

## Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío

Por, César A. Collao<sup>2</sup>, Emilia Curotto<sup>2</sup> y María E. Zúñiga<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Ingeniería Bioquímica.

<sup>2</sup>Instituto de Química Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, General Cruz 34, Valparaíso, Teléfono: 56-32-273659. Fax: 56-32-273803. E-mail: [mzuniga@ucv.cl](mailto:mzuniga@ucv.cl).

### RESUMEN

**Tratamiento enzimático en la extracción de aceite y obtención de antioxidantes a partir de semilla de onagra, *Oenothera biennis*, por prensado en frío.**

Se espera que el tratamiento enzimático, previo al prensado en frío, de la semilla de *Oenothera biennis*, mejore el rendimiento de extracción de aceite y la cantidad de antioxidantes extraídos de la harina residual. De una serie de cuatro preparados enzimáticos comerciales, se selecciona el más adecuado, el cual es evaluado bajo distintas condiciones de incubación: razones enzima/sustrato, tiempo, humedad y temperatura. El rendimiento aumenta un 12 % cuando se realiza un doble prensado sobre la semilla tratada con una mezcla enzimática formulada con Ultrazym 100G y Cellubrix en razón 1:1, concentración enzima/sustrato del 2 % p/p (base húmeda), durante 15 horas de incubación a 45 °C y 40 % de humedad. La harina residual desgrasada aumenta su contenido de antioxidantes desde 250 a 276 mg de fenoles expresados en catequina y el extracto mejora su actividad antioxidante desde 1463 a 1558 mg de trolox por gr de harina.

**PALABRAS-CLAVE:** Aceite de *Oenothera biennis* - Antioxidante enzimático - Extracción de aceite - Onagra - Polifenoles.

### SUMMARY

**Enzymatic treatment on oil extraction and antioxidant recuperation from *Oenothera biennis* by cold pressing.**

The aim of this work was to improve the yield in evening primrose oil extraction and the antioxidant potential of the residual meal using an enzyme assisted extraction process with cold pressing. Among four commercial enzymes, a mixture of two of them was selected in order to evaluate the effect of enzyme-substrate ratio, temperature, moisture and period of time of the enzymatic pretreatment on the extracted oil. The oil yield increased by 12% when the seeds were pretreated with 2% enzyme-substrate ratio of a mixture of 100G Ultrazym and Cellubrix (1:1) for 15 h at 40°C and 40% moisture. The defatted meal obtained from the enzyme aided process enhanced its phenol content and improved its potential antioxidant activity in comparison to the control from 250 to 276 mg of phenols/g of meal and from 1463 to 1558 mg of trolox/g of meal respectively.

**KEY-WORDS:** Antioxidants - Enzymes - Evening primrose - *Oenothera biennis* oil - Oil extraction - Polyphenol.

### 1. INTRODUCCIÓN

La onagra, primula o hierba del asno (*Oenothera biennis*) es una planta bianual originaria del norte de América y extendida en la actualidad en distintas partes del mundo. La semilla de la onagra contiene alrededor de un 15% de proteínas, 24% de aceite y un 43% de celulosa más lignina (Hudson, 1984). El principal producto obtenido de ésta semilla es el aceite, el cual es muy rico en ácidos grasos esenciales con un 65 a 80% de linoleico y 7 a 14% de gamma linolénico (Hudson, 1984), los cuales desempeñan un papel muy importante en la regulación metabólica del organismo y son precursores de diversos mediadores celulares e intercelulares.

Las técnicas más utilizadas a nivel industrial de extracción de aceites de semillas son las que aplican solventes orgánicos, principalmente hexano, y el prensado. El primero es el más eficiente, sin embargo, los solventes orgánicos utilizados son tóxicos e inflamables, es de alto costo energético y la desolventización daña la calidad de la harina residual. Para preservar la calidad de los principios bioactivos del aceite y la harina residual, tales como ácidos grasos polinsaturados y antioxidantes, es conveniente una técnica de extracción suave como el prensado en frío, sin embargo este último presenta bajos rendimientos (Hoffmann, 1989; Norris, 1982).

El tratamiento con enzimas que hidrolizan los envoltorios celulares de la semilla causaría menor resistencia al prensado, facilitándose la liberación del aceite desde las vacuolas intracelulares, esto ha sido demostrado en procesos de extracción por prensado en frío de aceite de: avellana chilena (Santamaría *et al.*, 2003; Zúñiga *et al.*, 2003), rosa mosqueta (Chamy *et al.*, 2001; Concha *et al.*, 2003), pipa de uva (Guerra *et al.*, 2003) y borraja (Soto *et al.*, 2004) mejorándose en todos estos casos el aceite extraído. En estos estudios, los autores concuerdan que: el éxito de la aplicación de enzimas, en el proceso extractivo, depende de cada materia prima (Soto *et al.*, 2004; Zúñiga *et al.*, 2003), no existiendo antecedentes sobre la extracción de aceite de *Oenothera biennis*, a pesar de la importancia nutraceútica y comercial de este producto.

La harina residual desgrasada es un producto subvalorado y en muchos casos considerados como un desperdicio industrial, por lo cual la presencia de compuestos bioactivos en estas harinas es cada vez más relevante, algunos de estos residuos podrían ser aplicados en la industria alimenticia o farmacéutica como fuente de extractos con propiedades antioxidantes. Se ha visto que en las fracciones externas de los vegetales se presenta el mayor contenido de polifenoles con actividad antioxidante (Cruz *et al.*, 2004), el contenido de polifenoles ha sido estudiado en los residuos sólidos desgrasados de ocho oleaginosas distintas (Mätthaus, 2002). En harinas desgrasadas de rosa mosqueta y avellana chilena existe una gran variedad de compuestos fenólicos (Moure *et al.*, 2001), la existencia de antioxidantes también se ha determinado en harina desgrasada de onagra (Balasinska *et al.*, 1998; Wettasinghe *et al.*, 1999).

La acción de enzimas hidrolíticas sobre las paredes celulares de la semilla, puede provocar una mejora en la extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, el uso de celulosas y pectinas mejora la extracción de polifenoles desde orujo de uvas (Meyer *et al.*, 1998) y orujo de grosella negra (Landbo y Meyer, 2001). Tobar *et al.*, 2005 encuentran que el tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pepa de uva por prensado en frío, afecta el contenido de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos desde la harina desgrasada residual, el que dependiendo de las condiciones de extracción puede aumentar en hasta cuatro veces en comparación con el control sin enzima.

Se estudia el efecto de la incorporación de un tratamiento enzimático y sus condiciones de hidrólisis en el proceso de extracción de aceite y en el contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante de la harina desgrasada residual.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Materia prima

Las Semillas de onagra (*Oenothera biennis*) son proporcionadas por la empresa "Loncopan S. A.", Quilicura, Región Metropolitana, Chile. Composición proximal de las semillas es 18% de aceite; 15,6% de proteínas; 8,6% de cenizas; 48,9% de fibra cruda y 5,4% de humedad.

### 2.2. Enzimas

Las enzimas usadas son Ultrazym 100G, Cellubrix y Pectinex Ultra SP de Novozyme A/S; Madrid, España y Maxoliva de DSM Food Specialties, aportada por FH Engel, Santiago, Chile.

### 2.3. Extracción por prensado

El proceso de extracción de aceite por prensado en frío es descrito por (Soto *et al.*, 2004). En éste, la

semilla sin impurezas se muele hasta alcanzar un tamaño homogéneo  $\leq 1,4$  mm. Las muestras (15 g) se tratan térmicamente a 100 °C por 20 minutos con el fin de inactivar la actividad enzimática endógena. Luego se realiza el prensado en una prensa manual hidráulica (Carver Press, Wabash, IN, EEUU) bajo condiciones de presión (44,1 MPa) y tiempo (45 min) y humedad de la muestra a prensar del 10 %, las cuales son seleccionadas de modo de alcanzar la mayor extracción de aceite dentro del rango de aplicación del equipo. El rendimiento de extracción de aceite se calcula midiendo el contenido en aceite de la harina inicial y residual respectivamente.

### 2.4. Extracción por prensado asistido con enzimas

Al protocolo anterior se le incorpora un tratamiento enzimático previo al prensado. Luego de la inactivación térmica se adiciona agua con la enzima disuelta, de modo de alcanzar la composición enzimática y la humedad en estudio. Las muestras se incuban a la temperatura de estudio por el tiempo de hidrólisis analizado, luego la reacción se detiene a 80 °C por 15 min, y luego por secado a vacío a 50 °C la humedad de la muestra se fija en 10 % para el prensado. La hidrólisis enzimática se compara con un control que incorpora agua en vez de catalizador. En el tratamiento enzimático se evalúa el tipo de catalizador, concentración de enzima entre 1- 5% de razón enzima/sustrato base húmeda (b.h.), temperatura entre 35 y 55 °C, tiempo de incubación entre 3 y 18 h, y humedad entre el 20 y 50 %.

Una vez definidas las condiciones de tratamiento enzimático se mide el efecto del tratamiento seleccionado sobre la extracción del aceite durante el prensado a 44,1 MPa, para ello se consideran hábitos comúnmente usados a escala industrial en extracción por lotes, como es el doble prensado o la aplicación de calor a la muestra previa al prensado. Las muestras tratadas enzimáticamente y sus controles se someten a: un prensado simple por 45 min; un doble prensado de 25 y 20 min cada uno; ambos sin y con precalentamiento de muestra, previo al prensado, a 80 °C por 10 min.

### 2.5. Métodos analíticos

El contenido en proteínas y ceniza de la semilla y la harina residual se mide por Kjeldahl y por calcinación, respectivamente, ambas técnicas descritas en la Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 1990). La determinación de: celulosa, hemicelulosa y lignina se realiza según los procedimientos descritos por Van Soest *et al.*, 1968, y Van Soest *et al.*, 1991. El contenido en aceite se determina por Soxhlet según el procedimiento descrito en el Instituto de Normalización de Chile (INN), 1988. El azúcar reductor se mide de acuerdo al procedimiento desarrollado por Miller,

1959. Los compuestos fenólicos de la harina desgrasada se extraen de acuerdo a lo descrito por Wettasinghe *et al.* (1999). El contenido en compuestos fenólicos de las harinas desgrasadas se mide a 765 nm, mediante la técnica propuesta por Singleton y Rossi (1965) y la actividad antioxidante se calcula usando el radical libre DPPH expresándose en concentración de trolox (Brand, 1995).

### 2.6. Análisis estadístico

Los datos se procesan por medio del análisis de varianza  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). ANOVA (Spiegel, 1991), midiendo las diferencias significativas entre grupos, se considera aceptable un nivel de significancia menor al 10% ( $p < 0,1$ ), entre muestras con y sin tratamiento enzimático.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el rendimiento de extracción de la semilla de onagra bajo un proceso de prensado en frío con pre-tratamiento con distintos preparados enzimáticos comerciales. En ella se observa que leves incrementos en el rendimiento en comparación con el control, un motivo para lo anterior puede ser que las condiciones de hidrólisis con 50% de humedad implican que ésta se realiza sobre un sólido húmedo en el cual es muy probable que la enzima sea adsorbida y por ende localizada, restando homogeneidad al sistema de reacción, sin embargo, estos incrementos son inferiores a los observados en sistemas de reacción similares sobre semilla de rosa mosqueta, avellana chilena (Zúñiga *et al.*, 2003), pipa de uva (Guerra y Zúñiga, 2003), borraja (Soto *et al.*, 2003), lo cual se debe a las diferencias de la composición y estructura de la pared celular de la semilla.

De los resultados de la figura 1 se selecciona el preparado comercial Ultrazym 100G para los estudios posteriores. En la figura 2 se observa que la temperatura y humedad apropiadas de tratamiento enzimático con Ultrazym 100G es de 45 °C y 40 % de humedad respectivamente.

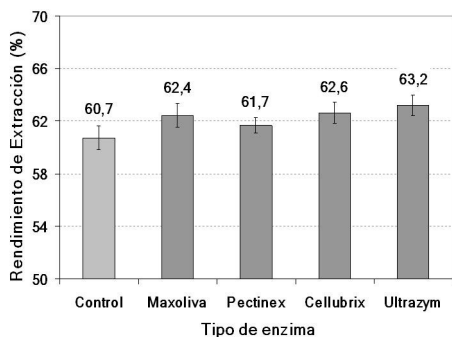


Figura 1

Efecto del tipo preparados enzimático comercial usado en el tratamiento enzimático sobre el aceite de onagra extraído por prensado en frío. La hidrólisis se lleva a cabo por 9 h con una razón Enzima/Sustrato del 1.0% p/p en base húmeda, 45°C y 30 % humedad.

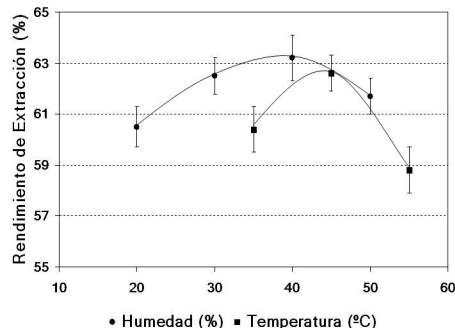


Figura 2

Efecto de la temperatura y humedad del tratamiento enzimático con Ultrazym 100G en razón Enzima/Sustrato del 1.0% p/p en base húmeda por 12 h, sobre el rendimiento de extracción de aceite onagra por prensado. Efecto de la temperatura se efectúa con 30 % de humedad y efecto de la humedad se realiza a 45°C,  $p < 0,1$  ( $n=3$ ).

En la figura 3 se obtiene que el tiempo de reacción más adecuado es de 15 horas para mejorar la extracción del aceite. Dependiendo de la semilla usada estos valores coinciden o varían de aquellos reportados. Estos resultados varían en relación a estudios anteriores realizados en otras semillas (Tobar *et al.*, 2005; Zúñiga *et al.*, 2003).

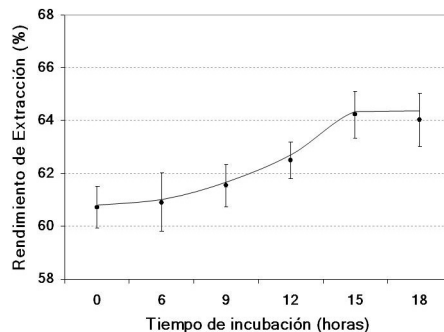


Figura 3

Efecto del tiempo de incubación del tratamiento enzimático con Ultrazym 100G en razón Enzima/Sustrato del 1.0% p/p en base húmeda, 45°C y 30 % humedad sobre el rendimiento de extracción de aceite de onagra,  $p < 0,1$  ( $n=3$ ).

La figura 4 muestra el efecto de la razón enzima/sustrato y del cambio a las condiciones de temperatura, humedad y tiempo de reacción enzimática desde las fijadas inicialmente y las previamente determinadas como las más adecuadas de tratamiento enzimático. Se observa el tratamiento enzimático que se efectúa a las condiciones apropiadas de tratamiento es sensible a la concentración de enzima en un rango más amplio, demostrando que la acción enzimática es en este caso limitada por la concentración de enzima.

La figura 5 indica que el tratamiento enzimático no solo mejora el rendimiento de extracción de aceite sino que, además, permitiría una disminución en los tiempos de prensado. Este hecho demuestra que el tratamiento enzimático facilita la li-

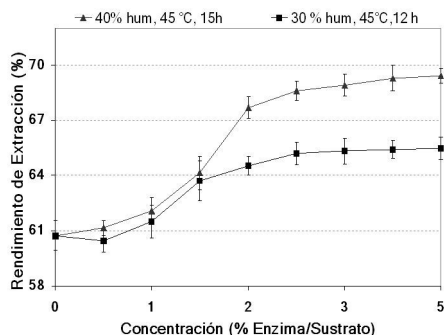


Figura 4 Efecto de la concentración de Ultrazym 100G y de las condiciones de incubación sobre el rendimiento de extracción de aceite de onagra por prensado,  $p < 0,1$  (n=3).

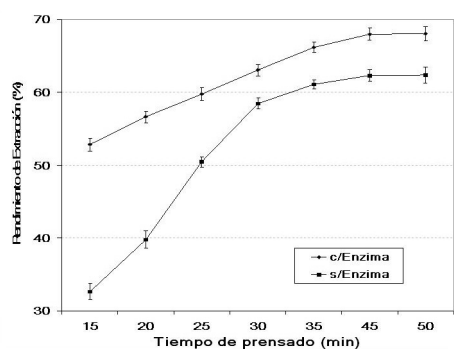


Figura 5 Efecto del tratamiento enzimático por 15h con Ultrazym 100G (◆) en razón Enzima/Sustrato del 2.0% p/p en base húmeda, 45°C y 40 % sobre la cinética de extracción de aceite de onagra por prensado, en comparación con muestras control (■).

beración de aceite al exterior de la semilla. También, se observa en la figura 5 que bajo las condiciones estudiadas, existe un límite en el tiempo de extracción y que por sobre este, en ambos casos, se alcanza el máximo rendimiento de extracción de aceite.

La figura 6 muestra que la aplicación de un doble prensado (DP) y calentamiento previo al prensado de la semilla (Q) puede mejorar aún más el rendimiento en la extracción del aceite. Ambas

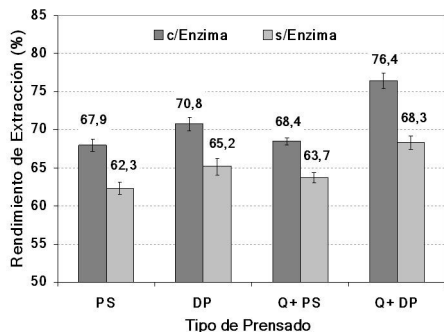


Figura 6 Efecto del tipo de prensado a 44.1MPa sobre el aceite de onagra extraído, con y sin tratamiento enzimático. PS: prensado simple por 45 min; PD: doble prensado por 25 y 20 min c/u; Q: muestras precalentadas a 80 °C por 10 min.

prácticas son comúnmente aplicadas para mejorar la extracción de aceites cosméticos por prensado hidráulico, y como se observa ambas (DP y Q), por separado o en conjunto, aumentan el rendimiento de extracción en similar magnitud a las muestras tratadas enzimáticamente como las sin enzima, en comparación con el prensado simple (PS), aunque la sinergia de ambas prácticas (DP y Q) aplicadas conjuntamente es mayor cuando las muestras han sido previamente hidrolizadas, esto también fue obtenido por Tobar *et al.* (2005).

En la Tabla 1 se muestra el efecto del tratamiento enzimático sobre la composición de la harina desgrasada de onagra. Se observa una disminución en el contenido de fibra cruda, lo cual es esperado debido a que el objetivo del preparado enzimático es la hidrólisis de los componentes de la pared celular. Además, se observa como se altera la composición porcentual de los distintos componentes de la pared celular por efecto de la acción enzimática, el cual ha sido confirmado visualmente. El azúcar reductor es modificado, pues las enzimas, al hidrolizar los distintos componentes de la pared celular, producen azúcares los cuales son determinados posteriormente. El aumento de los azúcares reductores indica que hubo hidrólisis enzimática.

Tabla 1 Efecto del tratamiento enzimático con Ultrazym 100 G sobre la composición y actividad antioxidante de la harina de onagra residual y desgrasada.

Componente	Composición porcentual (%) <sup>1</sup>	
	Sin Enzima	Con Enzima
Fibra Cruda	48.9 ± 2.0	44.9 ± 1.1
Lignina	27.4 ± 0.4	41.2 ± 0.7
Hemicelulosa	4.9 ± 0.5	3.6 ± 0.6
Celulosa	19.6 ± 0.8	8.8 ± 0.6
Proteína	18.4 ± 1.1	20.3 ± 1.0
Azúcar Soluble	0.9 ± 0.1	2.4 ± 0.2
Aceite Remanente	32.1 ± 0.8	37.7 ± 0.7
<b>mg (X)/ g de muestra</b>		
Cantidad Polifenoles (X=D-catequina)	250.5 ± 5.8	276.5 ± 3.8
Actividad Antioxidante (X=trolox)	1463 ± 20	1558 ± 21

<sup>1</sup> valores medios (n=3) ± desviación estándar

Como se observa en la tabla 1, tanto el contenido de fenoles como la actividad antioxidante aumentan con la adición de un tratamiento enzimático al proceso de extracción de aceite de onagra. Esto puede deberse a que la acción enzimática expone los fenoles presentes en la pared celular, facilitando su posterior extracción. Esto puede relacionarse con la degradación de la hemicelulosa, presente en la pared celular, que contiene ácido poligalacturónico en su estructura, el cual posee actividad antioxidante.



#### 4. CONCLUSIÓN

La incorporación de un tratamiento enzimático al proceso aumenta el rendimiento de extracción de aceite de onagra por prensado en frío, el incremento en el aceite extraído es dependiente de las condiciones de tratamiento enzimático, este incremento se ve aún más favorecido con el precalentamiento de la muestra y el doble prensado. Los resultados son significativos dentro de la confiabilidad del 90 %. Las mejoras obtenidas con la aplicación de enzimas son una alternativa justificable en aceites de alto valor agregado, como los de uso cosmético y en medicina preventiva.

El tratamiento enzimático, mejora el potencial antioxidante de la harina residual y amplía su potencial nutricional al reducir su contenido en fibras.

#### AGRADECIMIENTOS

Proyecto Fondecyt N° 1040752, CONICYT Chile; y Loncopan S.A.

#### BIBLIOGRAFIA

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1990. Official methods of analysis, 15<sup>th</sup> ed. 776-782, Arlington, EEUU.

Balaszynska B, Troszynska A. 1998. Total antioxidative of Evening Primrose (*Oenothera paradox*) cake extract measure in vitro by liposome model and murine L1210 cells. *J Agric Food Chem.* **46**, 3558-3563.

Brand WW, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* **28**, 25-30.

Chamy R, Domínguez H, Franco D, Lema JM, López-Munguía A, Moure A, Núñez MJ, Santamaría RI, Sineiro J, Soto C, Zúñiga ME. 2001. Enzyme-aided alternative processes for the extraction of oil from *Rosa rubiginosa*. *J Am Oil Chem Soc.* **78**, 437-439.

Concha J, Soto C, Chamy R, Zúñiga ME. 2004. Effect of Enzymatic Pretreatment on Rose Hip Oil Extraction: Hydrolysis and Pressing Conditions. *J Am Oil Chem Soc.* **81**(6), 550-552.

Cruz JM, Domínguez JM, Domínguez H, Parajó JC. 1999. Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates, a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chem.* **67**, 147-153.

Guerra EG, Zúñiga ME. 2003. Tratamiento enzimático en la extracción de aceite de pepa de uva, *Vitis vinifera*, por prensado en frío. *Grasas y Aceites* **54**, 53-57.

Harbone JB, Williams CA. 2000. Review: Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochem.* **55**, 481-504.

Hoffmann G. 1989 The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products". *Food Sci Technol.* A series of monographs: 29-137. Academic Press Inc. London.

Hudson, B.J.F. 1984. Evening primrose (*Oenothera spp.*) oil and seed. *J Am Oil Chem Soc.* **61**(3), 540-543.

Instituto Nacional de Normalización (INN) 1988. Nch 485. Granos o semillas oleaginosas: Determinación del extracto al éter de petróleo denominado contenido de aceite.

Landbo AK, Meyer AS. 2001. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black current juice press residues (*Ribes nigrum*). *J Agric Food Chem.* **49**, 3169-3177.

Mätthaus B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseed. *J Agric Food Chem.* **50**, 3444-3452.

Meyer AS, Jepsen SM, Sørensen NS. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *J Agric Food Chem.* **46**, 2439-2446.

Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid: Reagent for Determination of reducing Sugar. *Anal Chem.* **31**, 426-428.

Moure A, Domínguez H, Zúñiga ME, Soto C, Chamy R. 2002. Characterization of protein concentrates from *Guevina avellana* pressing cakes. *Food Chem.* **78**, 179-186.

Norris FA. 1982. Extraction of fats and oils. In: Swern, D. (ed.) *Bailey's industrial oil and fat products.* **2**, 178-253, John Wiley and Sons Inc., Canadá.

Santamaría RI, Soto C, Zúñiga ME, Chamy R, López-Munguía A. 2003. Enzymatic extraction of oil from *gevuina avellana*, the chilean hazelnut. *J Am Oil Chem Soc.* **80** (1), 33-36.

Singleton VL and Rossi JA Jr. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enology and Viticulture* **16**, 144-158.

Soto C, Chamy R, Zúñiga ME. 2004. Effect of enzymatic application on borage (*Borago officinalis*) oil extraction by cold pressing. *J Chem Eng of Japan* **37**, 326-331.

Spiegel M. *Estadística.* Mc Graw Hill, Interamericana de España, S.A. 1991, pp 375-410.

Tobar P, Moure A, Soto C, Chamy R, Zúñiga M E 2005. Winery Solid Residue Revalorization into Oil and Antioxidant with Nutraceutical Properties by an Enzyme Assisted Process. *J Water Sci Technol.* **51**, 47-52.

Van Soest PJ, Wine RH. 1968. Determination of Lignin and Cellulose in Acid-Detergent Fiber with Permanganate, *Journal of the A.O.A.C.* **51**, 780-785.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Non Starch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition, *J. Dairy Sci.* **74**, 3583-3597.

Wettasinghe M, Shahidi F. 1999. Evening Primrose Meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric Food Chem.* **47**, 1801-1812.

Zuñiga ME, Soto C, Mora A, Chamy R, Lema JM. 2003. Enzymic pre-treatment of *Guevina avellana mol* oil extraction by pressing. *Process Biochem.* **39**, 51-57.

Recibido: Marzo 2006  
Aceptado: Septiembre 2006