



KINGA SOŁTYSIAK

Koło naukowe „BIOACTIVE”

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska

Opiekun naukowy: prof. dr hab. inż. Stanisław Ledakowicz

EKSTRAKCYJA ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH Z ZIAREN RYŻU WSPOMAGANA ULTRADŹWIĘKAMI

Olej ryżowy jest używany na szeroką skalę w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym oraz spożywczym. Ze względu na bogatą zawartość takich związków, jak tokoferol, tokotrienol i oryzanol uznawany jest jako naturalne źródło antyoksydantów. W przeprowadzonych badaniach jako materiału badawczego użyto otrębów ryżowych będących produktem pośrednim w procesie przemiału ryżu. Ekstrakcję przeprowadzono, stosując cztery typy rozpuszczalników (etanol, aceton, izopropanol oraz heksan) przy zmianie podstawowych parametrów procesu (temperatura i czas). W celu zwiększenia ilości wyekstrahowanych związków zastosowano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami.

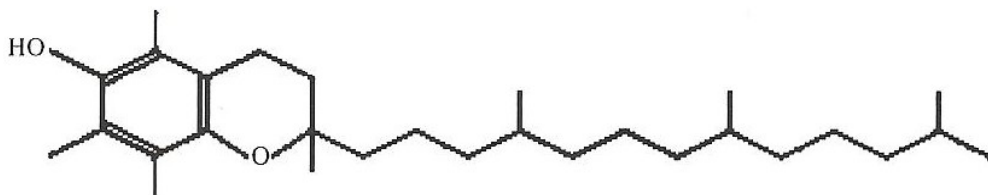
WPROWADZENIE

Ryż jest nieodłącznym elementem diety w krajach Azji. Tradycyjnie Chiny, Tajlandia oraz Indie mają największy udział w jego światowej produkcji^[1]. Otręby ryżowe jako produkt pośredni w procesie przemiału ryżu zawierają 8-20% oleju, w zależności od miejsca wzrostu i procesów technologicznych jakim podlegają^[2]. Obecność w ekstrahowanym oleju związków tokoferol, tokotrienol, oryzanol powoduje, że jest on uznawany jako

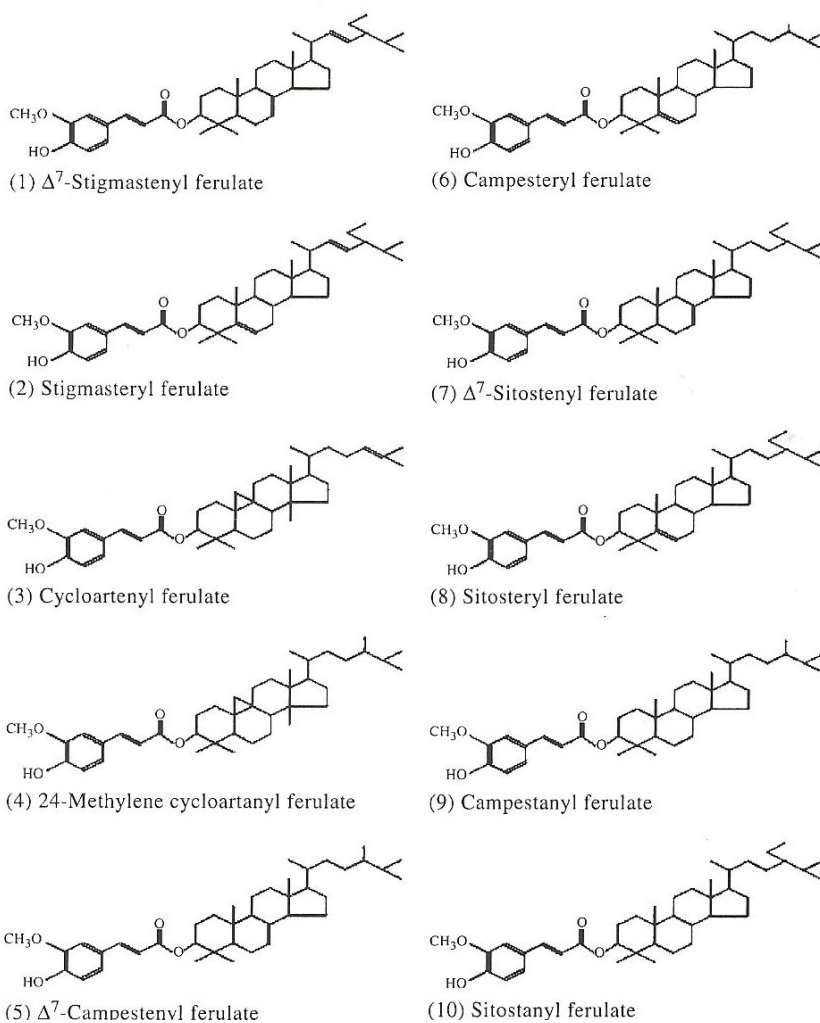


naturalne źródło antyoksydantów^[3]. Ich poszczególna zawartość oscyluje w zakresie 0,1-0,14% dla tokoferolu, 0,9-2,9% dla gamma-oryzanolu^[4,5]. Gamma-oryzanol jest kompleksem estrów fitoestrioli (kampestrolu, stigmasterolu i sitosterolu), kwasu felurowego i innych związków organicznych. Wysoka zawartość bioaktywnych frakcji pozwala wykorzystać olej, na szeroką skalę, w przemyśle chemicznym, farmacji i w przemyśle spożywczym do podniesienia wartości odżywczej końcowego produktu^[6,7]. Wiele badań potwierdza jego korzystny wpływ na układ odpornościowy oraz liczbę płytek miażdżycowych^[8,9]. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika w celu usunięcia lipofilnych cząsteczek z nierozpuszczalnego ciała stałego jest jednym z głównych czynników decydujących o ilości wyekstrahowanych związków w metodach tradycyjnej ekstrakcji. Polarność rozpuszczalnika i polarność odzyskiwanych frakcji powinna mieć zbliżoną wartość. Pomimo ryzyka pożarowego i szkodliwego oddziaływania na środowisko najczęściej wykorzystywanym rozpuszczalnikiem jest heksan ze względu na wysoką stabilność oraz zdolność do rozpuszczania wyekstrahowanego oleju^[10]. W celu znalezienia zamiennika heksanu prowadzono badania procesu ekstrakcji oleju ryżowego, stosując np. etanol, propanol^[11,12]. Przy zastosowaniu etanolu jako rozpuszczalnika zauważono, że końcowa zawartość gamma-oryzanolu jest często wyższa niż w przypadku stosowania heksanu. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami opiera się na interakcji wysokiej częstotliwości fal dźwiękowych z badanym materiałem. Kawitacja, tarcie na powierzchniach międzyfazowych i absorpcja energii fali akustycznej oraz związane z nimi wydzielanie ciepła sprawia, że wspomaganie ekstrakcji ultradźwiękami zwiększa rozpuszczalność, dyfuzję, penetrację rozpuszczalnika i transport analitu, a to zdecydowanie skraca czas ekstrakcji i zwiększa jej wydajność^[13].

Celem przeprowadzonych badań było przeanalizowanie czterech typów rozpuszczalników (heksan, aceton, etanol i propanol) w procesie ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami pod kątem zdolności do odzyskiwania oleju. W badaniach ponadto poddano ocenie wpływ czasu (20, 40, 60 min) oraz temperatury (30, 40°C) ekstrakcji na ilość gamma-oryzanolu.



Rys. 1. Struktura chemiczna α - tokoferolu



Rys. 2. Struktura chemiczna gamma-oryzanolu

MATERIAŁY I METODY

1. Przygotowanie materiału

W przeprowadzonych badaniach użyto otręb pochodzących z ryżu jaśminowego. Materiał przesiano przez sита o rozmiarach 850 μm w celu oczyszczenia z niechcianych ziaren i zanieczyszczeń. Frakcje przechowywano w foliowych woreczkach w lodówce. Zmierzona zawartość wilgoci wynosiła 11,86%.

2. Odczynniki chemiczne

Wzorzec gamma oryzanolu został dostarczony przez WakoPureChemicalIndustries Ltd. Japan. Heksan, etanol, propanol i aceton z firmy Baker Analyzed, USA. Rozpuszczalniki wykorzystane w analizie HPLC (metanol, etanol, heksan) pochodziły z firmy Carlo Erba.

3. Ekstrakcja UAE

Badany materiał został zmieszany z rozpuszczalnikiem w stosunku wagowym 1:4.5 g odważonych otrębów przesypiano do 30 ml szklanej butelki, a następnie dodano 20 ml wybranego rozpuszczalnika. Butelkę umieszczono w łaźni ultradźwiękowej. Ekstrakcja była przeprowadzona w różnej temperaturze (30, 40°C) i czasie (20, 40 i 60 min). Filtracja przez papier filtracyjny o rozmiarze por 0,45 μm miała na celu oddzielenie rozpuszczalnika z wyekstrahowanym olejem od cząstek stałych. Ekstrakt zagęszczono w temperaturze 40°C i pod ciśnieniem 5-10 mbar, stosując wyparkę obrotową. Poniższy wzór został użyty do obliczenia procentowej zawartości oleju w badanych próbach

$$\text{Zawartość oleju [\%]} = \frac{\text{waga wyekstrahowanego oleju (g)}}{\text{waga próbki(g)}} * 100\%$$

Próbki z olejem były przechowywane w lodówce, dopóki nie oznaczono w nich gamma oryzanolu. Każdą z prób w przeprowadzonych badaniach powtórzono dwukrotnie.

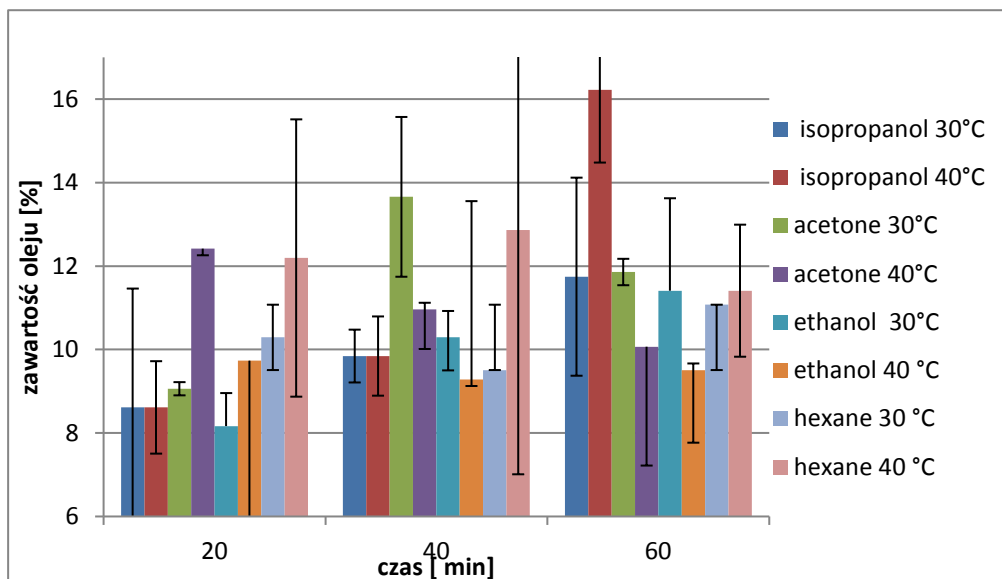
4. Oznaczenie gamma-oryzanolu za pomocą HPLC

Ilość gamma-oryzanolu w poszczególnych próbach zmierzono, stosując aparaturę HPLC. Fazę stacjonarną stanowiła kolumna C18 o rozmiarze 250 x 4,6 mm. Wyekstrahowany olej został rozpuszczony w fazie ruchomej stanowiącej mieszaninę metanolu, propanolu i octanu metylu (47.5:40:12.5 ml), uzyskując koncentrację 100 µg/ml. 20 µl, każde z przygotowanych prób wprowadzono do systemu z przepływem 1 ml/min. Długość fali detekcji ustawiono na 330 nm. Obliczenia koncentracji związku w poszczególnych próbach zostały oparte na analizie obszaru pod pikiem w takim samym czasie retencji jak wzorcowa próba gamma oryzanolu.

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Wpływ temperatury i czasu

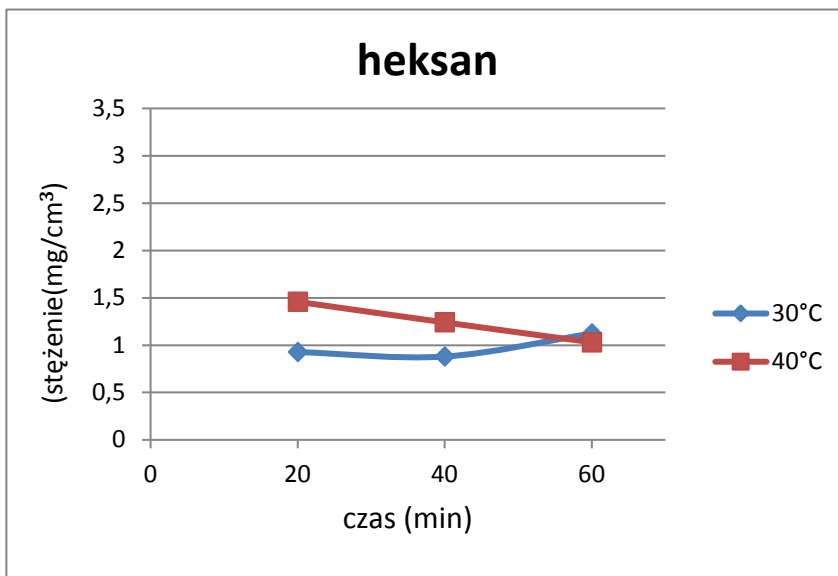
Z analizy rysunku 3 jednoznacznie wynika, że ilość wyekstrahowanego oleju zależy od temperatury i czasu prowadzenia reakcji. Dla propanolu wraz ze wzrostem czasu ekstrakcji wzrasta procentowa zawartość oleju^[11]. Co prawda, między 20 a 40 min wzrost jest nieznaczny (ok. 1,5%), jednak prowadząc proces w 40°C wydłużenie czasu reakcji o 40 minut skutkuje wzrostem o 8% ilości oleju. Stosując ten sam czas ekstrakcji dla procesu przebiegającego w temperaturze 30°C procentowa ilość otrzymanego oleju jest niższa o 6%. Warto także zauważyć, że zmiana temperatury ekstrakcji w 20 i 40 minucie nie skutkuje zmianą ilości wyekstrahowanego oleju. W przypadku zastosowania acetonu i etanolu jako rozpuszczalnika największą wydajność uzyskuje się prowadząc proces w temperaturze 30°C. Dla acetonu czas po którym uzyskano największą ilość wyekstrahowanego oleju to 40 minut (13,65%), w przypadku etanolu to 60 minut. Dla procesu przebiegającego w czasie 40 minut, stosując heksan jako rozpuszczalnik, zauważono, że ilość wydzielonego oleju w temperaturze ekstrakcji 40°C jest o 4,7% wyższa niż w temperaturze 30°C, w czasie 20 minut ok 2%. W przypadku ekstrakcji w czasie 60 minut różnica wynosiła tylko 0,6%.



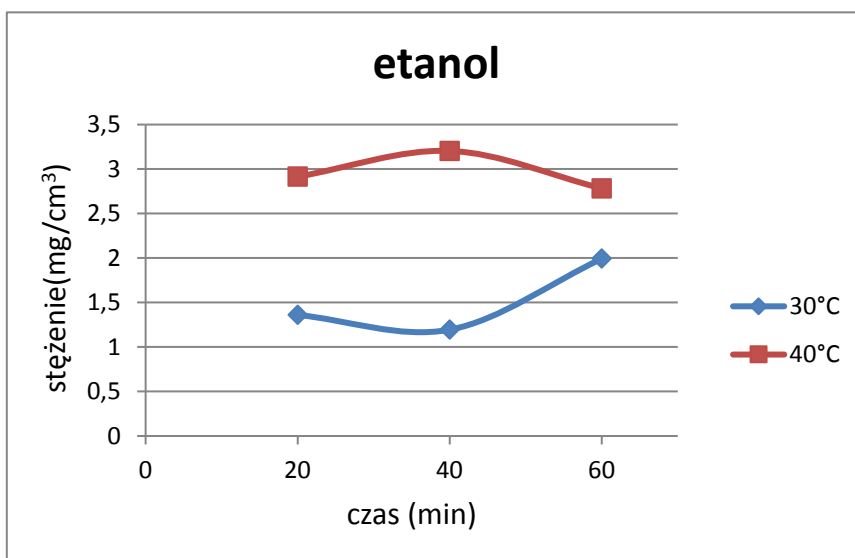
Rys. 3. Procent wyekstrahowania oleju przy zmianie czasu i temperatury procesu

2. Gamma-oryzanol

Z rysunków 4-5 wynika, że wzrost temperatury procesu ekstrakcji prowadzi do zwiększenia koncentracji gamma-oryzanolu w ekstrahowanym oleju. Wzrost temperatury zmniejsza lepkość rozpuszczalnika, co skutkuje zwiększoną dyfuzyjnością, a tym samym wzrostem wskaźnika ekstrakcji i ilością ekstrahowanych związków^[14]. Analizując proces w temperaturze 40°C i w czasie 20 minut stężenie gamma-oryzanolu w przypadku zastosowania etanolu jako rozpuszczalnika jest prawie dwa razy większe niż przy użyciu heksanu. Wynika to z faktu, iż gamma-oryzanol jest kompleksem polarnych molekuł, więc łatwiej rozpuszcza się w etanolu, który także jest polarnym związkami. Wiele badań dowiodło, że kluczowym czynnikiem wpływającym na końcową koncentrację gamma-oryzanolu jest objętość i rodzaj rozpuszczalnika^[15].



Rys. 4. Zmiana koncentracji gamma-oryzanolu od czasu prowadzenia ekstrakcji w temp. 30°C i 40°C w heksanie



Rys. 5. Zmiana koncentracji gamma-oryzanolu od czasu prowadzenia ekstrakcji w temp. 30°C i 40°C w etanolu



WNIOSKI

Optymalny czas oraz temperatura procesu ekstrakcji są ściśle powiązane z zastosowanym rozpuszczalnikiem. Otrzymane wyniki wskazują, że, przeprowadzając proces w temperaturze 40°C w czasie 40 minut przy zastosowaniu propanolu, jest możliwe uzyskanie, w porównaniu z innymi rozpuszczalnikami, największej ilości ekstraktu. Wzrost temperatury ekstrakcji prowadzi do zwiększenia koncentracji gamma-oryzanolu w ekstrahowanym oleju. Zastosowanie etanolu jako polarnego rozpuszczalnika umożliwia uzyskanie dwukrotnie wyższego stężenia gamma-oryzanolu.

LITERATURA

- [1] Sereewatthanawut I., Prapintip S., Watchiraruj K., Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis, *Bioresource Technology*, 2007.
- [2] Oliveira R., Oliveira V., Kazue K., Effects of the extraction conditions on the yield and composition of rice bran oil extracted with ethanol—A response surface approach, *Food and bioproducts processing*, 2012.
- [3] Saikia D. and Deka S.C., Cereals: from staple food to nutraceuticals, *International Food Research Journal* 18: 21-30, 2011.
- [4] Lerma-Garcia, Herreo-Martinez J.M., Ramos-Ramos G., Simo-Alfonso E.F., Mendonca R.B., Composition industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 6, 2015, 24-30.
- [5] Patel M. & Naik, Gamma-oryzanol from rice bran oil – a review, *Journal of Scientific & Industrial Research* Vol. 63, July 2004, 569-578.
- [6] Gul K., Yousuf B., Singh A.K., Singh P., Wani Ali Abas, Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food—A review, *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2015.



- [7] Most Marlene M., Tulley R., Morales Silvia Lefevre M., Rice bran oil, not fiber, lowers cholesterol in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 64-68.
- [8] Tabaraki R., Nateghi A., Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response Surface methology, *Ultrasonics Sonochemistry* 18(6):1279-86, 2011.
- [9] Kusum R., Bommayya H., Fayaz P., Palm oil and rice bran oil: Current status and future prospects, *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2011.
- [10] Cuevas Maite S., Shinzato Regiane E., Costa Mariana C., Rodrigues Christanne E.C., Gamma-oryzanol Solubility and Effects of Solvent Mixture, 2011.
- [11] Weicheng H., Wells J.H., Shin Tai Sun, Goldberg J.S., Comparison of isopropanol and Hexane for extraction of Vitamin E and Oryzanols from Stabilized Rice Bran, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996.
- [12] Sawada M.M., Lopes L., Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal, 2004.
- [13] Romdhanea M., Gourdon, Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound, *Chemical Engineering Journal* 87, 2002, 11-19.
- [14] Imsanguan P., Extraction of alpha-tocopherol and gamma-oryzanol from rice bran, *Swiss Society of Food Science and Technology*, 2007.
- [15] Heidtmann-Bemvenuti R., Saião N.N., Badiale-Furlong E., Extraction of γ -oryzanol from rice bran, 2012.