

Нискотемпературна екстракция на етеричномаслени суровини с втечнени газове. 1. Плодове на анасон (*Pimpinella anisum* L.)

Теодора Атанасова, Ненко Ненов, Ангел Конакчиев,
Магдален Златанов, Станка Дамянова, Албена Стоянова

Abstract. Extracts from anise seeds (*Pimpinella anisum* L.) by extraction with freon ($C_2H_2F_4$) at temperature 18 °C and duration 75 u 120 min have been obtained. The chemical composition of essential and vegetable oils have been established by GC/MS. The major compound of the essential oils was trans-anethole (92,9 – 93,4 %), and of the vegetable oils oleic (47,5 – 60,2 %) and palmitic acid (22,6 – 33,9 %). The antimicrobial activity of the essential oils was investigated. As test microorganisms have been used Gram-(+) bacteria *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus*; Gram(-) bacteria *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella abony* NTCC 6017; the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 and *Candida albicans* ATCC 10231 and the fungi: *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium graminearum* and *Botrytis cinerea*. The antimicrobial activity of the essential oils was best expressed towards the fungi.

Key words. Anise seeds, Freon extraction, chemical composition of essential and vegetable oils, antimicrobial activity of essential oils.

Въведение. Втечнените газове (бутан, пропан, CO_2) са по-селективни разтворители от летливите по отношение на ароматичните и баластните вещества. Използваните разтворители са огне- и взривобезопасни, изпаряват се при стайна температура, но изискват работа в апаратура под налягане (6 atm при бутана, 15 atm при пропана и 40-70 atm при CO_2) [5, 6, 12].

В литературата има данни само за преработка на плодовете от анасон чрез втечен CO_2 , като са уточнени и най-подходящите параметри на екстракцията [9, 16, 19, 22, 23]. Получените екстракти са с по-високо качество и по-малко токсични в сравнение с етеричното масло, получено чрез дестилация.

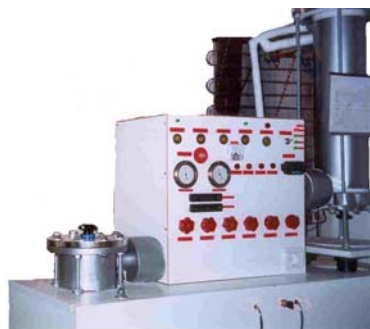
Екстрактите са с антибактериална активност и насоката на приложение във фармацията, хранително-вкусовата и парфюмерийно-козметичната промишленост, като 18 - 45 g екстракт заменя 1 kg суха подправка.

Според Пехов и съавт. [13 - 15] втечненият пропан е най-добрият разтворител на двете масла – етерично и глицеридно, тъй като не притежава избирателна способност. CO_2 има по-висока селективност като получаваните екстракти се доближават по вкусови свойства до изходната суровина. CO_2 -екстрактът от анасон, според авторите, е подходящ за ароматизиране на рибни консерви.

Един от перспективните неполярни разтворители-втечен газ за провеждане на процеса екстракция на растителни суровини е 1,1,1,2 тетрафлуоретан (фреон 134a). Няма данни за преработка на плодове от анасон с него, което е и цел на настоящата работа.

Материали и методи. Използвани са плодове от анасон (*Pimpinella anisum* L.), закупени от района на град Пазарджик, реколта 2005 г. със следните показатели влажност – 8,7%, етерично масло – 2,9 % и глицеридно масло – 28,7 %.

Влажността на суровината е определяна чрез ацеотропна дестилация [7]; съдържанието на етерично масло - чрез водна дестилация в апарат на Британската фармакопея, модифициран от Балинова и Дяков [1]; глицеридното масло – чрез екстракция на плодовете с диетилов етер в апарат на Soxlet за 48 h [17].



Фигура 1.
Общ изглед на
опитната уредба

Екстракцията с фреон 134а (тетрафлуоретан $C_2H_2F_4$) е проведена в лабораторна уредба, показан на фиг. 1 при температура $18\text{ }^\circ\text{C}$ и продължителност 75 и 120 min. Изборът на технологичните параметри е по предварителни наши непубликувани данни.

Разделянето на получената смес от етерично и глицеридно масло е чрез водна дестилация в описания по-горе апарат. Глицеридното масло е отделяно от водата чрез трикратна екстракция с диетилов етер и изпаряване на разтворителя.

Получените масла са окачествени по показателите: относителна плътност (d_{20}^{20}), коефициент на пречупване (n_D^{20}), киселинно число, mg KOH/g; естерно число, mg KOH/g; осапунително число, mg KOH/g; йодно число, g $J_2/100\text{ g}$ [6, 17].

Химичният състав на етеричните масла е определен: чрез ГХ анализ на апарат Hewlett-Packard 5890 с пламъчно-йонизационен детектор; капилярна колона HP INNOWAX (30 m x 0,25 mm; дебелина на филма 0,25 μm); температурна програма от $90\text{ }^\circ\text{C}$ до $230\text{ }^\circ\text{C}$ с $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; температура на инжектора и детектора $260\text{ }^\circ\text{C}$; газ-носител азот. При ГХ-МС анализа е използван апарат Hewlett-Packard 6890; газ-носител хелий, колона и температурен режим както при ГХ анализа.

Мастнокиселиният състав на глицеридните масла е определен чрез ГХ анализ на апарат Hewlett Packard 5890 A; капилярна колона (30 m x 0,25 mm); температура на колоната от $165\text{ }^\circ\text{C}$ до $225\text{ }^\circ\text{C}$ с $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; температура на инжектора $300\text{ }^\circ\text{C}$, температура на детектора $300\text{ }^\circ\text{C}$; газ-носител – азот. Метиловите естери на мастните киселини са пречиствани чрез тънкослойна хроматография на плочки Силикагел 60 G "Merck" (0,2 mm) при подвижна фаза хексан:диетилов етер = 97:3.

За определяне на антимикробното действие етеричните масла са изследвани като 20 % разтвори в етанол. Анализите са извършени паралелно с контроли, чрез които се отчита и коригира действието на съдържащия се в тях алкохол.

Като тест-микроорганизми са използвани: Gram-положителните бактерии *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus*; Gram-отрицателните бактерии *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony* NTCC 6017; дрождите *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 и *Candida albicans* ATCC 10231 и плесенни гъби: *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium graminearum* и *Botrytis cinerea*. Изследваните тест-култури са от NBIMCC (Национална банка за индустриални микроорганизми и клетъчни култури) – София и от колекцията на катедра "Биотехнологии и хранителни технологии" – Технологичен колеж, Разград.

Антимикробната активност е определена по метода дифузия в агар с използване на ямки (диаметър 8 mm) [24]. Изпитването е извършено върху хранителна среда на Oxoid [Lab-Lemco Powder (Oxoid L 29) – 3,0 g, Peptone (Oxoid L 37) – 5,0 g] с 2 % агар за бактериите и агар пивна мъст за плесени и дрожди. Титърът на пригответените суспензии при бактериите е в границите $1,4 \cdot 10^{10}$ - $1,6 \cdot 10^{10}$ cfu/cm³, а при дрождите и плесенните гъби от $6,0 \cdot 10^9$ до $6,4 \cdot 10^9$ cfu/cm³. В ямките е накапвано по 50 μl от разтворите на изследваните етерични масла. След култивиране при $37\text{ }^\circ\text{C}$ за 24 h (бактерии) и при $30\text{ }^\circ\text{C}$ за 72 h (дрожди и плесенни гъби) са отчитани диаметрите на стерилните зони в mm, като: до 15 mm микробната култура е слабо

чувствителна; от 15 mm до 25 mm – чувствителна и над 25 mm – силно чувствителна [2 - 4, 10, 11].

Всички опити са проведени в трикратна повторяемост, като данните в таблиците са средно аритметични.

Резултати и обсъждания. Добивът на етеричното и глицеридното масло, получено по двата варианта е представен в табл. 1. От данните се вижда, че екстрактите са по-богати на етерично масло, което се обяснява със селективността на разтворителя. По-продължителната екстракция (вар. 2) довежда до по-пълно извличане на етеричното масло.

Таблица 1. Добив на етерично и глицеридно масло чрез екстракция с фреон

Вар. №	Температура °C	Продължителност, min	Добив %	Етерично масло, % спрямо			Глицеридно масло % спрямо		
				Екстракт	Суровина	Отраб. суровина	Екстракт	Суровина	Отраб. суровина
1	18	75	2,7	85,6	2,71	0,44	14,4	0,29	16,3
2	18	120	2,8	87,8	2,46	0,32	12,2	0,34	20,8

Някои физични и химични показатели, както и химичният състав на маслата са представени в табл. 2 (етерично) и в табл. 3 (глицеридно).

Таблица 2. Показатели и състав на етерични масла

Физични и химични показатели на етеричното масло (контрола)			
Относителна плътност, d_{20}^{20}		0,9870	
Коефициент на пречупване, n_D^{20}		1,5542	
Киселинно число, mg KOH/g		2,2	
Естерно число, mg KOH/g		23,50	
Компоненти на етеричното масло (контрола), %			
Метилхавикол		следи*	
транс-Анетол		68,1	
цис-Анетол		следи	
p-Анисалдехид		17,1	
Анискетон		7,8	
цис-Псевдоевгенил 2-метилбутират		1,0	
транс-Псевдоевгенил 2-метилбутират		0,3	
Идентифицирани, %		94,3	
Физични и химични показатели на етеричното масло, получено с фреон			
		Варианти	
		1	2
Относителна плътност, d_{20}^{20}		0,9887	0,9890
Коефициент на пречупване, n_D^{20}		1,5527	1,5524
Киселинно число, mg KOH/g		1,9	2,0
Естерно число, mg KOH/g		1,8	2,2
Компоненти на етеричното масло, получено с фреон, %			
Метилхавикол		2,1	2,4
транс-Анетол		92,9	93,4
цис-Анетол		следи*	следи
p-Анисалдехид		0,2	0,1
Анискетон		0,1	следи
цис-Псевдоевгенил 2-метилбутират		1,8	1,1
транс-Псевдоевгенил 2-метилбутират		0,5	0,4
Идентифицирани, %		97,6	97,4

* под 0,1 %

От данните в табл. 2 се вижда, че маслата се различават помежду си както по показатели, така и по химичен състав. По-ниското съдържание на транс-анетол и по-високото на р-анисалдехид в маслото от суровината, получено чрез водна дестилация в сравнение с данните от литературата [8] се дължи на начина на преработка, в резултат на което протичат различни химични процеси. Маслата, получени чрез екстракция с фреон са с по-високо съдържание на транс-анетол.

Промени в показателите и химичния състав се наблюдават и при глицеридните масла. Извлечените с фреон масла са с по-ниско съдържание на олеинова и линолова киселина и завишено на палмитинова, което се обяснява с термичното въздействие при разделяне на двете масла и протичащи окислителни промени.

Таблица 3. Показатели и състав на глицеридни масла

Физични и химични показатели на глицеридното масло (контрола)			
Коефициент на пречупване, n_D^{20}	1,4740		
Киселинно число, mg KOH/g	7,43		
Естерно число, mg KOH/g	188,04		
Осапунително число, mg KOH/g	195,47		
Йодно число, g J ₂ /100 g	96,82		
Компоненти на глицеридното масло (контрола), %			
Лауринова (C _{12:0})	следи*		
Миристинова (C _{14:0})	0,6		
Палмитинова (C _{16:0})	4,2		
Палмит-олеинова (C _{16:1})	1,2		
Маргаринова(C _{17:0})	0,5		
Стеаринова (C _{18:0})	1,5		
Олеинова (C _{18:1})	75,4		
Линолова (C _{18:2})	16,0		
Линоленова(C _{18:3})	следи		
Арахинова(C _{20:0})	следи		
Идентифицирани, %		99,4	
Физични и химични показатели на глицеридното масло, получено с фреон			
	Варианти	1	2
Коефициент на пречупване, n_D^{30}		1,4859	1,4863
Киселинно число, mg KOH/g		8,9	9,1
Осапунително число, mg KOH/g		190,3	198,6
Естерно число, mg KOH/g		174,9	188,7
Йодно число, g J ₂ /100 g		96,9	98,2
Мастнокиселинен състав на глицеридното масло, получено с фреон, %			
Лауринова (C _{12:0})		следи	следи
Миристинова (C _{14:0})		3,6	3,2
Палмитинова (C _{16:0})		18,9	20,6
Палмит-олеинова (C _{16:1})		4,7	4,4
Маргаринова(C _{17:0})		следи	следи
Стеаринова (C _{18:0})		2,8	1,5
Олеинова (C _{18:1})		59,3	60,2
Линолова (C _{18:2})		9,4	8,8
Линоленова(C _{18:3})		0,9	0,8
Арахинова(C _{20:0})		следи	Следи
Идентифицирани, %		99,6	99,5

* под 0,1 %

Антимикробната активност на етеричните масла е представена на табл. 4. От данните се вижда, Грам-положителните бактерии се влияят слабо от анасоновите масла. По-голяма е чувствителността на изследваните Грам-отрицателни бактерии, като маслата въздействат в най-голяма степен върху *Escherichia coli*. При Грам-положителната бактерия *Bacillus pumilus* и Грам-отрицателната бактерия *P. aeruginosa* се наблюдава и бактериостатична зона. Изследваните дрожди *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans* са чувствителни към маслата. Те най-силно въздействат върху плесенните гъби, като при всички диаметрите на зоните на инхибиране са в границите от 25 до 50 mm. Етеричното масло, получено чрез водна дестилация от суровината подтиска в най-голяма степен плесенната гъба *Botrytis cinerea* (зона на инхибиране 60 mm). Изследваните масла са с по-изразена фунгицидна активност, което потвърждава данните от литературата [20].

Таблица 4. Антимикробна активност на етеричните масла

Тест микроорганизми	Диаметър на зоните на инхибиране, mm		
	Етерично масло (контрола)	Етерично масло чрез екстракция с фреон	
		Вариант 1	Вариант 2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	13,0 ± 0,5	11,0 ± 0,1	11,0 ± 0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	15,0 ± 0,0	10,0 ± 0,5	11,0 ± 0,0
<i>Bacillus pumilus</i>	15,0 ± 0,0	11,0 ± 0,2 15,0* ± 0,0	12,0 ± 0,3 14,0* ± 0,0
<i>Bacillus subtilis</i>	16,5 ± 0,3	13,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	15,0 ± 0,2	18,0 ± 0,0	15,0 ± 0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,4 24,0* ± 0,5	18,0 ± 0,3
<i>Salmonella abony</i> NTCC 6017	13,0 ± 0,1	14,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	25,0 ± 0,5	20,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20,0 ± 0,1	15,0 ± 0,2	16,0 ± 0,0
<i>Aspergillus niger</i>	35,0 ± 0,5	35,0 ± 0,5	30,0 ± 0,4
<i>Penicillium</i> sp.	45,0 ± 0,5	40,0 ± 0,5	20,0 ± 0,0
<i>Rhizopus nigricans</i>	25,0 ± 0,0	26,0 ± 0,5	40,0 ± 0,5
<i>Fusarium graminearum</i>	44,0 ± 0,5	40,0 ± 0,3	30,0 ± 0,5
<i>Botrytis cinerea</i>	60,0 ± 0,5	40,0 ± 0,5	50,0 ± 0,5

* - бактериостатична зона

Извод. Чрез екстракция на плодове от ананас с фреон 134a при температура 18 °C и продължителност 75 и 120 min се получават екстракти, които са по-богати на етерично масло с основен компонент транс-анетол (92,9 % и 93,4 %, съответно). Маслата са с по-силно изразена фунгицидна активност.

Литература

1. Балинова А., Г. Дяков – Подобрен апарат за микродестилация на розов цвят, Растениевъдни науки, т. 11, 1974, № 2, 79 – 85.
2. Бешков М. – Обща микробиология, Пловдив, Изд. “Х. Данов”, 1982.
3. Бешков М., Е. Карова, И. Мургов – Ръководство за упражнения по микробиология, София, Изд. “Земиздат”, 1986.
4. Влахов С., А. Иванов – Обща микробиология, София, СУ “Св. Климент Охридски”, 1991.
5. Георгиев Е. – Екстракция с втечени газове, В сборник лекции “Новости в производството на натурални и синтетични ароматични продукти”, Пловдив, ВИХВП, 1980, 117 – 129

6. Георгиев Е. – Технология на естествените и синтетичните ароматни продукти, София, Изд. “Земиздат”, 1995, 196-200.
7. Георгиев Е., А. Стоянова – Ръководство за лабораторни упражнения по технология на етеричните масла и ароматични вещества, Пловдив, 1997.
8. Георгиев Е., А. Стоянова - Справочник на специалиста от ароматичната промишленост, БНАЕМПК, Пловдив, 2005.
9. Касьянов Г., А. Пехов, А. Таран – Натуральные пищевые ароматизаторы - CO₂ экстракты, Москва, Изд. “Пищевая промышленность”, 1978, 27 – 119.
10. Митов Г., Г. Капрелян, Д. Димитров, Ю. Тягуненко, Р. Маринова, С. Златев – Микробиология, София, ДИ “Медицина и физкултура”, 1981.
11. Митов Г., Г. Хусебикян – Ръководство за практически упражнения по микробиология, София, ДИ “Медицина и физкултура”, 1990.
12. Ненов Н. – Экстракция на растителни суровини с втечени газове, Научни трудове УХТ, т. 53, 2006, св. 2, 195 – 200.
13. Пехов А., И. Пономаренко – Экстракция растительного сырья сниженными газами, Масло-жировая промышленность, 1968, № 6, 25 – 28.
14. Пехов А., Г. Гончаренко – Экстракция пряного растительного сырья сниженными газами, Масло-жировая промышленность, 1968, № 10, 26 – 29.
15. Пехов А., Г. Касьяков, Н. Судьева – Использование анетолсодержащего растительного сырья для ароматизации рыбопродукции, В сб. химия и химическая технология, Краснодар, 1973, ч. II, 185 – 187.
16. Судьева Г., В. Сенич – Некоторые данные о составе CO₂ – экстракта семян аниса, Масло-жировая промышленность 1971, № 8, 26 – 27.
17. Хаджийски Ц., М. Перифанова–Немска – Производство на растителни масла, (Ръководство за лабораторни упражнения), ВИХВП, Пловдив, 1994.
18. Basoglu N., B. Ozcelik, A. Karaali – Optimization of supercritical fluid extraction of anise essential oils from anise seeds using response – surface methodology, Technical Poster Session: Product Development: 2003, Chicago, 14 F-30.
19. Ehlers D., J. Farber, A. Martin, K. Quirin, D. Gerard – Analysis of essential oils. Comparison of CO₂-extracts and steam-distilled oils, Deutsche-Lebensmittel-Rundschau, 1996, 9, 330 – 335.
20. Fiedler H. – Antimicrobial effect of aroma compounds and essential oils, Seifen–Öle–Fette–Wachse, v. 107, 1981, № 3, 75 – 76.
21. Naik S., R. Maheshwari – Extraction of essential oils with liquid carbon dioxide, PAFAL Journal, v. 10, 1988, № 1, 18 – 24 (Chemical Abstracts, 1989, 109 : 115835 n).
22. Naik S., H. Lentz, R. Maheshwari - Extraction of perfumers and flavors from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid vapor equilibrium conditions, Fluid Phase Equilib, 49, 1989, 115 – 126 (Chemical Abstracts 1989, 109 : 201361 c).
23. Rodrigues M., T. Rosa, O. Marques, J. Petenate, A. Meireles – Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L.) using CO₂: solubility, kinetics and composition data, J Agric Food Chem., v. 51, 2003, № 6, 1518 – 1523.
24. Zaika L. – Spices and herbs : Their antimicrobial activity and determination, Journal of Food Safety, v. 9, 1988, 97 – 118.

- Ст.ас. инж. Теодора Атанасова и доц. д-р инж. Албена Стоянова – УХТ, Пловдив, катедра “Технология на тютюна, захарта, растителните и етеричните масла”.

- Гл.ас. д-р инж. Ненко Ненов - УХТ, Пловдив, катедра “Промислена топлотехника” - Хим. Ангел Конакчиев – ИОХЦФ-БАН, София.

- Доц. д-р Магдален Златанов – ПУ “П. Хилендарски”, Пловдив, катедра “Органична химична технология”.

- Доц. д-р инж. Станка Дамянова – Технологичен колеж, Разград, катедра “Биотехнологии и хранителни технологии”.