

# Izdvajanje polifenola, proteina i enzima iz kore citrusa primjenom eutektičkih otapala

---

Čukelj, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:011362>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Iva Čukelj**

7331/BT

**IZDVAJANJE POLIFENOLA, PROTEINA I ENZIMA IZ KORE  
CITRUSA PRIMJENOM EUTEKTIČKIH OTAPALA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

**Mentor:** Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

**Zagreb, 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Izdvajanje polifenola, proteina i enzima iz kore citrusa primjenom eutektičkih  
otapala**

***Iva Čukelj, 0058209431***

**Sažetak:** Konzumacija i prerada agruma u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji svakodnevno raste zahvaljujući bogatom nutritivnom sastavu, no time raste i količina otpada u obliku kore, koštica i pulpe. Kora naranče je neiskorišten izvor šećera, enzima i bioaktivnih komponenti. Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza sa 30 % 50% i 80% vode (w/w) u iskorištenju punog potencijala navedenog otpada kroz održivi proces. Eutektička otapala su biorazgradiva, niske su cijene i lako se pripremaju. Ispitano eutektičko otapalo sa 30 % i 50 % vode se pokazalo produktivno pri ekstrakciji polifenola iz otpadne kore naranče, dok je pokazalo vrlo slabu uspješnost pri ekstrakciji proteina. Ispitana je i aktivnost enzima pektin-esteraze ekstrahirane iz kore naranče pri čemu je navedeni enzim pokazao veću aktivnost samo u eutektičkom otapalu sa 30 % vode. Otapalo ChClGlc se pokazalo značajno boljim u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletal-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz narančine kore u odnosu na pufer, sa najvećim iskorištenjem u eutektičnom otapalu sa 80 % vode.

**Ključne riječi:** eutektičko otapalo, DES, otpadna narančina kora, pektin-esteraza, polifenoli, (*R,S*)-1-feniletal-acetat

**Rad sadrži:** 35 stranica, 16 slika, 2 tablice, 64 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

**Pomoć pri izradi:** Manuela Panić, mag.ing.bioproc.

**Datum obrane:**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Biotechnology**

**Isolation of polyphenols, proteins and enzymes from citrus peel with deep eutectic solvents**

***Iva Čukelj, 0058209431***

**Abstract:** Consumption and processing of citrus fruits in the food, cosmetic and pharmaceutical industries are increasing daily thanks to its rich nutritional composition, but with it waste in the form of peel inevitably increases. Orange peel is a rich source of sugar, enzymes and bioactive components. The aim of this thesis is to examine the possibility of using Deep Eutectic Solvent (DES) choline-chloride:glucose with 30%, 50% and 80% water (w/w) in the exploitation orange peel waste through a sustainable process. DES are biodegradable, low in cost and easy to prepare. Tested DES with 30% and 50% water proved to be good in the extraction of polyphenols, while it showed a poor protein extraction effect. The activity of the pectin-esterase enzyme extracted from orange peel was also examined, where pectin-esterase showed higher activity only in ChClGlc 30%. The enantioselective hydrolysis of (R, S)-1-phenylethyl acetate using orange peel hydrolytic enzymes all ChClGlc were significantly better comparing to buffer, especially ChClGlc 80%.

**Keywords:** deep eutectic solvent, pectin-esterase, polyphenols, (R,S)-1-phenylethyl acetate, waste orange peel

**Thesis contains:** 35 pages, 16 figures, 2 table, 64 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Marina Cvjetko Bubalo, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Manuela Panić, M. Sc. Eng.

**Defence date:**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1 Zelena otapala .....	2
2.1.1. Općenito o zelenim otapalima .....	2
2.1.2. Ionske kapljevine i eutektička otapala.....	4
2.2 Kora citrusa .....	6
2.2.1 Fenolni spojevi .....	8
2.2.2 Flavonoidi .....	9
2.2.3 Dijetalna vlakna .....	10
2.2.4 Eterična ulja .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>12</b>
3.1. Materijali .....	12
3.1.1 Biljni materijali .....	12
3.1.2 Kemikalije .....	12
3.1.3 Oprema i uređaji .....	12
3.2. Metode .....	13
3.2.1 Priprema eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza (ChClGlc) .....	13
3.2.2. Priprava ekstrakata narančine kore.....	14
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteau metodom.....	14
3.2.4. Određivanje proteina metodom po Bradfordu.....	15
3.2.5. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima narančine kore .....	16
3.2.6. Hidroliza (R,S)-1-feniletil-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore.....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteau metodom .....	20
4.2. Određivanje proteina metodom po Bradfordu .....	22

4.3. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima narančine kore .....	23
4.4. Hidroliza (R,S)-1-feniletil-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore .....	25
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>29</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>30</b>

# 1. UVOD

Neizbježan eksponencijalni porast svjetske populacije dovodi do porasta konzumacije hrane, potrošnje energije i drugih roba što znatno otežava ciljeve zelene kemije i očuvanja okoliša. Kroz program zelene kemije intenzivno se istražuju kemijski proizvodi i procesi kojima se smanjuje ili u potpunosti uklanja uporaba ili proizvodnja supstanci opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš. Vođena navedenim idejama Europska Unija je postavila ključne ciljeve vezane uz očuvanje okoliša sa fokusom na sljedeća područja: energija, emisija stakleničkih plinova i tvari koje oštećuju ozonski omotač, kakvoća i zagađenje zraka, emisije stakleničkih plinova i onečišćivača zraka te održiva potrošnja i proizvodnja (EEA, 2013).

Među svim obnovljivim izvorima energije, biomasa je najveći, najraznolikiji i najlakše dostupan izvor sirovina koji nudi mogućnost proizvodnje širokog raspona novih polimera i bioproizvoda (Cherubini, 2010). Naranča je plod čija se godišnja proizvodnja približno procjenjuje na 71 000 000 tona, od čega otpad u obliku kore čini oko 14 000 200 tona. Nusproizvodi prehrambene industrije smatraju se obnovljivim izvorom funkcionalnih komponenata s dodanom vrijednošću, poput vlakana, ulja, proteina, voskova, boja i biološki aktivnih komponenata (npr. polifenola), a cilj zelene kemije je ekstrahirati te komponente na ekološki prihvatljiv način. Da bi proces bio održiv, potrebno je koristiti i netoksična biorazgradiva otapala. Jedna od tih otapala su i eutektička otapala koja su nehlapljiva, nezapaljiva, niske cijene i jednostavne pripreme (Paiva i sur., 2014.).

Cilj ovog rada jest ispitati mogućnost primjene eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza s 30%, 50 % i 80 % vode (w/w) u iskorištavanju potencijala otpadne narančine kore koja je vrijedan izvor šećera, enzima i biološki aktivnih spojeva. U tu svrhu, ispitana je mogućnost izdvajanja polifenolnih spojeva te proteina iz narančine kore primjenom eutektičkog otapala, zatim aktivnost enzima pektin-esteraze izdvojenog iz narančine kore u sintetiziranom eutektičkom otapalu te iskorištavanje potencijala hidrolitičkih enzima narančine kore u kinetičkoj rezoluciji (*R,S*)-1-feniletil-acetata primjenom eutektičkog otapala kao medija za provedbu rezolucije.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1 ZELENA OTAPALA**

#### **2.1.1 Općenito o zelenim otapalima**

U mnogim industrijskim procesima primjenjuje se velika količina hlapljivih i zapaljivih organskih otapala (gotovo 20 milijuna tona) koja se dobivaju iz neobnovljivih sirovina poput nafte, stoga njihova primjena čini značajan dio ekoloških i ekonomskih značajki procesa. Unatoč tome organska otapala su najčešće korišten medij za provođenje kemijskih reakcija zbog njihove ključne uloge u otapanju krutih tvari, prijenosu mase i topline. Otapala su nužna u procesima kao što su ekstrakcija, razdvajanje, pročišćavanje i sušenje produkta, kod sintetskih reakcija za postizanje dovoljne čistoće proizvoda, ali i kod analitičkih metoda budući da omogućavaju međusobni kontakt komponenata u sustavu. Organska otapala jesu neophodna, ali nisu nezamjenjiva, no zbog njihove niske cijene, visoke učinkovitosti i dostupnosti još uvijek imaju većinsku primjenu. Činjenica da organska otapala čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih emisija hlapljivih spojeva, takva prekomjerna potrošnja neobnovljivih, otrovnih tvari štetnih za okoliš izvanredan su primjer ekološki neodržive industrije. Budući da Direktiva Europske Unije o industrijskim emisijama (2010/75/EU) izričito zahtijeva ograničenje emisije određenih hlapljivih organskih spojeva, kao i ostalih značajnih onečišćivača zraka, u razvoju zelenih tehnologija posebna pažnja je usmjerena ka razvoju novih, ekološki prihvatljivih otapala koja bi također zadovoljila i tehnološke te ekonomske zahtjeve (EU, 2010).

Posljednjih se godina u akademskim sredinama, a i u široj zajednici intenzivno istražuju novi, sigurniji i energetski učinkovitiji procesi proizvodnje i primjene kemikalija koji se zasnivaju na prihvatljivom kompromisu između ekonomskih, socijalnih i ekoloških zahtjeva, opisani kao zelena kemija. Pojam zelena kemija prvi put je upotrijebljen 1991. godine kada je P. T. Anastas pokrenuo program implementacije održivog razvoja u kemijske tehnologije, a danas se taj pojam definira kao dizajniranje kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju primjenu i stvaranje škodljivih i opasnih supstancija (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

Zelena se kemija bavi zamjenom opasnih otapala s onima koja pokazuju bolja svojstva prema okolišu, zdravlju i sigurnosti. Organska otapala se zamjenjuju otapalima iz obnovljivih izvora. Prema načelima zelene kemije koja su prikazana u tablici 1, odabir prikladnih zamjena za organska otapala temelji se na sigurnosti radnika (toksičnost, karcinogenost, mutagenost, apsorpcija putem kože i respiratornog sustava), sigurnosti procesa (zapaljivost, eksplozivnost, hlapljivost, potencijal stvaranja peroksida), sigurnosti



okoliša (ekotoksičnost, postojanost, kontaminacija podzemnih voda, uništavanje ozonskog omotača) i održivosti procesa (sposobnost recikliranja i mogućnost višekratne uporabe) (Alfonsi i sur., 2008). Nemoguće je istodobno maksimalno udovoljiti zahtjevima svih 12 načela, ali se tijekom pojedinih stupnjeva sinteze pokušava primijeniti što veći broj istih. Otapala koja su se najviše približila ovim zahtjevima su superkritični i subkritični fluidi, ionske kapljevine, eutektička otapala i otapala iz prirodnih/obnovljivih sirovina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

**Tablica 1.** Načela zelene kemije (Jukić i sur., 2004)

<b>Dvanaest načela zelene kemije</b>	
<b>1.</b>	Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao.
<b>2.</b>	Tijek kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni proizvod.
<b>3.</b>	Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i okoliš.
<b>4.</b>	Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost.
<b>5.</b>	Uporabu pomoćnih kemijskih tvari (npr. otapala, sredstva za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim gdje god je to moguće.
<b>6.</b>	Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
<b>7.</b>	Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo.
<b>8.</b>	Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštićivanje funkcionalnih skupina, privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa itd.).
<b>9.</b>	Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama.
<b>10.</b>	Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja.
<b>11.</b>	Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.
<b>12.</b>	U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

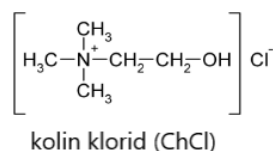
### 2.1.2 Ionske kapljevine i eutektička otapala

Tijekom proteklog desetljeća ionske kapljevine (*eng.* ionic liquids, IILs) i eutektička otapala (*eng.* deep eutectic solvents, DES) intenzivno se istražuju s ekološkog, tehnološkog i ekonomskog gledišta kao zamjena za tradicionalna organska otapala. Zelena svojstva ovih kapljevine su neznatna hlapljivost (smanjenje onečišćenja zraka), nezapaljivost (sigurnost procesa) te velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost (mogućnost recikliranja i višestruke uporabe) (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Ionske kapljevine, organske soli koje se tale pri temperaturi nižoj od 100 °C, pokazale su se izvrsnim otapalima u različitim područjima prehrambene tehnologije, biotehnologije i kemijske tehnologije. Međutim, bez obzira na njihove izvrsne tehnološke karakteristike, konvencionalne ionske kapljevine s imidazolijevim i piridinijevim kationom su skupe, uglavnom se dobivaju iz neobnovljivih sirovina te su pokazale umjerenu do visoku toksičnost (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Upravo to je posljednjih godina dovelo do razvoja eutektičkih otapala koja predstavljaju novu generaciju tekućih soli i općenito se temelje na mješavini jeftinih i lako dostupnih komponenti: netoksične kvartarne amonijeve soli (npr. kolin-klorid) i nenabijenog donora vodika poput šećera, amina, amida, alkohola, organskih kiselina i vitamina (Tang i Row, 2013). Te su tekućine najčešće sastavljene od staničnih metabolita u određenim molarnim omjerima, uključujući u nekim slučajevima i vodu, a odlikuju se snažnim intermolekulskim interakcijama (npr. vodikove i ionske veze). Eutektička se otapala ponekad nazivaju i ionskim kapljevinama četvrte generacije, iako s molekularnog aspekta to nije točno jer su za razliku od ionskih kapljevine sastavljena od neutralnih molekula povezanih vodikovim vezama (Zhang i sur., 2012). Eutektička otapala uz karakteristiku visoke biorazgradivosti imaju jednostavniju pripremu, nisku toksičnost te niske troškove proizvodnje (Paiva i sur. 2014), sigurna su za okoliš i ljude što proširuje mogućnost primjene na prehrambenu, farmaceutsku, kozmetičku i agrokemijsku industriju. Uz navedene prednosti pri korištenju eutektičkih otapala nisu potrebni ni brojni dodatni koraci pri pročišćavanju proizvoda pa eutektička otapala imaju pohvalan status dizajnerskih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b).

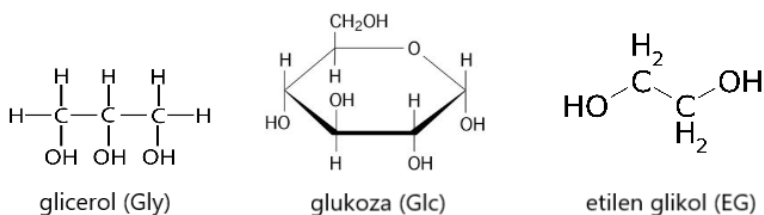
DES-ovi nastaju miješanjem nabijenog akceptora vodika (najčešće kvaterne amonijeve soli) s donorom vodika, gdje se navedene polazne krute komponente povezuju jakim vodikovim vezama te zagrijavanjem prelaze u tekuće otapalo. Kako je već navedeno DES-ovi se pripremaju od jeftinih, lako dostupnih, netoksičnih tvari i miješaju se u različitim molarnim omjerima. Najveća prednost DES-ova jest činjenica da je točka tališta pripremljenog DES-a niža od pojedinačnih komponenata. Raznolikost DES-ova te njihova različita kemijsko-fizikalna svojstva posljedica su velikog broja mogućih kombinacija ishodnih

tvori korištenih za sintezu (Kudlak i sur., 2015). Klasičan primjer je smjesa kolin-klorida (ChCl) ( $t_f = 302\text{ }^\circ\text{C}$ ) i uree ( $t_f = 133\text{ }^\circ\text{C}$ ) u molarnom omjeru 1:2, gdje je temperatura tališta pripremljenog DES-a  $12\text{ }^\circ\text{C}$  (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

#### akceptori vodika



#### donori vodika



**Slika 1.** Primjer akceptora (amonijeve soli) i donora vodika koji se koriste u pripravi eutektičkih otapala (Paiva i sur. 2014).

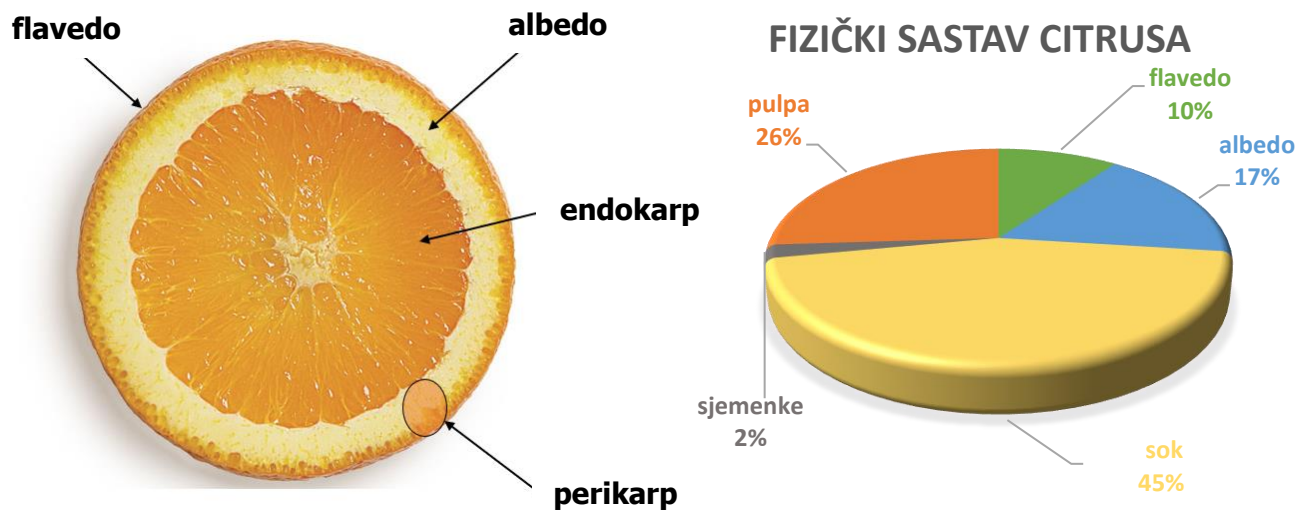
DES-ovi koji uključuju glicerol kao donor vodika može biti problematičan za mnoge kemijske postupke zbog visoke viskoznosti što nepovoljno utječe na prijenos mase, brzinu reakcije i općenito samo rukovanje. Kako bi se smanjila viskoznost, odnosno kako bi se oslabila vodikova veza između donora i akceptora vodika, Guajardo i sur. (2017) proveli su mnoga istraživanja u kojima je otkriveno da male količine vode uvelike smanjuju viskoznost.

DES-ovi se ne smiju smatrati netoksičnim iako se pripremaju iz spojeva koji se pojavljuju u prirodi. Hayyan i sur. (2013b) su istražili toksičnost i citotoksičnost četiri DES-a na osnovi kolin-klorida (s glicerolom, etilen glikolom, trietilen glikolom i ureom kao donorima vodika). Autori su otkrili da su svi DES-ovi netoksični; međutim, citotoksičnost svakog od pripremljenog DES-a s kolin-kloridom bila je značajno viša od pojedinačnih komponenata, no visok antibakterijski učinak te antifungalna svojstva DES-a mogu biti prednost za određene kemijske procese, posebno u biotehnološkoj industriji.

## 2.2 KORA CITRUSA – vrijedan izvor šećera, enzima i biološki aktivnih spojeva

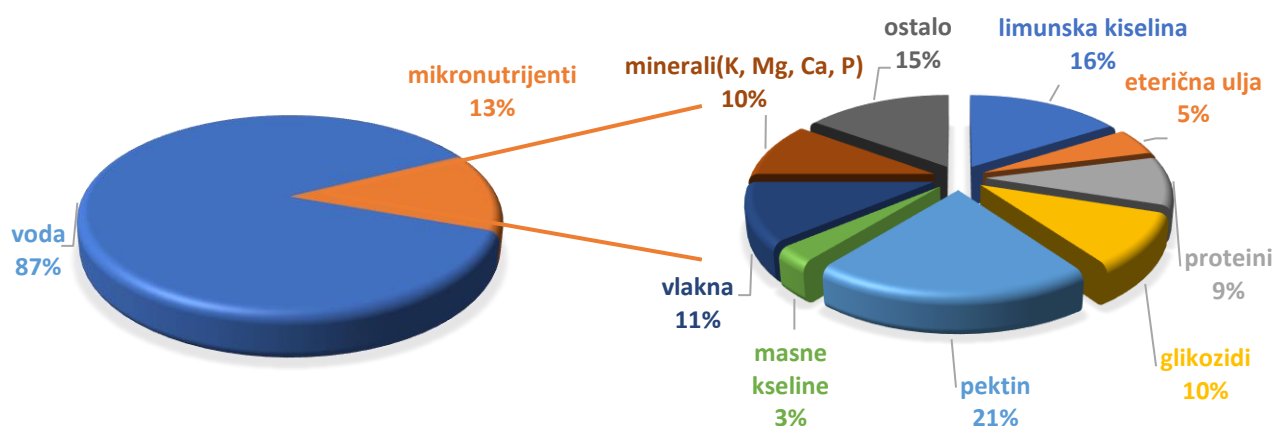
Citrusi ili agrumi su biljke iz porodice *Rutaceae* kojoj pripadaju plodovi poput naranče, mandarine, limuna, grejpa te limete. Prema podacima USDA (U.S. Department of Agriculture) 2010. godine proizvedeno je preko 82 milijuna tona agruma, a zanimljiv je i podatak da proizvodnja naranče čini čak 61 % ukupne svjetske proizvodnje agruma (Stinco i sur., 2016). Obzirom na drastično povećanje populacije te životnih standarda danas je taj broj mnogo veći, a time je i količina nusproizvoda mnogo veća jer se samo 1/3 naranče koristi za proizvodnju narančinog soka.

Svaki plod iz roda *Citrus* ima mesnati dio (mezokarp) i koru (perikarp) (slika 2). Koru čine dva različito obojena dijela, obojeni epikarp (flavedo) i bijela mekana sredina mezokarp (albedo) prikazani na slici 3. Obojenost kore se mijenja razmjerno o stupnju zrelosti ploda (Crnomarković i Kiridžija, 2014). Eterična ulja pojedinog ploda nalaze se u uljnim žlijezdama u vanjskom dijelu kore. Do oslobađanja mirisa dolazi pri mehaničkom oštećenju kao što je guljenje ili tješćenje usplođa te se tako dobiva eterično ulje .



**Slika 2.** Struktura citrusa (Mahato i sur.,2018).

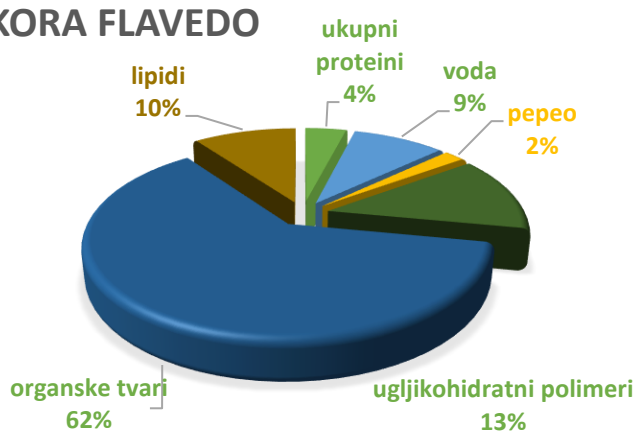
## KEMIJSKI SASTAV AGRUMA



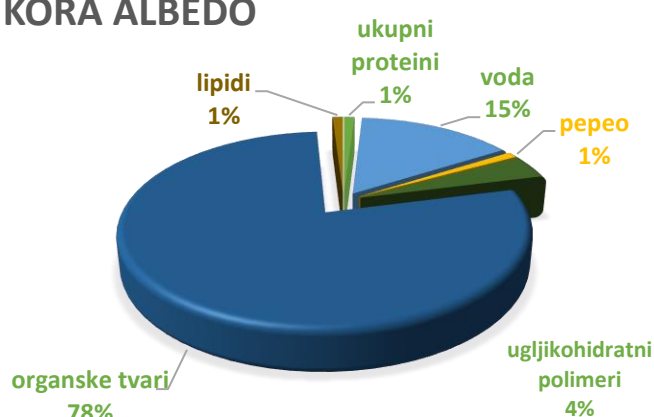
**Slika 3.** Kemijski sastav citrusa (Mahato i sur., 2018).

Preostale dvije trećine naranče čini otpad (koštice, kora) kojeg karakterizira visok udio organske tvari (95 % od ukupne količine krute tvari) i visok sadržaj vode (oko 80 – 90 %). Zbog nedostatka infrastrukture za obradu biomase i nedostatka znanja, ogromne količine nusproizvoda završe u okolišu. Citrusni otpad je štetan za okoliš jer sadrži mnogo bioaktivnih spojeva prikazanih na slici 4 te se mora pažljivo tretirati prije odlaganja. Organske tvari čine topljivi šećeri (npr. glukoza, fruktoza i saharoza), ugljikohidratni polimeri (celuloza, hemiceluloza i pektin), enzimi (pektinesteraza, fosfataze i peroksidaze), flavonoidi, eterična ulja (uglavnom limonen), pigmenti (Boukroufa i sur., 2015) te organske kiseline koje čine oko 1 % suhe tvari (Angel Siles Lopez i sur., 2010).

## KORA FLAVEDO



## KORA ALBEDO



**Slika 4.** Kemijski sastav perikarpa (Mahato i sur., 2018).

Češćom konzumacijom proizvoda koji sadrže dijetalna vlakna može se prevenirati i liječiti niz bolesti kao što su pretilost, dijabetes, neki gastrointestinalni poremećaji, kardiovaskularne i maligne bolesti. Dijetalna vlakna se sastoje od raznih ugljikohidratnih polimera kao što su celuloza, hemiceluloza, pektin,  $\beta$ -glukan te lignin, a možemo ih naći u voću i povrću (Elleuch i sur., 2011). Danas se čak fenoli, aminokiseline, eterična ulja, pektin, karotenoidi, flavonoidi i vitamin C, koji su prisutni u agrumima, povezuju sa prevencijom degenerativnih bolesti (Wang i sur., 2014).

Kora citrusa koja je primarni otpad dobar je izvor melase, pektina i limonena pa se minimalno obrađena, odnosno osušena, prodaje kao stočna hrana (Bocco i sur., 1998). Dolazimo do zaključka da bi kora agruma, koja se uglavnom odbacuje kao otpad u okoliš, pravilno obrađena te tretirana mogla koristiti i kao potencijalno ljudsko prehrambeno sredstvo zbog svoje niske cijene i lake dostupnosti. Prerada nusproizvoda agruma potencijalno predstavlja bogat izvor fenolnih spojeva i dijetalnih vlakana koji se nalaze u kori.

### **2.2.1 . Fenolni spojevi**

Istraživanja su pokazala da fenoli nisu prisutni samo u jestivim dijelovima biljke, već su također zapaženi u nejestivim dijelovima biljke s višestrukim biološkim učincima. Kao promicatelji zdravlja, fenolni spojevi imaju ulogu u diferencijaciji stanica, održavanju stabilnosti genoma, suzbijanju stvaranja *N*-nitrozamina i u metabolizmu estrogena (Shahidi, 1997). Glavni mehanizmi za antioksidativni učinak fenola u funkcionalnoj hrani uključuju uklanjanje slobodnih radikala i keliranje metala, odnosno uklanjanje teških metala iz tijela što znači da su polifenoli djelotvorni kod prevencije i liječenja bolesti posredovanih slobodnim radikalima kao što su maligne bolesti (Huang i sur., 2001), dijabetes (Boynes, 1991) i neurodegenerativne bolesti (Perry i sur., 2000). Agrumi sadrže brojne antioksidanse koji imaju širok raspon bioloških učinaka uključujući: antibakterijsko, antivirusno, protuupalno, antialergijsko djelovanje (Cook i Sammon, 1996).

Glavni uzroci kvarenja hrane, posebno mesnih proizvoda su oksidacija lipida i autooksidacija. Kako bi se usporilo i donekle spriječilo njihovo kvarenje koriste se sintetički antioksidansi koji mogu uzrokovati promjene u parametrima kvalitete mesa kao što su boja, okus, miris, tekstura pa čak i čak hranjiva vrijednost (Fernandez i sur., 1997). Za prevladavanje takvih nedostataka Devatkal i sur. (2010) su iz kore Kinnow mandarine dobili mljeveni praškasti ekstrakt koji se pokazao kao uspješna te sigurnija metoda prezerviranja hrane. Rezultati su pokazali da su upravo fenolni spojevi zaslužni za usporavanje autooksidacije. Benamrouchea i Madania (2013) su proveli istraživanje gdje su se

nusproizvodi dviju narančinih sorti uzgojenih u Alžiru (*Citrus sinensis* L. i *Citrus aurantium* L.) pokazali kao snažni antioksidansi (Rafiq i sur.,2016).

### **2.2.2. Flavonoidi**

Flavonoidi su najveća klasa polifenolnih spojeva sa preko 6000 različitih kemijskih spojeva, a zajednička im je struktura od 15 C atoma (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Ovisno o strukturi grupe koju čine 3 C atoma mogu se podijeliti u tri velike skupine: auroni, flavonodi te kalkoni i hidrokalkoni.

Citrusi sadrže tri vrste flavonoida: flavanone, flavone i flavonole. Flavanoni su najveća grupa flavonoida koja je prisutna u agrumima, a često se pojavljuju u obliku glikozida i to najčešće kao hesperidin i naringin. Najveća koncentracija flavonoida nalazi se upravo u kori, a ovisno o mjestu uzgoja biljke se razlikuje njihova ukupna količina (Manthey i Grohmann,2001; Wang i sur., 2014). U istraživanjima Chen i sur. (2017), ukupni sadržaj flavonoida u ekstraktu narančine kore bio je oko 14,0–31,9 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta narančine kore. Najzastupljeniji glikozidni flavanoni u citrusnoj kori su naringin, neohesperidin te dominirajući hesperidin, dok su specifično u ekstraktu narančine kore uz dominirajući hesperidin prisutni i narirutin, nobiletin i tangeritin (Chen i sur., 2017). Utvrđeno je da flavanoni imaju antivirusno i protuupalno djelovanje, smanjuju krhkost kapilara te ograničavaju agregaciju trombocita kod ljudi (Huet, 1982; Benavente-Garcia i sur., 1997).

Flavonoidi posjeduju širok spektar biokemijskih funkcija poput povećanja antioksidativnog kapaciteta protiv lipidne peroksidacije (Assini i sur., 2013) i reducira utjecaj oksidacijskog stresa koji uzrokuje oštećenje stanica. Ovi spojevi imaju korisne protuupalne, antitumorske (Romagnolo i Selmin, 2012;Park and Pezzuto, 2012) i antiarterosklerozne učinke (Mulvihill i Huff, 2012). Preporuča se povećan unos flavonoida kod različitih bolesti (npr. dijabetes, Aruoma i sur., 2012) i pri raznim liječenjima (npr. kemoterapije, Meiyanto i Hermawan, 2012), a pokazuju i odlične rezultate kao neuroprotektivni lijekovi (Hwang i sur., 2012). Osim tradicionalne ekstrakcije metanolom/etanolom, koriste se i ekstrakcija vrućom vodom, ekstrakcija uz pomoć mikrovalnog zračenja ili ultrazvuka, adsorpcija, enzimaska ekstrakcija i ekstrakcija primjenom zelenih otapala - superkritičnih fluida i DES-a .

### **2.2.3.Dijetalna vlakna**

Dijetalna vlakna se često klasificiraju kao topljiva i netopljiva dijetalna vlakna. Biljni ugljikohidratni polimeri, oligosaharidi i polisaharidi, poznatiji kao celuloza, hemiceluloza, lignin, gume, otporni škrob te inulin su netopljiva dijetalna vlakna (Fuentes-Zaragoza i sur., 2010). Da bi se određena hrana definirala kao izvor vlakana treba imati omjer SDF / IDF

blizu 1: 2, gdje je SDF-topljiva dijetalna vlakna i IDF-netopljiva dijetalna vlakna (Jaime i sur., 2002). Potreban dnevni unos dijetalnih vlakana za žene iznosi 21-25 g, dok za muškarce 30–38 g (Odbor za hranu i prehranu, Institut of Medicine, 2001). Većina nutricionista i stručnjaka za prehranu sugerira da 20-30% našeg dnevnog unosa vlakana dolazi iz topljivih vlakana. Prehrambena vlakna imaju i neka funkcionalna svojstva kao što su sposobnost zadržavanja vode, sposobnost zadržavanja ulja, stabilizacija emulzije te povećavaju vijek trajanja hrane ukoliko je ono bogato vlaknima (Satari i Karimi, 2018). Vlakna imaju mnogobrojne utjecaje na organizam, imaju važan utjecaj u regulaciji probave i apsorpcije u tankom crijevu, održavanju razine inzulina i u izbjegavanju hidrolize (Champ i sur., 2003; Fuentes-Zaragoza i sur., 2010). Žitarice, voće i povrće su najpoznatiji izvori vlakana, a ono što je zanimljivo jest da se i u njihovim nusproizvodima netopljiva dijetalna vlakna nalaze u velikim količinama. Tipičan primjer je primjena 1,5 % narančinog vlakna iz kore koje se može koristiti kao nadomjestak masnoći u suhim fermentiranim kobasicama (Garcia i sur. 2002). Najpoznatiji predstavnik topljivih dijetalnih vlakana je pektin koji se primarno nalazi u staničnoj stijenci kopnenih biljaka i u većini povrća i voća (Ciriminna i sur., 2015). Zahvaljujući svojstvu topljivosti koristi se u prehrambenoj industriji kao dodatak koji može osigurati poželjnu teksturu hrane i pića. Pri niskoj koncentraciji vode pektin djeluje kao hidrokolid, odnosno kao stabilizator i ugušćivač (npr. kod pripreme marmelade). Hidrokolidi imaju hidrofilna svojstva i dispergiraju se u otopini kao koloidi. Opća svojstva korisnih hidrokoloida su uz značajnu topljivost u vodi i sposobnost povećanja viskoznosti te sposobnost tvorbe gela. Dodatne specifične uloge hidrokoloida su stabilizacija pjena i emulzija, poboljšanje/smanjenje ljepljivosti glazura na pekarskim proizvodima, inhibicija kristalizacije (šećer i led) te inkapsulacija arome (Jašić M. 2013). Nadalje, kao rezultat njegove biorazgradivosti, biokompatibilnosti, jestivosti i kemijske stabilnosti, pektin se smatra prikladnom matricom za izradu jestivih aktivnih filmova pri pakiranju hrane (Espitia i sur., 2014). Također, pektin se veže na lipoprotein niske gustoće čime se smanjuje apsorpcija lipida tijekom probave, a time se povećava prikladnost prehrambenog proizvoda (Karboune i Khodaei, 2016).

#### **2.2.4. Eterična ulja**

Citrusova kora kao sirovina najviše služi za dobivanje esencijalnog ulja koja se najviše koriste se u prehrambenoj, a manje u kozmetičkoj i parfemskoj industriji (Marković, 2005). Nazivaju se još i „eteričnim“ jer ostavljena na otvorenome nestaju bez traga, hlapeći u eter (Wildwood, 2004.). Eterična ulja su smjese aromatskih i hlapljivih spojeva, većinom bezbojne, žućkaste ili tamnosmeđe boje. Pri sobnoj temperaturi su uglavnom u tekućem



stanju te lako kristaliziraju. Međusobno kombinirani atomi ugljika, kisika i vodika daju velik broj molekula s najrazličitijim grupama spojeva. Esencijalna ulja uz hlapljive dominirajuće terpene sadrže i alkohole, aldehide, ketone, fenole, estere, laktone i fenilpropane (Marković, 2005). Više od 400 različitih eteričnih ulja sadrže agrumi, sa 85–99 % hlapljivih, 1–15% nehlapljivih komponenti, a najbogatiji su limonenom s koncentracijom 73,9 -97,0 % (w/w et. ulja) (Satari i Karimi, 2018). Eterična ulja nastaju kao nusproizvodi metabolizma u specijaliziranim biljnim tkivima koja sadrže uljne žlijezde. Eterična ulja predstavljaju prirodni zaštitni mehanizam koji biljkama služi za preživljavanje, za odbijanje grabežljivaca i privlačenje kukaca koji pomažu pri oprašivanju i zaštiti biljke od bolesti. Eterična ulja se mogu nalaziti u različitim dijelovima biljke, primjerice drvo naranče proizvodi tri različite mirisne esencije, a svaka esencija ima različito farmakološko djelovanje. Eterična ulja agruma imaju veliku primjenu u prehrambenoj industriji zbog GRAS statusa koji im je dodjelila Američka agencija za hranu i lijekove (eng. US Food and Drug Administration) (Espina i sur., 2011).

Postoje biljke koje pripadaju istoj porodici i vrsti, imaju isti izgled, ali međusobno se razlikuju po svom kemijskom sastavu. Za takve biljke upotrebljava se izraz „kemotip“. Na kemijski sastav biljaka uvelike utječe i geografski položaj (samoniklo ili uzgoj), vrsta tla, klimatski uvjeti i nadmorska visina. Pri označavanju kemotipova eteričnih ulja, prema dogovorenoj terminologiji, nakon latinskog naziva biljke navodi se glavni kemijski spoj eteričnog ulja, kod naranče bi to bio D-limonen (Ferenčić i sur, 2016). Kiralnost je važna u svojstvima limonena jer o njoj ovisi miris i okus, (+)-limonen (također *R*- ili D-limonen) ima ugodan i klasičan narančin miris, dok (-)-limonen (također *S* ili L-limonen) ima oštar, pomalo neugodan miris (Jongedijk i sur., 2016). Trenutno, dominantni limonen enantiomer na tržištu je (+)-limonen, koji se uglavnom proizvodi iz nusproizvoda prerade limunskog voća različitim metodama ekstrakcije (Satari i Karimi, 2018).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 MATERIJALI

#### 3.1.1 Biljni materijali

- narančina kora nepoznatog podrijetla

#### 3.1.2 Kemikalije

- Albumin goveđeg seruma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Bradford reagens, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Demineralizirana voda, PBF
- 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etanol (96 %), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilen-glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Fenol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Galakturonska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *n*-Heptan, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij-fosfatni pufer, pripravljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Fisher Chemical, UK)
- Kalij, natrij tartarat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev hidroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev sulfit, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Pektin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- (*R*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R,S*)-1-feniletetil-acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala su bili analitičke čistoće.

#### 3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija

- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Homogenizator s regulacijom temperature, EppendorfThermoMixer C, Njemačka
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijska tresilica, Fisher Bioblock Scientific, tip KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete, tikvice s okruglim dnom, stakleni lijevak, stalak za epruvete)
- Magnetska mješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikropipete (20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1 mL, 5 mL )
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Tarionik s tučkom
- UV – Vis spektrofotometar, GENESYSTEM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

## 3.2. METODE

### 3.2.1 Priprema DES-a kolin-klorid:glukoza (ChClGlc)

U tikvici s okruglim dnom pripremljen je DES miješanjem kolin-klorida kao akceptora vodikove veze i glukoze kao donora vodikove veze u molarnom omjeru 1:1 s 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) (tablica 2). Priprema otapala je provedena na magnetskoj mješalici pri stalnoj temperaturi od 50 °C. Nakon 2 sata zagrijavanja dobivena je homogena, prozirna i bezbojna tekućina.

**Tablica 2.** Mase sirovina potrebnih za pripremu DES-a kolin klorid:glukoza

DES	Kratica	udio vode [% w/w]	m kolin-klorid [g]	m glukoze [g]	m voda [g]
Kolin-klorid:glukoza	ChClGlc 30 %	30	7	9,03	6,87
	ChClGlc 50 %	50	7	9,03	16,03
	ChClGlc 80 %	80	7	9,03	64,12

### 3.2.2. Priprava ekstrakata narančine kore

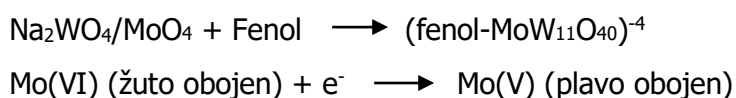
Da bi se uklonile površinske nečistoće sa kore, naranču je potrebno oprati pomoću detergenta, površinski sterilizirati etanolom i potom isprati demineraliziranom vodom. Zatim

se naranče pažljivo ogule nožićem te se kora nareže na komadiće približne veličine 5 mm x 5 mm x 2mm. Izvaže se 2,5 g isjeckane kore naranče koja se prenese u tarionik s tučkom gdje se zajedno sa 10 mL pripremljenih eutektskih otapala, kalij-fosfatnog pufera (pH=7) odnosno zakiseljenog etanola (75 % EtOH, 0,1 % HCl) mehanički homogenizira pomoću tučka. Provedene su tri ekstrakcije DES-om kolin-klorid:glukoza s 30 %, 50 % i 80 % vode.

Nakon dvije minute homogenizacije smjesa se centrifugira 15 min na 5000 rpm. Nakon toga, smjesa se filtrira pomoću običnog lijevka za filtraciju i filter papira budući da centrifugiranjem nisu potpuno odvojeni čvrsti dijelovi kore naranče. Supernatant je korišten za određivanje ukupnih polifenolnih spojeva i ukupnih proteina te određivanja aktivnosti pektin-esteraze.

### 3.2.3. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline. Folin-Ciocalteu metoda se temelji na reakciji oksidacije fenolnih spojeva u lužnatoj sredini smjesom fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline pri čemu se fosfovolframova i fosfomolibdenova kiselina reduciraju u plavo obojeni volframov i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog obojenja je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva.



#### *Postupak određivanja*

Ukupni polifenolni spojevi su određivani u ekstraktima narančine kore koji su pripremljeni u DES-u ChClGlc sa 30 %, 50 % i 80 % vode te zakiseljenom etanolu (75 % EtOH, 0,1 % HCl) koji je korišten kao referentno otapalo (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2). Pripremljeni ekstrakti narančine kore se razrijede 20 puta demineraliziranom vodom. U epruvete se otpipetira 0,25 mL razrijeđenog uzorka te se doda 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa koji se prethodno razrijedi 10 puta. Nakon 5 minuta na sobnoj temperaturi dodaje se 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ). Zatim slijedi termostatiranje otopine u vodenoj kupelji na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 5 minuta. Reakcija se zaustavlja hlađenjem u hladnjaku. ApSORBANCija pri  $\lambda=760 \text{ nm}$  se mjeri na UV/VIS spektrofotometru (Singleton i sur., 1999).

#### *Izrada baždarnog dijagrama*

Otopina galne kiseline koncentracije  $500 \text{ mg L}^{-1}$  koristi se kao standard za izradu baždarnog dijagrama. Iz ishodne otopine galne kiseline prirede se razrjeđenja koncentracija

10, 20, 30, 40 i 50 mg L<sup>-1</sup>. Baždarni dijagram se konstruira pomoću računala tako što se izmjerene vrijednosti apsorbancija razrijeđenih otopina galne kiseline nanese na ordinatu koordinatnog sustava, dok se koncentracije razrijeđenih otopina galne kiseline nanese na apscisu. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunaju se koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva u uzorcima ekstrakata narančine kore.

### **3.2.4. Određivanje proteina metodom po Bradfordu**

Ukupni proteini u ekstraktima narančine kore pripremljenima u DES-u ChClGlc sa 30, 50 i 80 % vode te puferu (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2) određeni su metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Ova kolorimetrijska metoda se temelji na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira s baznim pobočnim grupama, primarno Arg, Lys i His te u manjoj mjeri s aromatskim pobočnim grupama Tyr, Trp i Phe. Anionski oblik boje se hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama veže sa spomenutim ograncima proteina pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa protein – boja i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Prilikom vezanja na protein pomiče se apsorpcijski maksimum boje s valne duljine 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski.

#### *Postupak provođenja analize*

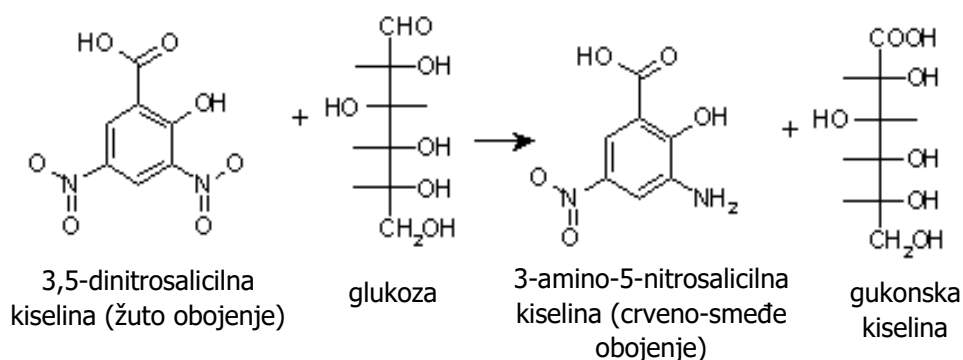
U kivete se otpipetira 40 µL uzorka te 1200 µL Bradford reagensa. Zatim slijedi inkubacija u tami na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon 15 minuta očitava se apsorbancija pri  $\lambda=595$  nm na spektrofotometru.

#### *Izrada baždarnog dijagrama*

Protein Albumin iz goveđeg seruma (BSA) koristi se kao standard za izradu baždarnog dijagrama. Potrebno je pripremiti otopine proteina albumina iz goveđeg seruma koncentracija 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1 i 1,2 mg mL<sup>-1</sup>. U kivete se otpipetira 40 µL otopine goveđeg albumina te se doda 1200 µL Bradford reagensa. Reakcija traje 15 minuta, nakon čega se mjeri apsorbancija pri  $\lambda=595$  nm na spektrofotometru. Baždarni dijagram se konstruira pomoću računala tako što se izmjerene vrijednosti apsorbancija razrijeđenih otopina goveđeg albumina nanese na ordinatu koordinatnog sustava, dok se koncentracije razrijeđenih otopina goveđeg albumina nanese na apscisu. Iz dobivene jednadžbe pravca izračunaju se koncentracije ukupnih proteina u uzorcima ekstrakata narančine kore.

### 3.2.5. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima narančine kore

Spektrofotometrijski se mjeri aktivnost pektin-esteraze na osnovi određivanja koncentracije reducirajućih šećera koji se oslobode nakon inkubacije enzima sa pektinom pomoću 3,5-dinitrosalicilne kiseline (eng. 3,5-dinitrosalicylic acid assay, DNSA) (Miller, 1959). U prisutnosti reducirajućih šećera 3,5-dinitrosalicilna kiselina se reducira do 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline, a karbonilna grupa šećera se oksidira u karboksilnu grupu (slika 5). Moguće je pratiti tijek kemijske reakcije promjenom boje DNSA reagensa koji mijenja boju s prvotne svijetlo žute u krajnju crveno-smeđu boju.



**Slika 5.** Kemijska reakcije redukcije 3,5-dinitrosalicilne kiseline u prisutnosti reducirajućih šećera.

#### *Priprema reagensa i otopina za analizu*

Za pripremu DNSA reagensa izvaže se 10 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline, 0,5 g natrijevog sulfita i 10 g natrijevog hidroksida te se otopi u 998 mL demineralizirane vode. Nakon otapanja doda se 2 mL fenola te se pripremljeni reagens pohrani u tamnoj boci. Rochellove soli se pripreme otapanjem 40 g natrij, kalij tartarata u demineraliziranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL.

#### *Postupak određivanja*

Ekstrakti narančine kore u DES-ovima i puferu (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2) razrijede se 30 puta. U Eppendorf epruvete od 1,5 mL se stavi 5-10 mg pektina te se doda 1 mL razrijeđenog uzorka. Proba s enzimom ne sadrži supstrat, dok kontrola supstrata i kontrola reagensa sadržavaju samo 1 mL demineralizirane vode. Zatim se vrši inkubacija tijekom 30 minuta na termomikseru pri 40 °C i 900 rpm. Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju 5 minuta na 10 000 rpm. Zatim se u Eppendorf epruvete od 2 mL doda 600 µL supernatant uzorka i 600 µL reagensa DNSA. Epruvete su inkubirane 15 min na 95 °C. Za stabilizaciju boje uzorka nakon inkubacije se odmah dodaje 200 µL otopine natrij, kalij

tartarata (Rochellova sol). Uzorci se ohlade na ledu tijekom 5 min, nakon čega se mjeri apsorbanacija pri  $\lambda=575$  nm.

#### *Izrada baždarnog dijagrama*

Za izradu baždarnog dijagrama korištena je otopina galakturonske kiseline koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  koja se pripravi otapanjem 100 mg galakturonske kiseline u 100 mL demineralizirane vode. Iz ishodne otopine se naprave serijska razrjeđenja koncentracija od 0,1 do  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Pomoću računala se konstruira baždarni dijagram tako da se izmjerene apsorbanacije pri  $\lambda=575$  nm nanese na ordinatu koordinatnog sustava, a koncentracije otopina galakturonske kiseline se nanese na apscisu.

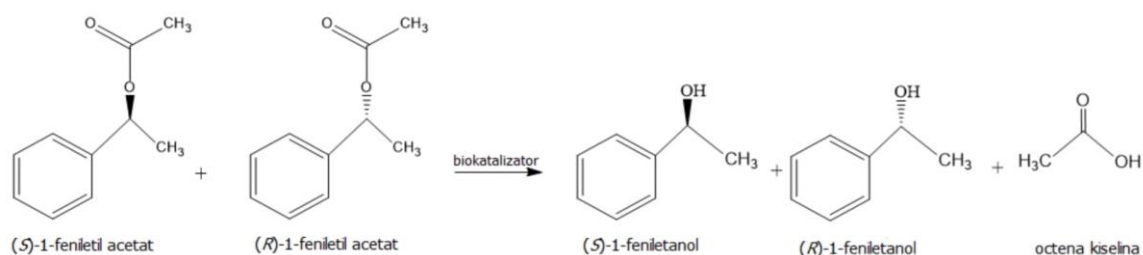
#### *Prikaz rezultata*

Od izmjerenih vrijednosti apsorbanacija u uzorcima ekstrakata narančine kore oduzme se apsorbanacija otopine enzima, apsorbanacija otopine supstrata te apsorbanacija otopine reagensa DNSA. Razlike apsorbanacija se uvrste u jednadžbu pravca baždarnog dijagrama te se izračuna koncentracija oslobođenih reducirajućih šećera ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). Jednom miligramu oslobođenog šećera odgovara  $5,1509 \text{ }\mu\text{mol}$  galakturonske kiseline. Aktivnost enzima pektin-esteraze se izračuna iz sljedećeg izraza:

$$\text{Aktivnost enzima (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{oslobođeni šećer } [\mu\text{mol}]}{\text{vrijeme inkubacije } [\text{min}] \cdot 1 \text{ mL}} \cdot \text{faktor razrjeđenja} \quad [1]$$

### **3.2.6. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore**

Pomoću hidrolitičkih enzima iz otpadne kore naranče u DES-u ChClGlc provedena je hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata (slika 6) s 30 %, 50 % i 80 % vode. Kao referentno otapalo koristi se pufer. Na analitičkoj vagi se odvaži 0,2 g isjeckane kore naranče. U Falcon epruvete se stavi po 1 mL otapala te 0,2 g isjeckane kore naranče te se reakcija započinje dodavanjem  $15 \text{ }\mu\text{L}$  supstrata (*R,S*)-1-feniletil-acetata. Reakcija se provodi na tresilici pri sobnoj temperaturi, a uzorkovanje se vrši nakon 48, 96 i 168 sati. Uzorak za analizu se pripremi tako da se reakcijskoj smjesi doda 1 mL demineralizirane vode te se nakon vorteksiranja doda 8 mL heptana. Zatim se provodi ekstrakcija preostalog supstrata te nastalih produkata snažnim miješanjem tijekom 3 minute. Pomoću plinske kromatografije se analizira ekstrakt ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ) iz heptanskog dijela.



**Slika 6.** Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata.

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u puferu te u DES-u s 30 %, 50 % i 80 % vode, izračuna se iskorištenje procesa hidrolize te enantiomerni višak.

### Određivanje koncentracije produkta (*R,S*)-1-feniletanola

Koncentracija dobivenog produkta (*R,S*)-1-feniletanola  $c_p$  (mol L<sup>-1</sup>) računa se prema jednadžbi 2:

$$c_p = c_{s1} - c_{s2} \quad [2]$$

gdje  $c_{s1}$  predstavlja početnu koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil-acetata (mol L<sup>-1</sup>), a  $c_{s2}$  koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil-acetata izmjerenu na kraju reakcije (mol L<sup>-1</sup>).

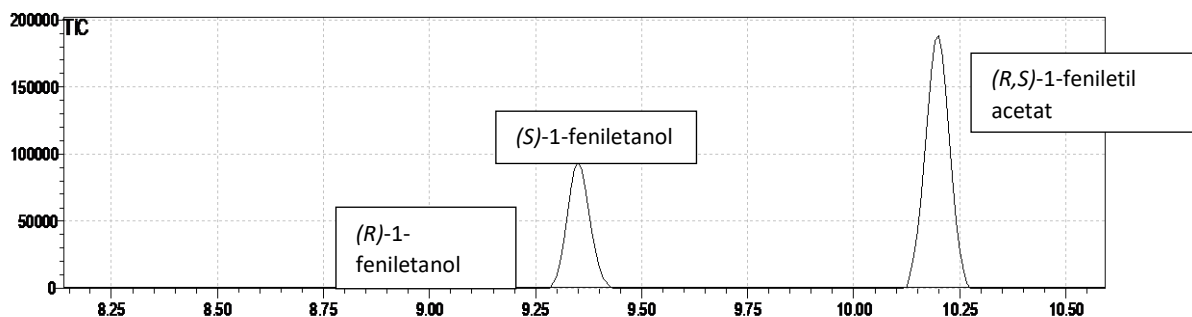
Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletil-acetata odnosno (*R,S*)-1-feniletanola provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom. Koncentracija (*R,S*)-feniletil-acetata  $c_{s2}$  izračuna se iz baždarnog pravca ovisnosti koncentracije istog o površini ispod kromatografskog pika analizom reakcijske smjese plinskom kromatografijom.

### Kromatografski uvjeti:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
- Pokretna faza: Helij
- Protok: 36,5 ml min<sup>-1</sup>
- Detektor: spektrometar masa
- Temperatura - kolona: gradijentno (T<sub>1</sub>=80 °C, T<sub>2</sub>=120 °C (Δt=15 °C min<sup>-1</sup>), T<sub>3</sub>=125 °C (Δt=2 °C min<sup>-1</sup>), T<sub>4</sub>=140 °C (Δt=1 °C min<sup>-1</sup>))
- Temperatura injektora 200 °C
- Detektor: temperatura ionskog izvora 200 °C, temperatura sučelja 200 °C
- Vrijeme trajanja analize: 26,37 min



Na slici 7 prikazan je tipičan plinski kromatogram enzimski katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata. Retencijsko vrijeme (*R<sub>t</sub>*) za (*R,S*)-1-feniletil-acetat iznosi 10,178 min, za (*R*)-1-feniletanol iznosi 9,095 min, a za (*S*)-1-feniletanol iznosi 9,334 min.



**Slika 7.** Prikaz tipičnog plinskog kromatograma enzimski katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletilacetata.

**Iskorištenje procesa hidrolize**  $\eta$  (%) izračuna se prema jednadžbi 3:

$$\eta_{hidroliza} = \frac{c_P}{c_T} \cdot 100 \quad [3]$$

gdje  $c_P$  predstavlja izmjerenu koncentraciju (*R,S*)-1-feniletanola ( $\text{mol L}^{-1}$ ), a  $c_T$  teoretski moguću koncentraciju (*R,S*)-1-feniletanola ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

**Enantiomerni višak**  $ee$  (%) izračuna se prema jednadžbi 4:

$$ee = \frac{R_{1-feniletanol} - S_{1-feniletanol}}{R_{1-feniletanol} + S_{1-feniletanol}} \cdot 100 \quad (\%) \quad [4]$$

gdje je  $R_{1-feniletanol}$  površina ispod pika (*R*)-1-feniletanola, a  $S_{1-feniletanol}$  površina ispod pika (*S*)-1-feniletanola.

#### *Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije supstrata*

Pripreme se otopine (*R,S*)-1-feniletil-acetata u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,001; 0,003; 0,005; 0,007 i 0,01  $\text{mol L}^{-1}$ . Zatim se 100  $\mu\text{L}$  pripremljenih otopina analizira plinskom kromatografijom. Baždarni dijagram se konstruira pomoću računala tako što se na ordinatu nanese izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija otopina. Iz dobivene jednadžbe pravca izračunaju se nepoznate koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata u uzorcima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

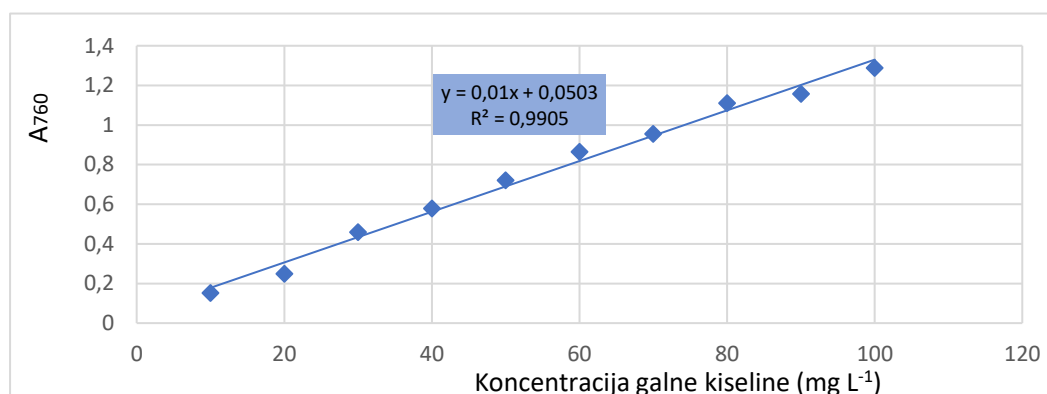
Agrumi su najviše konzumirani plodovi jer posjeduju velike prehrambene vrijednosti i od velike su zdravstvene koristi. Sadrže brojne antioksidanse koji imaju širok raspon bioloških učinaka uključujući: antibakterijsko, antivirusno, protuupalno, antialergijsko djelovanje (Cook i Sammon, 1996). Samo se 45 % naranče koristi, većinom u prehrambenoj industriji, dok se preostalih 55% smatra otpadom. Kako bi se iskoristio cjelokupni potencijal naranče, ovaj brzo akumulirajući otpad potrebno je preraditi te u konačnici iskoristiti. Donedavno se ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz kore naranče provodila pomoću zapaljivih i hlapljivih organskih otapala, štetnih za okoliš. Organska otapala se u akademskoj zajednici polako zamjenjuju otapalima iz obnovljivih izvora koja zadovoljavaju načela zelene kemije pa ih nazivamo i zelenim otapalima. Jedna od njih su eutektička otapala čija sposobnost ekstrakcije bioaktivnih spojeva pokazuje zadovoljavajuće rezultate.

U cilju pronalaska najboljeg DES-a za ekstrakciju bioaktivnih spojeva, određivanje aktivnosti enzima pektin-esteraze, određivanje koncentracije proteina te biokatalizu u ovom radu je ispitan DES kolin-klorid:glukoza s različitim udjelima vode. Kako bi se usporedila uspješnost ekstrakcije polifenolnih spojeva iz otpadne narančine kore korišten je zakiseljeni EtOH kao referentno otapalo, dok se u preostalim ispitivanjima koristio kalij-fosfatni pufer. Također je ispitana mogućnost enantioselektivne hidrolize racemičnog estera (*R,S*)-1-feniletil-acetata pomoću hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore.

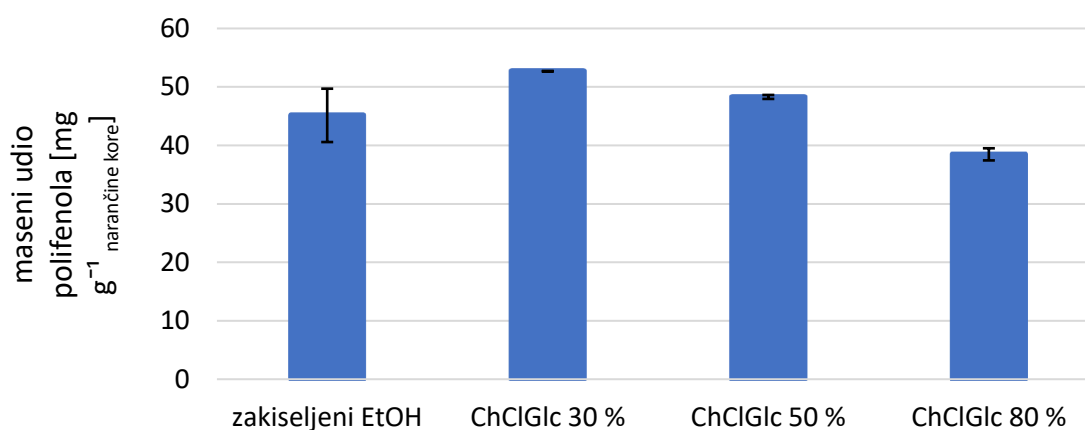
### 4.1 Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

Narančina kora bogata je fenolnim spojevima, sekundarnim metabolitima biljaka. Kora naranče obiluje fenolnim spojevima koji pokazuju veliko antioksidativno djelovanje, a osnovnu strukturu karakterizira aromatski prsten.

Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima otpadne narančine kore pripremljenima s DES-om kolin-klorid:glukoza je provedeno u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom. Rezultati mjerenja su izraženi kao mg galne kiseline po gramu narančine kore. Slika 8 prikazuje baždarni dijagram koji predstavlja ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na slici 9 su prikazani rezultati mjerenja.



**Slika 8.** Baždarni dijagram galne kiseline.



**Slika 9.** Maseni udjeli polifenola u ekstraktima narančine kore \*, \*\*.

\*rezultati su srednja vrijednost ± S.D (n= 3)

\*\* zakiseljeni EtOH=ekstrakt pripremljen u etanolu zakiseljenom sa HCl (75 %,v/v s 0,1 %, v/v HCl), ChClGlc30%=ekstrakt pripremljen u otapalu kolin-klorid:glukoza s 30 %, v/v vode, ChClGlc50%=ekstrakt pripremljen u otapalu kolin-klorid:glukoza s 50 %, v/v vode, ChClGlc80= ekstrakt pripremljen u otapalu kolin-klorid:glukoza s 80 % vode

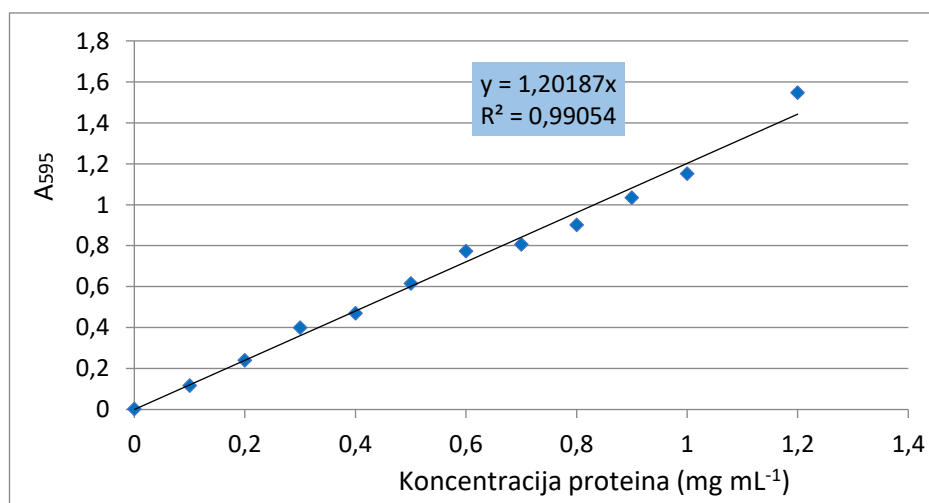
Ekstrakcija polifenolnih spojeva provedena je pomoću DES-a kolin-klorid:glukoza s 3 različita udjela vode, 30 %, 50 % te 80 % (w/w). Kao referentno otapalo korišten je etanol, zakiseljen s klorovodičnom kiselinom. Iz grafa se može iščitati da je najveći maseni udio polifenolnih spojeva ekstrahirani DES-om ChClGlc s 30 % vode (52,69 ± 0,035 mg g<sup>-1</sup> narančine kore). Pripravljenim DES-om ChClGlc sa 50 % vode (48,28 ± 0,34 mg g<sup>-1</sup> narančine kore) ekstrahirana je veća količina polifenolnih spojeva iz narančine kore u usporedbi s referentnim otapalom (45,13 ± 4,52 mg g<sup>-1</sup> narančine kore). U odnosu na sva ispitana otapala ChClGlc s 80 % vode pokazuje najmanji udio ekstrahiranih polifenolnih spojeva. U usporedbi s hlapljivim organskim otapalima kao što je etanol, DES-ovi ChClGlc sa 30 % i 50 % vode predstavljaju bolji izbor otapala za ekstrakciju polifenolnih spojeva. U literaturi su poznata brojna istraživanja bazirana na ekstrakciji polifenolnih spojeva iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016a, Radošević i sur., 2016). Tako su Radošević i sur.

(2016) proveli ekstrakciju polifenolnih spojeva iz pokožice grožđa, a ekstrakti su promatrani s obzirom na ekstrakciju pojedinačnih polifenola. Najveća efikasnost ekstrakcije (+)-katehina postignuta je s otapalom kolin-klorid:fruktoza a zatim slijede ChCl:jabučna kiselina > ChCl:ksiloza > ChCl:glukoza > ChCl:glicerol. Kao i u našem slučaju otapalo na bazi kolin klorida i šećera kao donora vodikove veze je među najproduktivnijim otapalima dok se otapalo kolin klorida i glicerola pokazalo kao najmanje selektivno. Međutim, osim (+) katehina u pokožici grožđa nalazi se još jedan važan flavonoid – kvercetin-3-*O*-glukozid. Najveća količina ekstrahiranog kvercetin-3-*O*-glukozida postignuta je s otapalima kako slijedi: ChCl:Fru > ChCl:ksiloza > ChCl:Gly > ChCl:jabučna k. > ChCl:Glc. Radi usporedbe ekstrakcija je provedena i s vodenom otopinom metanola (70 %, v/v) (Radošević i sur., 2016).

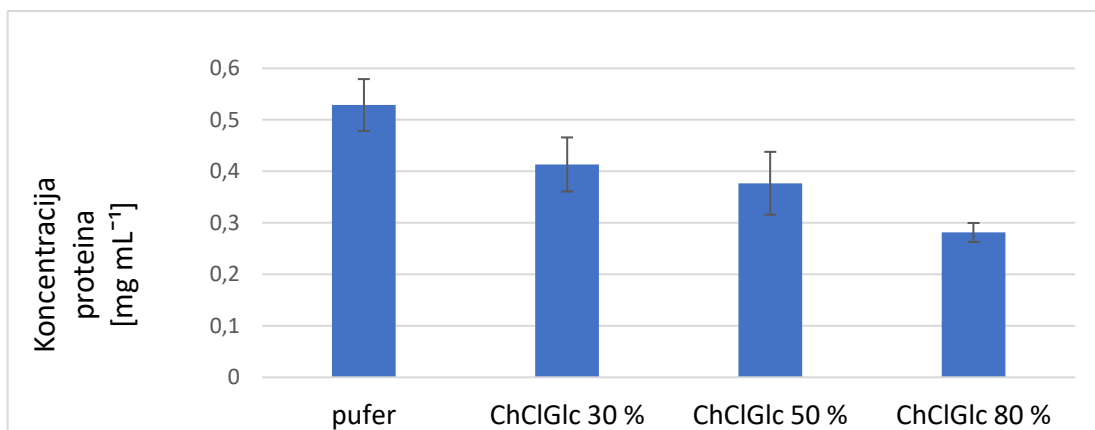
Istraživanjem je utvrđeno da su DES-ovi dobra zamjena konvencionalnim otapalima gdje je jedan DES postigao veće iskorištenje u ekstrakciji polifenolnih spojeva u odnosu na metanol. Navedeni rezultati se podudaraju s našima, otapalo ChFru se pokazalo selektivnije od zakiseljenog etanola (70 %, v/v) dok druga otapala pokazuju sličnu ili nižu selektivnost. Naime, DES-ovi imaju sposobnost tvorbe vodikovih veza s polifenolnim spojevima što posljedično povećava kapacitet otapanja istih (Radošević i sur., 2016).

#### 4.2. Određivanje proteina metodom po Bradfordu

Ukupna koncentracija proteina određuje se metodom po Bradfordu na temelju reakcije proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. Vrijeme reakcije se bilježi promjenom boje iz smeđe u plavu. Pomoću baždarnog dijagrama na slici 10 izačunate su koncentracije proteina u ekstraktima narančine, a rezultati mjerenja su prikazani na slici 11. Koncentracije proteina su izražene u mg proteina po mL ekstrakta narančine kore.



**Slika 10.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.



**Slika 11.** Koncentracija proteina u ekstraktima kore naranče\*.

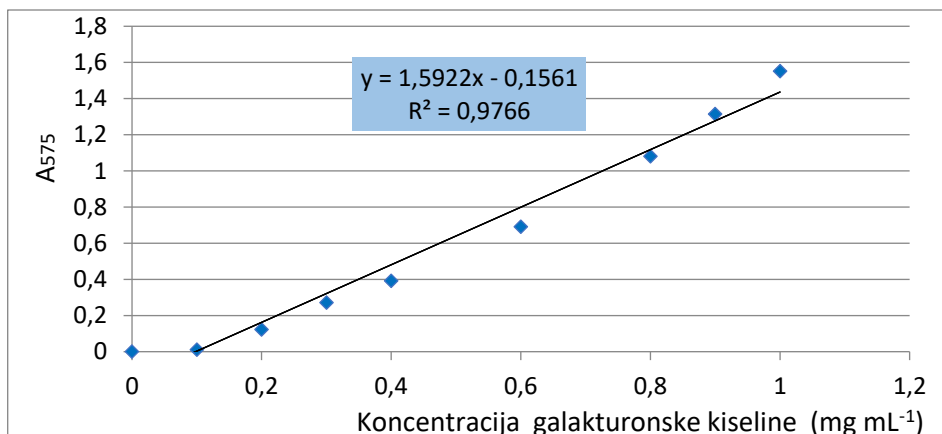
\*rezultati su srednja vrijednost ± S.D (n= 3)

Slika 11 prikazuje da DES ChClGlc sa udjelom vode od 30 % ima najveću selektivnost ( $0,41 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u ekstrakciji proteina u odnosu na preostala dva ispitana DES-a. Vidljivo je kako se povećanjem udjela vode smanjuje selektivnost prema ekstrakciji proteina. U odnosu na pufer ( $0,53 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) otapala pokazuju od 21% do 53 % manju selektivnost. Najmanja koncentracija proteina, točnije dvostruko manja u odnosu na pufer, je ekstrahirana pomoću ChClGlc sa 80 % vode ( $0,28 \pm 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

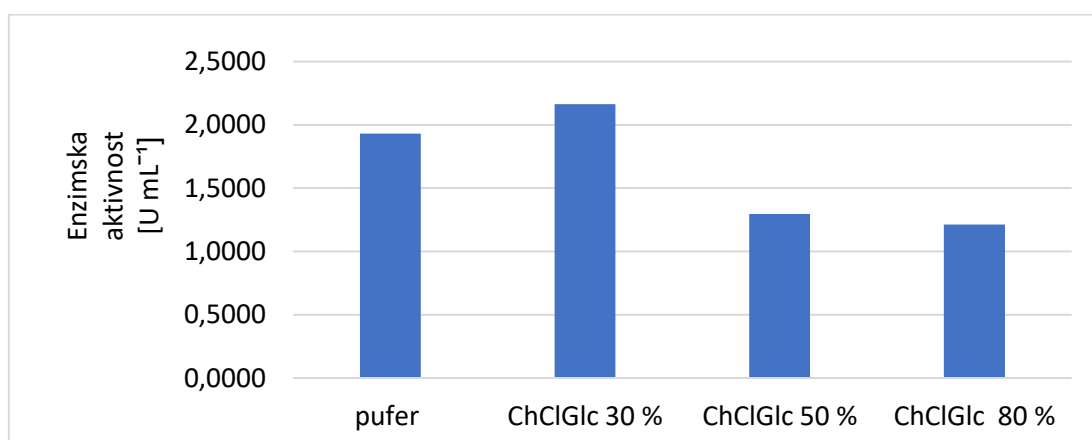
Liu i sur. (2016) su kroz istraživanja dokazali da molarni omjer donora i akceptora vodikove veze utječe na učinkovitost ekstrakcije proteina. Veća koncentracija kolin-klorida u proteinskoj otopini može povećati hidrofobne interakcije, što dovodi do smanjenja topljivosti proteina u vodi, odnosno dolazi do isoljavanja. Primjerice, Liu i sur. (2016.) su zaključili da je optimalni molarni omjer pripremljenog DES-a, polietilenglikola 200 (PEG) i kolin-klorida 3: 1. Time dolazimo do zaključka da bi se učinkovitost ekstrakcije mogla povećati većim molarnim omjerom glukoze naspram kolin-klorida, no potrebno je istražiti optimalni molarni omjer. Prevelika koncentracija donora vodikove veze može uzrokovati destrukciju stanične stijenke što bez dovoljne koncentracije akceptora može smanjiti ekstrakciju proteina.

#### 4.3. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima narančine kore

Aktivnost enzima pektin-esteraze u ekstraktima narančine kore je određena pomoću DNSA reagensa čija boja otopine se mijenja iz svijetlo žute u crveno-smeđu kao rezultat redukcije DNSA reagensa u prisutnosti reducirajući šećera. Kao standard je korištena otopina galakturonske kiseline. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galakturonske kiseline je prikazan na slici 12, dok su rezultati mjerenja su prikazani na slici 13.



**Slika 12.** Baždarni dijagram galakturonske kiseline.



**Slika 13.** Aktivnost enzima pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče.

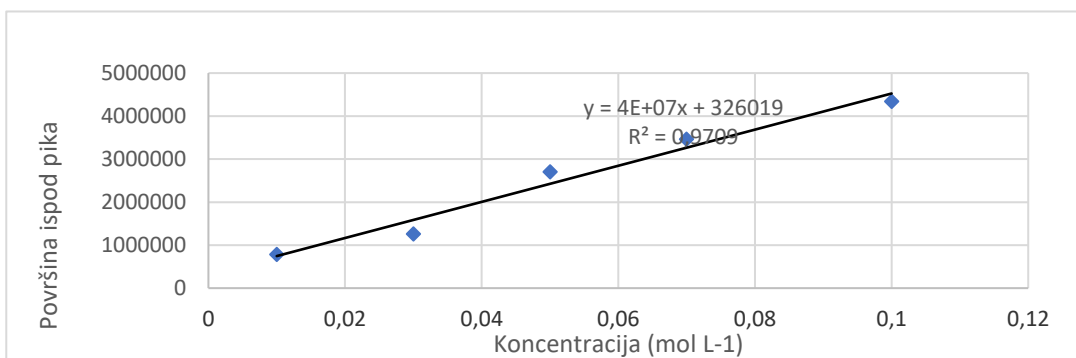
Slika 13 pokazuje da je aktivnost enzima pektin-esteraze, u odnosu na pufer (1,93 U mL<sup>-1</sup>), veća samo u DES-u ChClGlc sa 30 % vode (2,16 U mL<sup>-1</sup>). Preostala dva ispitana DES-a sa 50 % i 80 % vode pokazuju slične enzimske aktivnosti, no u odnosu na referentni pufer pokazuju manje enzimske aktivnosti. Pektin-esteraza pokazuje najveću aktivnost u DES-u ChClGlc s 30 % vode.

Proteini su materijalna osnova života i ključni su za pravilno funkcioniranje svakog živog organizma, stoga se svakodnevno ispituju različite metode za izolaciju te pripremu čistih proteina. Zbog svoje trodimenzionalne strukture proteini se lako denaturiraju u nepovoljnim uvjetima. Konvencionalne metode pročišćavanja proteina uključuju taloženje amonijevim sulfatom, isoljavanje, elektroforezu, ionsku izmjenu, kromatografiju i afinitetnu kromatografiju. Kroz ove dugotrajne, a ponekad i skupe metode, proteini gube aktivnost. Kao alternativa za tradicionalnu ekstrakciju organsko otapalo-voda primjenjuje se metoda ekstrakcije tekuće-tekuće zvana vodeni dvofazni sustav. Vodeni dvofazni sustav (ATPS od eng. aqueous two-phase system) nalazi primjenu kod odvajanja i pročišćavanja bioloških

materijala kao što su proteini, enzimi, nukleinske kiseline, virusi, antitijela i stanične organele. Nastaje miješanjem dvaju polimera ili polimera i soli u vodi, čime se eliminiraju hlapljivi organski spojevi. Prema našim saznanjima, ne postoji istraživanje u kojem se je određivala pektin-esterazna aktivnost u ekstraktima kore naranče pripremljenima prirodnim DES-ovima, no Zeng i sur. (2014) su ispitali su utjecaj DES-a te soli na učinkovitost ekstrakcije proteina, točnije dikalijeva fosfata. Ispitivani sljedeći parametri koji utječu na ekstrakciju su tip DES-a, masa DES-a, koncentracija  $K_2HPO_4$  te temperatura. Zeng i sur. (2014) su koristeći BAS kao primjer proučavali utjecaj mase  $ChCl$ -uree na raspodjelu proteina u dvije faze, a rezultati su pokazali da kad se masa DES-a kretala od 0,8 g do 1,4 g, učinkovitost ekstrakcije se brzo povećavala. Međutim, kad je masa DES-a bila povećana na 1,6 g, učinkovitost ekstrakcije se nije povećala. Povećanjem koncentracije otopine  $K_2HPO_4$  ispod  $0,6 \text{ g mL}^{-1}$  efikasnost ekstrakcije raste jer  $K_2HPO_4$  u proteinskoj otopini povećava broj hidrofobnih interakcija, što dovodi do smanjenja topljivosti proteina u vodi. Kada koncentracija  $K_2HPO_4$  pređe  $0,6 \text{ g mL}^{-1}$  dolazi do smanjena učinkovitosti ekstrakcije jer je sekundarna struktura proteina kontrolirana i molekulama vode na površini proteina. Provedeno istraživanje je pokazalo da su pokretačka sila ove ekstrakcije hidrofobne interakcije, efekt isoljavanja te vodikove veze koje u konačnici guraju agregate proteina u DES-om bogatu fazu.

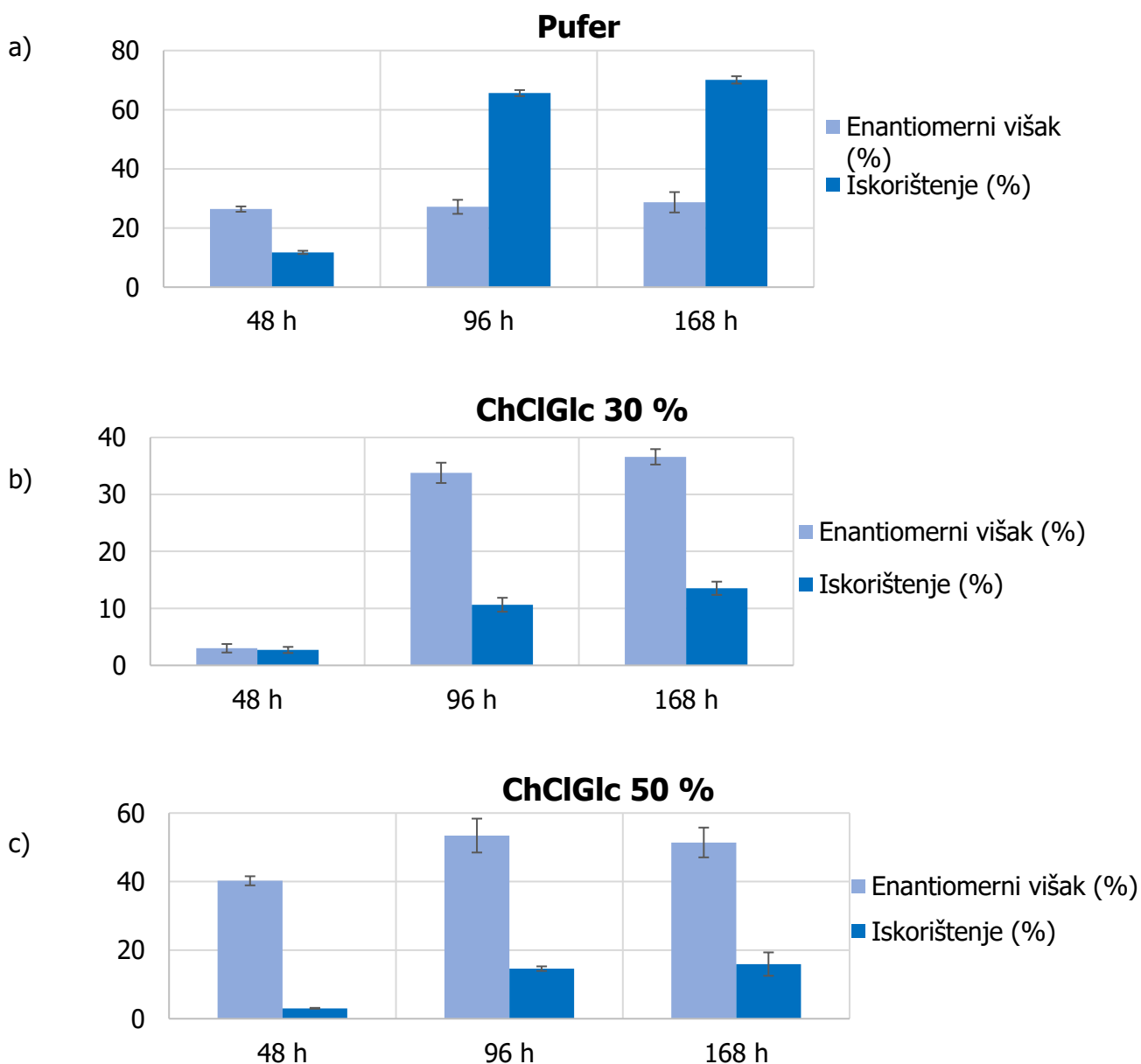
#### **4.4. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletal-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore**

Hidrolitički enzimi, koji se nalaze u otpadnoj narančinoj kori, od posebnog su značaja jer su stereoselektivni te kao takva imaju sposobnost hidrolize jednog enantiomernog oblika. Enantiomeri imaju različite strukturne karakteristike zbog čega imaju različitu biološku aktivnost (Vandenberghes i sur., 2013). Hidrolitički enzimi u kori naranče, mogu hidrolizirati ester (*R*)- odnosno (*S*)-1-feniletal-acetata u odgovarajući (*R*)- odnosno (*S*)-1-feniletanol. (*R*)-1-feniletanol se koristi kao sintetski intermedijer ili kao građevni blok za fine kemikalije u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji (Suan i Sarmidi, 2004), dok se oba enantiomerna oblika koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerne čistoće i za asimetrično otvaranje cikličnih anhidrida i epoksida (Frings i sur., 1999). Reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletal-acetata u DES-u  $ChCl:Glc$  sa 30 %, 50 % i 80 % vode i u referentnom kalij-fosfatnom puferu praćena je ekstrakcijom zaostalog supstrata i nastalih produkata u *n*-heptan uz snažno miješanje. Heptanski ekstrakt analiziran je plinskom kromatografijom. Dobiveni baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata prikazan je na slici 14.



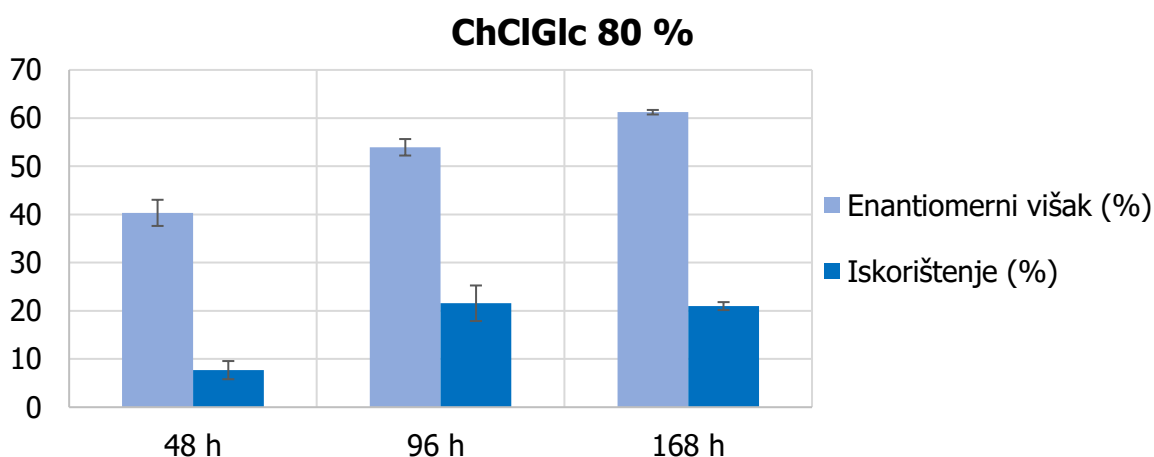
**Slika 14:** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (R,S)-1-feniletil-acetata.

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u referentnom puferu te u DES-u s 30 %, 50 % i 80 % vode, izračunati su iskorištenje procesa hidrolize te enantiomerni višak. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 15 a – d.

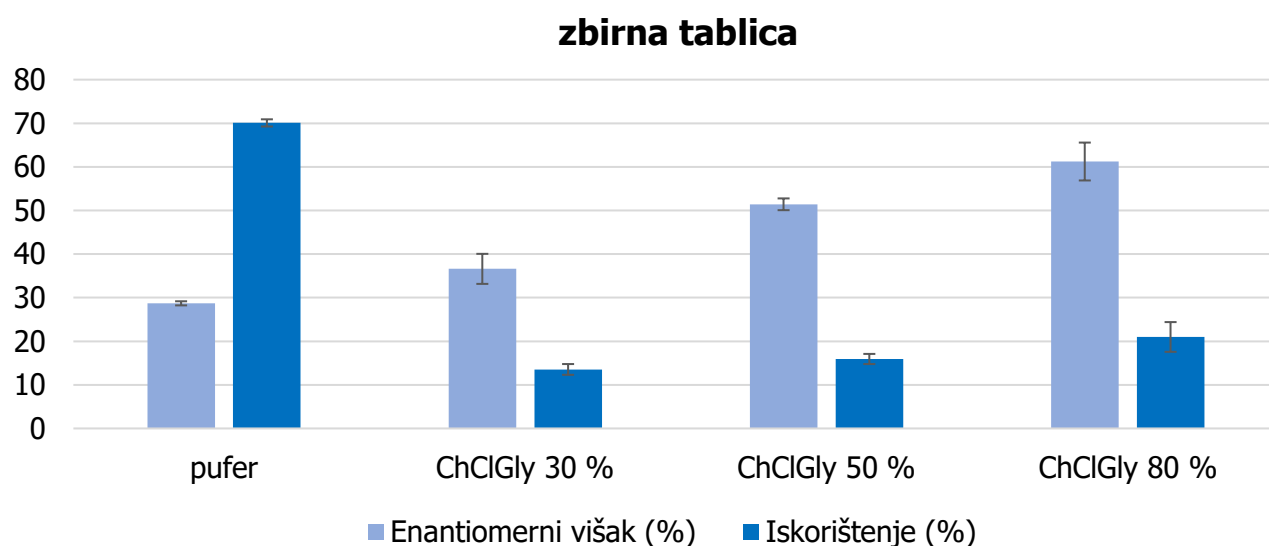




d)



**Slika 15.** Enantiomerni višak te iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane enzimima otpadne narančine kore kroz vrijeme, odnosno nakon 48, 96 i 168 sati u a) puferu, b) DES-u ChClGlc s 30 % vode, c) DES-u ChClGlc s 50 % vode i d) DES-u ChClGlc s 80 % vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3).



**Slika 16.** Enantiomerni višak te iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane enzimima otpadne kore naranče u puferu te DES-u ChClGlc s 30, 50 i 80 % vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L<sup>-1</sup> (*R, S*)-1-feniletil-acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C; 168 sati. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3).

Enantiomerni višak (*ee*) hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u ispitanim DES-ovima iznosi od 36,6 % do 61,2 %, dok u referentnom puferu 28,8 %. Enantiomerni višak daje podatak o čistoći uzorka, *ee* od 100 % označava enantiomerno čist spoj, dok vrijednost 0 % označava racemat, odnosno jednake količine enantiomera kiralnog spoja. Sa slike 16 može se primjetiti da se enantiomerni višak u svim DES-ovima povećava povećanjem udjela vode. Najmanja vrijednost enantiomernog viška hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata je u DES-u ChClGlc 30 %, no još uvijek veća u odnosu na pufer. Možemo zaključiti da su enzimi

narančine kore sposobni hidrolizirati oba enantiomera, nisu stereospecifični za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata, što su zaključili i Vandenberghe i sur. (2013). U odnosu na pufer vidljivo je poboljšanje u enantioselektivnosti uDES-ovima. Različita enantioselektivnost u puferu i eutektičkom otapalu može se objasniti prisutnošću nekoliko hidrolitičkih enzima u narančinoj kori s različitom enantioselektivnošću koji pretvaraju ili (*R*) ili (*S*) ester, a ovisno o karakteristikama DES-a različito su inhibirani u navedenom mediju (Panić i sur., 2018). Maugeri i Domínguez de María (2014) su također uočili različitu enantioselektivnost enzima u ovisnosti o količini vode u DES-u. Dosadašnja istraživanja navode da je različita enantioselektivnost rezultat inhibicije pojedinih enzima, dok drugi ostaju aktivni.

Iskorištenje reakcije hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata provedene u puferu iznosi 70,08 % nakon 168 sati reakcije. Općenito iskorištenje hidrolize veće od 50 % ukazuje na to da enzimi iz kore naranče provode hidrolizu i (*R*)- i (*S*)-1-feniletil-acetata u pripadajuće alkohole. Kao najbolji DES se pokazao ChClGlc s udjelom vode 80 % te iskorištenjem od 21,0 %. Prema dobivenim podacima smanjenjem udjela vode u eutektičkom otapalu smanjuje se iskorištenje reakcije, tako je iskorištenje ChClGlc 50 % 15,9 % , a ChClGlc 30 % 13,5 %.

U zaključku, u ovom radu je proučavan neiskorišten potencijal otpadne kore naranče. Ekstrahiran je najveći maseni udio polifenolnih spojeva DES-om ChClGlc 30 % ( $52,69 \pm 0,035 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore) u usporedbi s ostalim ispitivanim otapalima. U odnosu na zakiseljeni EtOH navedena otapala imaju od 7 do 15 % veću moć ekstrakcije polifenolnih spojeva. Ekstrakcija proteina nije bila toliko uspješna u odnosu na referentno otapalo ( $0,53 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) sa maksimumom ekstrakcije u ChCl:Glc 30 % ( $0,41 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Također se DES ChClGlc 30 % pokazalo najbolje u mjerenju aktivnosti pektin esteraze ( $2,16 \text{ U mL}^{-1}$ ), dok je najvišu enantioselektivnost pokazao ChClGlc 80 % sa iskorištenjem reakcije hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata od 21,0% .

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je ispitana mogućnost primjene DES-a kolin-klorid:glukoza sa udjelom vode 30 %, 50 % i 80 % (w/w) u iskorištavanju potencijala otpadne narančine kore. Na osnovi dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz otpadne narančine kore DES-om kolin-klorid:glukoza sa 30 % vode ( $52,69 \pm 0,035 \text{ mg g}^{-1}$ ) pokazala se 15 % , a s 50 % vode ( $48,28 \pm 0,34 \text{ mg g}^{-1}$ ) 7 % učinkovitijom u odnosu na ekstrakciju etanolom.
2. Ekstrakcija proteina DES-om kolin-klorid:glukoza sa 30 % ( $0,41 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 50 % ( $0,38 \pm 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i 80 % ( $0,28 \pm 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ ) vode pokazala se značajno lošijom u odnosu na pufer ( $0,53 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) što ne ukazuje na mogućnost primjene ispitivanog eutektičkog otapala pri ekstrakciji proteina iz otpadne narančine kore.
3. Enzim pektin-esteraza pokazuje 11 % veću aktivnost u ispitivanom DES-u sa 30 % vode u odnosu na pufer. Promjena udjela vode može utjecati na aktivnost enzima pektin-esteraze, što se vidi kod ispitivanog DES-a ChClGlc 50 % gdje se primjećujemo drastičan pad aktivnosti.
4. Eutektičko otapalo kolin-klorid:glukoza s 80 % vode se pokazalo najučinkovitijim u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata. Enantiomerni višak u eutektičkim otapalima iznosi od 36,6 % do 61,2 % te se smanjuje smanjenjem udjela vode. Ispitani DES-ovi su se pokazali obećavajućim u odnosu na pufer gdje enantiomerni višak provedene hidrolize iznosi 28,8 %.

## \* 6. LITERATURA

Angel Siles López J., Li Q, Thompson IP. (2010) Biorefinery of waste orange peel. *Critical Reviews in Biotechnology* **30**: 63 – 69.

Aruoma, O.I., Landes, B., Ramful-Baboolall, D., 2012. Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. *Preventive Medicine* **54**: 12 – 16.

Assini, J.M., Mulvihill, E.E., Sutherland, B.G. (2013) Naringenin prevents cholesterol-induced systemic inflammation, metabolic dysregulation, and atherosclerosis U: Ldlr/mice. *J. Lip. Res.* **54**: 711 – 724.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Francisco R., Ana-Ortuno M., Delrio J. (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 4505 – 4515.

Bocco A., Cuvelier M.E., Richard, H., Berset C. (1998) Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 2123 – 2129.

Boynes, J.W. (1991) Role of oxidative stress in the development of complication in diabetes. *Diabetes* **40**: 405–411.

Bradford M. M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248 – 254.

Champ M., Langkilde A.M., Brouns F., Kettlitz B., Collet Y., Le B.(2003) Advances in dietary fibre characterisation. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects. *Nutrition Research Review* **16**: 71 – 82.

Cherubini F. (2010) The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* **51**: 1412 – 1421.

Coby J. Clarke, Wei-Chien Tu, Oliver Levers, Andreas Bröhl, and Jason P. Hallett (2018) Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chemical Review* **118**: 747 – 800.

Cook, N.C., Sammon, S. (1996) Flavanoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **7**: 66 – 76.

Cvjetko Bubalo, M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić-Redovniković, I. (2016a) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry* **200**: 159 – 166.

Devatkal S.K., Narsaiah K., Borah A. (2010) Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. *Meat Sci.* **85** (1): 155 – 159.

Dubravka Ferenčić , Gluhić D. , Slavica Dudaš (2016) Hranjiva vrijednost mandarina (*Citrus reticulata* Blanco, *Citrus nobilis* Lour) *Glasnik zaštite bilja* 3

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H. (2011) Dietary fibre and fibre rich by-products of food processing: characterisation, technological functionality and commercial applications: a review. *Food Chemistry* **4**: 411 – 421.

EU, 2010. Directive 2010/75/EU of the European Parliament and of the Council of 24 November 2010 on industrial emissions (integrated pollution prevention and control), OJ L 334, 17.12.2010, str. 17 – 119.

Fernandez J., Perej-Alvarez J.A., Fernandez-Lopez J.A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* **59**: 345 – 353.

Frings K., Koch M., Hartmeier W. (1999) Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. *Enzyme nad Microbial Technology* **25**: 303 – 309.

Fuentes-Zaragoza E., Riquelme-Navarrete M.J., Sanchez-Zapata E.,Perez-Alvarez J.A.(2010) Resistant starch as functional ingredient: a review. *Food Research International* **43** (4): 931 – 942.

Fuentes-Zaragoza, E., Riquelme-Navarrete, M.J., Sanchez-Zapata, E., Perez-Alvarez, J.A. (2010) Resistant starch as functional ingredient *Food Res. Int.* **43** (4): 931 – 942.

Garcia M.L., Dominguez R., Galvez M., Gavlez D., Casas C., Selgas M.D. (2002) Utilisation of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausage. *Meat Science* **60**: 227 – 236.

Guajardo, N.; Domínguez de María, H. P.; Ahumada, K., Schrebler, R. A., Ramírez-Tagle, R.; Crespo, F. A., Carlesi, C. (2017) Water as Cosolvent: Nonviscous Deep Eutectic Solvents for Efficient Lipase-Catalyzed Esterifications. *ChemCatChem* **9**: 1393–1396.

Hayyan M., Hashim M.A., Hayyan A., Al-Saadi M.A., AlNashef I.M., Mirghani M.E.S., Saheed O.K. (2013b) Are deep eutectic solvents benign or toxic *Chemosphere* **90**: 2193 - 2195.

Hong, M.; Chen, E. Y.-X. (2017) Chemically Recyclable Polymers: A Circular Economy Approach to Sustainability. *Green Chemistry* **19**: 3692 – 3706.

Huet, R. (1982) Constituents of citrus fruits with pharmacodynamic effect: citroflavonoids. *Fruits* **37**: 267 – 271.

Hwang, S.L., Shih, P.H., Yen, G.C., 2012. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 877 – 885.

Jaime, L., Molla, E., Fernandez, A., Martin-Cabrejas, M.A., Lopez Andreu, F.J., Esteban, R.M. (2002) Structural carbohydrates differences and potential source of dietary fibre of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (1): 122 – 128.

Jongedijk, Esmer & Cankar, Katarina & Buchhaupt, Markus & Schrader, Jens & Bouwmeester, Harro & Beekwilder, Jules (2016) Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*. 100

Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2004) "Zelena" kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kemija u industriji* **53**: 217 - 224.

Karboune, Salwa & Khodaei, Nastaran. (2016). Structures, isolation and health-promoting properties of pectic polysaccharides from cell wall-rich food by-products: A source of functional ingredients. *Current Opinion in Food Science* **8**: 5 - 55

Kasali, A. Oladipupo, A. Lawal , Olatunji T. F. Abanikannda, Abayomi A. Olaniyanand William N. Setze (2010) Citrus Essential Oils of Nigeria Part IV: Volatile Constituents of Leaf Oils of Mandarins (*Citrus reticulata* Blanco). *Records of National Products* **4**: 156 - 162.

Kim Alfonsi, Juan Colberg, Peter J. Dunn, Thomas Fevig, Sandra Jennings, Timothy A. Johnson, H. Peter Kleine, Craig Knight, Mark A. Nagy, David A. Perry, Mark Stefaniak (2008) Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chemistry* **10**: 31 – 36.

Kudlak B., Owczarek K., Namieśnik J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 11975 - 11992.

Laura Espina, María Somolinos, Susana Lorán, Pilar Conchello, Diego García, Rafael Pagán (2011) Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes *Food Control* **22** (6): 896 - 902

Li, S., Wang, H., Guo, L., Zhao, H., Ho, C.T. (2014) Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites. *Journal of Functional Foods* **6**: 2 – 10.

Liu, R-L., Yu, P., Ge, X-L., Bai X-F., Li, X-Q., Fu, Q. (2016) Establishment of an Aqueous PEG 200-Based Deep Eutectic Solvent Extraction and Enrichment Method for Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Seed Protein. *Food Analytical Methods* **10**(6): 1669 - 1680.

Liwen Wang, Jinhan Wang, Lianying Fang, Zuliang Zheng, Dexian Zhi, Suying Wang, Shiming Li, Chi-Tang Ho, and Hui Zhao (2014) Anticancer Activities of Citrus Peel Polymethoxyflavones Related to Angiogenesis and Others *BioMed Research International*. str 10

Manthey, J.A., Grohmann, K. (2001) Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (7): 3268 – 3273.

Marina Cvjetko Bubalo, Senka Vidović, Ivana Radojčić Redovniković, Stela Jokić (2015) Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **90**: str. 1631 – 1639.

Marković, S. (2005.) Fitoaromaterapija, Centar Cedrus, Zagreb, str. 162, 178, 207-208.

Meiyanto, E., Hermawan, A. (2012) Natural products for cancer targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **13** (2): 427 – 436.

Meryem Boukroufa, Chahrazed Boutekedjiret, Loïc Petigny, Njara Rakotomanomana, Farid Chemat (2015) Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin *Elsevier* **24**: 72 – 79.

Midaht Jašić (2013) Hidrokoloide i pektinske supstance Tehnologija voća i povrća - *Tehnologija hrane* str. 369

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

- Mulvihill, E.E., Huff, M.W. (2012) Citrus flavonoids and the prevention of atherosclerosis. *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets* **12** (2): 84 – 91.
- Neelima Mahato, Kavita Sharma, Mukty Sinha, Moo Hwan Cho (2018) Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives *Journal of Functional Foods* **40**: 307 – 316.
- Pagliaro, Mario & Ciriminna, Rosaria & Chavarría-Hernández, Norberto & Adriana Rodríguez Hernández (2015) Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **9** (4) : 368 - 377.
- Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2**: 1063 – 1071.
- Panić M., Elenkov M. M., Roje M., Cvjetko Bubalo M., Radojčić Redovniković I. (2018) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry* **66**: 133 – 139.
- Park, E., Pezzuto, J.M. (2012) Flavonoids in cancer prevention. *Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry* **12** (8) : 836 – 851.
- Paula Judith, Pérez Espitiaa, Wen-Xian, Dub Roberto, Jesús Avena-Bustillosb, Nilda de Fátima, Ferreira Soaresa, Tara H.McHughb (2014) Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties *Food Hydrocolloids* **35**: 287-296.
- Perry G., Raine K.A., Nunomura A., Watayc T., Sayre L.M., Smith M.A. (2000) How important is oxidative damage? Lessons form Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **28**: 831 – 834.
- Radošević, K., Ćurko N., Gaurina Srček V., Cvjetko-Bubalo M., Tomašević M., Kovačević Ganić, K., Radojčić-Redovniković I. (2016) Natural deep eutentic solvents as beneficial extracants for enchancement of plant extracts bioactivity. *LWT Food Science and Technology* **73**: 45 – 51.
- Romagnolo, D.F., Selmin, O.I. (2012) Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics* **31** (3): 206 – 238.



Satari B., Karimi K. (2018) Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling* **129**: 153 – 167.

Shahidi, F. (1997) Natural antioxidants an over view. In: Shahidi, F. (Ed.), *Natural Antioxidants*. AOCS Press, Illinois, pp. 1–11.

Shafiya Rafiq , Rajkumari Kaul, S.A. Sofi, Nadia Bashir, Fiza Nazir, Gulzar Ahmad Nayik (2018) Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Science* **17**: 351 – 358.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**: 152 – 178.

Stinco, Carla & Escudero-Gilete, M.L. & Heredia, Francisco J. & Vicario, Isabel M. & Meléndez-Martínez, Antonio J. (2016) Multivariate analyses of a wide selection of orange varieties based on carotenoid contents, color and in vitro antioxidant capacity. *Food Research International*. 90.

Vandenbergh A., Markó I.E., Lucaccioni F., Lutts S. (2013) Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Industrial Crops and Products* **42**: 380 – 385.

Wildwood, C., (2004.), *The Bloomsbury Encyclopedia of Aromatherapy*, Biovega d.o.o., Zagreb str. 7, 39.


Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Chen, J., Xu, K. (2014) Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. *Analyst*. **139** (10): 2565 - 2573.

Zhang Q., De Oliveira Vigier K., Royer S., Jerome F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**: 7108 – 7146.

Zhang, H., Wang, Y., Xu, K., Li, N., Wen, Q., Yang, Q., Zhou, Y. (2016) Ternary and binary deep eutectic solvents as a Novel Extraction Media for Protein Partitioning. *Analytical Methods* **8**: 8196 - 8207

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

  
Iva Čukelj