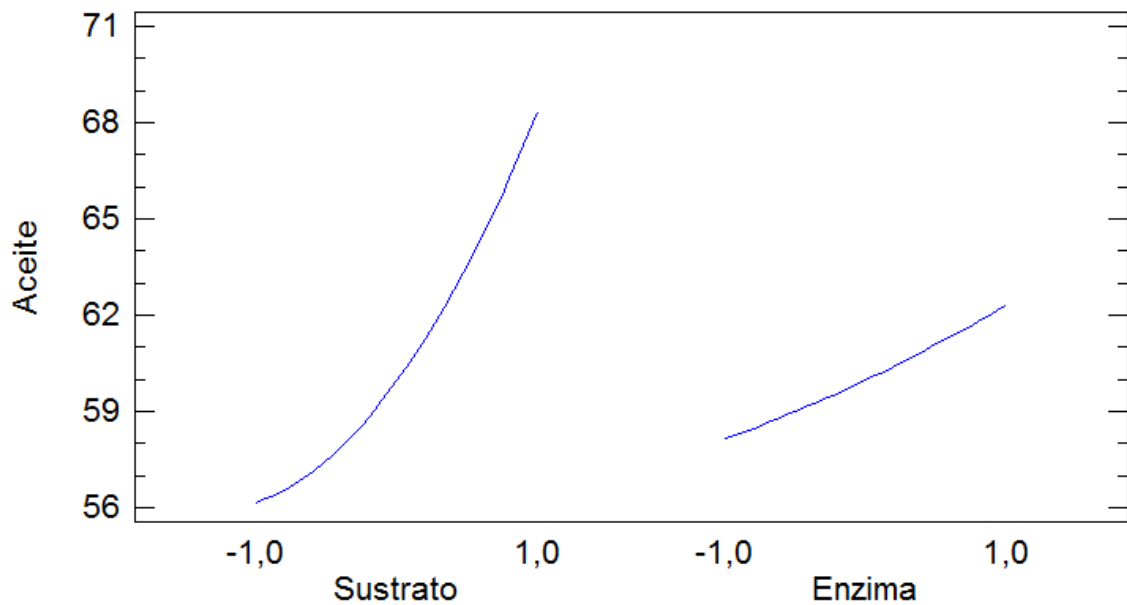
Para la selección de las condiciones de la reacción se mantuvo constante la temperatura (50 °C), la agitación (200 rpm) y el tiempo de reacción (4 h) y se variaron la concentración de sustrato (entre 10 y 25%) y la concentración de

enzima (entre 1 y 10%). En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la ejecución de los experimentos del diseño experimental, los cuales fueron analizados usando la metodología de superficie de respuesta que permite evaluar el efecto que tienen las variables independientes y la interacción entre ellas, sobre el eficiencia de la extracción del aceite de palmiste.

**Tabla 5.** Resultados del diseño experimental

<b>Experimento</b>	<b>Bloque de experimentos</b>	<b>Concentración de sustrato, %</b>	<b>Concentración de enzima, %</b>	<b>Eficiencia de extracción, %</b>
1	1	17	10	62,91
2	1	25	1	66,40
3	1	25	10	69,69
4	1	10	10	59,08
5	1	10	1	54,48
6	1	10	5	56,87
7	1	17	5	56,48
8	1	25	5	69,34
9	1	17	1	56,52
10	2	17	10	64,68
11	2	25	1	66,67
12	2	25	10	71,50
13	2	10	10	55,03
14	2	10	1	56,35
15	2	10	5	56,19
16	2	17	5	62,66
17	2	25	5	67,41
18	2	17	1	57,56

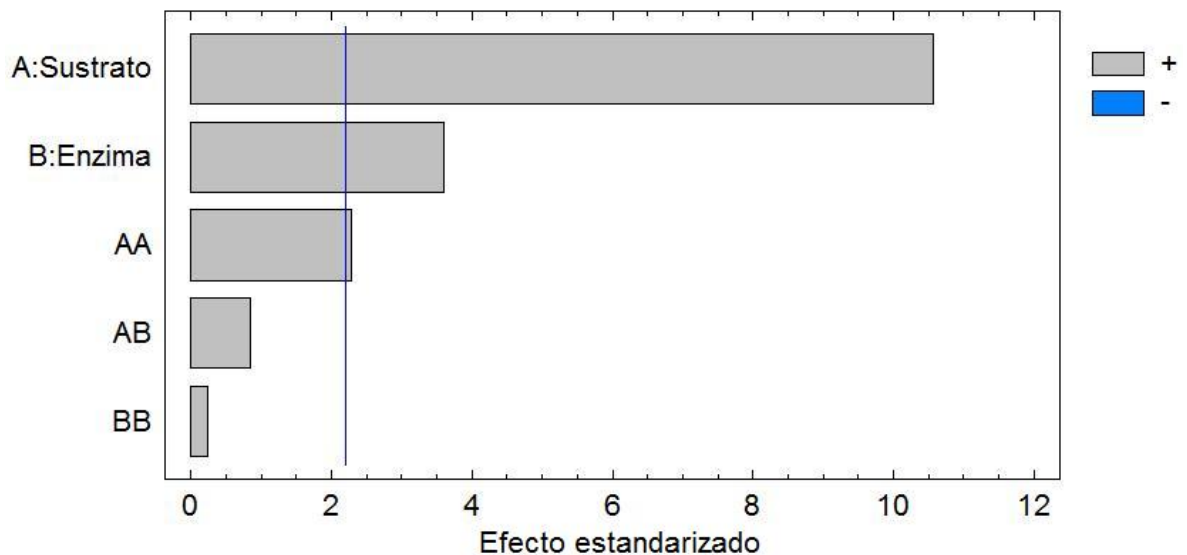
El diagrama de efectos principales (Figura 7) que presenta la variable respuesta en función de las variables independientes, muestra para ambas funciones una tendencia positiva, y pendientes que van en aumento en el avance de la función, lo que indica que la eficiencia de la extracción aumenta con los niveles en ambos casos.



**Figura 7.** Diagrama de efectos principales sobre la variable respuesta.

Esta tendencia se observa también en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 8) que muestra la importancia que tiene cada una de las variables independientes, por separado y conjugadas. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado (efecto estimado/error estándar). Se observa que la concentración de enzima y la concentración de sustrato tienen un efecto positivo sobre la eficiencia de extracción del aceite al igual que la interacción sustrato-sustrato. Las barras que corresponden a estas variables se extienden más allá de la línea azul lo que indica que presentan efectos significativos en un

nivel de confianza del 95 %; la interacción enzima-enzima y la interacción de la concentración sustrato-enzima tienen un efecto positivo pero no tienen un efecto significativo en el nivel de confianza del 95%.



**Figura 8.** Diagrama de Pareto.

Al aplicar el análisis de varianza ANOVA, utilizando el software Statgraphics Centurion XV<sup>®</sup>, se observó que el valor P que determina si los valores estimados para la varianza difieren significativamente, fue menor de 0,05 para los efectos lineales de concentración de sustrato (A) y concentración de enzima (B) y para el efecto cuadrático de concentración de sustrato (AA), lo que indica que estos factores afectan significativamente la variable respuesta dentro de un nivel de confianza del 95% (Ver Tabla 6). El valor de R-cuadrado, 92,3, indica que el ajuste del diseño experimental al modelo matemático es alto.



**Tabla 6.** Análisis de varianza para la eficiencia de extracción de aceite de palmiste.

Variable	SCM	CME	Relación F	Valor P
A:Sustrato	444,205	444,205	111,63	0,0000
B:Enzima	51,709	51,709	12,99	0,0041
AA	20,8392	20,8392	5,24	0,0429
AB	2,9282	2,9282	0,74	0,4093
BB	0,245025	0,245025	0,06	0,8086
bloques	2,19102	2,19102	0,55	0,4736
Error Total	<b>43,7731</b>	<b>3,97937</b>		

F: Prueba de significancia; P: Probabilidad de error; SCM: Suma de cuadrado medio; CME: Suma de cuadrado medio del error total.

A partir de estos resultados se estableció un modelo matemático polinomial para relacionar la variable respuesta con las dos variables independientes, como sigue:

$$\text{Rendimiento de Extracción} = \beta_0 + \beta_1(A) + \beta_2(B) + \beta_3(A)^2 + \beta_4(B)^2 + \beta_5(A * B)$$

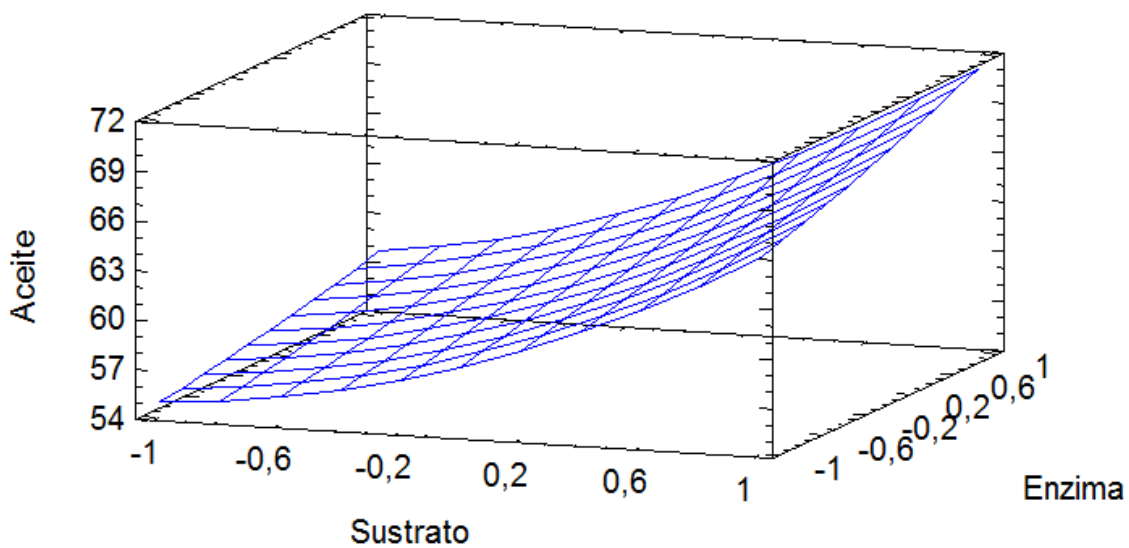
Donde  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  y  $\beta_5$  corresponden a cada una de los coeficientes descritos en la Tabla 7, A y B corresponden a la concentración de sustrato y de enzima, respectivamente.

Con los coeficientes de regresión calculados por el método de Gauss Newton (Tabla 7) se construyó la gráfica de superficie de respuesta estimada (ver Figura 9) que muestra la distribución de los valores ajustados a una distribución normal. La tendencia de la superficie de repuesta presentó un máximo en los niveles 1

para la enzima y 1 para el sustrato, que corresponden a concentraciones del 10 y 25%, respectivamente, con estos valores se observó que la máxima eficiencia predicha para la extracción del aceite fue de 71,27%. Este valor fue similar al obtenido al aplicar el proceso de optimización usando el software Statgraphics Centurion XV<sup>®</sup>.

**Tabla 7.** Coeficientes de regresión para la eficiencia de extracción.

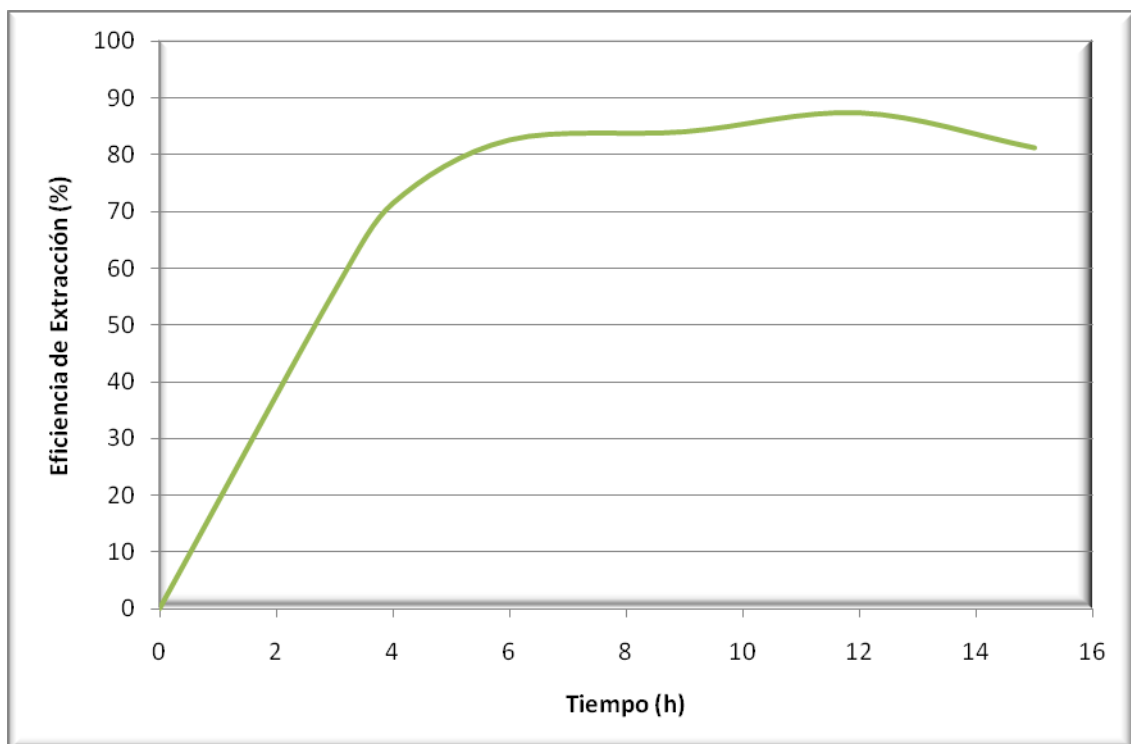
Términos		Coeficientes	
Lineal	A: Sustrato	$\beta_0$	59,97
	B: Enzima	$\beta_1$	6,08
		$\beta_2$	2,08
Cuadrático	A*A	$\beta_3$	2,28
	B*B	$\beta_4$	0,25
Interacciones	A*B	$\beta_5$	0,61



**Figura 9.** Superficie de respuesta estimada para la eficiencia de extracción

### 3.5 CINÉTICA DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE

En las condiciones seleccionadas anteriormente, 25% de sustrato y 10% de enzima en relación al sustrato, y usando la enzima Flavourzyme® se estableció la cinética de la eficiencia de extracción del aceite. Se observa (Figura 10) que la eficiencia de la extracción de aceite se incrementa con el tiempo, sin embargo después de 6 h las diferencias no son representativas, lo que indica que la reacción se puede llevar a cabo a un tiempo de 6 h con una eficiencia del 82,73%.



**Figura 10.** Cinética de la eficiencia de extracción.

Finalmente, aún cuando en el diseño experimental se evaluó la concentración de sustrato hasta un valor de 25%, se procedió a hacer experimentos con concentraciones de torta de palmiste superiores (30 y 34%) teniendo en cuenta que esta muestra es sólida y entre mayor sea la cantidad de sustrato procesado mayor será la productividad. La máxima concentración de sustrato no excedió el 34% debido a la dificultad que se presenta para agitar la mezcla de reacción por la alta absorción de la torta de palmiste. Para las dos concentraciones se mantuvo la misma concentración de enzima (10% respecto a la concentración de sustrato) y las mismas condiciones de temperatura, pH y agitación empleadas en los ensayos anteriores. Bajo estas condiciones se alcanzó una eficiencia de extracción 72,53 y 76,66%, respectivamente.

En este punto, sin embargo, es necesario tener en cuenta que para llevar a cabo la reacción enzimática se requiere adicionar agua (aproximadamente dos terceras partes), por lo que finalmente, una vez separado el aceite, se va a tener un efluente rico en hidrolizados de proteínas que puede constituir una fuente de contaminación, si no se le da un uso.

Finalmente, y teniendo en cuenta que el rendimiento de extracción del aceite de palmiste en la empresa Palmeras de Puerto Wilches S.A. es del 38.01%, equivalente a una eficiencia del proceso del 72,33%, se puede establecer que el uso de las enzimas proteolíticas que permite aumentar la extracción del aceite en un 6,33% incrementa la eficiencia de la línea de palmistería en un 12,04%. Este incremento es importante si se tiene en cuenta el alto valor que tiene en la actualidad el aceite palmiste.

No existen publicaciones sobre la utilización de estas enzimas en el proceso de extracción del aceite de palma ni de palmiste.

#### 4. CONCLUSIONES

1. El uso de la enzima Flavourzyme<sup>®</sup> en el proceso de extracción del aceite de la torta de palmiste, permitió aumentar el rendimiento de extracción en un 6,33% lo que equivale a aumentar la eficiencia del proceso de palmistería en un 12,04%.
2. La máxima eficiencia de extracción con Flavourzyme<sup>®</sup> (76,66%) se alcanzó usando una concentración de sustrato de 34%, de enzima 10%, a una temperatura de 50 °C, agitación de 200 rpm, en un tiempo de 4h.
3. El uso de celulasas combinadas con la enzima proteolítica Flavourzyme<sup>®</sup> no representa un incremento significativo en la eficiencia del proceso de extracción del aceite de palmiste.

## **5. RECOMENDACIONES**

Se recomienda hacer un estudio de la viabilidad económica y ambiental del proceso de extracción de aceite de palmiste, usando enzimas, dentro del cual se incluya el escalado de la reacción y su estudio cinético, además de evaluar alternativas para el uso de los efluentes de la reacción.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

\_\_\_\_\_. A.O.A.C. The official and recommended practices of the American Lo Chesmest's Society. (1987).

Bazán, V.J. (1993). Estudo da produção enzimática de dextrana clínica. *Dissertação de Mestrado*, Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 136 p.

Bhat, M.K., & Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biochemistry Advances*. 15, 583-620.

Bocevaska, M., Karlović, D., Turkulov, J., & Pericin, D. (1993). Quality of corn germ oil obtained by aqueous enzymatic extraction, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, No 12, 1273-1277.

Chou, T.Y.C., Chang M.M., & Tsao, G.T. (1981). Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. *Advances in Biochemical Engineering*. 20, 16-42.

Coil, L., Saura, D., Ros, J.M., Moliner M., & Laencina, J. (1996). Enzymatic treatment in the extraction of cold-pressed lemon peel oils. *Pectins and Pectinases*, 963-970.

Cuadros, B.J., & Celis A.O., (2007). Efectos del pretratamiento con ácido diluido e hidrólisis enzimática del bagazo de caña para la producción de glucosa. Bucaramanga, Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.

Dahlstrom, D. A. (1999). "Liquid-Solid Operations and Equipment" In Perry's Chemical Engineers' Handbook, by Perry, R. H., D. W. Green. y J. O. Maloney, 7<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill, section 18, 58-59.



Domínguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (1993). Oil extractability from enzymatically treated soybean and sunflower: range of operational variables. *Food Chemistry*, 46, 3, 277–286.

Espitaleta, C.L., & Rodríguez S.A., (2004). Obtención de etanol combustible a partir del parénquima de la hoja de palma africana por hidrólisis oxidativa y fermentación con *Zymomonas mobilis*. Bucaramanga, Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.

Evans, S. (2000). Notas taxonómicas, etnobotánicas y de nomenclatura sobre la *Eleais Guinensis*. *Palmas*. 12, 17-21.

Fan, L.T., Lee Y.H., & Gharpuray, M.M. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*. 23, 158-187.

Fedepalma Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite <http://www.fedepalma.org/palma.htm>, acceso 21 de febrero de 2008.

Gan, Q., Allen, S.J., & Taylor, G. (2003). Kinetics dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochemistry*. 38, 1003-1018.

Gaur, R., Sharma, A., Khare, S.K., & Gupta, M.N. (2007). A novel process for extraction of edible oils Enzyme assisted three phase partitioning (EATPP). *Bioresource Technology*, 98, 696-699.

González Q.A., (2007). Hidrólisis enzimática de bagazo de caña; cinética y diseño preliminar de reactores. Bucaramanga, Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.

Guerra, E. G., & Zúñiga, M. E. (2003). Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pipa de uva, *Vitis vinifera*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites*, 54. No 1, 53-57.

Heikinheimo, L. (2002). *Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton. Doctoral dissertation. *Vtt Publications* 483, Espoo, Finlandia.

Hishamuddin, M.A. (2001). Malaysian Palm Kernel Cake as Animal Feed. *Malaysian Palm Oil Board*. Kuala Lumpur. 1-6.

Irwin, D., Spezio, M., Walker, L., & Wilson, D. (1993). Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain efforts. *Biotechnology Bioengineering*. 42, 1002-1013.

ISTA. Global analysis all major oilseeds, oils and oilmeals. Supply, demand and price outlook. 06. 2009. Alemania. *Oil world Annual Report*.

Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., & Xu, S. (2009). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and bioproducts processing*. 42, 1, 171-175.

Kashyap, M.C., Agrawal, Y.C., Ghosh, P.K., Jayas, D.S., Sarkar, B.C., & Singh, B.P.N. (2007). Oil extraction rates of enzymatically hydrolyzed soybeans. *Journal of Food Engineering*, 81. 611–617.

Ljungdahl, L.G., & Eriksson, K.E. (1985). Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbiology and Ecology*. 8, 237-299.

Luque de Castro, M. D., & Garcia-Ayuso L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta*, 369, 1–10.

Luque-Garcia, J. L., & Luque de Castro, M. D. (2004). Ultrasound assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment—Application to the

extraction of total fat from oleaginous seeds, *Journal of Chromatography A*, 1034, 237–242.

Mamidipally, P. K., & Liu, S. X. First approach on rice bran oil extraction using limonene, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 122–125. (2004).

Mani, S. Tabil, L.G., & Opuku, A. (2002). Etanol from agricultural crop residues, an overview. Asae/Csae North Central Intersectional Meeting. Canada.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, pp. 426–428.

Moreau, R.A., Dickey, L.C., Johnston, D.B., & Hicks, K.B. (2009). A Process for the Aqueous Enzymatic Extraction of Corn Oil from Dry Milled Corn Germ and Enzymatic Wet Milled Corn Germ (E-Germ). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 469-474.

Najafian, L., Ghodsvali, A., Haddad, M.H., & Diosady, L.L. (2009). Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International*, 42, 171–175.

Nidetzky, B., Steiner, W. (1993). A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnology Bioengineering*, 42, 469-479.

Nyam, L.K., Tan, C.P., Lai, O.M., Long, K., & Man, Y.B.C. (2009). Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Kalahari Melon Seed Oil: Optimization Using Response Surface Methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 1235-1240.

Ranalli, A., & De Mattia, G. (1997). Characterisation of olive oil produced with a new enzyme processing aid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1105-1113.

Ranalli, A., & Ferrante, M. L. (1996). Physico-chemical and analytical characteristics of extra-virgin olive oils extracted by using a pectolytic enzymatic processing aid. *Olivae*, 9, 27-32.

Ranalli, A., & Lazzari, M. (1996). New technological solutions for optimization of olive oil quantity and quality. *Rivista Industria Chimica*, 34, 74-84.

Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjan, Gilmour, K.S., & Trinca, L. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*. 19, 402–520.

Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjan, Gilmour, K.S., & Trinca, L. (2001). Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology*. 28, 499–509.

Sambanthamurthi,R., Let,C., Cheang,O., Huat,K., & Rajan,P. (1991). Chilling induced lipid hydrolysis in the oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *Journal of Experimental Botany*, 42, 1199-1205.

Shah, S., Sharma, A., & Gupta, M.N. (2004). Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning. *Industrial Crops and Products*, 20, 275–279.

Sharma, A., Khare, S.K., & Gupta, M.N. (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 3, 215-218.

Shoemaker, L.W. (1981). Solvent safety. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 197-198.

Silva, A. (2009). La industria de la palma de aceite en América. XVI conferencia Internacioanal sobre Palma de Aceite: Los retos del desarrollo sostenible de la palma de aceite. FEDEPALMA.

- Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez M.J., & Lema J.M. (1998). Optimization of the enzymatic treatment during aqueous oil extraction from sunflower seeds. *Food Chemistry*, 61, 4, 467-474.
- Sosulski, K., Sosulski, F. W., & Coxworth, E. (1988). Carbohydrase hydrolysis of canola to enhance oil extraction with hexane. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 3, 357–361.
- Tang, T.S., & Teoh, P.K. (1985). Palm kernel oil extraction – The Malaysian experience. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62, 2, 254-261.
- WAMBECK NOEL. (2003). Sinopsis del proceso de la palma de aceite. Tomo 1 63-84.
- Wood, T.M. (1989). Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: Coughlan, M.P. (Ed). *Enzyme systems for lignocellulose degradation*, London. 17-35.
- Young, F.V.K. (1983). Palm Kernel and coconut oils: Analytical characteristics, process technology and uses, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 2, 374-379.
- Zarnowski, R. & Y. Suzuki, (2004). Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 649–664.
- Zhang, S.B., Zhang, W., & Xu, S.Y. (2007). Optimization of the Aqueous Enzymatic Extraction of Rapeseed Oil and Protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 97-105.
- Zúñiga, M.E., Soto, C., Mora, A., Chamy, R., & Lema, J.M. (2003). Enzymic pre-treatment of Guevina avellana mol oil extraction by pressing. *Process Biochemistry*, 39, 51-57.