

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023

Anamarija Vrabc
7734/MB

**ZELENA EKSTRAKCIJA
LIGNINA, POLIFENOLA I VINSKE
KISELINE POMOĆU**

**NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA**

Diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković te uz pomoć Anje Damjanović, mag. ing.



Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Održivo gospodarenje otpadom od proizvodnje vina“, KK.01.1.1.07.007. Projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Voditeljica projekta: prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na pruženoj prilici za izradu ovog diplomskog rada i uloženom trudu tijekom izrade.

Zahvaljujem i svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na ugodnoj i vedroj radnoj atmosferi te pomoći, a veliko hvala dr. sc. Manueli Panić i mag. ing. Anja Damjanović na svoj pomoći, uloženom vremenu i trudu, te razumijevanju tijekom provedbe rada.

Zahvaljujem svojoj majci i sestri na podršci tijekom cjelokupnog studiranja, svojim prijateljima za sve lijepe trenutke, ostatku obitelji i svim ostalima koji su bili uz mene kroz sve ovo vrijeme te dočekali sretan kraj ove priče.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Molekularna biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ZELENA EKSTRAKCIJA LIGNINA, POLIFENOLA I VINSKE KISELINE POMOĆU NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Anamarija Vrabec, univ. bacc.ing. biotechn., 0125162544

Sažetak: Zadnjih nekoliko desetljeća počeli su se razvijati procesi u skladu sa principima zelene kemije, odnosno proizvodnje i ekstrakcije prirodnih produkata što uključuje smanjenu potrošnju energije, veću sigurnost i kvalitetu po okoliš i potrošače. Zbog toga se tradicionalno korištena otapala zamjenjuju sa sigurnijim i efektivnijim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima prilikom ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora, a koji ujedno omogućavaju stabilizaciju tih spojeva. Neki od takvih visoko vrijednih prirodnih spojeva su polifenoli i vinska kiselina čiji je dobar izvor komina grožđa dobivana nakon procesa proizvodnje vina. Također, važan spoj je i lignin dobiven iz lignocelulozne biomase koja se u novije vrijeme procesira upravo niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Lignin dobiven takvim procesom veće je čistoće te posjeduje karakteristike prikladne za daljnju obradu.

Ključne riječi: *niskotemperaturna eutektička otapala, lignin, polifenoli, vinska kiselina, komina grožđa*

Rad sadrži: 40 strana, 11 slika, 6 tablica, 54 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković*

Pomoć pri izradi: *Anja Damjanović, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić
4. izv. prof. dr. sc. Natka Ćurko

Datum obrane: 27., rujan, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Molecular biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

GREEN EXTRACTION OF LIGNIN, POLYPHENOLS AND TARTARIC ACID USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Anamarija Vrabc, univ. bacc.ing. biotechn., 0125162544

Abstract: In the last few decades, the processes of green chemistry, i.e. the production and extraction of natural products, have begun to develop, which includes reduced energy consumption, greater safety and quality for the environment and consumers. For this reason, traditionally used solvents are replaced with safer and more effective low-temperature eutectic solvents when extracting bioactive compounds from natural sources and enable their stabilization. Some of such highly valuable natural compounds are polyphenols and tartaric acid, a good source of which is grape pomace obtained after the winemaking process. Also, an important compound is lignin obtained from lignocellulosic biomass, which is recently processed with low-temperature eutectic solvents. The lignin obtained by such a process is of higher purity and has characteristics suitable for further processing.

Keywords: *natural deep eutectic solvents, lignin, polyphenols, tartaric acid, grape pomace*

Thesis contains: 40 pages, 11 figures, 6 tables, 54 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor

Technical support and assistance: *Anja Damjanović, mag. ing., Research Assistant*

Reviewers:

1. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Assistant professor
2. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor
3. Karin Kovačević Ganić, PhD, Full professor
4. Natka Ćurko, PhD, Assistant professor

Thesis defended: September 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PRINCIPI ZELENE KEMIJE	2
2.2. NISKOTEMPERATurna EUTEKTIČKA OTAPALA	4
2.2.1. Fizikalna i kemijska svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	5
2.3. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U BIOTEHNOLOGIJI	9
2.3.1. Upotreba niskotemperaturnih eutektičkih otapala u obradi otpada proizvodnje vina	9
2.3.2. Upotreba niskotemperaturnih eutektičkih otapala za pred tretman lignocelulozne biomase	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Komina i piljevina.....	13
3.1.2. Kemikalije	13
3.1.3. Otopine i puferi	14
3.1.4. Oprema	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Procjena topljivosti ciljnih molekula u niskotemperaturnih eutektičkim otapalima otapala pomoću programa COSMOtherm	15
3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	15
3.2.3. Ekstrakcija i izolacija lignina u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	16
3.2.4. Ekstrakcija vinske kiseline u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.....	17
3.2.5. Ekstrakcija vinske kiseline i polifenola u dvofaznom sustavu niskotemperaturnih eutektičkih otapala	17
3.2.6. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom	18
3.2.7. Mjerenje koncentracije vinske kiseline	19
3.2.8. Određivanje udjela vinske kiseline i polifenola u konini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. IZOLACIJA LIGNINA I EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ PILJEVINE I	

PETELJKE.....	23
4.2. ODABIR NISKOTEMPERARURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA EKSTRAKCIJU VINSKE KISELINE I POLIFENOLA IZ KOMINE GROŽĐA.....	25
4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VINSKE KISELINE U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIH POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA	28
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

U posljednjih nekoliko desetljeća aktualna tema u multidisciplinarnim područjima kemije, biologije i tehnologije je stvaranje zelenih i održivih procesa proizvodnje te ekstrakcije prirodnih produkata. Zelena ekstrakcija prirodnih produkata temelji se na dizajniranju procesa smanjene potrošnje energije uz očuvanje sigurnosti ekstrakta i kvalitete te okoliša i potrošača (Chemat i sur., 2019).

Načela zelene i održive kemije korištena su u različitim industrijama s ciljem stvaranja zelenije i sigurnije proizvodnje, kao i nadomještanjem opasnih otapala s onim sigurnijim i efektivnijim. Analize niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep eutectic solvents*, DES) u zadnje vrijeme, naslućuju njihov konstantni razvitak u multidisciplinarnim područjima kemije, posebno kao otapala za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora. Zbog svojih svojstva, DES-ovi se također mogu koristiti kao stabilizator ekstrahiranih bioaktivnih spojeva (Rente i sur., 2022).

Otpad od proizvodnje vina je dobar izvor bioaktivnih spojeva. Među tim bioaktivnim spojevima, od velikog interesa su fenolni spojevi, značajni zbog svojih dobro poznatih bioaktivnih svojstva, poput antibakterijskog, protuupalnog, antioksidativnog i antitumornog djelovanja (Teixeira i sur., 2014). korištenjem prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Natural Deep eutectic solvents*, NADESs) u procesima zelene ekstrakcije iz otpada proizvodnje vina dobivaju se značajni prinosi ne samo fenolnih spojeve već i vinske kiseline (Palos-Hernández i sur., 2022).

DES-ovi su klasa zelenih otapala koji se zbog svojih svojstava niskog tlaka para, visoke toplinske stabilnost, niske toksičnosti i biorazgradivost, upotrebljavaju i za procesiranje lignocelulozne biomase, s naglaskom na ekstrakciju lignina. DES-ovi ne samo da otapaju lignin iz lignocelulozne biomase, već također pružaju ekstrahiranom ligninu karakteristike prikladne za njegovu daljnju obradu (Chen i sur., 2020).

Cilj ovog rada bio je odabir prikladnih niskotemperaturnih otapala (DES-a) za zelenu ekstrakciju lignina, iz piljevine ali i peteljke, polifenola i vinske kiseline pomoću DES-ova.

2. TEORIJSKI DIO

Zelena kemija je zajednički naziv za kemijske procese i njihove produkte čiji je cilj smanjiti ili eliminirati proizvodnju i upotrebu opasnih tvari. Primjenom zelene kemije kroz sva područja istraživanja želi se spriječiti zagađivanje na molekularnoj razini, smanjiti negativan utjecaj kemijskih produkata i procesa na ljudsko zdravlje i okoliš, dizajnirati kemijske produkte i procese smanjenih opasnosti. Usvajanjem principa zelene kemije (slika 1) smanjuje se količina otpada u samim počecima procesa jer se minimalizira ili eliminira opasnost kemijskih sirovina, reagensa, otopina i produkata.

Za razliku od procesa remedijacije, zelena kemija sprječava da štetni materijali dospiju do okoliša, dok remedijacija samo odvaja otpad i čini ga donekle sigurnim za odlaganje. Takav postupak zbrinjavanja otpada bi se kvalificirao kao zelena kemija tek onda kada bi eliminirao utjecaj kemikalija koje služe za čišćenje otpada izbačenog u okoliš, a da ga se pri tome ponovo ne zagađi istim tim kemikalijama.

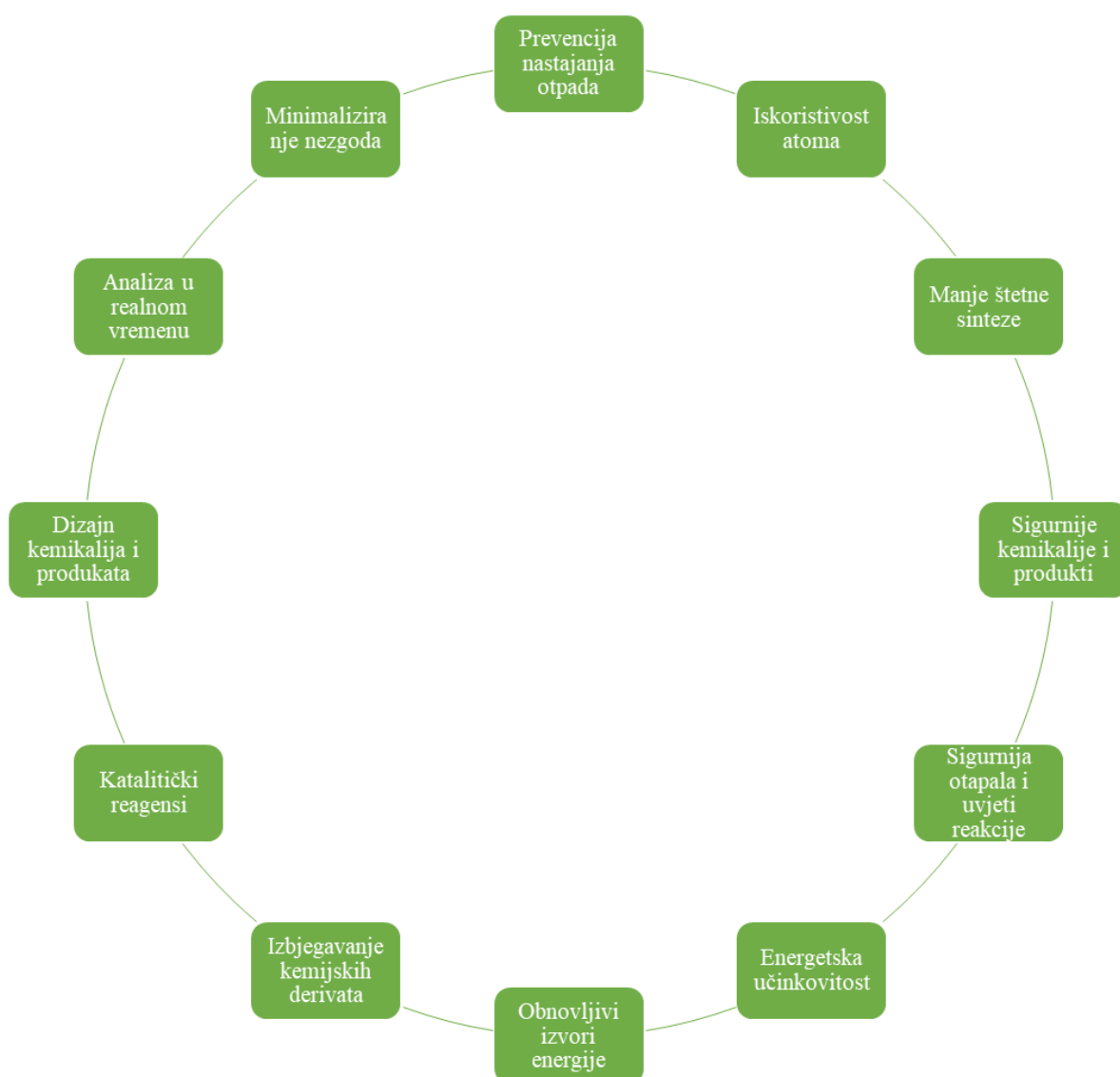
2.1. PRINCIPI ZELENE KEMIJE

Zelena kemija temelji se na dvanaest principa:

1. Prevencija nastajanja otpada: kemijska sinteza u kojoj nema otpada za zbrinuti.
2. Iskoristivost atoma: proces sinteze mora biti takva da je u produkt uključena maksimalna količina početne sirovine.
3. Dizajniranje manje štetnih sinteza: korištenje i proizvodnja netoksičnih ili manje toksičnih tvari za ljudsko zdravlje i okoliš.
4. Dizajniranje sigurnijih kemikalija i produkata: dizajnirani kemijski produkti potpune učinkovitosti i minimalne toksičnosti.
5. Korištenje sigurnijih otapala i uvjeta reakcija: izbjegavanje otapala, agenasa za razdvajanje ili pomoćnih kemikalija i zamjena sigurnijim pandanima.
6. Praćenje energetske učinkovitosti: provođenje kemijskih reakcija na sobnoj temperaturi i tlaku kad god je to moguće.
7. Upotreba obnovljivih izvora energije: korištenje obnovljivih sirovina, npr. otpad iz različitih procesa ili produkti iz poljoprivrede.
8. Izbjegavanje kemijskih derivata: upotreba zaštitnih skupina ili sličnih modifikacija zahtjeva dodatne agense i stvara otpad.
9. Korištenje katalitičkih reagensa: minimalizira se otpad njihovim korištenjem jer se

reakcija može proizvesti više puta s malom količinom katalizatora za razliku od reagensa u stehiometrijskim količinama.

10. Dizajniranje kemikalija i produkata: dizajn tvari korištenih u kemijskoj reakciji koji se razgrađuju nakon upotrebe i neškodljivi su za okoliš
11. Analiza u realnom vremenu: praćenje tijeka reakcije i kontrola tijekom sinteze kako bi se minimalizirala ili eliminirala formacija nusprodukta.
12. Minimalizirati potencijalne nezgode: dizajn kemikalija i njihovih oblika (krutine, tekućine ili plinove) kako bi se smanjila mogućnost nesreće, npr. eksplozije, požari i ispuštanje u okoliš (United States Environmental Protection Agency (2023), Pristupljeno 12. srpnja 2023.).



Slika 1. Dijagram 12 principa zelene kemije (prema United States Environmental Protection Agency)

Zelena otapala zauzimaju tek mali dio otapala koje se koriste u kemijskoj industriji, a njihove glavne odlike su niska cijena i smanjen negativan utjecaj na okoliš. Poticaji za njihov razvitak i korištenje bili su veća potražnja za ekološki prihvatljivim i održivim tehnologijama te manje štetne, a efikasnije, tehnike proizvodnje farmaceutika kao i ostalih kemikalija. Upotreba zelenih otapala omogućava jednostavniji oporavak i recikliranje samih otapala te selektivnost i aktivnost različitih komponenata pri čemu se kao kriteriji gledaju njihova fizikalna, kemijska i/ili biološka svojstva. (Banger i sur., 2023)

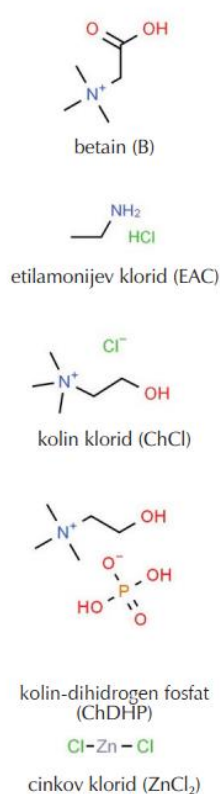
2.2. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su vrsta zelenih otapala izvedenih iz ionskih tekućina (engl. *Ionic Liquids*, IL) (Chen i sur., 2019). Ionske tekućine su organske soli niske temperature tališta, a bile su smatrane zelenom alternativom uobičajenim organskim otapalima zbog iznimno niskih tlakova pare te izvrsne kemijske i toplinske inertnosti. Kasnije su odbačene zbog svoje biotoksičnosti i problematične biorazgradnje (Thuy Pham i sur., 2010).

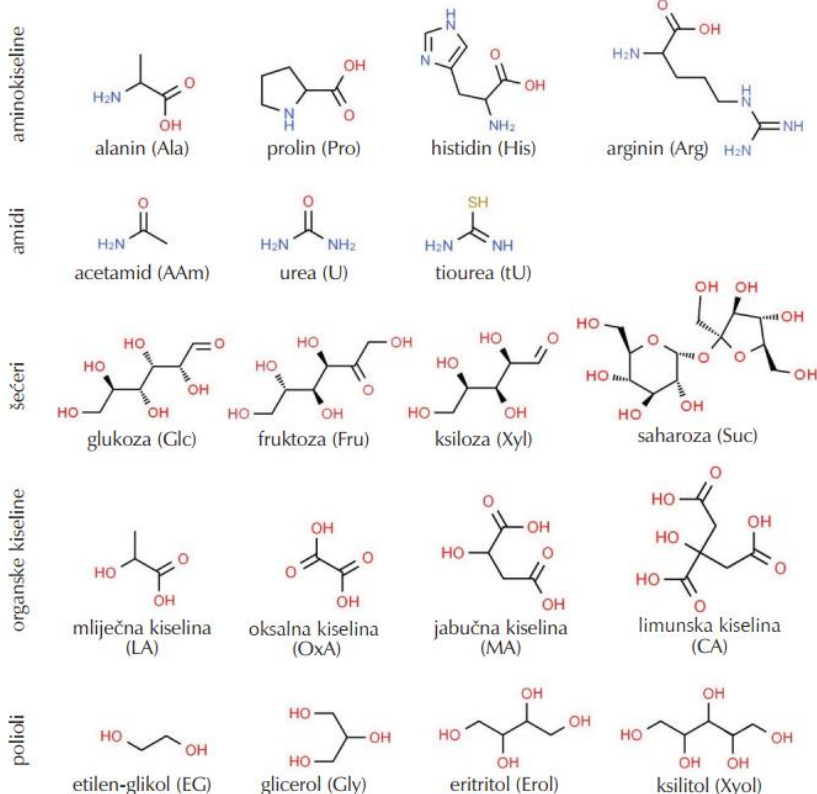
DES-ovi su smjesa dvije pojedinačne komponente pri čemu je jedna akceptor vodika (engl. *Hydrogen-bond acceptor*, HBA) dok je druga donor vodika (engl. *Hydrogen-bond donor*, HBD) (Chen i sur., 2019). Karakterizira ih niski tlak para, visoka toplinska stabilnost, niska toksičnost te dobra biorazgradivost (Yang i Wen, 2015). U usporedbi s uobičajenim IL, lakše ih je sintetizirati postupkom liofilizacije ili zagrijavanjem uz miješanje te su same njihove komponente dostupnije. Prednosti DES-ova još uključuju lakšu pripremu visoke čistoće te iznimne mogućnosti dizajniranja.

DES-ovi se mogu podijeliti na četiri vrste: tip I (kvartena sol Cat^+X^- i halogenidi metala kao što su cink ili željezo), tip II (kvartena sol Cat^+X^- i halogenidi metala kao što su krom ili kolbalt), tip III (kvartena sol Cat^+X^- i donori vodikove veze kao što su kiseline ili alkoholi), tip IV (kvartena sol Cat^+X^- i donori vodikove veze kao što su amidi ili alkoholi) (Sheldon, 2017). Od navedenih, najviše se koristi tip III zbog niske cijene i velikog broja dostupnih spojeva pri čemu Cat^+X^- akseptori mogu biti primjerice kolin-klorid ili betain dok su donori vodikove veze (X^-) šećeri (glukoza i saharoza), polioli (sorbitol, ksilitol i glicerol), amidi (urea) i organske kiseline (mliječna, limunska i jabučna), a u sastav može ulaziti i voda (slika 2) (Smith i sur., 2014).

Akceptori vodikove veze



Donori vodikove veze



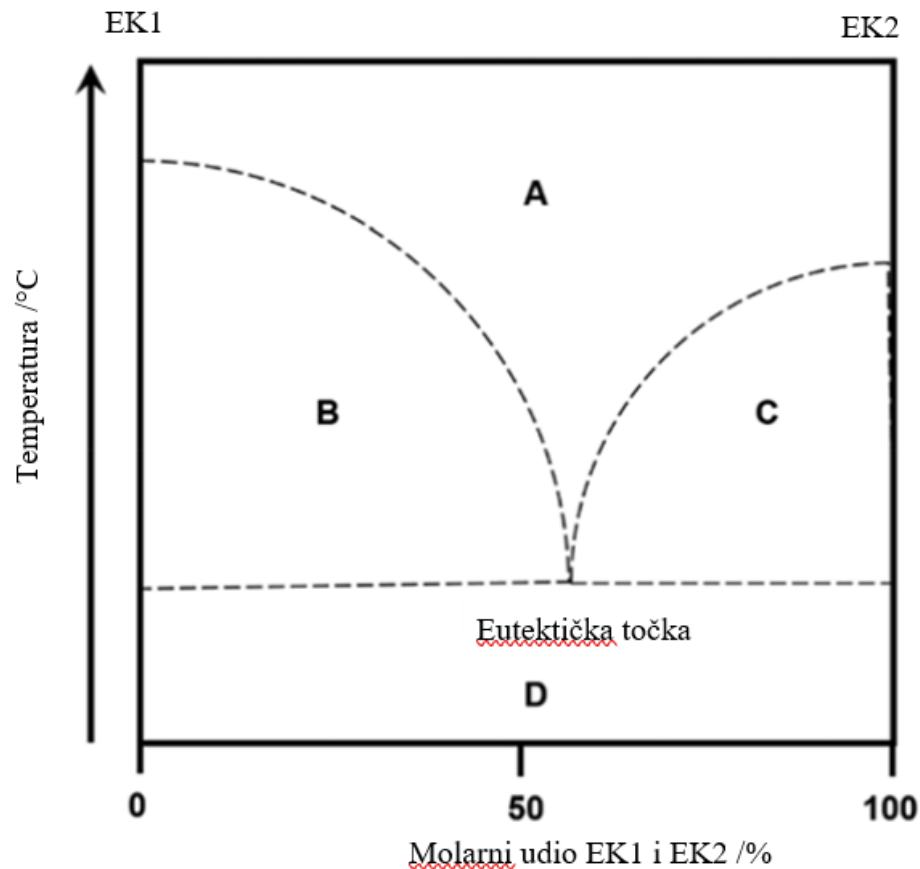
Slika 2. Primjeri uobičajeno korištenih spojeva za izradu DES-ova (prema Smith i sur., 2014).

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) tipovi su DES-ova čije su komponente zapravo primarni metaboliti biljaka poput poliola, šećera, aminokiseline, masnih i organskih kiselina (Yang, 2019) koje organizam proizvodi u suvišku. Raznolikost komponenti NADES-a poboljšava njihova svojstva i proširuje mogućnosti njihove aplikacije. Pretpostavlja se da su niske toksičnosti zbog toga jer njihove komponente potječu od staničnih metabolita te je za veliki broj NADES-a to i potvrđeno. Također ih karakterizira visoka polarnost i hidrofilnost te mogućnost otapanja širokog spektra analita. Viskozniji NADES-i teže otapaju analite, ali brzina otapanja nije jednaka topljivosti istih te se ona može povećati zagrijavanjem i/ili miješanjem (Liu i sur., 2018).

2.2.1. Fizikalna i kemijska svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Eutektička temperatura je najniža temperatura pri kojoj je tekuća faza prisutna u sustavu (Daněk, 2006), odnosno točka u kojoj krutine prelaze u kapljevitost (slika 3). Kod DES-ova ili temperatura tališta znatno je niža u usporedbi s temperaturama tališta pojedinih komponentama smjese. Sniženje točke tališta događa se zbog delokalizacije naboja uzrokovane

jakim intermolekulskim interakcijama kao što su to vodikove, ionske i van der Waalsove veze (Paiva i sur., 2014).



Slika 3. Dijagram eutektičke točke u dvokomponentnom sustavu pri čemu je EK eutektička komponenta. A je nedefinirani tekući medij dok su B i C mješavine EK1 i EK2 (kruto/tekuće ili tekuće/kruto), a D je mješavina EK1 i EK2 (kruto/kruto). Eutektička točka je značajna po tome što se dva ili više spoja mogu miješati u preciznim omjerima kako bi postali međusobno kompatibilni što uzrokuje sniženje talište smjese (prema Liu i sur., 2018).

Istraživanja ukazuju na to da su DES-ovistabilni u temperaturnom opsegu od 0 do 100 °C (Dai i sur., 2013). Također, tališta su im niža od 150 °C dok se na sobnoj temperaturi upotrebljavaju otapala tališta nižih od 50 °C te im se temperatura tališta snižava porastom udjela hidroksilnih grupa, odnosno vodikovih interakcija (Paiva i sur., 2014). Promjena omjera dvokomponentnog DES-a ne utječe značajno na promjenu temperature tališta pri istom udjelu vode (Savi i sur., 2019). Za predviđanje optimalnog omjera komponenta DES-a koristi se računalni program COSMOtherm koji za to koristi informacije o termodinamičkim svojstvima otopine.

Gustoće svih DES-ova veće su i do 20 % nego gustoća vode i uobičajeno korištenih

organskih otapala te linearno opadaju povećanjem temperature ili udjela vode (Dai i sur., 2013). Viskoznost je povezana s molekularnim kohezivnim silama u tekućini, određuje njenu fluidnost te ograničenost prijenosa mase u njoj. Većina DES-ova i NADES-ova su visoko viskozne tekućine u odnosu na uobičajena organska otapala zbog cijele mreže njihovih vodikovih interakcija, odnosno zbog više hidroksilnih grupa, donora vodikovih veza, pa se i k tome broj vodikovih interakcija povećava. Visoke vrijednosti za viskoznost jedna su od mana korištenja DES-ova i NADES-ova kao otapala pa je taj problem riješen povećanjem ili udjela vode ili temperature (Yang, 2019).

Polarnost je odlučujući faktor otapala prilikom utvrđivanja sposobnosti otapanja. S obzirom na polaritet hidrofilnih i mnogih lipofilnih metabolita, DES-ovi imaju široki opseg polarnosti (Liu i sur., 2018). Prilikom eksperimenta mjerenja polarnosti za 13 uobičajenih DES-ova, sastavljenih od različitih komponenti, otkriveno je da su DES-ovi bazirani na organskim kiselinama najpolarniji, nakon njih oni na bazi amino-kiselina dok su DES-ovi na bazi šećera i poliola najmanje polarnosti, blizu vrijednosti vode (Dai i sur., 2013). Polarnost DES-ova se može povećati dodatkom vode (Huang i sur., 2017).

Dobra sposobnost otapanja je još jedna u nizu dobrih karakteristika DES-a. Njihov opseg otapanja je velik te uključuje metabolite koji su slabo topljivi u vodi kao i proizvode prirodnog porijekla malih ili velikih molarnih masa (npr. ginkolid B, proteini, DNA) (Yang, 2019). Topljivost spoja u DES-u je vjerojatno povezana s polarnošću otapala te se povećava dodatkom vode ili povećanjem temperature pri čemu optimalni udio vode kod kojeg je topljivost najveća ovisi o samoj otopljenoj tvari. DES-ovi posjeduju i svojstvo stabilizacije makromolekula. Tako su primjerice otopljeni prirodni pigmenti stabilniji na svjetlosti i visokim temperaturama te im se produljuje vrijeme skladištenja u nekim DES-ovima na bazi šećera, što se obično pripisuje smanjenom udjelu vode i povećanoj viskoznosti (Dai i sur., 2013).

Indeks loma (engl. *Refractive Index, IR*) je također bitno svojstvo otapala i rijetko se o njemu izvještava kad su u pitanju ionske tekućine i DES-ovi. Vrijednosti indeksa loma DES-ova, kolin-klorida i fruktoze (ChCl:Fru) te kolin-klorida i glukoze (ChCl:Glc), kreću se od 1,51 do 1,52 te od 1,66 do 1,67 u temperaturnom opsegu od 25 do 85 °C. Kao i u prethodnom slučaju površinske napetosti, vrijednosti indeksa loma linearno opadaju povećanjem temperature (Yang, 2019).

Provodnost DES-a ovisi o njegovom sastavu te se može opisati sljedećom skalom baza/poliakohol > baza/organska kiselina > baza/šećer > organska kiselina/amino kiselina (nepolarna) > organska kiselina/šećer > šećer/šećer. Provodnost se također mijenja promjenom temperature ili udjela vode, odnosno linearno raste povećanjem temperature dok se odnos

udjela vode i provodnosti može prikazati zvonolikom krivuljom (Dai i sur., 2013).

Funkcija vode u DES-ima je uobičajena kao i kod drugih otapala. Ona mijenja njihova svojstva i strukturu pri čemu povećanjem njenog udjela dolazi do smanjenja gustoće i viskoznosti dok se istovremeno povećava njihova polarnost (Dai i sur., 2015). Sposobnost otapanja i provodnost opisuju se već prije spomenutom krivuljom oblika zvona. NMR studije su utvrdile da dodatkom vode dolazi do prekida vodikovih interakcija u eutektičnom otapalu, što dovodi do pukotina u supramolekularnoj strukturi (Yang, 2019).

Unatoč tome što pojedina komponenta DES-a sama za sebe nije štetna, zabrinjava mogućnost toksičnosti kada su komponente pomiješane (Alfonsi i sur., 2008). To je posebno važno kad je riječ o primjeni u industriji gdje se *in vitro* ispitivanja citotoksičnosti provode zbog zaštite okoliša i ljudskog zdravlja, prepoznavanjem i otklanjanjem tvari koje jesu ili bi mogle biti toksične (Hayyan i sur., 2015).

Prvi test citotoksičnosti DES-a proveo se s njih jedanaest te usporedno s dva IL-a ([BMIm][Ac] i [BMIm][Cl]). Četiri od jedanaest DES-ova koja su se sastojala od vinske i limunske kiseline pokazali su jako nisku viabilnost, kao i dva IL-a (Paiva i sur., 2014). Što pokazuje da prisutnost organskih kiselina štetno djeluje na stanice, a kasnijim testiranjima je to dodatno potvrđeno. Pretpostavljeni razlog je sniženje vrijednosti pH potaknut organskim kiselinama (Zhao i sur., 2015). U završnom radu Brdarević (2021) ispitan je citotoksičan učinak DES-ova limunska kiselina i glukoza (Ca:Glc), betain, jabučna kiselina i glukoza (B:Ma:Glc) te glicerol i glukoza (Gly:Glc) u rasponu koncentracija od 5 do 2000 mg L⁻¹ na stanične linije Caco-2 i HeLa pri čemu niti jedan od DES-ova nije pokazao citotoksično djelovanje ili izazvao morfološke promjene na ijednoj od staničnih linija te su prema tome sigurni za korištenje.

O biorazgradnji DES-a zna se vrlo malo zbog manjka istraživanja te teme. Doduše, DES mogu biosintetizirati, pa i metabolizirati gotovo svi organizmi, što objašnjava njihovu veliku biokompatibilnost. U usporedbi s organskim otapalima i ionskim tekućinama, biorazgradivost DES-a pomaže kod korištenja otapala koja su sigurna za zdravlje i okoliš. Stoga, se DES sustavi općenito smatraju ekološki prihvatljivima i “zelenim” otapalima (Paiva i sur., 2014). Za sad je poznata sljedeća skala biorazgradnje: DES-ovi na bazi amina \approx DES-ovi na bazi šećera > DES-ovi na bazi alkohola > DES-ovi na bazi kiselina (Yang, 2019).

Za primjenu u obliku funkcionalnog otapala, DES se može reciklirati i ponovno koristiti. Do sada, mnoge strategije oporavka, kao što su superkritični ugljikov dioksid, antiotapala, povratna ekstrakcija, kromatografija (ionska izmjena na anionskom nosaču i protustrujno odvajanje) korišteni su za tu svrhu (Dai i sur., 2013). Prema jednoj studiji, razrjeđivanje DES-a će ne utječe na njihovo ponašanje tijekom kromatografije (Dai i sur., 2016). Ovo sugerira da

se odvajanje željenog analita i recikliranje DES-a može postići istovremeno.

2.3. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U BIOTEHNOLOGIJI

2.3.1. Upotreba niskotemperaturnih eutektičkih otapala u obradi otpada proizvodnje vina

Nakon procesa proizvodnje vina, dobiva se nusprodukt – komina grožđa koja predstavlja problem gospodarenjem otpada s ekološkog i ekonomskog stajališta (Panić i sur., 2021). Ovaj se jeftini otpad može pretvoriti u vrijednu sirovinu za potrebe kozmetičke, farmaceutske i prehrambene industrije i time smanjiti nakupljanje otpada vinske industrije. Naime, ovaj nusprodukt je izuzetno bogat biološki aktivnim komponentama u sjemenkama, kao što su polifenolni spojevi, esencijalne masne kiseline, uglavnom linolenske i oleinske kiseline, i drugi antioksidansi kao što su tokoferol i β -karoten, ali i fitosteroli, dok su u kožici grožđa zaostaju uglavnom tartarati, primjerice vinska kiselina (Teixeira i sur., 2014).

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka te su bitan dio ljudske prehrane zbog iznimnih antioksidativnih i antimikrobnih djelovanje kao i drugih bioloških aktivnosti. U ranijim radovima je potvrđena i njihova uloga u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009), a između ostalog, inhibiraju rast bakterija, protozoa i funga (Hassan i sur., 2019).

Polifenolni sastav komine grožđa ovisi o mnogo faktora, uključujući raznolikosti vinove loze, a svoj utjecaj ima i veličina bobica, kultivacija, godišnje doba i okolišni faktori (Palos-Hernández i sur., 2022). Također, zbog velike koncentracije polifenola komina grožđa ima i antioksidativno djelovanje što pozitivno utječe na ljudsko zdravlje, već od prije spomenuto antiviralno, antitumorsko i protuupalno djelovanje. Uz to, značajna koncentracija pigmenta antocijanina u komini čini ju obećavajućim prirodnim izvorom bojila što je od velike koristi za prethodno spomenuta područja farmacije, kozmetike i prehrane (Fontana i sur., 2013).

Za potrebe prehrambene, kozmetičke i farmaceutske industrije čiji su proizvodi namijenjeni ljudskoj uporabi, a u sebi sadrže sekundarne biljne metabolite, mogu se koristiti *ready-to-use* ekstrakti što smanjuje troškove i vrijeme trajanja proces. Zbog toga se za pripremu takvih ekstrakata sve više koriste niskotemperaturna eutektička otapala (DES-ovi). DES-ovi također pojačavaju biološku aktivnost i stabilnost biološki aktivnih spojeva kao što su kao polifenoli, tartarati i pigmenti (Panić i sur., 2019). Također se smanjuje potrošnja energije, mogućnost kontaminacije te isključuje pojava toksičnosti u ekstraktima (Palos-Hernández i sur., 2022).

Osim faktora koji značajno utječu na tijek ekstrakcije, na primjer polarnost i viskoznost otapala, složenost fenolnog udjela u biljci uvjetuje izbor odgovarajućeg DES-a (Panić i sur.,

2019). Nedavno su razvijene različite tehnike odabira DES-a za ekstrakciju antocijanina iz komine grožđa. Analiza različitih radova pokazala je da DES-ovi postižu slične prinose nasuprot organskih otapala, a u slučaju optimiziranog procesa, ih udvostručuju (Palos-Hernández i sur., 2022). Nadalje, uporaba DES-a u vodenim otopinama ne komplicira ekstrakciju antocijanina zbog afiniteta između antocijanina i same vode, već je olakšava zbog smanjenja viskoznosti i smanjuje troškove otapala (Benvenuti i sur., 2020).

Vinska kiselina ima širok raspon potencijalnih primjena za mnoga područja prehrambene, farmaceutske, kemijske i kozmetičke industrije. Primjerice, vinska kiselina bi mogla biti izvrsna alternativa široko primijenim kiselinama, limunskoj i fosfornoj, u industriji hrane i pića. Stoga se ona koristi u izradi bombona, pekarskih proizvoda poput kolačića i gaziranih pića. Zbog relativno dobre mikrobne stabilnost, vinska kiselina čini ove proizvode stabilnijima te postoji manja potreba za kemijskim ili termičkim očuvanjem istih. Vinska kiselina se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji tako da se proizvodi samo iz kalijevog hidrogentartarata i kalcijevog tartarata dobivenim u vinarijama (Salgado i sur., 2010).

Za izolaciju vinske kiseline koristi se najčešće ekstrakcija tekuće-tekuće pri čemu su nedavno potvrđeni prirodni sastojci, primjerice mentol, geraniol i timol, kao dobri kandidati za pripremu održivih i jeftinih hidrofobnih otapala za ekstrakciju zbog njihove vrlo niske topljivosti u vodi (Rodríguez-Llorente i sur., 2019). U radu Liu i sur., 2021, predlažu nove DES-ove na bazi amida kao HBA i terpena kao HBD za odvajanje karboksilnih kiselina, limunske, jabučne i vinske kiseline. Pri čemu su HBA uglavnom utjecali na elektrostatsku interakciju vodikove veze i povećavaju koeficijent raspodjele stvaranjem dvostrukih vodikovih veza s limunskom, jabučnom i vinskom kiselinom. U međuvremenu, HBD uglavnom utječu na poboljšavanje selektivnost karboksilnih kiselina.

Glavni nedostaci provođenja procesa ekstrakcije pomoću DES-a su velika gustoća i viskoznost što otežava primjenu u industriji. Takvi nedostaci mogu se prevladati dodatkom vode ili reguliranim povećanjem temperature, kako ne bi došlo do raspada spojeva od interesa. Postoji i problem s niskim tlakom para DES-a, što otežava izolaciju željenih spojeva iz ekstrakta pri čemu u većini slučajeva je potrebno koristi organska otapala, kao što su etanol ili metanol (Palos-Hernández i sur., 2022).

2.3.2. Upotreba niskotemperaturnih eutektičkih otapala za pred tretman lignocelulozne biomase

Lignocelulozna biomasa je najrasprostranjenija sirovina zbog proizvodnje biogoriva, ponajprije bioetanola (Zhang i sur., 2017). Sastoji se od ugljikohidratnih (celuloze i hemiceluloze) i fenolnih (lignin) polimera. Osim toga smatra se i obećavajućim obnovljivim izvorom sirovine kod proizvodnje kemikalija na biološkoj bazi. Međutim, većina biorafinerijskih procesa trenutačno je usmjerena na iskorištavanje frakcija ugljikohidrata (celuloze i hemiceluloze), pri čemu zaostaje nedovoljno iskorišten lignin (Wang i sur., 2019).

Lignin je jedina obnovljiva aromatična sirovina, velikih količina, koja se nalazi u većini kopnenih biljaka (Wang i sur., 2019). To je trodimenzionalni aromatski polimer sastavljen od tri velike podjedinice, p-hidroksifenila, gvaiačila i siringila izvedenih iz trans-p-kumaril, trans-koniferil i trans-sinapil alkohola. Ove tri fenilpropanske jedinice međusobno su povezane putem nasumičnog aril-etera (β -O-4, α -O-4, 4-O-5) i C-C (5-5', β -5, β -1, β - β) veze koje tvore složenu matricu tešku za probijanje (Schutyser i sur., 2018).

Uspješna konvezija lignina u željene proizvode trebala bi riješiti probleme vezane uz frakcioniranje biomase, što uključuje karakterizaciju lignina i njegovih derivata, depolimerizacija lignina i nadogradnju produkta. Dobra metoda frakcioniranja trebala bi izolirati lignin visokog prinosa i čistoće te zadržati β -O-4 veze u tehničkom ligninu, za naknadne procese pretvorbe (Kim i sur., 2018).

Početni korak valorizacije lignina je učinkovita ekstrakcija lignina iz biomase. Pred tretman lignocelulozne biomase je preduvjet te skupa s razdvajanjem lignina od celuloze i hemiceluloze, kritičan korak za proizvodnju bioetanola. Često se u takvim procesima koriste organska otapala koja predstavljaju opasnost za zdravlje i okoliš, a ta etapa konverzije lignina je i najskuplja (Haghighi Mood i sur., 2013)

Zelena i efikasna ekstrakcija prirodnih proizvoda iz biomase važna je za farmaceutsku i biokemijsku industriju. Zbog jedinstvenih svojstava DES-ova, posebno iznimne sposobnosti otapanja prirodnih produkata različitih polarnosti, porasla je i njihova upotreba kod ekstrakcije bioaktivnih tvari iz prirodnih izvora (Chen i sur., 2019). Mana njihove upotrebe i efikasnosti je visoka viskoznost, koja se razrješuje povećanjem temperature ili udjela vode kako je prije navedeno. Također, bitnu ulogu u efikasnosti ekstrakcije ima i polarnost samog DES-a. Kako bi se smanjila upotreba kemikalija i troškovi pred tretmana, potrebne su velike količine vode kako bi se isprale krutine i istaložio otopljeni lignin što utječe na svojstava DES-ova. Da bi se

svojstva održala dobrim, višak vode se mora ukloniti za recikliranje DES-a (Chen i sur., 2019).

U zadnje vrijeme počeli su se koristiti DES-ovi u procesu ekstrakcije lignina zbog svoje jednostavne sinteze, biorazgradivosti i ekološke prihvatljivosti. Lignin ekstrahiran pomoću DES-a na bazi karboksilne kiseline dobro je proučen jer je ovakva vrsta DES-a dobro istražena u primjeni frakcioniranja biomase i ekstrakcije lignina pri čemu je karakteristična velika čistoća produkta (Zhao i sur., 2017). Također, lignin niske molekularne težine i visoke čistoće dobiven je pred tretmanom uz pomoć mikrovalova (*Microwave-Assisted Extraction*, MAE). MAE je unaprijedila efikasnost i praktičnost procesa skraćivanjem vremena pred tretmana. Upotreba mikrovalova zamijenila je uobičajeno korištene metode zagrijavanja i u kombinaciji s DES-om pokazala visoku efikasnost frakcioniranja biomase (Chen i Wan, 2018). Osim toga, ovaj lignin također je pokazao druga korisna svojstva, kao što je veliki stupanj demetilacije, koji ligninu povećava reaktivnost pri kemijskoj modifikaciji.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Komina i piljevina

Pri izradi rada korištena je komina sorte grožđa *Vitis vinifera* cv. Graševina. Komina je čuvana u zamrzivaču na -18°C, za potrebe provedenih eksperimenata je usitnjena. Piljevina

Pri izradi rada korištena je piljevina bukve čuvana u kutiji. Za potrebe provedenih eksperimenata je usitnjenja i čuvana na 25 °C.

3.1.2. Kemikalije

- Betain, 98%, Thermo Scientific, Massachusetts, SAD
- Destilirana voda, PBF
- Eukaliptol, 99+%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Etilen glikol, Kemika, Zagreb, RH
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, RH
- Kamfor, 96%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kolin-klorid, 99%, Thermo Scientific, Massachusetts, SAD
- Ksiloz, 99+%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, Fisher Bioreagents, Pennsylvania, SAD
- Laktična kiselina, 90%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Laurinska kiselina, 98+%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Limunska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev karbonat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Malična kiselina, 99+%, New Jersey, SAD
- Mentol, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Oktanska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Saharoz, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sumporna kiselina, 96%, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, Francuska
- Kit za određivanje koncentracije vinske kiseline, Megazyme, Michigan, SAD
- Urea, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Otopine i puferi

- Folin-Ciocalteu reagens

FC reagens do 25 mL

Destilirana voda do 250 mL

- Otopina etanola

EtOH (96%) 109,4 mL

Destilirana voda do 150 mL

- Otopina natrijevog karbonata

Na₂CO₃ 7,5 g

Destilirana voda do 50 mL

- Otopina octene kiseline

HAc 1,25 mL

Destilirana voda do 500 mL

3.1.4. Oprema

- Analitička vaga, Sartorius, Entris, Njemačka
- Autoklav, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- Centrifuga, Megafuge ST Plus Series, Thermo Scientific, Massachusetts, SAD
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- HPLC, Agilent1260 Infinity II Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Laboratorijski pribor (epruvete, kivete, laboratorijske čaše, menzure, pipetmani, odmjerne tikvice, lijevci, sterilni filtar, vialo, špatule)
- Mlinac, RC 2 Lite, IKA Werke, Njemačka
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- pH-metar METTLER TOLEDO pH/Ion meter S220, Zagreb, RH
- Rotacioni viskozimetar, ViscoQC300, Anton Paar Croatia d.o.o., Hrvatska
- Shaker, Environmental Shaker - Incubator ES – 20/60, BioSan, Latvija

- Termo mikser, Thermomixer C, Eppendorf, SAD
- UV – Vis spektrofotometar, GENESYSTM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Ultrazvučna kupelj, XUB Series Digital Ultrasonic Baths, BioSan, Latvija
- Uređaj za mjerenje gustoće, Mettler Toledo DE40, Švicarska
- Vakumska pećnica

3.2.METODE

3.2.1. Procjena topljivosti ciljnih molekula u niskotemperaturnih eutektičkim otapalima otapala pomoću programa COSMOtherm

COSMOtherm je računalni program koji daje izračun kemijskog potencijala gotovo svake molekule u skoro svakoj čistoj ili miješanoj tekućini na promjenjivoj temperaturi te tako olakšava odabir i eliminaciju DES-a za procese u kojima se oni koriste (Panić i sur., 2021). U COSMOtherm programu ispitana je topljivost molekula od interesa u odabranim otapalima, odnosno DES-ovima. Dobiveni rezultat je logaritam koeficijena aktivnosti, $\ln(\gamma)$, za ispitanu tvar. Ako je taj koeficijent manji znači da je tvar više topljiva u odabranom otapalu, dok veći koeficijent indicira na manju topljivost tvari.

Ispitivana je topljivost katehina, najzastupljenijeg polifenola u uzorku, te vinske kiseline u različitim DES-ovima pomoću COSMOtherm programa čime je omogućen odabir prikladnih DES-ova za njihovu ekstrakciju.

3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

DES se priprema kombinacijom najčešće kolin-klorida i betaina kao, akceptora vodikove veze, te šećera, poliola, aminokiselina i organskih kiselina, kao donora vodikove veze, u određenim molarnim omjerima. Odabire se jedne od tri metode:

1. Zagrijavanje uz miješanje: smjesa se zagrijava na otprilike 80 °C tijekom 1-2 sata na magnetskoj miješalici dok ne postane obezbojena.
2. Vakuum isparavanje: komponente se otpe u vodi i ispare na rotacionom vakuum uparivaču pri 50 °C.
3. Liofilizacijom: liofilizacija komponenata prethodno otopljenih u vodi (Yang, 2019).

Na početku pripreme otapala izračuna se potrebna masa ili volumen komponenata smjese prema određenim molarnim omjerima. Prirodna eutektička otapala pripravljena su u bočicama

od 100 mL. Prvo se dodaju izračunate komponente a na kraju voda, ako je otapalo hidroforno, u protivnom se voda ne dodaje. Bočica se premjesti na elektromagnetsku miješalicu i uz zagrijavanje miješa tijekom nekoliko sati dok smjesa ne postane tekuća, prozirna i homogena. Otapala se nakon sinteze čuvaju na sobnoj temperaturi (tablica 1).

Tablica 1. Popis DES-ova korištenih tijekom izrade diplomskog rada

DES	Kratica	Molarni omjer	Udio vode (%)
Betain:etilen-glikol	B:EG	1:2	30
Betain:glukoza	B:Glc	1:1	30
Betain:laktična kiselina	B:LA	1:5	15
Betain:limunska kiselina	B:CA	1:1	30
Betain:limunska kiselina	B:CA	1:3	30
Betain:limunska kiselina:saharoza	B:CA:Suc	1:1:5	30
Betain:malična kiselina	B:Ma	1:1	30
Betain:saharoza	B:Suc	4:1	30
Kolin-klorid:ksiloza	ChCl:Xyl	1:2	30
Kolin-klorid:ksiloza	ChCl:Xyl	2:1	30
Kolin-klorid:limunska kiselina	ChCl:CA	1:10	30
Kolin-klorid:urea	ChCl:U	1:2	30
Mentol:kamfor	Me:Cam	1:1	-
Mentol:eukaliptol	Me:Eu	1:1	-
Mentol:laurinska kiselina	Me:Lau	2:1	-

3.2.3. Ekstrakcija i izolacija lignina u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Za ekstrakciju lignina pomoću niskotemperaturnih eutektičkih otapala korištene su peteljka komine grožđa i piljevina bukve. Tretman je započeo sušenjem sirovina u vakuum sušioniku na 70 °C tijekom 5 sati, a nakon čega je provedeno mljevenje pomoću uređaja za mljevenje RC 2 Lite pri 3000 okretaja u trajanju od 12 minuta i 15 sekundi. Usitnjena sirovina je prosijana kroz sito veličina pora 900 µm, kako bi se uklonilo sve što je zaostalo od mljevenja. Odvagano je 10 g prosijane sirovine za pojedini ekstrakt i dodano je 100 mL prethodno pripremljenih DES-ova (B:CA, B:LA, ChCl:LA) za ekstrakciju. Za usporedbu učinka ekstrakcije uzeto je 10 g prosijane sirovine te 100 mL otopine mravlje i octene kiseline. Ekstrakcija je provedena u autoklavu sa zadržavanjem na 120 °C tijekom 15 sekundi. Nakon toga su ekstrakti stavljeni na

preko noćnu filtraciju pomoću filter papira u Falcon epruvete od 50 mL te su pohranjeni za danje korištenje.

Ekstraktima je dodana destilirana voda u omjeru 1:2 ili 1:3 prema dobivenom volumenu ekstrakta. Ekstrakti su nakon toga centrifugirani na centrifugi Megafuge ST Plus Series pri 10 000 RCF tijekom 5 minuta. Talog je zadržan i pročišćen smjesom etanola i vode u omjeru 1:9. Izvedena su po 2 ciklusa ispiranja na sobnoj temperaturi nakon 1 sata uz filtriranje između svakog od ciklusa. Zatim je slijedilo sušenje i gravimetrijska analiza. Izračunati je prinos prema omjeru suhe mase dobivene frakcije i početne mase korištenih sirovina.

3.2.4. Ekstrakcija vinske kiseline u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Za ekstrakciju vinske kiseline korišteni su DES-ovi: B:CA (1:1), B:EG (1:2), B:Ma (1:1), B:Suc (4:1), ChCl:CA (2:1), ChCl:U (1:2), ChCl:Xyl (1:2) i ChCl:Xyl (2:1) (tablica 1) dok je otopina kisele vode služila kao kontrola. Odvagan je 1 g prosijane komine za pojedini ekstrakt i dodano je 10 mL prethodno navedenih DES-ova. Za usporedbu je uzet 1 g prosijane komine te 10 mL otopine kisele vode. Smjesa je miješana na shakeru na 700 rpm i 60 °C tijekom 1 sata. Nakon ekstrakcije smjesa je centrifugirana 15 minuta na 4 °C i 8 000xg. Koncentracija vinske kiseline mjerena je u supernatantu.

Za usporedbu, provedena je klasična izolacija vinske kiseline pomoću kalcijevih soli. U dobivene ekstrakte dodano je CaCO_3 ($1,2 \text{ g L}^{-1}$) i CaCl_2 ($15,2 \text{ g L}^{-1}$) pri čemu je pH smjese podešen na oko 5,2. Smjesa je miješana na 50 rpm-a tijekom 2 sata na 20 °C, a zatim je filtrirana. Talog je osušen u vacuum sušari na 75 °C do konstantne mase.

3.2.5. Ekstrakcija vinske kiseline i polifenola u dvofaznom sustavu niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Kako bi se pospješila učinkovitost i daljnje odvajanje spojeva različitih polarnosti napravljena je simultana ekstrakcija različitih spojeva pomoću DES-ova suprotnih polarnosti. Korištenjem dvofaznog sustava niskotemperaturnih eutektičkih otapala ideja je u jednom koraku ekstrahirati i razdvojiti polifenole i vinsku kiselinu iz komine grožđa.

Za ekstrakciju polifenola i vinske kiseline u dvofaznom sustavu korišteni su sljedeći DES-ovi: B:Glc (1:1) i B:Ma (1:1) kao hidrofilne faze te Me:Cam (1:1), Me:Eu (1:1) i Me:Lau (2:1) (tablica 1) kao hidrofobne faze.

Odvagano je po 2 g prosijane komine te je dodano 10 mL hidrofilnog DES-a i 10, odnosno

20 mL hidrofobnih DES-ova kako bi se istovremeno ispitaio utjecaj različitih volumnih omjera faza na učinkovitost ekstrakcije vinske kiseline. Smjesa je miješana na shakeru na 700 rpm i 60 °C tijekom 1 sata. Nakon toga su ekstrakti stavljeni na preko noćnu filtraciju preko filter papira u Falcon epruvete od 50 mL.

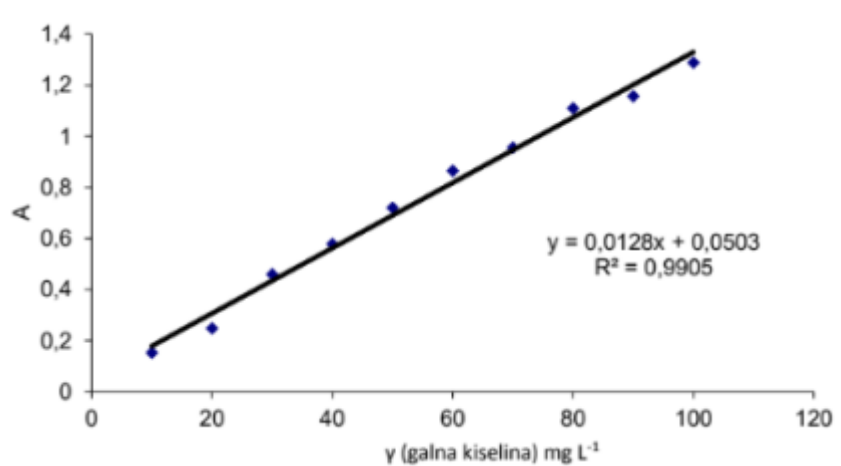
Nakon prethodne filtracije, razdvojene su prema različitoj obojanosti hidrofobna i hidrofilna faza u zasebne Falcon epruvete od 15 mL za daljnju analizu.

3.2.6. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom

U svim napravljenim ekstraktima određivana je koncentracija ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu (FC) reagensom. FC metoda se zasniva na redukciji fosfomolibdovolframa na plavo obojeni heteropoli molibden kompleks uz oksidaciju fenola (Ainsworth i Gillespie, 2007). Intenzitet razvijenog obojenja proporcionalan je udjelu polifenola u uzorku.

Ekstrakti su razrijeđeni 20 puta destiliranom vodom. U posebnu epruvetu otpipetirano je 0,25 mL razrijeđenog uzorka te dodano 1.25 mL FC reagensa prethodno razrijeđenog 10 puta. Smjesa je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga joj je dodan 1 mL Na_2CO_3 , koncentracije 75 g L^{-1} . Nakon dodatka Na_2CO_3 otopine su premještene u vodenu kupelj, prethodno zagrijanu na 50 °C, gdje su ponovno inkubirane na 5 minuta. Reakcija je brzo prekinuta stavljanjem na hlađenje u ledenu kupelj. Zatim je mjerena apsorbancija na GENESYS 10S UV/Vis spektrofotometru na $\lambda=760 \text{ nm}$ u tri paralele za svaki uzorak (Ainsworth i Gillespie, 2007).

Koncentracija ukupnih polifenola računana je kao ekvivalent galne kiseline pomoću baždarenog dijagrama na slici 4. Rezultati mjerenja izražavani su kao mg polifenola po gramu suhe tvari (s.t.) biomase.



Slika 4. Baždareni pravac ovisnosti masene koncentracije galne kiseline (mg mL^{-1}) o apsorbanciji (Šango, 2017).

Pri čemu vrijedi:

$$y = ax + b$$

$$y = 0,0128x + 0,0503, R^2 = 0,9905$$

y – apsorbancija pri 760 nm,

x – masena koncentracije galne kiseline (mg mL^{-1})

3.2.7. Mjerenje koncentracije vinske kiseline

Određivanje koncentracije vinske kiseline pomoću komercijalnog kit-a je brza, jednostavna, pouzdana i točna metoda za specifično mjerenje i analizu vinske kiseline u vinu, voćnom soku i drugim materijalima kao što je to komina grožđa. Metoda je spektrofotometrijska a do obojenja dolazi reakcijom uzorka koji sadrži vinsku kiselinu sa *Reagensom I* i *Reagensom II* vinske kiseline pri čemu vinska kiselina ulazi u kompleks s vanadijem stvarajući žuto obojenje.

U plastične kivete od 2,5 mL otpipetirano je 50 μL ekstrakta i 875 μL vode. Slijepa proba je sadržavala 50 μL DES-a umjesto uzorka, odnosno 50 μL standarda u slučaju njegovog mjerenja. Dodano je još 200 μL Tartaric acid reagent 1 otopine i nakon 1 minute mjerena je apsorbancija na UV/Vis spektrofotometru pri $\lambda=505$ nm u tri paralele. Zatim je dodano 125 μL Tartaric acid reagent 2 otopine te je nakon 4 minute ponovo mjerena je apsorbancija na UV/Vis spektrofotometru pri $\lambda=505$ nm. Na kraju je mjerena standard istim, prethodno opisanim postupkom.

Koncentracija vinske kiseline računa se prema jednadžbi:

$$c_{\text{vinska kiselina}} = \frac{\Delta A_{\text{vinska kiselina-uzorak}}}{\frac{\Delta A_{\text{vinska kiselina-STD}}}{c_{\text{vinska kiselina-STD}}}} \times F$$
$$\text{učinak ekstrakcije} = \frac{c_{\text{vinska kiselina}} [\text{g L}^{-1} \text{ uzorka}]}{\text{masa uzorka} [\text{g L}^{-1} \text{ uzorka}]} \times 100$$

Pri čemu vrijedi:

$$\Delta A_{\text{vinska kiselina}} = A_2 - A_1$$

$$\Delta A_{\text{vinska kiselina-uzorak}} = \Delta A_{\text{vinska kiselina}} - \Delta A_{\text{slijepa proba}}$$

$$\Delta A_{\text{vinska kiselina-STD}} = \Delta A_{\text{vinska kiselina}} - \Delta A_{\text{slijepa proba}}$$

A – apsorbancija pri 760 nm

c – koncentracija vinske kiseline

F – faktor razrjeđenja

3.2.8. Određivanje udjela vinske kiseline i polifenola u konini grožđa primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola i vinske kiseline u ekstraktima komine grožđa provedena je uporabom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-DAD detektorom. Kromatografska analiza provedena je na HPLC uređaju Agilent1260 Infinity II Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) uz module kvarterne pumpe (Quat Pump G711B), degazera (G7122A), autosampler-a (Vilesampler G7129A), modula kolone (ICC G7130A) te uz detekciju na DAD detektoru (VWD G7114B), a podatci su obrađeni računalnim programom Lab Advisor Software. Vinska kiselina bila je detektirana na Poroshell 120 EC-C18 koloni dimenzija 4,6 × 100 mm, 2,7 μm. Injektirani volumen uzoraka bio je 5 μL. Mobilna faza je bila otapalo C (25 mM kalij-fosfatni pufer, pH=2,4) pri protoku 1 mL/min. Polifenoli bili su razdvojeni na Poroshell 120 EC-C18 koloni dimenzija 4,6 × 100 mm, 2,7 μm. Injektirani volumen uzoraka bio je 5 μL. Mobilne faze su bile otapalo B (acetonitril) i otapalo D (0,25 % octena kiselina) pri protoku 1 mL/min. Uvjeti kromatografske analize prikazani su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Uvjeti kromatografske analize vinske kiseline u ekstraktima komine grožđa.

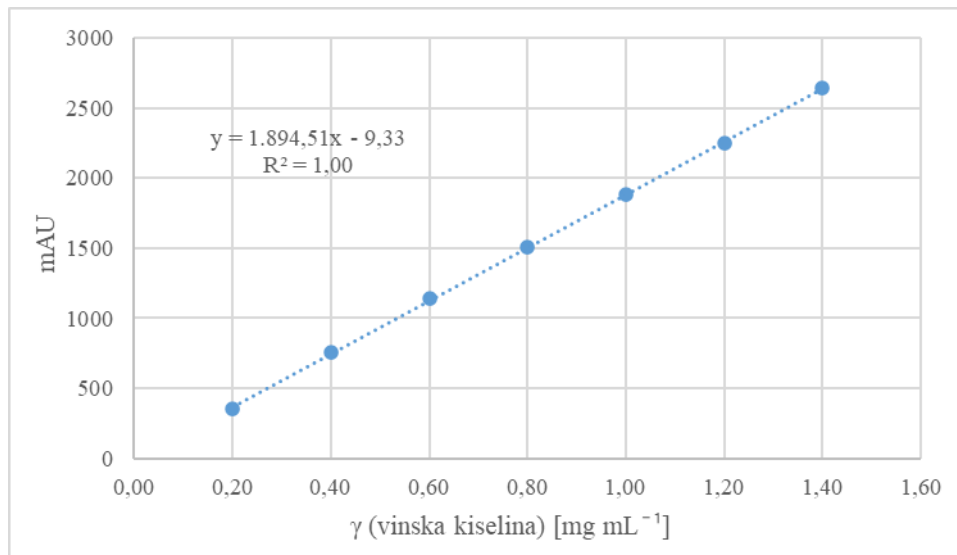
HPLC uvjeti			
Kolona	Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 mm, 2,7 μm		
Mobilna faza	Otapalo C	25 mM kalij-fosfatni pufer, pH=2,4	
Volumen injektiranja (μL)	4		
Protok (mL/min)	1		
Temperatura (°C)	40		
Vrijeme analize (min)	14		
Eluiranje	Gradijentno	Vrijeme (min)	Otapalo
			C %
		0	100
		14	100

Tablica 3. Uvjeti kromatografske analize polifenola u ekstraktima komine grožđa.

HPLC uvjeti				
Kolona	Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 mm, 2,7 μm			
Mobilna faza	Otapalo A	0,25 % octena kiselina		
	Otapalo B	Acetonitril		
Volumen injektiranja (μL)	4			
Protok (mL/min)	1			
Temperatura (°C)	40			
Vrijeme analize (min)	25			
Eluiranje	Gradijentno	Vrijeme (min)	Otapalo	
			B %	D %
		0	10	90
		7,5	15	85
		15	27	73
25	10	90		

Identifikacija i kvantifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena spojeva i površine ispod pikova na grafovima vinske kiseline i katehina, epikatehina, galne kiselina procijanidina B1, B2, B3, B4 i C1 kao najzastupljenijih polifenola u grožđu.

Kalibracijska krivulja i formula prema kojoj se računala koncentracija vinske kiseline prikazana je na slici 5.



Slika 5. Kalibracijska krivulja ovisnosti masene koncentracije vinske kiseline (mg mL⁻¹) o apsorbanciji.

Pri čemu vrijedi:

$$y = ax + b$$

$$y = 1894,51x - 9,33$$

y – apsorbancija pri 760 nm,

x – koncentracije vinske kiseline (mg mL⁻¹)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Razvojem zelene kemije u znanstvenim krugovima i u industriji, razvijaju se i zelena otapala kao zamjena za konvencionalno korištena otapala. Zbog jedinstvenih svojstava koja ne ugrožavanja sigurnosti i biološku učinkovitost, DES-ovi su privukli pozornost biokemijske, farmaceutske, kozmetičke te prehrambene industrije.

Prilikom izrade ovog rada korišteni su prirodni, netoksični i jeftini DES-ovi za ekstrakciju visokovrijednih spojeva lignina, polifenola i vinske kiseline. Lignin je obnovljiva sirovina, prisutna u kopnenim biljkama čiji se potencijal vidi u proizvodnji biogoriva i biokemikalija (Wang i sur., 2019). Polifenoli se također vežu uz biljke kao njihovi sekundarni metaboliti te su dobri antioksidansi i imaju blagotvorni učinak na zdravlje (Hassan i sur., 2019). Vinska kiselina uvelike se koristi u prehrambenoj, farmaceutskoj, kemijskoj i kozmetičkoj industriji, a mogla bi postati i zamjena za uobičajno korištene kiseline u spomenutim područjima (Salgado i sur., 2010).

Odabrana niskotemperaturna eutektička otapala s visokom predviđenom topljivošću upotrebljena su za zelenu ekstrakciju lignina, polifenolnih spojeva i vinske kiseline te klasično korištena otapala za ekstrakciju kako bi se usporedili rezultati. Izolacija lignina i ekstrakcija polifenola iz piljevine i peteljke provedena je u autoklavu sa zadržavanjem na 120 °C tijekom 15 sekundi. Ekstrakcija vinske kiseline iz komine grožđa provedena u shakeru na 700 rpm i 60 °C tijekom 1 sata kao i ekstrakcija prethodno spomenutih spojeva u dvofaznom DES sustavu. U svih ekstraktima određen je ukupni sadržaj polifenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa te HPLC-a. Provedena je i kvantitativna analiza vinske kiseline pomoću HPLC-a i komercijalno korištenog kit-a.

4.1. IZOLACIJA LIGNINA I EKSTRAKCIJA POLIFENOLA IZ PILJEVINE I PETELJKE

Za izolaciju lignina iz piljevine bukve i peteljke komine grožđa odabrani su sljedeći DES-ovi prema literaturi: kolin-klorid:mliječna kiselina (ChCl:LA), betain:limunska kiselina (B:CA) i betain:mliječna kiselina (B:LA). Kao kontrola korištena je otopina mravlje i octene kiseline u omjeru 1:1 koja se prema literaturi inače koristi za ekstrakciju lignina prema radu Ma i sur., 2021. Nakon ekstrakcije pomoću DES-ova, provedena je izolacija lignina iz DES-ova, a uz to je određena i ukupna koncentracija polifenola u dobivenim ekstraktima Folin-Ciocalteu reagensom. Dobivene vrijednosti za uzorke piljevine i peteljke prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Vrijednosti dobivene određivanjem ukupnih polifenola Folin-Ciocalteau reagensom i iskorištenje procesa izolacije lignina.

Uzorak	Polfenoli		Lignin	
	DES	w [mg 100 g ⁻¹]	m [mg]	η [%]
Piljevina	ChCl:LA	0,53	148	1,48
	B:CA	0,28	-	-
	B:LA	0,34	31,7	0,32
	Mravlja:octena	0,55	276,8	2,77
Peteljka	ChCl:LA	0,74	397,4	3,97
	B:CA	0,72	55,1	0,55
	B:LA	0,54	419,5	4,19
	Mravlja:octena	0,67	224,9	2,25

Na temelju rezultata danih u tablici 4 može se zaključiti da je izoliran lignin iz piljevine i peteljke. Izolacija je bila uspješnija kod peteljke nego kod piljevine te kod DES-ova na bazi kolin-klorida nego betaina kod piljevine, dok su u slučaju peteljke DES-ovi ChCl:LA i B:LA podjednako dobri za izolaciju. DES koji se nije pokazao kao optimalan za izolaciju lignina je B:CA s kojim je dobiveno vrlo malo lignina u oba slučaja. Dobivene vrijednosti kreću se od 0 pa do 1,48 mg za piljevinu te 0,55 do 4,19 mg za peteljku.

U radu Chen i sur., 2020, uspoređeni su DES-ovi na bazi kolin-klorida i betaina s istim donorima vodikovih veza. Iako kolin-klorid i betain imaju sličnu strukturu, DES-ovi na bazi ChCl daju bolje daleko bolje rezultate od onih na bazi betaina što je vidljivo iz prikazanih rezultata u slučaju piljevine.

Rezultati za ChCl:LA DES ne iznenađuju s obzirom na to da se u radu Chen i sur., 2019 također pokazao kao najbolji DES za izolaciju lignina iz piljevine, a u radu Filippi i sur., 2023 je integriran u pred tretman peteljke grožđa unutar biorafinerije i pokazao se kao obećavajuće otapalo za spomenuti proces zbog velike učinkovitosti te mogućnosti recikliranja. Prema Chen i sur., 2020, dobra svojstva ChCl:LA kod ekstrakcije lignina mogu se pripisati aktivnijim protonima koje donira mlječna kiselina, što olakšava protonom katalizirano cijepanje različitih tipova veze (npr. eterske veze u ligninu, glikozidne veze u polisaharidu te veze lignin-polisaharid).

Iz rezultata prikazanih u tablici 4 zaključujemo da je peteljka dobar izvor polifenola dok piljevina nije, a rezultati se kreću od 0,54 do 75 mg na 100 g s.t.. Taj rezultat je znatno lošiji kod piljevine, od 0,28 do 0,53 mg na 100 grama suhe tvari. Učinkovitost DES-ova u ekstrakciji lignina možemo poredati prema ovom redoslijedu, počevši od najboljeg za piljevinu:

ChCl:LA>Mravlja:octena(kontrola)>B:LA>B:CA, ipeteljku: ChCl:LA > B:CA > Mravlja:octena (kontrola)>B:LA. DES s najviše izoliranih polifenola u oba slučaja je bio ChCl:LA, dok je DES s najmanje izoliranih polifenola ovisio o tome radi li se o piljevini ili peteljci. Ekstrakcija polifenola, konkretno antocijanina, pomoću DES-ova korištena je i u radu (Panić i sur., 2019) . Između ostalih, upotrjebljeni su i DES-ovi na bazi kolin-klorida i betaina gdje su se kao i u ovom slučaju oni na bazi kolin-klorida pokazali kao bolji izbor za isti proces. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu reagensom je također provedeno u radu Anastasiadi i sur., 2012 pri čemu su kod peteljke grožđa dobiveni posebno dobri rezultati što ukazuje na to da je peteljka izvrstan izvor tih bioaktivnih spojeva.

4.2. ODABIR NISKOTEMPERARURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA EKSTRAKCIJU VINSKE KISELINE I POLIFENOLA IZ KOMINE GROŽĐA

Odabiru najboljih DES-ova za postupke izolacije vinske kiseline i polifenola iz komine grožđa, prethodilo je ispitivanje topljivosti pomoću računalnog programa COSMO_{therm}. Model COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents) jedna je od najtočnijih i najpreciznijih računalnih metoda koja predviđa eutektičku temperaturu te topljivosti ciljanih komponenata, u ovom slučaju ekstrakcije u eutektičkim otapalima. Time se smanjuje utrošak vremena i sredstava potrebnih za eksperimentalno traganje odgovarajuće topljivosti. Također dobiva se mogućnost probira velikog broja kombinacija sastavnica otapala nego što bi to bio slučaj eksperimentalnih putem.

COSMO-RS je metoda za procjenu termodinamičkih podataka tekućih sustava temeljena na principima simulacija molekularnih interakcija. Program kombinira kvantno-kemijske metode otopljenih tvari i otapala pa uz statističku termodinamiku pronalazi interakcije površina molekula. Time COSMO-RS daje vrlo točan rezultat velikog broja karakteristika koje se ne mogu dobiti upotrebom drugih metoda (Klamt i sur., 2010). Primjenjuje se i za uspješno pročišćavanje otapala te optimiziranje različitih kemijskih procesa (Klamt, 2017).

Za odabir optimalnih DES-ova za ekstrakciju, prvi je korak bio procijeniti topljivost katehina i vinske kiseline u hidrofobnim i hidrofilnim DES-ovima s dvije ili tri komponente u različitim molarnim omjerima korištenjem COSMO_{therm} funkcije izračuna koeficijenta aktivnosti. Svi hidrofilni DES koji su bili korišteni sadržavali su s 30 % vode zbog najboljih fizikalno-kemijska svojstva za ekstrakciju, kao što je to predloženo u radu Panić i sur., 2021. Dobiveni su logaritmi koeficijenta aktivnosti ($\ln(\gamma)$) koji govore o topljivosti ispitivanih spojeva u određenim otapalima, ovdje konkretno DES-ovima. Manja vrijednost koeficijenta predstavlja

veću topljivost spoja u odabranom sustavu.

Nakon korištenja programa COSMO $therm$ i dobivenih rezultata, za ekstrakciju vinske kiseline su odabrana otapala:

- Betain: etilen-glikol (B:EG),
- Betain: limunska kiselina (B:CA),
- Betain: jabučna kiselina (B:Ma),
- Betain: saharoza (B: Suc),
- Kolin-klorid: limunska kiselina (ChCl:CA),
- Kolin-klorid: urea (ChCl:U),
- Kolin-klorid: ksiloza (ChCl:Xyl)

Za ekstrakciju vinske kiseline i polifenola u dvofaznom DES sustavu su odabrana otapala:

- Betain: glukoza (B:Glc),
- Betain: jabučna kiselina (B:Ma),
- Mentol: eukaliptol (Me:Eu),
- Mentol: kamfor (Me:Cam),
- Mentol: laurinska kiselina (Me:Lau)

Prema rezultatima analize, kao najbolji DES-ovi za ekstrakciju željenih polifenola pokazali su se polarni DES-ovi (tablica 5).

Niži koeficijent aktivnosti ($\ln(\gamma)$) ispitivanih akceptora i donora vodikove veze upućuje i na veću topljivost odabranih spojeva. U tablici 5 prikazani su koeficijenti aktivnosti odabranih DES-ova pri čemu zaključujemo da su otapala na bazi kolin-klorida bolja za ekstrakciju vinske kiseline u odnosu na DES-ove na bazi betaina što je također kasnije potvrđeno i eksperimentom.

Prilikom COSMO-RS analize topljivosti vinske kiseline, nekoliko hidrofobnih sustava se pokazalo zanimljivim (Me:Cam, Me:Eu i Me:Lau) i zbog toga je provedena ekstrakcija u dvofaznom sustavu kako bi se ispitala mogućnost simultane ekstrakcije spojeva različitih polarnosti u jednom koraku.

Tablica 5. Prikaz rezultata COSMO-RS analize topljivosti katehina kao najzastupljenijeg polifenola u komini grožđa i vinske kiseline u odabranim DES sustavima* s 30 ili 0% vode.**

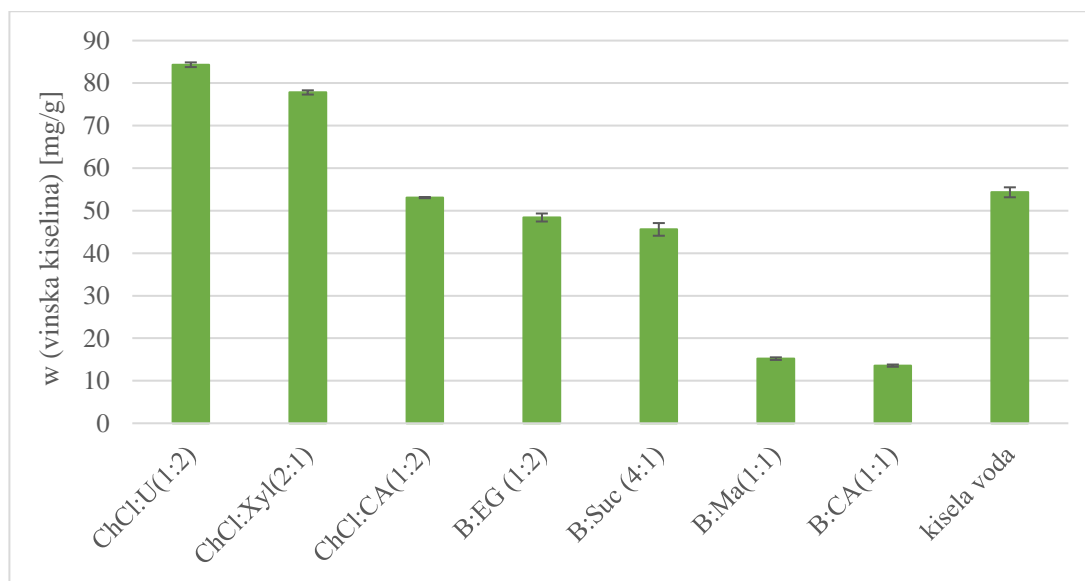
Katehin				Vinska kiselina			
DES	$\ln(\gamma)$	DES	$\ln(\gamma)$	DES	$\ln(\gamma)$	DES	$\ln(\gamma)$
B:Glc	-10,65	Sor:EG	-3,56	B:Suc	-13,24	Me:Cam	-5,79
B:Suc	-10,25	Sol:EG	-3,32	ChCl:U	-12,36	Sor:EG	-5,69
B:EG	-9,03	Suc:EG	-2,68	B:EG	-11,86	Xyl:EG	-5,43
ChCl:Xyol	-8,11	Pro:Ma	-2,58	ChCl:U	-11,25	Suc:EG	-5,2
ChCl:EG	-7,81	Gly:Glc	-2,51	ChCl:Xyol	-10,69	Me:Cam	-5,19
B:Xyl	-7,63	Glc:Fru	-2,46	ChCl:EG	-10,09	Glc:EG	-4,91
ChCl:U	-7,55	Gly:Sol	-2,31	ChCl:Xyl	-10,04	Gly:Glc	-4,5
B:Gly	-7,07	Ma:Fru	-2,23	B:Gly	-9,74	Glc:Fru	-4,47
ChCl:Suc	-6,94	Suc:Glc:U	-2,17	ChCl:Glc	-9,5	Ma:Fru	-3,71
B:Ma	-6,94	Ma:Glc	-1,87	B:Xyl	-9,49	Ma:Suc	-3,41
Me:Cam	-6,16	CA:Fru	-1,70	B:Glc	-9,43	CA:Sor	-3,32
ChCl:Fru	-5,73	Ma:Suc	-1,43	B:Ma	-9,4	CA:Fru	-3,19
ChCl:CA	-5,51	CA:Glc	-1,43	ChCl:Fru	-8,31	Ma:Glc	-3
ChCl:Gly	-5,34	CA:Sor	-1,36	ChCl:Suc	-8,28	CA:Glc	-2,95
ChCl:Sor	-5,22	CA:Suc	-1,06	ChCl:Sor	-8,26	Me:SA	-2,64
ChCl:Xyl	-5,17	Me:SA	-0,85	ChCl:CA	-8,22	Me:C8	-1,74
ChCl:Glc	-5,13	Me:Ty	0,37	ChCl:Gly	-7,9	Me:Ty	-1,61
ChCh:Ma	-5,04	Me:C8	0,48	ChCl:Glc	-7,83	CA:Suc	-1,2
ChCl:Sol	-5,01	Ty:Cou	0,78	Me:Eu	-7,48	Me:C10	-0,59
B:CA	-4,93	Me:C10	0,91	ChCh:Ma	-7,43	Ty:Cou	-0,23
ChCl:OxA	-4,70	Me:C18:2	1,45	B:CA	-7,38	Me:C18:2	-0,2
Fru:EG	-4,03	Ty:C8	1,64	ChCl:OxA	-7,35	Ty:C8	1,23
Xyl:EG	-3,59	Ty:C10	2,61	ChCl:Sol	-7,19	Ty:C10	2,11
Glc:EG	-3,57			Fru:EG	-5,85		

*B: betain, C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, CA: limunska kiselina, Cam: kamfor, Ch: kolin-klorid, Cou: kumarin, Me: mentol, EG: etilenglikol, Eu: eukaliptol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, LA: mliječna kiselina, Lau: laurinska kiselina, Ma: jabučna kiselina, OxA: oksalna kiselina, Pro: prolin, Ty: timol, SA: salicilna kiselina, Suc: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, U: urea, Xyl: ksiloza, Xyol: ksilitol.

**Topljivost opada od crvene prema plavoj boji.

4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VINSKE KISELINE U EKSTRAKTIMA KOMINE GROŽĐA PRIPREMLJENIH POMOĆU EUTEKTIČKIH OTAPALA

Za ekstrakciju vinske kiseline korišteni su DES-ovi: B:CA (1:1), B:EG (1:2), B:Ma (1:1), B: Suc (4:1), ChCl:CA (2:1), ChCl:U (1:2), ChCl:Xyl (1:2) i ChCl:Xyl (1:2) dok je otopina kisele vode služila kao kontrola. Rezultati mjerenja vinske kiseline pomoću protokola prikazani su na slici 6.



Slika 6. Udio ekstrahirane vinske kiseline u DES-u iz komine grožđa.

Uspješno je provedena ekstrakcija vinske kiseline u DES-ovima odabranim pomoću računalnog programa COSMOtherm kao i detekcija pomoću komercijalnog kit-a. Na temelju rezultata možemo zaključiti da je komina grožđa solidan izvor vinske kiseline na što je prije ukazao rad Teixeira i sur., 2014 jer se u komini između ostalog nalazi i kožica grožđa bogata tartaratima, odnosno vinskom kiselinom. Najveća koncentracija vinske kiseline dobivena je kod sustava ChCl:U i iznosi 8,43 mg 100 g⁻¹ komine, a najmanja kod sustava B:CA u iznosu od 1,36 mg na 100 g komine. Također, sustavi na bazi kolin-klorida pokazali su se boljima nego oni na bazi betaina, a općenito su koncentracije vinske kiseline bile veće u sustavima koji su sadržavali šećere, ksilozu i saharozu dok su oni s organskim kiselinama ekstrahirali manje koncentracije. Bili su korišteni različiti DES-ovi pa je time i efikasnost ekstrakcije bila različita te se oni mogu poredati sljedećim redoslijedom, počevši od najboljeg: ChCl:U > ChCl:Xyl (2:1) > ChCl:Xyl (1:2) > kisela voda (kontrola) > ChCl:CA > B:Suc > B:EG > B:Ma > B:CA.

Iz prikazanih rezultata je zaključeno kako su čak tri DES-a, ChCl:U, ChCl:Xyl (2:1),

ChCl:Xyl (1:2), bolja za izolaciju vinske kiseline nego što je to kisela voda što upućuje da bi eutektička otapala bila dobra alternativa uobičajeno korištenim otapalima za ekstrakcije. Osim toga se i COSMO $_{therm}$ pokazao kao pouzdan alat za predviđanje topljivosti ciljanih spojeva pri čemu se dobivene vrijednosti za $ln(\gamma)$ potvrđuju uspješnom ekstrakcijom polifenola iz komine grožđa.

Također je provedena izolacija vinske kiseline iz ekstrakta i ekstrakcija u referentnom otapalu dodatkom CaCO₃ i CaCl₂. Izolacija je bila uspješna u referentnom otapalu, ali u eutektičkom otapalu na takav način vinska kiselina nije istaložena (slika 7). Prema tome, možemo zaključiti da DES-ovi nisu pogodni za izolaciju čiste vinske kiseline uobičajenim postupkom, zbog čega smo ispitali potencijal dobivanja čiste faze s vinskom kiselinom nakon dvofazne ekstrakcije u DES-u kako bi se izbjegli daljnji koraci pročišćavanja i izolacije.



Slika 7. Vinska kiselina izolirana iz konvencionalnog otapala i DES-a (vlastita fotografija).

4.4. EKSTRAKCIJA VINSKE KISELINE I UKUPNIH POLIFENOLA IZ KOMINE GROŽĐA U DVOFAZNOM SUSTAVU EUTEKTIČKIH OTAPALA

Ekstrakcijom bioaktivnih molekula u sustavu različitih faza koje se ne miješaju pruža se mogućnost lakšeg i učinkovitiji proces odvajanja spojeva u jednom koraku. Ova strategija omogućuje selektivnost ciljanih bioaktivnih spojeva što je izuzetno povoljno kod specifičnih primjena. Ekstrakcija u dvofaznom sustavu DES-ova koristi dva DES-a dovoljno različitih polarnosti da se oni ne miješaju. Dvofazni DES sustavi ne samo da mogu ekstrahirati ciljane spojeve u većim koncentracijama, već također mogu razdvojiti spojeve na temelju njihovih polariteta. Kao rezultat se u jednom koraku dobivaju ekstrakti očigledno razdvojenih faza u

kojima se nalaze i sami ciljani spojevi raspodijeljeni prema svojoj polarnosti. Takav način ekstrakcije također omogućava i lagano odvajanje faza nakon procesa ekstrakcije kako bi se provela daljnja analiza produkata Viera i sur. (2022).

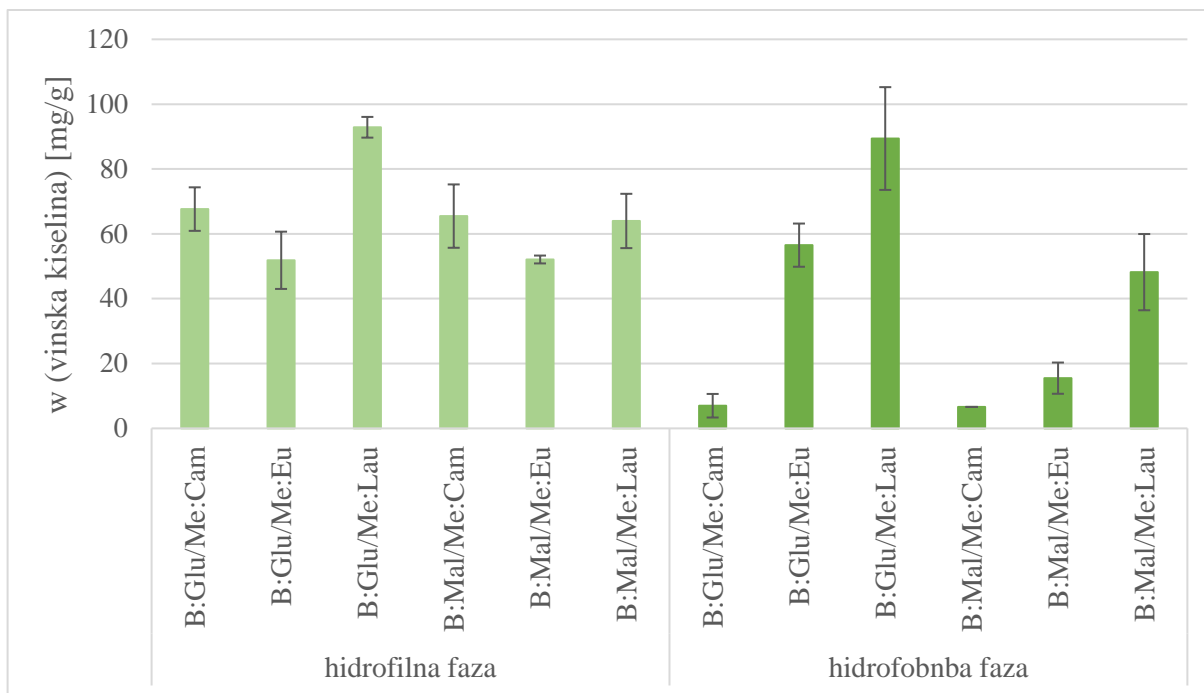
Za separaciju vinske kiseline od polifenola isprobana je metoda dvofazne ekstrakcija pomoću eutektičkih otapala s ciljem dobivanja čiste faze s vinskom kiselinom kako bi se izbjegli daljnji koraci pročišćavanja. Izolacijom vinske kiseline komina grožđa dobiva dodatnu vrijednost, a sam proces izolacije koji uključuje nekoliko koraka filtracije, separacije i taloženja mogao bi se zamijeniti dobivanjem ekstrakta vinske kiseline kao gotovog proizvoda u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Za dvofaznu ekstrakciju vinske kiseline i polifenola su odabrana tri hidrofobna DES-a: mentol:eukaliptol u molarnom omjeru 1:1, mentol:kamfor u omjeru 1:1 i mentol:laurinska kiselina u omjeru 2:1.

Kao hidrofilna faza odabrani su DES-ovi betain:glukoza i betain:maltoza s 30 % vode koji su se u prethodnim istraživanjima pokazali kao dobar odabir za ekstrakciju polifenola iz komine grožđa (Panić i sur., 2021). Na slici 8 su prikazane odvojene faze različite boje što bi ukazivalo na to da je postignut određeni stupanj separacije prilikom ovakvog tipa ekstrakcije.

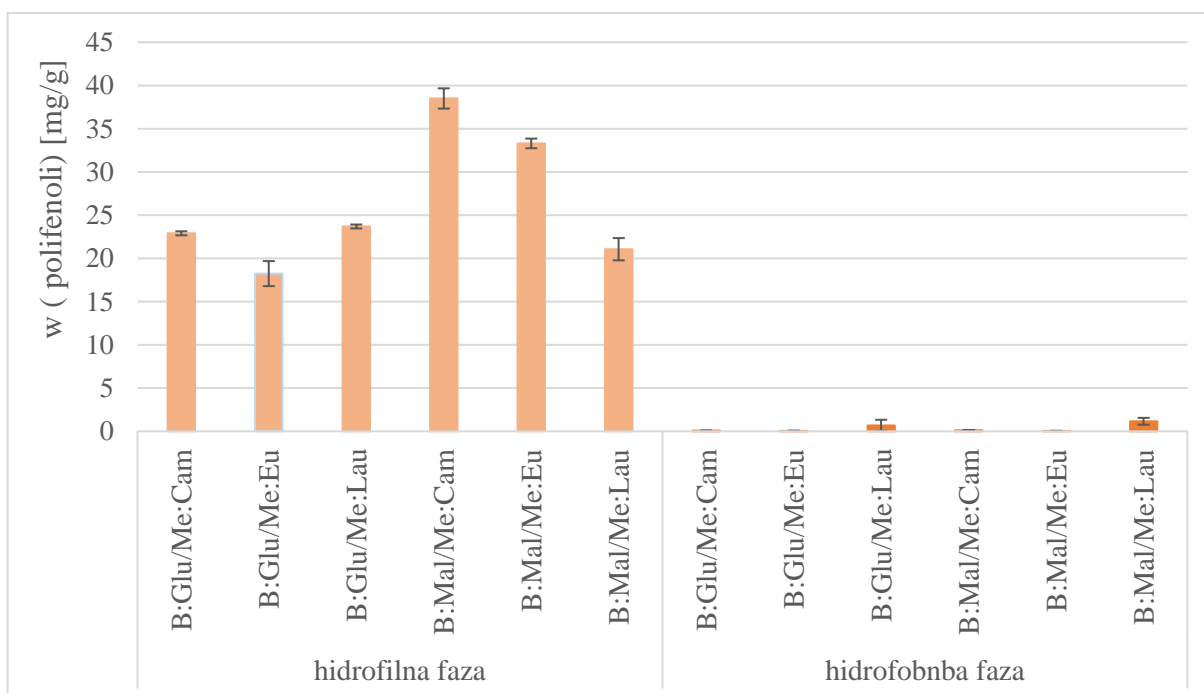


Slika 8. Odvojene faze prije postavljanja ekstrakcije vinske kiseline (desno) i dobiveni ekstrakti (lijevo) (vlastita fotografija).

Ekstrakcija je prvo provedena u volumnom omjeru 1:1 hidrofilne i hidrofobne faze pomoću navedenih DES-ova. Nakon razdvajanja faza provedena je analiza koncentracije ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom u obje faze kao i analiza koncentracije vinske kiseline pomoću komercijalnog kit-a. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 9 i 10.



Slika 9. Udio vinske kiseline [mg/g s.tv. komine] u pojedinim fazama nakon provedene ekstrakcije komine grožđa u dvofaznom sustavu eutektičkih otapala.



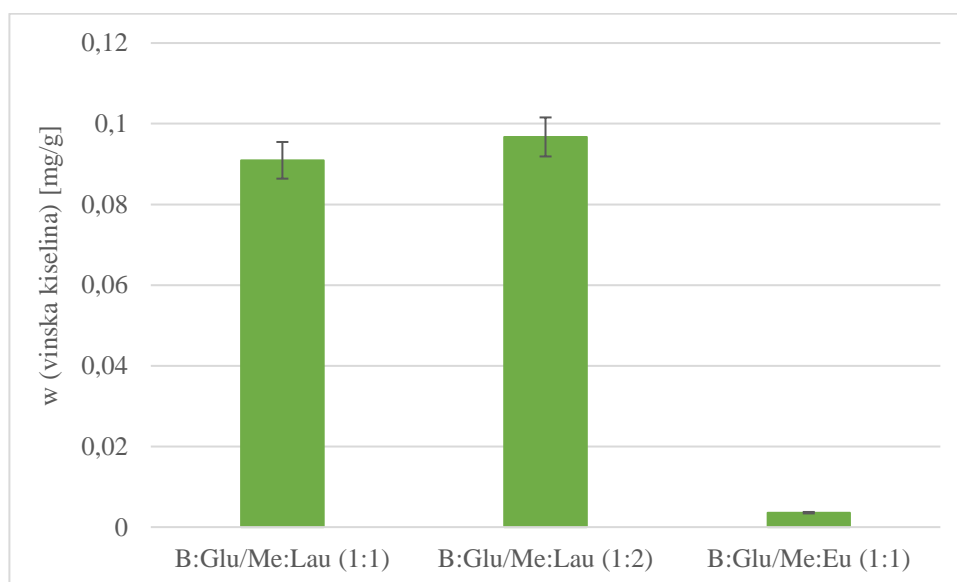
Slika 10. Udio polifenola [mg/g s.tv. komine] u pojedinim fazama nakon provedene ekstrakcije komine grožđa u dvofaznom sustavu eutektičkih otapala.

Iz rezultata na slici 9 je vidljivo da su se polifenoli ekstrahirali gotovo isključivo u hidrofilnoj fazi što je u skladu sa očekivanjima. Ekstrahirana vinska kiselina je detektirana u

hidrofilnoj i hidrofobnoj fazi. Kao što je prikazano na slici 10, hidrofobni DES-ovi pokazali su različitu učinkovitost ekstrakcije vinske kiseline. Me:Cam faza pokazala je najnižu selektivnost za vinsku kiselinu dok su Me:Eu i Me:Lau pokazali potencijal za primjenu u selektivnoj ekstrakciji pomoću dvofaznih sustava.

Dalje je ispitano kakav bi utjecaj na selektivnost vinske kiseline imao dodatak hidrofobne faze u većem volumnom omjeru u odnosu na hidrofilnu fazu. Za taj eksperiment je korišten DES B:Glu kao hidrofilna faza, zbog toga što je taj DES pokazao nešto manju selektivnost prema vinskoj kiselinu, dok su za hidrofobnu fazu korišteni sustavi Me:Lau i Me:Eu.

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) provedena je kvantitativna analiza vinske kiseline i polifenola u ekstraktima komine grožđa pri čemu su se uspoređivala retencijska vremena spojeva i vanjski standardi vinske kiseline te najčešćih polifenola u grožđu epikatehina, katehina, procijanidina B1, B2, B3, B4 i C1.



Slika 11. Usporedba udjela [mg/g s.tv. komine] vinske kiseline u hidrofobnim fazama nakon provedbe ekstrakcije s različitim volumnim udjelima hidrofobnog DES-a u dvofaznog sustava.

Određivanjem ukupnih polifenola u ekstraktima komine grožđa pomoću Folin-Ciocalteu reagensa dobiveni su rezultati izraženi kao mg polifenola po g su tvari biomase.

Tablica 6. Polifenolni sastav (mg g s.tv.⁻¹)* u polarnim fazama pripremljenih ekstrakta.

Spoj	B:Glu/Me:Eu	B:Glu/Me:Eu	B:Glu/Me:Lau	B:Glu/Me:Lau
	(1:1)	(1:2)	(1:1)	(1:2)
Procianidin B2	0,02	0,02	n.d.	0,01
Procianidin B3	0,30	n.d.	0,21	0,26
Procianidin B4	0,03	0,02	0,05	n.d.
Procianidin C1	n.d.	0,01	n.d.	n.d.
Ukupni polifenoli	32,74	48,22	58,09	38,59

*s. tv.: suha tvar

Na temelju rezultata iz slike 11 možemo zaključiti da se vinska kiselina ekstrahirala u hidrofobnim fazama DES-a, osim u slučaju hidrofobne faze Me:Eu kod omjera hidrofilne i hidrofobne faze 1:2. Vinska kiselina u ovom slučaju nije detektirana ni u hidrofilnim faza, najvjerojatnije zbog nedostatka u odabranoj metodi prilikom korištenja HPLC-a zbog čega je potrebno provesti dodatne analize kako bi se detektirala prisutnost vinske kiseline u hidrofilnoj fazi, odnosno unaprijediti korištenu HPLC metodu. Najmanja koncentracija je također uočena kod hidrofobne faze Me:Eu kod omjera hidrofilne i hidrofobne faze 1:1, dok je najveća koncentracija vinske kiseline utvrđena kod hidrofobne faze ekstrakta sustava Me:Lau u omjeru hidrofobne i hidrofilne faze 1:2. Iz prikazanih rezultata i standardne devijacije nemoguće je zaključiti ima li povećanje omjera faza utjecaj na uspješnost ekstrakcije, ali su sustavi DES-ova hidrofobnih faza Me:Lau bolji za ekstrakciju vinske kiseline, u oba omjera hidrofilne i hidrofobne faze, nego Me:Eu.

U tablici 6 prikazane su skupine detektiranih polifenola u uzorcima od kojih je utvrđena prisutnost samo skupine procijanidina u hidrofilnim fazama B:Glc, dok vinska kiselina u njima nije detektirana. Rezultati kod kojih je pojedina skupina polifenola detektirana, odnosno nije detektirana, su u skladu s radom Palos-Hernández i sur., 2022 koji navodi kako polifenolni sastav ovisi o puno faktora, primjerice vinovoj lozi, veličini bobica, načinu obrade zemlje, godišnjem dobu i okolišu.

Najviše polifenola detektirano je u hidrofilnoj fazi sustava s Me:Lau u omjeru hidrofobne i hidrofilne faze 1:1. Nešto manje je detektirano u hidrofilnoj fazi sustava s Me:Eu u omjeru hidrofobne i hidrofilne faze 1:2 i hidrofilnoj fazi sustava s Me:Lau u omjeru hidrofobne i hidrofilne faze 1:2. dok je najmanje polifenola uočeno u hidrofilnoj fazi sustava s Me:Eu u omjeru hidrofobne i hidrofilne faze 1:1. Pa možemo zaključiti kako je sustav u kojem je prisutna laurinska kiselina proveo bolju izolaciju polifenola nego sustav s eukaliptolom ako se radi o omjerima hidrofilne i hidrofobne faze 1:1, dok je u slučaju omjera 1:2 istih, sustav s eukaliptolom proveo bolju ekstrakciju. U radu Tang i Row, 2020 sugeriraju da je su hidrofobni DES-ovi na bazi mentola dobri u ulozi hidrofobne faze dvofaznog sustava čiji je polaritet pogodan za ekstrakciju i odvajanje spojeva niskih polarnosti, što je potvrđeno u ovom eksperimentu.

Na kraju možemo zaključiti da su sve DES kombinacije pokazale selektivnost, što ukazuje na to da su bioaktivni spojevi promjenjivog polariteta ekstrahirani selektivno te su razdvojeni na temelju svojih polarnosti kao što je predloženo u radu Viera i sur., 2022. Također se ekstrakcija u dvofaznom DES sustavu pokazala kao potencijalno dobar način izdvajanja spojeva različitih polarnosti u jednom koraku, ali je metodu potrebno optimizirati u ovom slučaju.

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivanje topljivosti ciljnih molekula, vinske kiseline i polifenola katehina, pomoću računalnog programa COSMOtherm se pokazalo kao pouzdana metoda jer su dobiveni logaritmi koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$, bili u skladu sa rezultatima provedenih ekstrakcija.
2. Niskotemperaturna eutektička otapala pokazala su kao dobar izbor otapala prilikom ekstrakcije lignina i polifenola iz piljevine bukve i peteljke grožđa. Pri čemu je učinkovitija ekstrakcija navedenih spojeva bila kod peteljke. Eutektička otapala imaju potencijal zamijeniti uobičajeno korištena otapala, a kao najuspješnije otapalo se pokazao ChCl:LA s najviše ekstrahiranog lignina i polifenola.
3. Uspješno je provedena ekstrakcija i separacija, do određenog stupnja, vinske kiseline i polifenola u dvofaznom sustavu eutektičkih otapala te je daljnjim postupcima potrebno prilagoditi metodu kako bi se postigla potpuna separacija ciljanih spojeva u jednom koraku ekstrakcije.

6. LITERATURA

Alfonsi K, Colberg J, Dunn PJ, Fevig T, Jennings S, Johnson TA, i sur. (2008) Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem* **10**, 31–36. <https://doi.org/10.1039/B711717E>

Anastasiadi M, Pratsinis H, Kletsas D, Skaltsounis AL, Haroutounian SA (2012) Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT* **48**, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.006>

Banger A, Srivastava A, Yadav A, Sharma R, Srivastava M (2023) Application of Green Solvent in Green Chemistry: An overview. *Green Chem Lett Rev* **9**, 01–14. <https://doi.org/10.18510/gctl.2023.911>

Benvenuti L, Sanchez-Camargo A del P, Zielinski AAF, Ferreira SRS (2020a) NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from Myrciaria cauliflora fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. *J Mol Liq* **315**, 113761. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113761>

Brdarević, K. (2021). Procjena toksičnosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala za razvoj formulacije ciprofloksacina.

Chemat F, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Strube J, Uhlenbrock L, Gunjevic V, i sur. (2019) Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *Trends Anal Chem* **118**, 248–263. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>

Chen Y, Zhang L, Yu J, Lu Y, Jiang B, Fan Y, i sur. (2019) High-purity lignin isolated from poplar wood meal through dissolving treatment with deep eutectic solvents. *R Soc Open Sci* **6**. <https://doi.org/10.1098/rsos.181757>

Chen Z, Ragauskas A, Wan C (2020) Lignin extraction and upgrading using deep eutectic solvents. *Ind Crops Prod* **147**, 112241. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112241>

Chen Z, Wan C (2018) Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresour Technol* **250**, 532–537. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.066>

Craveiro R, Aroso I, Flammia V, Carvalho T, Viciosa MT, Dionísio M, i sur. (2016) Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **215**, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>

Dai Y, Rozema E, Verpoorte R, Choi YH (2016) Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability

replacing conventional organic solvents. *J Chromatogr A* **1434**, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>

Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>

Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem* **187**, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>

Daněk V (2006) *Physico-Chemical Analysis of Molten Electrolytes*, 1. izd., Elsevier B.V., Amsterdam, str. 107–219.

Fontana AR, Antonioli A, Bottini R (2013) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric Food Chem* **61**, 8987–9003. <https://doi.org/10.1021/jf402586f>

EPA (2023) Basics of Green Chemistry. EPA-United States Environmental Protection Agency, <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry#definition>. Pristupljeno 21. srpnja 2023.

Filippi K, Stylianou E, Pateraki C, Koutinas A, Ladakis D (2023) Pretreatment of Grape Pomaces and Stalks Using Deep Eutectic Solvents for Succinic Acid Production Integrated in a Biorefinery Concept. *Waste Biomass Valorization* **14**, 2857–2872. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02047-1>

Francisco M, Van Den Bruinhorst A, Kroon MC (2013) Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A New Generation of Designer Solvents. *Angew Chem Int Ed* **52**, 3074–3085. <https://doi.org/10.1002/anie.201207548>

Haghighi Mood S, Hossein Golfeshan A, Tabatabaei M, Salehi Jouzani G, Najafi GH, Gholami M, i sur. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sust Energ Rev* **27**, 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>

Hassan YI, Kosir V, Yin X, Ross K, Diarra MS (2019) Grape Pomace as a Promising Antimicrobial Alternative in Feed: A Critical Review. *J Agric Food Chem* **67**, 9705–9718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02861>

Hayyan M, Looi CY, Hayyan A, Wong WF, Hashim A (2015) *In Vitro* and *In Vivo* Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLOS ONE* **10**, 1179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117934>

Huang Y, Feng F, Jiang J, Qiao Y, Wu T, Voglmeir J, i sur. (2017) Green and efficient

extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem* **221**, 1400–1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>

Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY, i sur. (2017) Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J Clean Prod* **151**, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>

Kim KH, Dutta T, Sun J, Simmons B, Singh S (2018) Biomass pretreatment using deep eutectic solvents from lignin derived phenols. *Green Chem* **20**, 809–815. <https://doi.org/10.1039/C7GC03029K>

Klamt A (2018) The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mo. Sci* **8**, 1338. <https://doi.org/10.1002/wcms.1338>

Klamt A, Eckert F, Arlt W (2010) COSMO-RS: An Alternative to Simulation for Calculating Thermodynamic Properties of Liquid Mixtures. **1**, 101–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100903>

Liu L, Su B, Wei Q, Ren X (2021) Selective separation of lactic, malic, and tartaric acids based on the hydrophobic deep eutectic solvents of terpenes and amides. *Green Chem* **23**, 5866–5874. <https://doi.org/10.1039/D1GC01088C>

Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* **81**, 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>

Ma Q, Wang L, Zhai H, Ren H (2021) Lignin dissolution model in formic acid–acetic acid–water systems based on lignin chemical structure. *Int J Biol Macromol* **182**, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.179>

Ogihara W, Aoyama T, Ohno H (2004) Polarity measurement for ionic liquids containing dissociable protons. *Chem Lett* **33**, 1414–1415. <https://doi.org/10.1246/cl.2004.1414>

Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng* **2**, 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>

Palos-Hernández A, Gutiérrez Fernández MY, Escuadra Burrieza J, Pérez-Iglesias JL, González-Paramás AM (2022) Obtaining green extracts rich in phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. *Sustain Chem Pharm* **29**, 100773. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100773>

Pandey KB, Rizvi SI (2009) Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and

Disease. *Oxid Med Cell Longev* **2**, 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>

Panić M, Gunjević V, Cravotto G, Radojčić Redovniković I (2019) Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. *Food Chem* **300**, 125185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>

Panić M, Gunjević V, Radošević K, Bubalo MC, Ganić KK, Redovniković IR (2021) COSMOtherm as an Effective Tool for Selection of Deep Eutectic Solvents Based Ready-To-Use Extracts from Graševina Grape Pomace. *Molecules* **26**, 4722. <https://doi.org/10.3390/molecules26164722>

Panić M, Radić Stojković M, Kraljić K, Škevin D, Radojčić Redovniković I, Gaurina Srček V i sur. (2019) Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. *Food Chem* **283**, 628–636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.061>

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kem Ind* **70**, 551-562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>

Rente D, Cvjetko Bubalo M, Panić M, Paiva A, Caprin B, Radojčić Redovniković I, i sur. (2022) Review of deep eutectic systems from laboratory to industry, taking the application in the cosmetics industry as an example. *J Clean Prod* **380**, 135147. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135147>

Rodríguez-Llorente D, Bengoa A, Pascual-Muñoz G, Navarro P, Águeda VI, Delgado JA, i sur. (2019) Sustainable Recovery of Volatile Fatty Acids from Aqueous Solutions Using Terpenoids and Eutectic Solvents. *ACS Sustain Chem Eng* **7**, 16786–16794. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110507>

Salgado JM, Rodríguez N, Cortés S, Domínguez JM (2010) Improving downstream processes to recover tartaric acid, tartrate and nutrients from vinasses and formulation of inexpensive fermentative broths for xylitol production. *J Sci Food Agric* **90**, 2168–2177. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4065>

Savi LK, Dias MCGC, Carpine D, Waszczynskyj N, Ribani RH, Haminiuk CWI (2019) Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. *Int J Food Sci Technol* **54**, 898–907. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14013>

Schutyser W, Renders T, Van Den Bosch S, Koelewijn SF, Beckham GT, Sels BF (2018) Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chem Soc Rev* **47**, 852–908. <https://doi.org/10.1039/C7CS00566K>

Sheldon RA (2017) The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem* **19**, 18–43. <https://doi.org/10.1039/C6GC02157C>

Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev* **114**, 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

Tang W, Row KH (2020) Design and evaluation of polarity controlled and recyclable deep eutectic solvent based biphasic system for the polarity driven extraction and separation of compounds. *J Clean Prod* **268**, 122306. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122306>

Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, i sur. (2014) Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *Int J Mol Sci* **15**, 15638–15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>

Thuy Pham TP, Cho CW, Yun YS (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res* **44**, 352–372. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.030>

Viñas-Ospino A, Panić M, Radojčić- Redovniković I, Blesa J, Esteve MJ (2023) Using novel hydrophobic deep eutectic solvents to improve a sustainable carotenoid extraction from orange peels. *Food Biosci* **53**, 102570. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102570>

Wang H, Pu Y, Ragauskas A, Yang B (2019) From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. *Bioresour Technol* **271**, 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.072>

Yang Z (2019) Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Adv. Biochem Engin/Biotechnol* **168**, 31–59. https://doi.org/10.1007/10_2018_67

Yang Z, Wen Q (2015) Deep Eutectic Solvents as a New Reaction Medium for Biotransformations. *Ionic Liquid-Based Surfactant Science: Formulation, Characterization, and Applications* 517–531. <https://doi.org/10.1002/9781118854501.ch25>

Zhang Z, Song J, Han B (2017) Catalytic Transformation of Lignocellulose into Chemicals and Fuel Products in Ionic Liquids. *Chem Rev* **117**, 6834–6880. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00457>

Zhao BY, Xu P, Yang FX, Wu H, Zong MH, Lou WY (2015) Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain Chem Eng* **3**, 2746–2755. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619>

Zhao X, Li S, Wu R, Liu D (2017) Organosolv fractionating pre-treatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification: chemistry, kinetics, and substrate structures. *Biofuels Bioprod Biorefin* **11**, 567–590. <https://doi.org/10.1002/bbb.1768>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja ANAMARIJA VRABEC izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Anamarija Vrabc

Vlastoručni potpis