

Biorafinerijski pristup u obradi kore naranče

Čupić, Ivona

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:116887>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivona Čupić

7372/BT

BIORAFINERIJSKI PRISTUP U OBRADI KORE NARANČE

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

Biorafinerijski pristup u obradi kore naranče

Ivona Čupić, 0058210044

Sažetak: Primjena biorafinerijskog pristupa u iskorištavanju biomase, kao obnovljivog izvora energije, predstavlja potencijalno rješenje za smanjenje potrebe za fosilnim gorivima te ublažavanje klimatskih promjena. Kako bi se koncept biorafinerije u potpunosti temeljio na ekološki prihvatljivim načelima, prilikom valorizacije biomase, poželjno je korištenje zelenih otapala kao što su eutektička otapala. U ovom radu je ispitana mogućnost primjene eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) u biorafineriji otpadne narančine kore. Ispitano eutektičko otapalo se pokazalo kao dobra zamjena za zakiseljeni etanol pri ekstrakciji polifenola iz kore naranče, dok je pokazalo vrlo slab ekstrakcijski učinak pri ekstrakciji proteina. Također je ispitana aktivnost enzima pektin-esteraze ekstrahiranog iz otpadne narančine kore, pri čemu je pektin-esteraza pokazala značajno veću aktivnost u eutektičkom otapalu u odnosu na pufer. Osim toga, otapalo kolin-klorid:etilen-glikol se pokazalo boljim otapalom za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz narančine kore u odnosu na pufer.

Ključne riječi: biorafinerijski pristup, eutektičko otapalo, kora naranče, pektin-esteraza, polifenoli, (*R,S*)-1-feniletil acetat

Rad sadrži: 35 stranica, 14 slika, 1 tablica, 48 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: Dr. sc. Martina Andlar

Datum obrane: 9. srpnja 2019.

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

Biorefinery approach in the processing of orange peel

Ivona Čupić, 0058210044

Abstract: Application of biorefinery approach in the utilization of biomass, as a renewable energy source, represents the potential solution for reducing the need for fossil fuels and mitigating the climate change. In order to make the biorefinery concept fully based on environmentally acceptable principles, during biomass valorization, green solvents such as deep eutectic solvents (DESs) are desirable. In this paper, the possibility of using choline chloride:ethylene glycol with 30%, 50% and 80% of water (w/w) in the biorefinery of waste orange peel has been investigated. Investigated DES was found to be a good substitute for acidified ethanol in extraction of polyphenols from orange peel, while it showed low protein extraction efficiency. The activity of pectin-esterase, which was extracted from waste orange peel, was also examined and it was observed that pectin-esterase exhibit significantly higher activity in DES in comparison to buffer. In addition, choline chloride:ethylene glycol was shown to be a better solvent for the enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate using hydrolytic enzymes from orange peel in comparison to buffer.

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

Thesis contains: 35 pages, 14 figures, 1 table, 48 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: PhD Martina Andlar

Defence date: July 9th 2019

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Koncept biorafinerije.....	2
2.1.1. Sirovine korištene u biorafinerijama	2
2.1.2. Klasifikacija biorafinerija	3
2.1.3. Tehnički izazovi biorafinerija	5
2.1.4. Primjena biorafinerijskog pristupa na otpadnoj kori naranče iz prehrambene industrije.....	7
2.2. Eutektička otapala.....	9
2.2.1. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji.....	11
2.2.2. Primjena eutektičkih otapala u biokatalizi.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Biljni materijal.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Oprema i uređaji	13
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Sinteza eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol (ChClEG)	14
3.2.2. Priprava ekstrakata kore naranče.....	15
3.2.3. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom	15
3.2.4. Određivanje proteina metodom po Bradfordu	16
3.2.5. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče.....	17
3.2.6. Hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom	21

4.2. Određivanje proteina metodom po Bradfordu.....	23
4.3. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče	24
4.4. Hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore.....	25
5. ZAKLJUČCI.....	30
6. LITERATURA.....	31

1. UVOD

Povećanje svjetske populacije, uz promjenu načina života te visoki životni standard, dovelo je do povećanja svjetske potrošnje energije. Trenutno je sirova nafta osnovna sirovina za proizvodnju goriva i kemikalija, ali zalihe nafte se vrlo brzo smanjuju što stavlja pritisak na automobilsku i avionsku industriju. Osim toga, postoje jasni znanstveni dokazi da emisije stakleničkih plinova koje proizlaze iz izgaranja fosilnih goriva i prenamjene zemljišta uzrokuju klimatske promjene na Zemlji. Uzimajući u obzir navedene probleme, postoji značajan interes za pronalaskom jeftinih, obnovljivih izvora energije koji će zamijeniti fosilna goriva, ali također smanjiti emisiju stakleničkih plinova (Suhag i Sharma, 2015).

Među svim obnovljivim izvorima energije, biomasa je najveći, najraznolikiji i najlakše dostupan resurs koji nudi mogućnost proizvodnje širokog raspona novih polimera i bioproizvoda (Cherubini, 2010). Biorafinerija je postrojenje koje ujedinjuje procese prerade biomase te opremu za proizvodnju kemikalija s dodanom vrijednošću, goriva, topline te energije iz različitih izvora biomase (Demirbas, 2010).

Na svjetskoj razini se svake godine proizvede oko 140 bilijuna tona biomase u poljoprivrednom sektoru, a velik dio se smatra otpadom (Zuin i Ramin, 2018). Narančina kora jest izvrstan primjer poljoprivrednog otpada koji u velikoj količini zaostaje nakon proizvodnje sokova, a može poslužiti kao sirovina u biorafinerijama budući da je bogata polimerima (celuloza, hemiceluloza i pektin), enzimima (npr. pektin-esteraza), flavanoidima, eteričnim uljima (većinom limonen) te pigmentima. Kako bi se koncept biorafinerije potpuno temeljio na ekološki prihvatljivim načelima, prilikom iskorištavanja potencijala biomase potrebno je primjenjivati tehnologije koje proizvode što manje dodatnog otpada i zahtijevaju manji utrošak energije te osigurati primjenu ekološki neškodljivih kemikalija i otapala (Morais i Bogel-Lukasik, 2013).

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol s 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) u valorizaciji otpadne narančine kore. U tu svrhu, ispitana je mogućnost izdvajanja polifenolnih spojeva te proteina iz narančine kore primjenom eutektičkog otapala, 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. Koncept biorafinerije

Sve brojnija ljudska populacija te posljedično rastuća potražnja za hranom, energijom i vodom, kao i klimatske promjene, predstavljaju ozbiljne probleme s kojima se čovječanstvo suočava. Navedeni izazovi dovode do razvoja novih tehnologija koje će pomoći u savladavanju jaza između gospodarskog rasta te ekološke održivosti. Svjetski gospodarski forum (eng. World Economic Forum) 2008. i 2009. godine je identificirao primjenu biorafinerija kao jedno od potencijalnih rješenja koje će ublažiti prijetnju klimatskih promjena te zadovoljiti potrebe čovječanstva za energijom, gorivima, materijalima i kemikalijama. Biorafinerija je slična rafineriji nafte, osim što biorafinerija koristi biomasu umjesto nafte za proizvodnju transportnih goriva, topline, energije, kemikalija i materijala. Biomasa predstavlja obnovljiv izvor energije te je CO₂ neutralna (World Economic Forum, 2010).

Biorafinerija ne predstavlja potpuno novi koncept. Industrije škroba, šećera, pulpe i papira koje koriste tradicionalne procese konverzije se smatraju prvom fazom biorafinerija. Međutim, globalno zatopljenje, potreba za sigurnošću opskrbe energijom i hranom te poljoprivredna politika usmjeravaju ove industrije da se razvijaju u biorafinerije koje će održivo proizvoditi širok spektar kemikalija, materijala te bioenergije (Diep i sur., 2012). Ideja koncepta biorafinerije jest daljnji razvoj postojećih biorafinerija baziranih na proizvodnji hrane kao što su postrojenja za preradu šećera, biljnih ulja, škroba i žitarica, ili razvoj potpuno novih sustava koji bi se bazirali na frakcioniranju biomase cijelih usjeva u odgovarajuće primarne sirovine, a one bi se dalje prerađivale u održive bioproizvode (van Ree i Annevelink, 2007).

2.1.1. Sirovine korištene u biorafinerijama

Pojam sirovine se odnosi na sirovi materijal koji se koristi u biorafinerijama. Biomasa se sintetizira fotosintetskim procesima tijekom kojih se atmosferski ugljikov dioksid te voda pretvaraju u šećere. Biljke koriste šećere kako bi sintetizirale složene spojeve koji se općenito nazivaju biomasom. Obnovljive sirovine za biorafinerije se mogu osigurati iz četiri različita sektora, a to su poljoprivreda (namjenski usjevi i ostaci), šumarstvo, industrija (ostaci) i kućanstva (čvrsti otpad i otpadne vode) te akvakultura (alge i morske trave) (Cherubini, 2010).

Biorafinerije koje se baziraju na šećernim usjevima najčešće koriste šećernu repu ili šećernu trsku kao sirovine koje su bogate saharozom. Saharoza se može lako ekstrahirati iz biljnog materijala te se zatim procesom fermentacije prevodi do etanola ili drugih

biokemikalija. Usjevi bogati škrobom kao što su kukuruz te pšenica podvrgavaju se enzimskoj hidrolizi kako bi se škrob razgradio do fermentabilnih šećera koji se prevode u gorivo i kemikalije. Međutim, cijena korištenja sirovina bogatih šećerom i sirovina bogatih škrobom je visoka. Posljedično je došlo do porasta u istraživanju prerade lignocelulozne biomase fokusirajući se na poljoprivredne ostatke te ostatke iz šumarstva koji su lako dostupni, jeftini te ne konkuriraju prehrambenoj industriji. Lignocelulozna biomasa je najzastupljenija u biosferi te ima glavnu ulogu u zamjeni fosilnih goriva kao sirovina za održivu proizvodnju tekućih goriva i kemikalija kroz pristupe biorafinerije. Biomasa algi predstavlja također obećavajuću alternativnu sirovinu u biorafinerijama zbog puno veće fotosintetske učinkovitosti, produktivnosti te sadržaja ulja. Dodatnu prednost predstavlja to što biomasa algi ne konkurira prehrambenim usjevima, obradivu tlu i pitkoj vodi (Suhag i Sharma, 2015). Mikroalge rastu većom brzinom te zahtijevaju manje vode u odnosu na kopnene usjeve (Balat, 2011.), dok njihov fototrofni rast ima pozitivan učinak na okoliš budući da mikroalge recikliraju CO₂ koji se sagorijevanjem ispusti u okoliš tijekom fotosintetskih procesa (100 tona biomase zahtijeva 180 tona CO₂) (Chisti, 2007). Biomasa mikroalgi se može koristiti kao potencijalna sirovina za proizvodnju biodizela, bioetanolu te drugih visokovrijednih proizvoda. Nakon ekstrakcije ulja i pigmenata, ostatak biomase se može koristiti kao supstrat za proizvodnju vodika (Suhag i Sharma, 2015).

2.1.2. Klasifikacija biorafinerija

Potpuno jasan klasifikacijski sustav biorafinerija još uvijek ne postoji. Postoji nekoliko klasifikacijskih sustava koje su razvile različite organizacije (Diep i sur., 2012).

Klasifikacijski sustav korišten u Izvješću o statusu biorafinerije iz 2007. godine (eng. Status Report Biorefinery 2007) dijeli biorafinerije na konvencionalne biorafinerije, zelene biorafinerije, biorafinerije cijelih usjeva, biorafinerije lignocelulozne sirovine, biorafinerije zasnovane na konceptu dvije platforme, termokemijske biorafinerije te morske biorafinerije (van Ree i Annevelink, 2007).

1. Konvencionalne biorafinerije su zapravo već spomenute postojeće industrije kao što su industrija škroba i prehrambena industrija. Ove industrije pokušavaju dodati vrijednost svojim otpadnim proizvodima opskrbljujući njima druge industrijske sektore kao što je industrija stočne hrane. Međutim, i dalje je naglasak na glavnim proizvodima te se još uvijek ne ulažu veliki naponi u proizvodnju biokemikalija i biogoriva.
2. Zelene biorafinerije se baziraju na tlačenju biomase prirodno bogate vodom kao što su zelena trava te djetelina. Koncept ove biorafinerije se razlikuje od ostalih jer se

svježa biomasa procesira što znači da je nužno brzo procesiranje biomase ili je potrebno koristiti metode konzerviranja (npr. silaža) kako bi se spriječila razgradnja biomase.

3. Biorafinerije cijelih usjeva se zasnivaju na suhom ili vlažnom mljevenju biomase. Sirovine koje se koriste jesu žitarice poput pšenice, kukuruza i raži. Prvi korak jest mehaničko razdvajanje u dvije frakcije koje se dalje prerađuju. Ukoliko je riječ o kukuružu, prvu frakciju će činiti zrna kukuruza, a drugu stabljika, lišće te klip kukuruza.
4. Biorafinerije lignocelulozne sirovine se zasnivaju na frakcioniranju biomase bogate lignocelulozom u međuproizvode poput celuloze, hemiceluloze i lignina, koji se dalje prerađuju u različite proizvode.
5. Biorafinerije zasnovane na konceptu dvije platforme se temelje na frakcioniranju biomase u šećernu frakciju te frakciju lignina. Šećerna frakcija se biokemijski pretvara u potencijalne bioproizvode poput kemikalija, biogoriva i materijalnih proizvoda, dok se frakcija lignina termokemijski prevodi u sintetički plin za proizvodnju proizvoda na bazi bioplina, uključujući energiju i/ili toplinu.
6. Termokemijska biorafinerija se zasniva na nekoliko tehnologija kao što su torefakcija, piroliza te uplinjavanje biomase.
7. Morska biorafinerija se zasniva na primjeni mikroalgi i makroalgi kao izvora biomase. Ovisno o vrsti algi te uvjetima uzgoja, morska biomasa može akumulirati značajne količine bioloških proizvoda (ugljikohidrati, škrob, vitamini).

Navedeni kriterij klasifikacije biorafinerija nije homogen. Neki sustavi se odnose na vrstu sirovine (npr. biorafinerija lignocelulozne sirovine, morska biorafinerija), dok se drugi sustavi baziraju na primijenjenim tehnologijama (npr. termokemijska, konvencionalna te biorafinerija zasnovana na konceptu dvije platforme). U ovakvom načinu klasifikacije nedostaje mogućnost primjene tehnoloških procesa na različite izvore sirovina. Primjerice, biorafinerije u kojima se drvo uplinjava do sintetičkog plina mogu se okarakterizirati kao biorafinerije lignoceluloze biomase te kao biorafinerije zasnovane na konceptu dvije platforme. Zatim, biorafinerije koje koriste zrna žitarice i/ili ostale dijelove žitarica (kao u konvencionalnoj proizvodnji bioetnola iz kukuruza) mogu se nejasno klasificirati kao biorafinerije cijelih usjeva. Također nije uzeta u obzir mogućnost kombiniranja različitih biorafinerija povezivanjem različitih tehnologija (Cherubini i sur., 2009).

Prema sustavu klasifikacije preporučenom od Internacionalne agencije za energiju (eng. International Energy Agency, IEA), svakom biorafinerijskom sustavu se pristupa

neovisno o drugim sustavima, te se svaki sustav identificira, klasificira i opisuje prema individualnim karakteristikama koje uključuju platforme, proizvode, sirovine i procese (Cherubini i sur., 2009; Diep i sur., 2012).

Platforme (npr. jednostavni šećeri (pentoze i heksoze), sintetički plin, bioplina) predstavljaju intermedijere koji povezuju sirovine s konačnim proizvodom. Broj uključenih platformi je pokazatelj složenosti biorafinerijskog sustava. Proizvodi biorafinerije su podijeljeni na energetske proizvode i materijalne proizvode. U energetske proizvode spadaju transportna goriva kao što su bioetanol, biodizel, sintetička biogoriva, biometan te struja i toplina, a materijalni proizvodi uključuju fine kemikalije poput aminokiselina i organskih kiselina koje se koriste u prehrambenoj, kemijskoj i petrokemijskoj industriji, krmiva, polimere, biomaterijale. Sirovine se mogu podijeliti na namjenske usjeve iz poljoprivrede, šumarstva ili vodenih sustava (npr. škrobni usjevi te morska biomasa) te na ostatke biomase koji dolaze iz poljoprivrede, šumarstva i industrije (npr. lignocelulozni ostaci, organski ostaci) (Diep i sur., 2012). Što se tiče procesa koji se koriste u biorafinerijama, razlikuju se četiri vrste procesa. Mehanički/fizikalni procesi (npr. predtretman, mljevenje, destilacija) ne mijenjaju kemijsku strukturu komponenata biomase, ali djeluju na smanjenje čestica biomase ili uzrokuju razdvajanje komponenata biomase. Biokemijski procesi se odvijaju pri blagim uvjetima uz pomoć mikroorganizama ili enzima, a uključuju aerobnu i anaerobnu fermentaciju, enzimsku konverziju te anaerobnu razgradnju. Tijekom kemijskih procesa dolazi do kemijske promjene u supstratu (npr. hidroliza, transesterifikacija, oksidacija), dok se tijekom termokemijskih procesa sirovina izlaže ekstremnim uvjetima (visoka temperatura i/ili tlak), a one uključuju pirolizu, sagorijevanje, uplinjavanje. Primjer ovakvog načina klasifikacije jesu biorafinerije zasnovane na platformi C6 šećera za dobivanje bioetanola i stočne hrane iz škrobnih usjeva te biorafinerije zasnovane na platformi sintetičkog plina za dobivanje sintetičkih goriva i kemikalija iz lignoceluloznih ostataka (Cherubini i sur., 2009).

2.1.3. Tehnički izazovi biorafinerija

Postoje mnogi tehnički izazovi koje biorafinerije trebaju savladati u budućnosti, a uključuju povećanje prinosa sirovine, napredak tehnologija za iskorištenje lignina, poboljšanje enzima i mikrobnih stanica, napredak procesa prerade sirovine te logistiku (Diep i sur., 2012).

Prinos sirovine i sastav biomase. Ključno je poboljšati prinos sirovine te sastav biomase radi postizanja optimalne učinkovitosti konverzije, a to se može postići primjenom metoda genetičkog inženjerstva (Diep i sur., 2012). Važna je i sigurnost opskrbe sirovinom. Različiti

vremenski uvjeti uzrokuju varijacije u količini, kvaliteti i cijeni sirovine zbog čega je potrebno osigurati veći globalni sektor biomase te rezervne zalihe biomase (Bauen i sur., 2012).

Unaprjeđenje tehnologija za iskorištenje lignina. Lignin je važan sastavni dio lignocelulozne biomase te čini 10 – 35 % težine biomase. To je aromatski heteropolimer koji povezuje celulozna vlakna u čvrstu izvanstaničnu strukturu te štiti biljku od okolišnih uvjeta. Povijesno gledano, lignin se iskorištavao sagorijevanjem pri čemu se oslobađa energija potrebna za rad postrojenja. Međutim, razvoj konkurentnog biorafinerijskog sustava zahtijeva povećanje iskoristivosti lignina zbog čega je potrebno razviti procese za razdvajanje lignina od drugih dijelova biomase te procese depolimerizacije lignina na monomerne podjedinice koje će se zatim prevesti u visokovrijedne proizvode kao što su ugljična vlakna, adhezivi, fenolne smole (Davis i sur., 2016).

Povećanje učinkovitosti enzima. Najveću primjenu u biorafinerijskim sustavima imaju amilaze, celulaze, ksilanaze te lignin peroksidaze. Obećavajući potencijal u biorafinerijama imaju i lipaze, proteaze te pektinaze (Escamilla-Alvarado i sur., 2016). Veliki tehnički izazov jest potreba za razvojem učinkovitijih enzima te enzima otpornijih na ekstremne uvjete, pogotovo za preradu lignoceluloznih sirovina. Najveća prepreka učinkovitosti enzimske razgradnje lignocelulozne sirovine jest evolucija biljaka tako da stanična stijenka bude što otpornija na razgradnju pomoću mikroorganizama i njihovih enzima. Kako bi se poboljšala izvedivost biokonverzije lignoceluloze, enzimi moraju imati visoku katalitičku učinkovitost, otpornost na visoke temperature te ne smiju biti podložni inhibiciji produktom zbog čega postaju značajni pristupi poput enzimskog inženjerstva, rekonstitucije sastava enzimskih koktela te potražnje za superiornijim enzimima (Mohanram i sur., 2013).

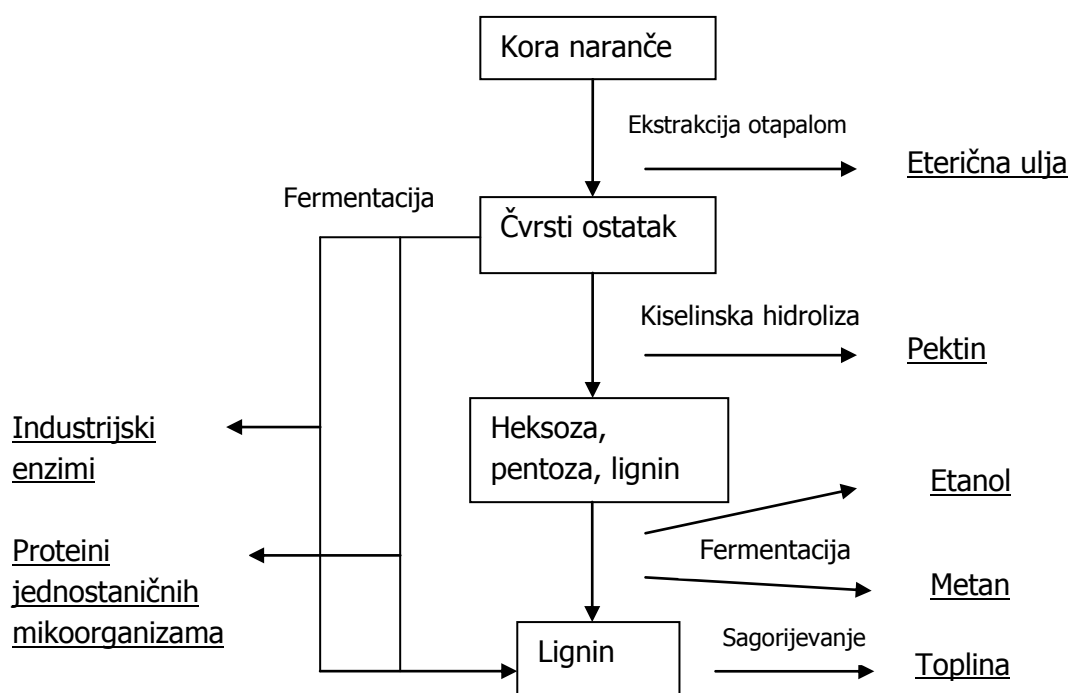
Poboljšanje karakteristika mikroorganizama. Za povećanje prinosa potrebni su mikroorganizmi koji će imati visoku produktivnost te će osigurati visok prinos željenog produkta (Diep i sur., 2012).

Optimizacija procesa prerade sirovine te logistika. Tehnički izazovi se također odnose na optimizaciju procesa prerade sirovina te logistiku što uključuje osiguravanje niske cijene transporta sirovine, razvoj tehnika očuvanja sirovine radi kontrole kemijskih i fizičkih promjena biomase tijekom procesa prije obrade sirovine (npr. transport, skladištenje) te uspostavljanje distribucijske mreže proizvoda koja može koristiti već postojeći infrastrukturu (npr. postojeće naftovode) (Diep i sur., 2012).

2.1.4. Primjena biorafinerijskog pristupa na otpadnoj kori naranče iz prehrambene industrije

Proizvodnja naranči ima veliku ulogu u gospodarstvu brojnih država poput Brazila, Sjedinjenih Američkih Država, Meksika te mediteranskih država. Otprilike 50-60 % mase obrađenih agruma predstavlja otpad kojeg čine kora, sjemenke te ostaci membrana koji zaostaju nakon ekstrakcije soka (Wilkins i sur., 2007). Navedeni otpadni produkti su se najčešće zbrinjavali odlaganjem na zemljištu u blizini mjesta proizvodnje što je u nekim područjima ugrozilo lokalne vodotokove te uzrokovalo nekontroliranu proizvodnju metana. Problem zbrinjavanja otpada naranče te drugih agruma doveo je do značajnog interesa u pronalasku odgovornijih načina postupanja s takvim otpadom (Àngel Siles López i sur., 2010).

Kora naranče sadrži ugljikohidratne polimere (celulozu, hemicelulozu, pektin), slobodne šećere (glukozu, fruktozu i saharozu), masti, organske kiseline, enzime (pektinaze, fosfataze i peroksidaze), flavanoide, eterična ulja te pigmente (Satari i Karimi, 2018). Primjena kore naranče bez razdvajanja sastavnih komponenata predstavlja najjednostavniji način iskorištavanja kore naranče. Takav pristup podrazumijeva korištenje kore naranče kao dodatka krmivima pri čemu se otpad suši te oblikuje u pelete, nakon čega se peleti koriste kao hrana za životinje (Wilkins i sur., 2007) ili kompostiranje kore naranče, nakon čega se koristi kao organsko gnojivo (van Heerden i sur., 2002). Međutim, kora naranče sadrži mnoge visokovrijedne spojeve te se zbog toga nastoji povećati vrijednost ovog poljoprivrednog otpada primjenom biorafinerijskog pristupa (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz biorafinerije narančine kore (Àngel Siles López i sur., 2010).

U visokovrijedne spojeve narančine kore koji imaju najveću ekonomsku vrijednost ubrajaju se eterična ulja te pektin (Àngel Siles López i sur., 2010).

Eterična ulja su smjese aromatskih i hlapljivih spojeva, a ekstrahiraju se iz biljaka. Pri sobnoj temperaturi su uglavnom u tekućem stanju te lako kristaliziraju. Eterična ulja su važna za zaštitu biljaka budući da pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv patogena koji se prenose hranom. Sadrže preko stotinu različitih spojeva, a najveći udio čine terpeni. 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). Glavna komponenta eteričnih ulja u kori naranče je limonen. Limonen je monociklički terpen koji se sastoji od dvije izoprenske jedinice, a sintetizira se u biljci kao sekundarni metabolit. Razlikuju se D-limonen i L-limonen, pri čemu samo D-limonen ima ugodan miris naranče. D-limonen ima veliku primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Također se koristi kao zeleno otapalo pri ekstrakciji (Ciriminna i sur., 2014). Ekstrakcija limonena iz kore naranče je relativno jednostavna te se provodi hladnim prešanjem, destilacijom ili ekstrakcijom pomoću otapala, najčešće heksanom ili ugljičnim dioksidom (Hull i sur., 1953).

Otpadna kora naranče je vrlo važan izvor pektina budući da u svom sastavu u sadrži 42,50 % pektina (Rivas i sur., 2008). Pektini su heteropolisaharidi sastavljeni od tristo do tisuću saharidnih jedinica galakturonske kiseline i ramnoze s bočnim ograncima građenim od β -D-galaktoze ili L-arabinoze. Nalaze se u primarnoj staničnoj stijenci te središnjoj lameli stanične stijenke biljaka (Ciriminna i sur., 2015). Pektini imaju primjenu u prehrambenoj industriji kao gelirajući agensi (proizvodnja džemova, želea i sličnih proizvoda) te se koriste pri proizvodnji slatkiša, punjenja, kao stabilizatori u voćnim sokovima i mliječnim napicima. Kako bi se ekstrahirao pektin, kora naranče se suši i zatim se podvrgava kiseloj hidrolizi. Hidrolizat se odvaja, koncentrira te se potom provodi ekstrakcija etanolom. Gel koji se formira nakon 24 sata pri niskoj temperaturi odvaja se filtracijom i suši na 70 °C. Pektin se također može ekstrahirati iz otpadne kore naranče pomoću poligalakturonaze koju proizvodi *Kluveromyces fragilis* (Àngel Siles López i sur., 2010).

Osim eteričnih ulja i pektina, vrlo značajni spojevi u otpadnoj kori naranče su flavanoidi. To su fenolni spojevi koji su prisutni u visokim koncentracijama u kori agruma, a pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje zbog antioksidacijskog učinka. Flavanoni su najveća grupa flavanoida koja je prisutna u agrumima. Količina flavanoida u kori naranče se razlikuje ovisno o mjestu uzgoja biljke. Flavanoidi se najčešće ekstrahiraju pomoću etanola i/ili mješavine etanola i metanola (Satari i Karimi, 2018).

Narančina kora sadrži također značajne količine celuloze, hemiceluloze i lignina koji se mogu iskoristiti za proizvodnju visokovrijednih proizvoda kao što su etanol, metan te industrijski enzimi pomoću mikroorganizama. Budući da je kora naranče bogata organskim kiselinama te eteričnim uljima koji se smatraju antimikrobnim agensima, potrebno je odrediti najvišu koncentraciju D-limonena koja neće inhibirati proizvodnju etanola te neutralizirati pH radi ostvarenja najveće produktivnosti. Otpadna kora naranče se može koristiti i kao supstrat za proizvodnju metana, glavne komponente prirodnog plina, u anaerobnim uvjetima pomoću metanogenih bakterija. Primjer industrijski važnih enzima koji se mogu dobiti pomoću otpadne kore naranče jesu pektinaze. Visok sadržaj pektina u kori naranče može inducirati sintezu pektinaza u mikroorganizmima koji rastu na otpadnoj kori naranče (Àngel Siles López i sur., 2010). Ovi enzimi imaju širok raspon primjene u proizvodnji sokova gdje služe u poboljšavanju ekstrakcije i bistroće sokova (Kashyap i sur., 2001).

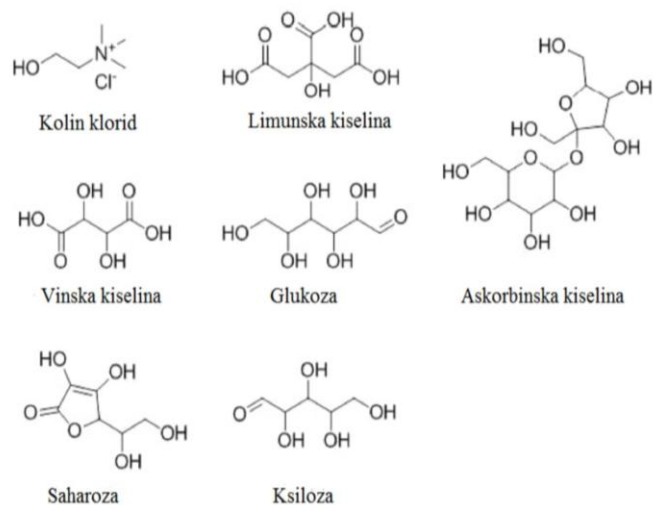
Otpadna narančina kora ima također i brojne druge primjene koje su slabije istražene, ali imaju velik potencijal. Potencijalnu primjenu ima u apsorpciji iona teških metala te tekstilnih boja u otpadnim vodama, za proizvodnju sukcininske kiseline koja služi za proizvodnju poliamida i poliestera te kao dodatak papirnoj pulpi što dovodi do smanjenja konačne cijene papira (Àngel Siles López i sur., 2010).

2.2. Eutektička otapala

Zelena tehnologija je u potrazi za novim otapalima koja će zamijeniti uobičajena organska otapala koja se toksična i hlapljiva. U zadnja dva desetljeća veliku pozornost znanstvenika su privukle ionske kapljevine (eng. Ionic Liquids, ILs) zbog njihove nehlapljivosti pomoću kojih bi se smanjila emisija hlapljivih organskih spojeva u atmosferu (Rogers i Seddon, 2003). Ionske kapljevine su organske soli sa temperaturom tališta nižom od 100 °C (Huddleston i sur., 1998). Velik potencijal ovih otapala proizlazi iz njihovih fizikalno-kemijskih svojstava koja se mogu mijenjati kombinacijom različitih kationa i aniona. Međutim, nedostatak ionskih kapljevina je njihova slaba biorazgradivost, biokompatibilnost te održivost (Paiva i sur., 2014).

Alternativa ionskim kapljevina je eutektička otapala (eng. Deep Eutectic Solvents, DES). To su smjese dviju ili više komponenata koje se međusobno mogu povezati vodikovim vezama tvoreći eutektičku smjesu koja ima niže talište, nego pojedinačne komponente smjese (Zhang i sur., 2012). Kada su komponente koje izgrađuju eutektičko otapalo primarni metaboliti kao što su organske kiseline, aminokiseline i šećeri (slika 2), takva se otapala nazivaju prirodnim eutektičkim otapalima (eng. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES)

(Paiva i sur., 2014). Eutektička otapala imaju velik potencijal kao zelena tehnologija u biorafinerijskom konceptu za separaciju pojedinih dijelova biomase.



Slika 2. Kemijske strukture različitih spojeva koji mogu formirati prirodna eutektička otapala (Paiva i sur., 2014).

U većini slučajeva, eutektička otapala se dobivaju miješanjem kvaterne amonijeve soli s metalnim solima ili donorom vodikove veze koji ima sposobnost stvaranja kompleksa s halogenim anionom kvaterne amonijeve soli (Zhang i sur., 2012). Kolin-klorid se vrlo često koristi kao organska sol za proizvodnju eutektičkih otapala koja ulazi u interakciju s jeftinim i lako dostupnim donorima vodika (urea, glicerol, polioli iz ugljikohidrata ili karboksilne kiseline dobivene iz različitih izvora) zbog niske cijene, biorazgradivosti i niske toksičnosti (Zhao i sur., 2013). Novonastale vodikove veze u ovim otapalima uzrokuju mjestimičnu delokalizaciju naboja što uzrokuje snižavanje tališta smjese u odnosu na talište pojedinačnih komponenti. Sinteza eutektičkih otapala ima stopostotnu atomsku iskoristivost, jednostavna je te nije potrebno pročišćavanje čime je prijenos u veće mjerilo lako izvediv (Zhang i sur., 2012). Eutektička otapala se mogu pripremiti na više načina: iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do unaprijed određene vrijednosti temperature (Paiva i sur., 2014).

Glavna prednost eutektičkih otapala u odnosu na ionske kapljevine jest činjenica da se eutektička otapala mogu sintetizirati od prirodnih primarnih metabolita što upućuje na to da eutektička otapala imaju značajno manju toksičnost od ionskih kapljevine (Paiva i sur., 2014). Toksičnost eutektičkih otapala ovisi o sastavu, viskoznosti te koncentraciji otapala

(Hayyan i sur., 2013). Toksičnost pojedinih eutektičkih otapala prema bakterijama ukazuje na potencijalnu primjenu ovih otapala kao antibakterijskih agensa (Paiva i sur., 2014).

2.2.1. Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji

Učinkovitost otapala koja se koriste u procesu ekstrakcije ovisi o njihovoj sposobnosti otapanja različitih komponenti. Eutektička otapala imaju sposobnost primanja i otpuštanja protona i elektrona zbog čega mogu uspostavljati vodikove veze, a time se poboljšava njihova sposobnost otapanja.

Eutektička otapala povećavaju topljivost slabo topljivih molekula kao što su benzojeva kiselina, griseofulvin, danazol te itrakonazol. Zapažena je od 5 do 20 000 puta bolja topljivost ovih spojeva u eutektičkom otapalu sastavljenom od kolin-klorida i uree, nego u vodi što potvrđuje primjenjivost eutektičkih otapala u ekstrakciji bioaktivnih molekula (Paiva i sur., 2014).

Dai i sur. (2013) su proučavali ekstrakciju polifenolnih spojeva iz šafranike koristeći različita prirodna eutektička otapala sastavljena od mliječne kiseline i glukoze, glukoze i kolin-klorida te fruktoze, glukoze i saharoze. Zapažena je velika sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva što je povezano s vodikovim vezama koje se ostvaruju između fenolnih spojeva i molekula eutektičkog otapala. Fizikalne karakteristike prirodnih eutektičkih otapala, kao što su polarnost i viskoznost, također značajno utječu na učinkovitost ekstrakcije. Optimiziranjem svih parametara (viskoznost, polarnost i temperatura) zabilježena je veća učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom prirodnih eutektičkih otapala u odnosu na konvencionalna otapala kao što su etanol i voda.

Eutektička otapala također pronalaze primjenu u pročišćavanju biodizela. Koriste se za uklanjanje lipida iz biomase, ekstrakciju slobodnih masnih kiselina i nezasićenih masnih kiselina, ekstrakciju glicerola nakon provedene reakcije transesterifikacije te ekstrakciju preostalog katalizatora iz sirovog biodizela. Shahbaz i sur. (2010) su istraživali primjenu 2 različita eutektička otapala u ekstrakciji glicerola koji se stvara kao sporedni produkt u reakciji transesterifikacije. Eutektička otapala su pripremljena pomoću kolin-klorida i etilen-glikola ili 2,2,2-trifluoroacetamida u različitim molarnim omjerima. Zapažena je potpuna ekstrakcija slobodnog glicerola pomoću sintetiziranih eutektičkih otapala.

2.2.2. Primjena eutektičkih otapala u biokatalizi

Na biokatalizu utječu karakteristike eutektičkog otapala. Vrlo je bitan odabir donora i akceptora vodikove veze. Primjerice, eutektičko otapalo pripremljeno od kolin-klorida i glicerola se obično koristi kao dobro otapalo za enzimске reakcije, dok eutektičko otapalo sastavljeno od kolin-klorida i malične kiseline ne daje zadovoljavajuće rezultate (Durand i sur., 2012). Donori vodikove veze utječu na viskoznost eutektičkog otapala, a to utječe na prijenos mase svih reaktanata te mijenja brzinu reakcije (Zhang i sur., 2012).

Zabilježen je i utjecaj eutektičkih otapala na strukturu i aktivnost biokatalizatora što posljedično povećava ili smanjuje efikasnost biokatalize. Eutektičko otapalo može promijeniti sekundarnu strukturu enzima povećavajući ili smanjujući udio α -zavojnice u sekundarnoj strukturi. Primjer je peroksidaza iz hrena, gdje je veći udio donora vodikove veze u eutektičkom otapalu povećao udio α -uzvojnice. Veći udio α -uzvojnice, a manji udio β -nabrane ploče je povećao aktivnost i stabilnost peroksidaze. Osim na sekundarnu strukturu, eutektička otapala mogu utjecati i na 3D strukturu enzima u vodenom okruženju (Xu i sur., 2017).

Mnogi enzimi su aktivni u eutektičkim otapalima iako eutektička otapala mogu biti sastavljena od denaturirajućih spojeva kao što su urea i limunska kiselina (Paiva i sur., 2014). Primjer ovakvih enzima jesu lipaze. Lipaza B iz *Candida antartica* pokazuje visoku aktivnost i stabilnost u eutektičkim otapalima koja sadrže kolin-klorid (Durand i sur., 2013). Lipaze imaju veliku primjenu u farmaceutskoj industriji zbog visoke enantioselektivnosti, regioselektivnosti i kemoselektivnosti. Međutim, velik problem predstavlja dobivanje čistog produkta, a potencijalno rješenje bi bila primjena dvofaznog separacijskog sustava sastavljenog od prirodnog eutektičkog otapala i superkritičnog CO₂ pri čemu bi se reakcija odvijala u fazi eutektičkog otapala, a produkt bi se ekstrahirao u fazu superkritičnog CO₂. Superkritični CO₂ ima visoku topljivost u prirodnim eutektičkim otapalima, a prirodna eutektička otapala su gotovo netopljiva u superkritičnom CO₂ zbog niskog tlaka pare što otvara nove mogućnosti za jeftine i ekološki prihvatljive biokatalitičke procese u dvofaznim sustavima (Paiva i sur., 2014).

Prirodna eutektička otapala bazirana na glicerolu predstavljaju alternativu za biokataliziranu proizvodnju biodizela. Merza i sur. (2018) su proučavali učinkovitost eutektičkog otapala sastavljenog od kolin-klorida i glicerola u omjeru 1:2. Prinos biodizela je povećan sa 6.3% u reakcijskoj smjesi bez eutektičkog otapala na 30.3 % u prisutnosti eutektičkog otapala. Primjenom eutektičkog otapala sastavljenog od kolin-klorida, glicerola i 1 % vode prinos je povećan na 40 %.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

Narančina kora (naranče kupljene na lokalnoj tržnici).

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, pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF (KH_2PO_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-feniletanol-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 μ L, 100 μ 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. Sinteza eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol (ChCIEG)

Pripremljeno je eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w). U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se kolin-klorid i etilen-glikol u molarnom omjeru 1:2. Zatim se u tikvicu doda određen volumen vode kako bi se dobilo eutektičko otapalo s 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w). Mase potrebnih sirovina su prikazane u tablici 1. Sinteza otapala je provedena na magnetskoj mješalici zagrijavanjem na 50 °C tijekom 2 sata, nakon čega je dobivena homogena, prozirna i bezbojna tekućina.

Tablica 1. Mase sirovina potrebnih za pripremu eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol

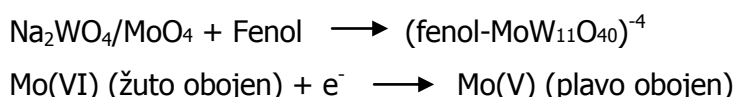
Eutektičko otapalo	Kratice eutektičkog otapala	Udio vode [% w/w]	m (kolin-klorid) [g]	m (etilen-glikol) [g]	m (voda) [g]
Kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 % vode	ChCIEG30%	30	7	6,22	5,67
Kolin-klorid:etilen-glikol sa 50 % vode	ChCIEG50%	50	7	6,22	13,22
Kolin-klorid:etilen-glikol sa 80 % vode	ChCIEG80%	80	7	6,22	52,90

3.2.2. Priprava ekstrakata kore naranče

Ekstrakcija je provedena pomoću eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol s 30 %, 50 % i 80 % vode, kalij-fosfatnog pufera (pH=7) odnosno zakiseljenog etanola (75 % EtOH, 0,1 % HCl) u tarioniku s tučkom. Naranče se operu pomoću detergenta, površinski steriliziraju etanolom i potom isperu demineraliziranom vodom. Zatim se naranče ogule nožićem te se kora naranče isjecka na kockice. Na analitičkoj vagi se odvaži 2,5 g isjeckane kore naranče te se prenese u tarionik s tučkom zajedno sa 10 mL pripremljenih eutektičkih otapala, pufera odnosno zakiseljenog etanola. Homogenizacija se vrši tijekom dvije minute pomoću tučka. Zatim se homogenizati naranče centrifugiraju 15 min na 5000 rpm. Budući da centrifugiranjem nisu potpuno odvojeni čvrsti dijelovi kore naranče, provodi se filtracija pomoću običnog lijevka za filtraciju i filter papira. Pripremljeni ekstrakti kore naranče su korišteni u daljnjim postupcima određivanja 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 reducira 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 eutektičkom otapalu ChCIEG 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 Na_2CO_3 (75 g/L). Zatim slijedi termostatiranje otopine u vodenoj kupelji na 50 °C tijekom 5 minuta. Reakcija se zaustavlja hlađenjem u hladnjaku. ApSORBANCija pri $\lambda=760$ nm se mjeri na UV/VIS spektrofotometru (Singleton i sur., 1999).

Izrada baždarnog dijagrama

Kao standard za izradu baždarnog dijagrama koristi se otopina galne kiseline koncentracije 500 mg L⁻¹. Iz ishodne otopine galne kiseline prirede se razrijeđenja koncentracija 10, 20, 30, 40 i 50 mg L⁻¹. 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 eutektičkom otapalu ChClEG 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.

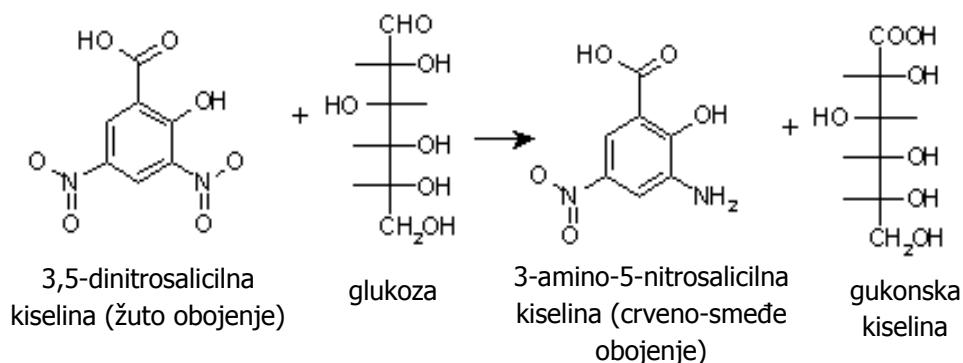
Izrada baždarnog dijagrama

Kao standard za izradu baždarnog dijagrama koristi se albumin iz goveđeg seruma (BSA). 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⁻¹. U kivete se otpipetira 40 µL otopine goveđeg albumina te se doda 1200 µL Bradford reagensa. Nakon 15 minuta 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 jednađbe pravca izraĉunaju se koncentracije ukupnih proteina u uzorcima ekstrakata naranĉine kore.

3.2.5. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima kore naranĉe

Aktivnost pektin-esteraze je određivana spektrofotometrijski 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 3). Kao rezultat kemijske reakcije, DNSA reagens mijenja boju s prvotne svijetlo žute u krajnju crveno-smeđu boju.



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

Priprema reagensa i otopina za analizu

Za pripravu 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 naranĉine kore u eutektičkim otapalima 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 sadrāvavaju 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 10000 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 $^{\circ}\text{C}$. 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 apsorbancija pri $\lambda=575$ nm.

Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama korištena je otopina galakturonske kiseline koncentracije 1 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 mg mL^{-1} . Pomoću računala se konstruira baždarni dijagram tako da se izmjerene apsorbancije pri $\lambda=575$ nm nanesu na ordinatu koordinantnog sustava, a koncentracije otopina galakturonske kiseline se nanesu na apscisu.

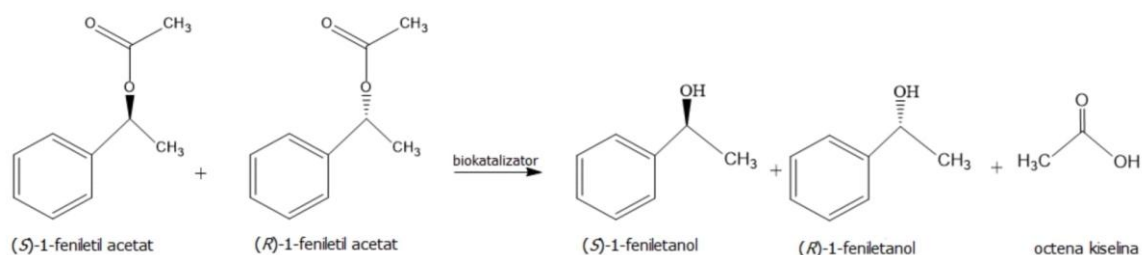
Prikaz rezultata

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

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

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

Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata (slika 4) je provedena pomoću hidrolitičkih enzima iz otpadne kore naranče u eutektičkom otapalu ChClEG s 30 %, 50 % i 80 % vode te u puferu kao referentnom otapalu. 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. Reakcija se započne dodavanjem 15 μL supstrata (*R,S*)-1-feniletil acetata te se provodi na tresilici pri sobnoj temperaturi. Uzorkovanje se vrši nakon 48, 96 i 168 sati od trenutka započinjanja reakcije. Uzorak za analizu se pripremi tako da se reakcijskoj smjesi doda 1 mL demineralizirane vode te se vorteksira. Zatim se doda 8 mL heptana te se provede ekstrakcija preostalog supstrata te nastalih produkata snažnim miješanjem tijekom 3 minute. Iz heptanskog dijela se izuzme 100 μL ekstrakta te se analizira plinskom kromatografijom.



Slika 4. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata.

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u puferu te u eutektičkom otapalu 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⁻¹) računa se prema jednadžbi 2:

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

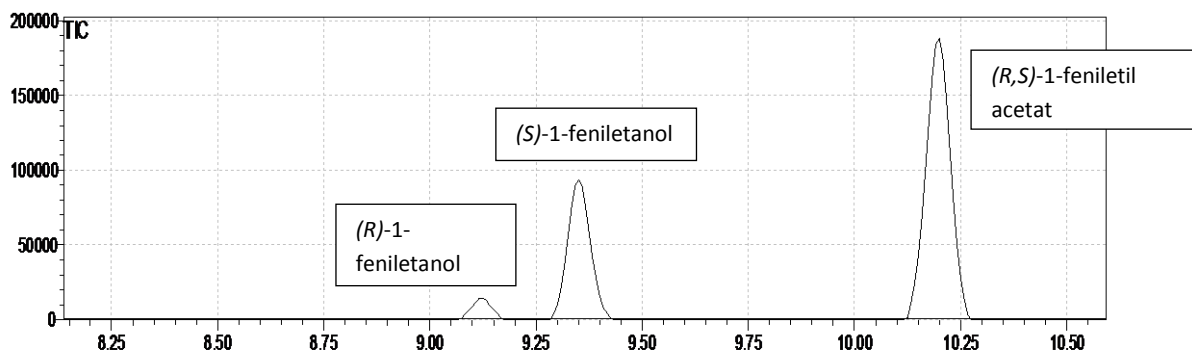
gdje c_{s1} predstavlja početnu koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil acetata (mol L⁻¹), a c_{s2} koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil acetata izmjerenu na kraju reakcije (mol L⁻¹).

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⁻¹
- Detektor: spektrometar masa
- Temperatura - kolona: gradijentno (T₁=80 °C, T₂=120 °C (Δt=15 °C min⁻¹), T₃=125 °C (Δt=2 °C min⁻¹), T₄=140 °C (Δt=1 °C min⁻¹))
- Temperatura injektora 200 °C
- Detektor: temperatura ionskog izvora 200 °C, temperatura sučelja 200 °C
- Vrijeme trajanja analize: 26,37 min

Na slici 5 prikazan je tipičan plinski kromatogram enzimski katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata. Retencijsko vrijeme (*R_t*) 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 5. Prikaz tipičnog plinskog kromatograma enzimski katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata.

Iskorištenje procesa hidrolize η (%) 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 (mol L^{-1}), a c_T teoretski moguću koncentraciju (*R,S*)-1-feniletanola (mol L^{-1}).

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

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

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 mol L^{-1} . Zatim se 100 μL 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

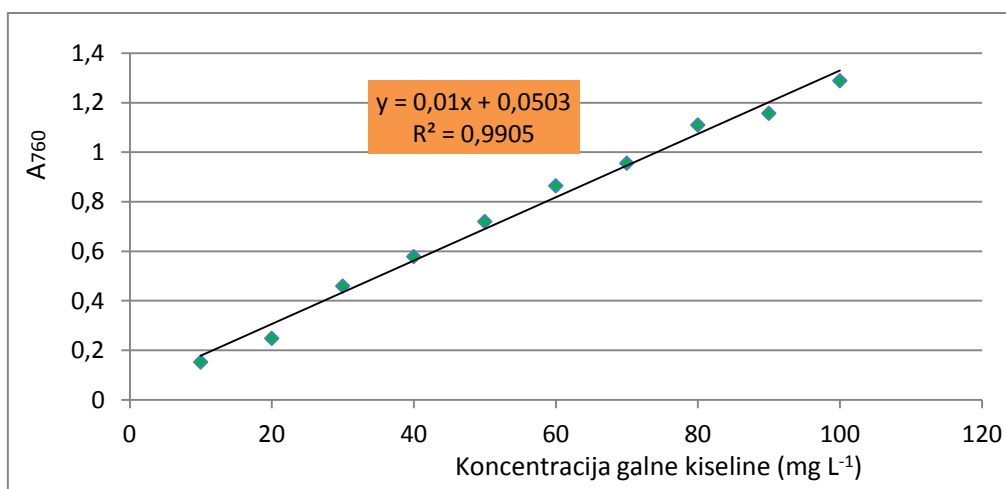
Godišnje se na svjetskoj razini proizvede oko 71 000 000 tona naranči. Nakon ekstrakcije soka, otprilike 50 % mase procesiranih naranči čini otpad koji predstavlja izvor brojnih spojeva koji se mogu prevesti u proizvode visoke vrijednosti primjenom biorafinerijskog pristupa (Àngel Siles López i sur., 2010). Posljednih godina značajno je porastao broj znanstvenih radova koji se bave istraživanjem primjene eutektičkih otapala u biorafineriji otpada iz prehrambene industrije zbog niske cijene i jednostavnosti pripreme, biorazgradivosti te niske toksičnosti ovih otapala.

Kako bi se koncept biorafinerije u potpunosti temeljio na ekološki prihvatljivim načelima, u ovom radu je ispitana primjena eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) u iskorištavanju potencijala otpadne narančine kore kao sirovine za dobivanje proizvoda sa dodanom vrijednošću. Valorizacija narančine kore je provedena ispitujuću mogućnost ekstrakcije proteina i polifenola iz otpadne narančine kore. Također je ispitana aktivnost pektin-esteraze te mogućnost enantioselektivne hidrolize racemičnog estera (*R,S*)-1-feniletil acetata pomoću hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore.

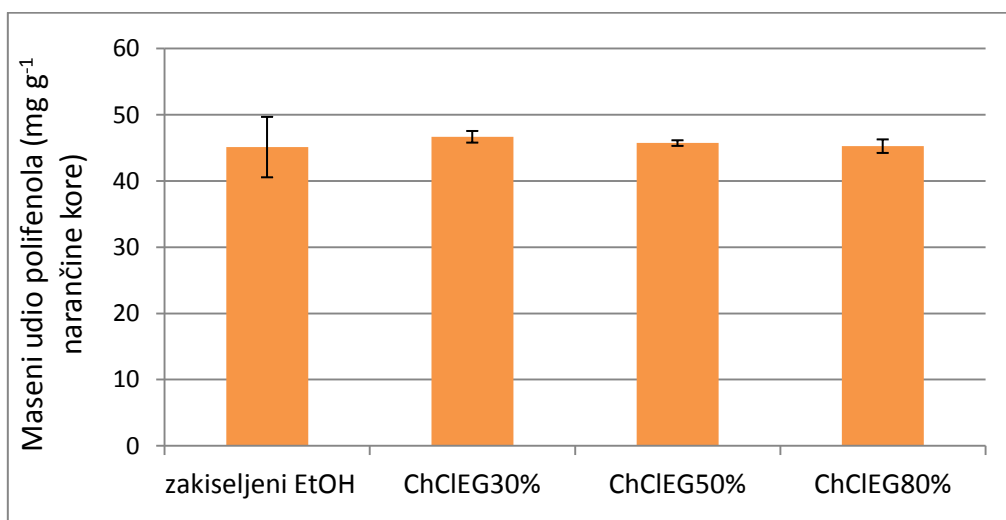
4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

U vrlo važne spojeve narančine kore ubrajaju se polifenoli, spojevi koji su prisutni u visokoj koncentraciji u narančinoj kori te imaju nutritivne prednosti zbog antioksidativnog djelovanja (Satari i Karimi, 2018).

Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima otpadne narančine kore pripremljenima s eutektičkim otapalom kolin-klorid:etilen-glikol je provedeno u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom. Rezultati mjerenja su izraženi kao mg galne kiseline po gramu narančine kore. Na slici 6 je prikazan baždarni dijagram koji predstavlja ovisnost apsorbancije o koncentraciji galne kiseline (mg L^{-1}), a rezultati mjerenja su prikazani na slici 7.



Slika 6. Baždarni dijagram galne kiseline.



Slika 7. Maseni udjeli polifenola u ekstraktima kore naranče *, **.

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

** zakiseljeni EtOH=ekstrakt pripremljen u etanolu zakiseljenom sa HCl (75%,v/v), ChCIEG30%=ekstrakt pripremljen u otapalu kolin-klorid:etilen-glikol s 30% vode, ChCIEG50%=ekstrakt pripremljen u otapalu kolin-klorid:etilen-glikol s 50% vode, ChCIEG80%= ekstrakt pripremljen u otapalu kolin-klorid:etilen-glikol s 80% vode

Ekstrakcija polifenolnih spojeva je provedena pomoću eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol s 3 različita udjela vode, a kao referentno otapalo korišten je etanol zakiseljen s klorovodičnom kiselinom. Iz rezultata prikazanih na slici 7 može se zaključiti da pripravljeno eutektičko otapalo ChCIEG sa 30 %, 50 % i 80 % vode pokazuje vrlo sličnu selektivnost referentnom otapalu ($45,13 \pm 4,56 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore) pri ekstrakciji polifenolnih spojeva iz narančine kore. Najveću selektivnost prema ekstrakciji polifenolnih spojeva je pokazalo eutektičko ChCIEG s 30 % vode ($46,69 \pm 0,88 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore). Iako sintetizirana otapala ChCIEG s 30 %, 50 % i 80 % vode nisu pokazala značajno veću selektivnost od referentnog otapala, eutektičko otapalo ChCIEG predstavlja bolji izbor otapala

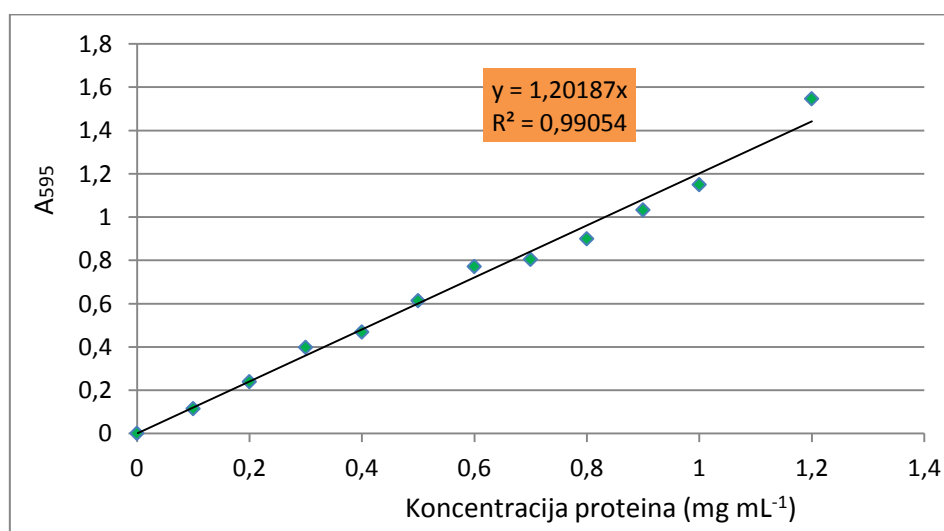
za ekstrakciju polifenolnih spojeva budući da su eutektička otapala biorazgradiva, stabilnija, nisu hlapljiva te su manje toksična prema okolišu i ljudima u usporedbi s hlapljivim organskim otapalima kao što je etanol.

Mnogi autori su također primijetili da eutektička otapala koja u svom sastavu sadrže polialkohol (npr. etilen-glikol) imaju veliku moć ekstrakcije polifenolnih spojeva iz različitih biljnih vrsta, a to se može objasniti vrlo niskom viskoznošću ovakvih eutektičkih otapala te visokom sposobnošću za vezanjem vodika. Zbog svoje polarnosti, etilen-glikol ostvaruje značajne polarne interakcije s polarnim spojevima kao što su polifenoli. Također je primijećeno da linearna struktura etilen-glikola omogućuje lakšu interakciju između ciljanih spojeva i kolin-klorida od onih postignutih s razgranatim polialkoholima (Alañón i sur., 2018).

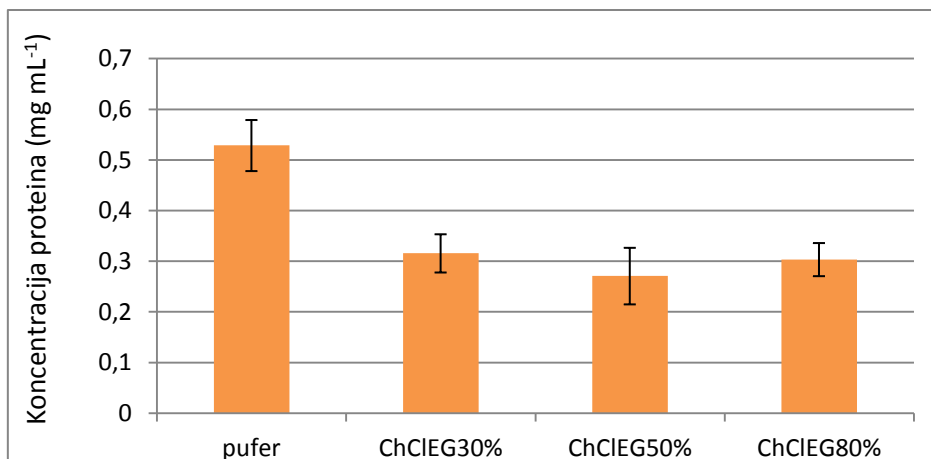
4.2. Određivanje proteina metodom po Bradfordu

Proteini predstavljaju materijalnu osnovu života te su prisutni u svim stanicama. Bitni su elementi prehrane za ljude i životinje, te su također važna sirovina u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Xiu i Shabazi, 2015).

Ukupna koncentracija proteina je određena metodom po Bradfordu na temelju reakcije proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju, nakon čega dolazi do promjene boje iz smeđe u plavu. Koncentracije proteina u ekstraktima narančine kore su izračunate pomoću baždarnog dijagrama prikazanog na slici 8, a rezultati mjerenja su prikazani na slici 9. Koncentracije proteina su izražene u mg proteina po mL ekstrakta narančine kore.



Slika 8. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.



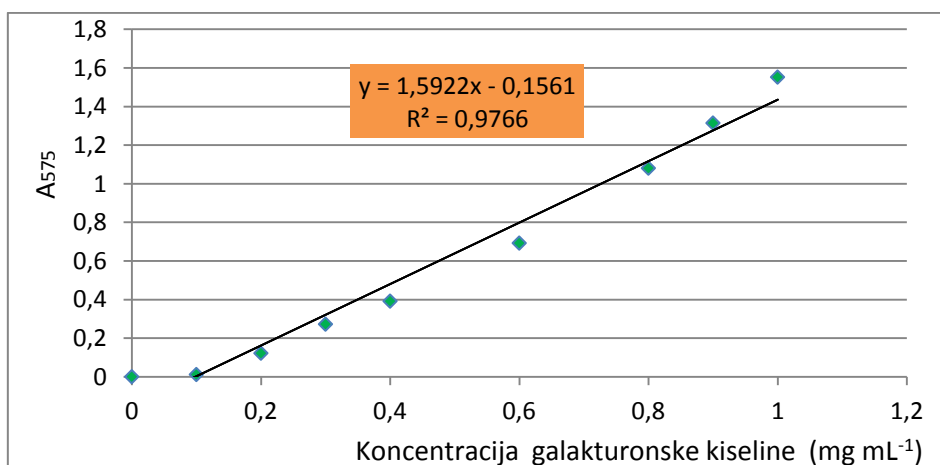
Slika 9. Koncentracija proteina u ekstraktima kore naranče*.

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

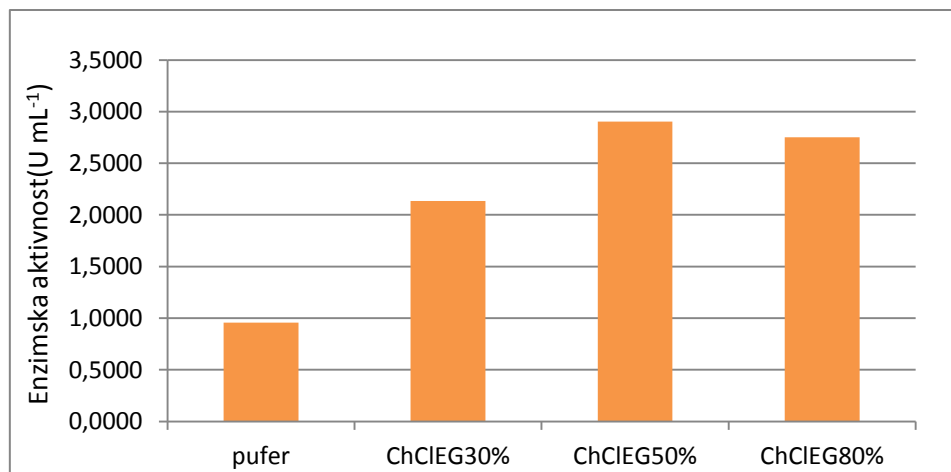
Na temelju prikazanih rezultata (slika 9) može se zaključiti da eutektičko otapalo ChCIEG pokazuje nisku selektivnost prema ekstrakciji proteina u odnosu na pufer. Najmanja koncentracija proteina je ekstrahirana pomoću ChCIEG sa 50 % vode ($0,27 \pm 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$), dok je koncentracija proteina ekstrahirana pomoću pufera gotovo dvostruko veća ($0,53 \pm 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$). Od ispitanih eutektičkih otapala najboljim se pokazalo ChCIEG s 30 % vode ($0,32 \pm 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$).

4.3. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče

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 10, dok su rezultati mjerenja su prikazani na slici 11.



slika 10. Baždarni dijagram galakturonske kiseline.



Slika 11. Aktivnost enzima pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče.

Iz rezultata prikazanih na slici 11 može se zaključiti da je aktivnost enzima pektin-esteraze značajno veća u eutektičkom otapalu ChCIEG sa sva 3 udjela vode, nego u puferu. Pektin-esteraza pokazuje najveću aktivnost u eutektičkom otapalu ChCIEG sa 50 % vode, u kojem je zapažena gotovo 3 puta veća aktivnost pektin-esteraze ($2,75 \text{ U mL}^{-1}$) u odnosu na aktivnost u puferu ($0,96 \text{ U mL}^{-1}$).

Mnogi autori su također uočili da esteraze (npr. lipaze i proteaze) imaju visoku aktivnost u eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida ili etilamonijevog klorida u kombinaciji s donatorom vodikove veze kao što su alkoholi (npr. etilen-glikol), kiseline ili amidi (Zhao i sur., 2011; Durand i sur., 2012). Autori su zaključili da enzimi zadržavaju aktivnost unatoč prisutnosti klorida i donora jakih vodikovih veza koji najčešće ne ometaju reakcije. Xu i sur. (2017) objašnjavaju veću aktivnost enzima u eutektičkom otapalu kao posljedicu utjecaja eutektičkog otapala na sekundarnu strukturu enzima.

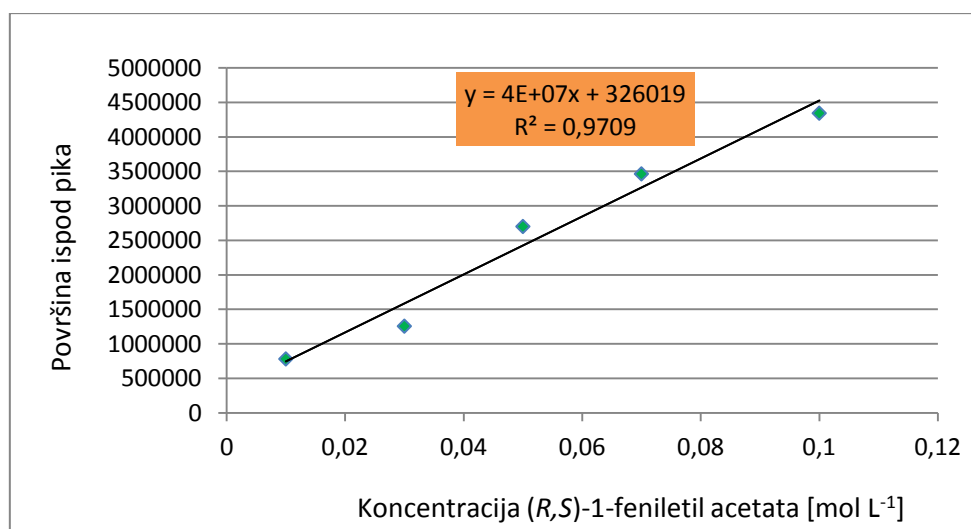
Xu i sur. (2017) također ističu da koncentracija eutektičkog otapala te udio vode u eutektičkom otapalu vrlo značajno utječu na efikasnost reakcije. Visok udio vode smanjuje viskoznost eutektičkog otapala te omogućuje kontakt molekule enzima i supstrata. Međutim, prevelik udio vode djeluje razarajuće na mrežu vodikovih veza eutektičkog otapala te smanjuje njegovu učinkovitost. U skladu s tim, od 3 ispitana udjela vode u eutektičkom otapalu ChCIEG, najboljim se pokazalo eutektičko otapalo ChCIEG sa 50 % vode.

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

Posebnu važnost u narančinoj kori imaju hidrolitički enzimi (npr. esteraze) zbog sposobnosti stereoselektivne hidrolize jednog enantiomernog oblika estera (*R*)- odnosno (*S*)-1-feniletil acetata u odgovarajući (*R*)- odnosno (*S*)-1-feniletanol. Enantiomerno čisti spojevi su potencijalni kiralni građevni blokovi za sintezu farmaceutski važnih molekula,

poljoprivrednih kemikalija te asimetričnih kiralnih liganada. Enantiomeri imaju različite strukturne karakteristike zbog čega imaju različitu biološku aktivnost (Vandenberghe i sur., 2013). Primjerice, (*R*)-1-feniletanol se koristi kao kiralni građevni blok i kao sintetski intermedijer 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). Važnu primjenu u proizvodnji kiralnih građevnih blokova imaju biotransformacije koje se definiraju kao kemijske reakcije katalizirane izoliranim enzimima, mikroorganizmima ili kulturama stanica. Međutim, ove tri tehnike imaju ograničenu primjenu, ili zbog cijene ili zbog komplicirane primjene ovih tehnika na industrijskoj razini zbog čega se počinje razmatrati primjena voća i povrća ili dijelova voća i povrća kao katalizatora reakcija, pri kojima nastaju enantiomerno čisti spojevi. Ova vrsta biokatalize je ekološki prihvatljiva budući da se odvija pri blagim uvjetima (sobna temperatura, neutralan pH), pri čemu su biokatalizatori netoksični i biorazgradivi (Vandenberghe i sur., 2013).

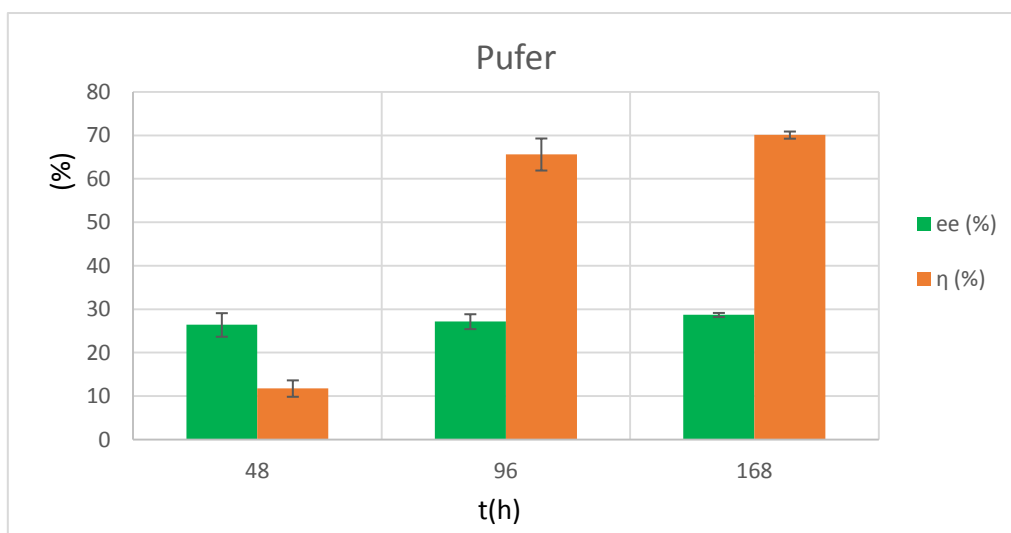
Reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u eutektičkom otapalu ChClEG sa 30 %, 50 % i 80 % vode i kalij-fosfatnom puferu praćena je ekstrakcijom zaostalog supstrata i nastalih produkata u *n*-heptan uz snažno miješanje. Heptanski ekstrakt analiziran je plinskom kromatografijom. Dobiveni baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata prikazan je na slici 12.



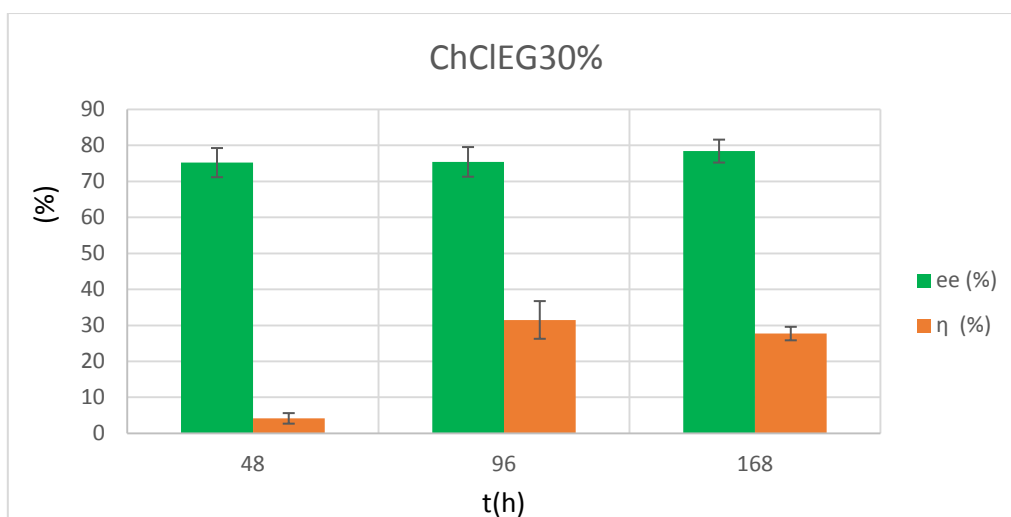
Slika 12. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R,S*)-1-feniletil acetata.

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u puferu te u eutektičkom otapalu s 30 %, 50 % i 80 % vode, izračunati su iskorištenje procesa hidrolize te enantiomerni višak. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 13 a – d.

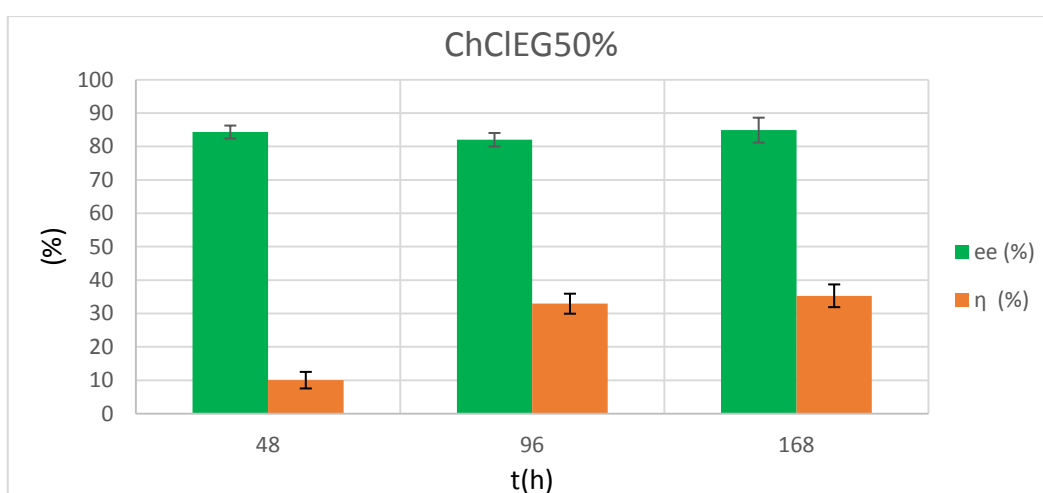
a)



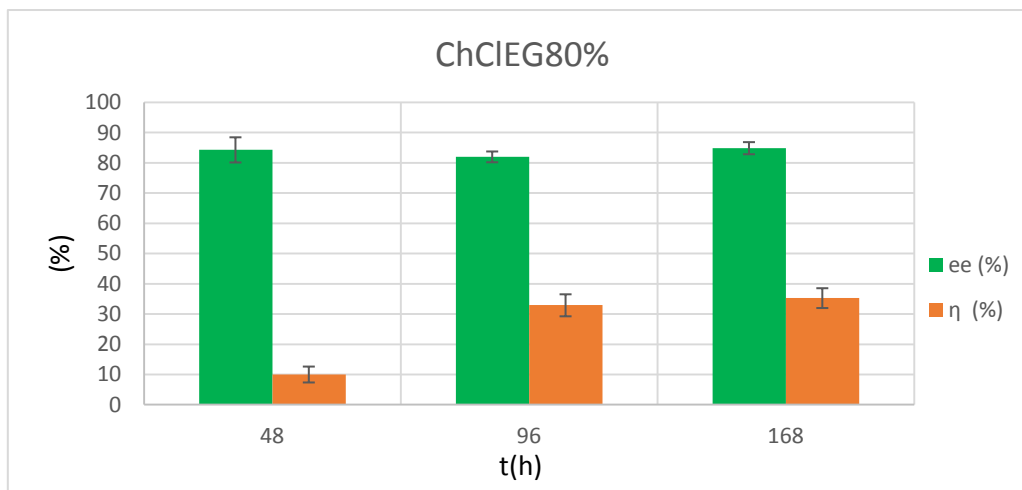
b)



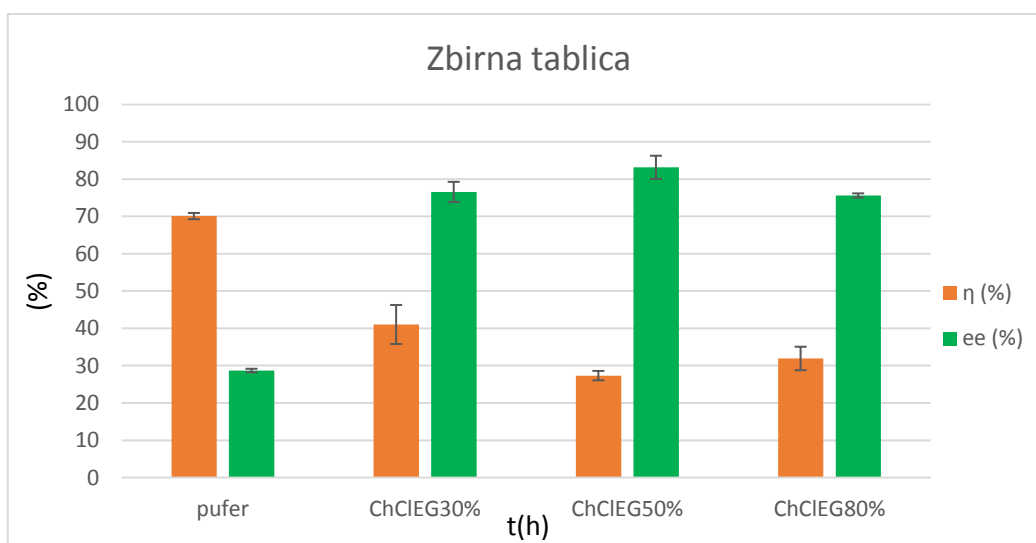
c)



d)



Slika 13. Enantiomerni višak te iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima otpadne narančine kore nakon 48, 96 i 168 sati u a) puferu, b) eutektičkom otapalu ChCIEG s 30% vode, c) eutektičkom otapalu ChCIEG s 50% vode i d) eutektičkom otapalu ChCIEG s 80% vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3).



Slika 14. Enantiomerni višak te iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima otpadne kore naranče u puferu te eutektičkom otapalu ChCIEG s 30, 50 i 80 % vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C; 168 sati. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3).

(*R,S*)-1-feniletil acetat je izabran kao supstrat zbog toga što je predstavnik brojnih visokovrijednih kemijskih struktura kao što su ibuprofen i naproksen.

U enzimski kataliziranoj kinetičkoj rezoluciji racemičnog supstrata jedan enantiomer brže stupa u reakciju. Kada je katalizator potpuno stereoselektivan, 50 % enantiomerno čistog supstrata će ostati neizreagirano na kraju reakcije. Niža enantioselektivnost

biokatalizatora će se odraziti na iskorištenju reakcije koje tada iznosi više od 50 % (Vandenberghe i sur., 2013).

Iskorištenje reakcije hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata provedene u puferu je iznosilo 70,08 %, dok je enantiomerni višak iznosio tek 28,69 % nakon 168 sati reakcije. Iskorištenje hidrolize veće od 50 % ukazuje na to da enzimi iz kore naranče, u puferu kao otapalu, provode hidrolizu i (*R*)- i (*S*)-1-feniletil acetata u pripadajuće alkohole. Enantiomerni višak za reakcije hidrolize provedene u eutektskom otapalu ChCIEG je značajno viši (>75 %), pri čemu iskorištenje hidrolize ne prelazi 50 %. Najboljim se pokazalo otapalo ChCIEG sa 50 % vode gdje je enantiomerni višak nakon 168 sati reakcije iznosio 84,89 %, dok je iskorištenje iznosilo 35,3 %.

Različita enantioselektivnost u puferu i eutektskom otapalu se može objasniti prisutnošću nekoliko hidrolitičkih enzima u narančinoj kori s različitom enantioselektivnošću koji pretvaraju ili (*R*) ili (*S*) ester, a koji su različito inhibirani u eutektskom otapalu ovisno o karakteristikama eutektskog otapala (Panić i sur., 2018). Maugeri i Domínguez de María (2014) su također uočili različitu enantioselektivnost enzima u ovisnosti o količini vode u eutektskom otapalu. Autori navode da je različita enantioselektivnost rezultat inhibicije pojedinih enzima, dok drugi ostaju aktivni.

Uspoređujući enantiomerni višak hidrolize u eutektskom otapalu ChCIEG i puferu (slika 14), vidljivo je da se otapalo ChCIEG pokazalo učinkovitijim za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata.

U zaključku, rezultati prikazani u ovom radu predstavljaju značajan doprinos u razvoju biorafinerijskih pristupa koji se zasnivaju na ekološki prihvatljivim načelima. Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu, može se zaključiti da zeleno otapalo kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) ima velik potencijal u biorafineriji otpadne narančine kore. Ispitano eutektsko otapalo se pokazalo kao pogodno otapalo za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz narančine kore te boljim otapalom za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz narančine kore u odnosu na pufer. Ispitano eutektsko otapalo je također pokazalo pozitivan utjecaj na aktivnost pektin-esteraze što ukazuje na potencijalnu primjenu ovog otapala u enzimski kataliziranim reakcijama. Prikazani rezultati predstavljaju izvorni znanstveni doprinos primjeni eutektskih otapala u preradi biomase, području koji je još uvijek u početnoj fazi, ali s naznakom vrlo obećavajućeg ekološki prihvatljivog pristupa biorafinerije otpada iz prehrambene industrije.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz narančine kore eutektičkim otapalom kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 %, 50 % i 80 % vode pokazala se gotovo jednako učinkovitom kao ekstrakcija etanolom, što ukazuje na potencijalnu zamjenu organskog otapala – zakiseljenog etanola, koje se uobičajeno koristi pri ekstrakciji polifenolnih spojeva, eutektičkim otapalom kolin-klorid:etilen-glikol.
2. Ekstrakcija proteina eutektičkim otapalom kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 %, 50 % i 80 % vode pokazala se značajno lošijom u odnosu na pufer što ne ukazuje na mogućnost primjene ispitivanog eutektičkog otapala pri ekstrakciji proteina iz narančine kore.
3. Enzim pektin-esteraza pokazuje značajno veću aktivnost u ispitivanom eutektičkom otapalu u odnosu na pufer. Također, promjenom udjela vode može se utjecati na aktivnost enzima pektin-esteraze, pri čemu se najboljim pokazalo otapalo kolin-klorid:etilen-glikol sa 50 % vode.
4. Eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen-glikol se pokazalo učinkovitijim u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil acetata u odnosu na pufer pri čemu enantiomerni višak za reakciju hidrolize koja je provedena u puferu iznosi 28,69 %, dok je za reakcije provedene u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol veći od 75%. Kao najbolje otapalo za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata pokazalo se eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen-glikol sa 50 % vode.
5. Eutektičko otapalo kolin klorid:etilen-glikol pokazalo se obećavajućim zelenim otapalom u biorafinerijskom pristupu u obradi kore naranče.

6. LITERATURA

Alañón M. E., Ivanović M., Gómez-Caravaca A. M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. (2018) Choline chloride derivative-based deep eutectic liquids as novel green alternative solvents for extraction of phenolic compounds from olive leaf. *Arab. J. Chem.* DOI: 10.1016/j.arabjc.2018.01.003 (rad u tisku).

Àngel Siles López J., Li Q., Thompson I.P. (2010) Biorefinery of waste orange peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**: 63 – 69.

Balat M. (2011) Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work. *Energy Convers. Manag.* **52**: 1479 – 1492.

Bauen A., Berndes G., Junginger M., Londo M., Vuille F. (2012) Bioenergy – a Sustainable and Reliable Energy Source.

<[https://www.researchgate.net/publication/48326680_Bioenergy - A Sustainable and Reliable Energy Source](https://www.researchgate.net/publication/48326680_Bioenergy_-_A_Sustainable_and_Reliable_Energy_Source)> Pristupljeno 15. travnja 2019.

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

Cherubini F., Jungmeier G., Wellisch M., Willke T., Skiadas I., Van Ree R., De Jong E. (2009) Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **3**: 534 – 546.

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

Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**: 294 – 306.

Ciriminna R., Lomeli-Rodriguez M., Demma Carà P., Lopez-Sanchez J. A., Pagliaro M. (2014) Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chem. Commun.* **50**: 15288 – 15296.

Ciriminna R., Chavarría-Hernández N., Rodríguez Hernández A. I., Pagliaro M. (2015) Pectin: a new perspective from the biorefinery standpoint. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* **9**: 368 –377.

Dai Y., Witkamp G. J., Verpoorte R., Choi Y. H. (2013) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* **85**: 6272 – 6278.

Davis K. M., Rover M., Brown R. C., Bai X., Wen Z., Jarboe L. R. (2016) Recovery and Utilization of Lignin Monomers as Part of the Biorefinery Approach. *Energies* **9**: 808.

Demirbas A. (2010) Biorefinery Technologies for Biomass Upgrading *Energ. Source. Part A* **32**: 1547 – 1558.

Diep N. Q., Sakanishi K., Nakagoshi N., Fujimoto S., Minowa T., Tran X. D. (2012) Biorefinery: Concepts, Current Status, and Development Trends. *Int. J. Biomass Renew.* **1**: 1 – 8.

Durand E., Lecomte J., Baréa B., Piombo G., Dubreucq E., Villeneuve P. (2012) Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem.* **47**: 2081 – 2089.

Durand E., Lecomte J., Villeneuve P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**: 379 – 385.

Escamilla-Alvarado C., Pérez-Pimienta J. A., Ponce-Noyola T., Poggi-Varaldo H. M. (2016) An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **92**: 906 – 924.

Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García, D. Pagán, R. (2011) Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* **22**: 896 – 902.

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 Microb. Technol.* **25**: 303 – 309.

Hayyan M., Hashim M. A., Al-Saadi M. A., Hayyan A., AlNashef I. M., Mirghani M. E. S. (2013) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**: 455 – 459.

Huddleston J. G, Willauer H. D., Swatloski R. P., Visser A. E., Rogers R. D. (1998) Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction. *Chem. Commun.* **16**: 1765 – 1766.

Hull W. Q., Lindsay C. W., Baier W. E. (1953) Chemicals from oranges. *Ind. Eng. Chem.* **45**: 876 – 890.

Kashyap D. R., Vohra P. K., Chopra S., Tewari R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* **77**: 215 – 227.

Maugeri Z., Domínguez de María P. (2014) Whole-Cell Biocatalysis in Deep-Eutectic-Solvents/Aqueous Mixtures. *ChemCatChem* **6**: 1535 – 1537.

Merza F., Fawzy A. , AlNashef I., Al-Zuhair S., Taher H. (2018) Effectiveness of using deep eutectic solvents as an alternative to conventional solvents in enzymatic biodiesel production from waste oils. *Energy Reports* **4**: 77 – 83.

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

Mohanram S., Amat D., Choudhary J., Arora A. and Nain L. (2013) Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. *Sustain. Chem. Process.* **1**: 15.

Morais A. R. C., Bogel-Lukasik R. (2013) Green chemistry and the biorefinery concept. *Sustain. Chem. Process.* **1**:18.

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 Chem. Eng.* **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 Biochem.* **66**: 133 – 139.
- Rivas B., Torrado A., Torre P., Converti A., Domínguez J.M. (2008) Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 2380 – 2387.
- Rogers R. D., Seddon K. R. (2003) Ionic liquids - Solvents of the future?. *Science* **302**: 792 – 793.
- Satari B., Karimi K. (2018) Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resour. Conserv. Recy.* **129**: 153 – 167.
- Shahbaz K., Mjalli F. S., Hashim M., AlNashef I. M. (2010) Using deep eutectic solvents for the removal of glycerol from palm oil-based biodiesel. *J. Appl. Sci.* **10**: 3349 – 3354.
- 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 Enzymol.* **299**: 152 – 178.
- Suan C. L., Sarmidi M. R. (2004) Immobilised lipase-catalysed resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **28**: 111 – 119.
- Suhag M., Sharma H.R. (2015) Bioenergy Concept: An Overview of Producing Energy, Fuels and Materials from Biomass Feedstocks. *IARJSET* **2**: 103 – 109.
- Vandenbergh A., Markó I.E., Lucaccioni F., Lutts S. (2013) Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Ind. Crops Prod.* **42**: 380 – 385.
- van Heerden I., Cronjé C., Swart S.H., Kotzé J.M. (2002) Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresour. Technol.* **81**: 71 – 76.

- van Ree R., Annevelink B. (2007) Status Report Biorafinery 2007
<<http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/42141>> Pristupljeno 20. travnja 2019.
- Wilkins M. R., Suryawati L., Maness N. O., Chrz D. (2007) Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1161 – 1168.
- World Economic Forum (2010) The Future of Industrial Biorefineries.
<https://www.iwbio.de/fileadmin/Publikationen/IWBio-Publikationen/WEF_Biorefineries_Report_2010.pdf> Pristupljeno 10. svibnja 2019.
- Xiu S., Shahbazi A. (2015) Development of Green Biorefinery for Biomass Utilization: A Review. *Tr. Ren. Energy* **1**: 4 - 15.
- Xu P., Zheng G. W., Zong M. H., Li N., Lou W. Y. (2017) Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.* **4**: 34.
- Zhang Q., De Oliveira Vigier K., Royer S., Jerome F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**: 7108 – 7146.
- Zhao H., Baker G. A., Holmes S. (2011) Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **72**: 163 – 167.
- Zhao H., Zhang C., Crittle T. D. (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **85**: 243–247.
- Zuin V. G., Ramin L. Z. (2018) Green and Sustainable Separation of Natural Products from Agro-Industrial Waste: Challenges, Potentialities, and Perspectives on Emerging Approaches. *Top. Curr. Chem.* **376**:3.

Izjava o izvornosti

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

Ivona Čupić

Ivona Čupić
