

Primjena eutektičkih otapala u valorizaciji otpada narančine kore

Novak, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:449278>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Biotehnologija

Ana Novak

7523/BT

Primjena eutektičkih otapala u valorizaciji otpada narančine kore

Završni rad

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cyjetko 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

Primjena eutektičkih otapala u valorizaciji otpada narančine kore

Ana Novak, 0058211590

Sažetak: Koncept valorizacije otpada nastalog preradom citrusa koji uključuje i narančinu koru predstavlja potencijalno rješenje za smanjenje onečišćenja okoliša te dodatno iskorištenje otpada. Kako bi se proveo postupak izdvajanja bioloških spojeva kore naranče s dodanom vrijednošću, prema ekološki prihvatljivim načelima poželjno je korištenje zelenih otapala kao što su eutektička otapala. Stoga, u ovom je radu ispitana mogućnost primjene prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerola sa 30, 50 i 80 % vode (w/w) u valorizaciji otpadne kore naranče. Ispitano eutektičko otapalo, u usporedbi s konvencionalnim otapalima, pokazalo se pogodnim za ekstrakciju polifenolnih spojeva, a nepovoljnim za ekstrakciju 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:glicerol se pokazalo boljim otapalom za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz narančine kore u odnosu na pufer.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 14 slika, 2 tablica, 49 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. rujna 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

Application of deep eutectic solvents in valorisation of orange peel waste

Ana Novak, 0058211590

Abstract: The concept of waste valorisation comes from the processing of citrus, which includes the orange peel, as a potential solution to reduce environmental pollution and benefit from waste utilization. In order to make the valorisation of orange peel waste concept fully based on environmentally acceptable principles, during the process of extracting biological active compounds, green solvents such as deep eutectic solvents (DESs) are desirable. In this paper, the possibility of using choline chloride:glycerol with 30%, 50% and 80% of water (w/w) in the valorisation 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, however, 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 the buffer. Furthermore, choline chloride:glycerol was shown to be more efficient solvent for the enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate during the usage of hydrolytic enzymes from orange peel in comparison to buffer.

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

Thesis contains: 34 pages, 14 figures, 2 table, 49 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: September 9th 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VALORIZACIJA KORE CITRUSA KAO OTPADA PREHRAMBENE INDUSTRIJE	2
2.1.1. <i>Otpad nastao tijekom prerade citrusa</i>	2
2.1.2. <i>Važnost valorizacije organskog otpada citrusa</i>	3
2.1.3. <i>Ekološka opterećenja industrije prerade citrusa</i>	4
2.1.4. <i>Zelena ekstrakcija za izolaciju visokovrijednih biološki aktivnih ekstrakata</i>	6
2.2. ZELENA OTAPALA	8
2.2.1. <i>Ionske kapljevine</i>	8
2.2.2. <i>Eutektička otapala</i>	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. <i>Biljni materijal</i>	12
3.1.2. <i>Kemikalije</i>	12
3.1.3. <i>Oprema i uređaji</i>	12
3.2. METODE	13
3.2.1. <i>Priprema prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol (ChClGly)</i>	13
3.2.2. <i>Priprava ekstrakata kore naranče</i>	14
3.2.3. <i>Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom</i>	14
3.2.4. <i>Određivanje proteina metodom po Bradfordu</i>	15
3.2.5. <i>Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče</i>	16
3.2.6. <i>Hidroliza (R,S)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz</i>	18
<i>otpadne narančine kore</i>	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA FOLIN-CIOCALTEAU METODOM	21
4.2. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO BRADFORDU	23
4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PEKTIN-ESTERAZE U EKSTRAKTIMA KORE NARANČE	25
4.4. HIDROLIZA (R,S)-1-FENILETIL ACETATA PRIMJENOM HIDROLITIČKIH ENZIMA IZ OTPADNE.....	26
NARANČINE KORE	26
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	32

1.Uvod

Stanovništvo svijeta se eksponencijalno širi i posljedično tome sve su veći zahtjevi za osnovnim ljudskim potrepštinama (hrana i voda). Zbog promjene načina života te podizanja životnog standarda dolazi do potrebe unaprjeđenja već postojeće industrije i pronalaženja resursa za uspostavu novih tehnoloških rješenja. Europska Unija je u razdoblju od 2010. do 2050. godine postavila ključne ciljeve vezane uz očuvanje okoliša. Problemi s kojima se treba suočiti su vezani uz područja: energije; emisije stakleničkih plinova i tvari koje oštećuju ozonski omotač; kakvoće i zagađenje zraka; emisije stakleničkih plinova i onečišćivača zraka od strane sektora prijevoza otpada; voda; održiva potrošnja i proizvodnja; kemikalije; biološka raznolikost i korištenje zemljišta (EEA, 2013). S tom mišlju dolazi do razvoja *zelene ekonomije* koja objedinjuje brojna područja biologije, kemije i biotehnologije.

Citrusi koji su od davnina uvršteni kao prehrambena namirnica bogatog nutritivnog sadržaja svakodnevno se prerađuju u tvornicama diljem svijeta. Tijekom industrijskog procesa prerade citrusa nastaje velika količina otpada koju je potrebno zbrinut prema načelima razvoja *zelene ekonomije*. Tu ubrajamo valorizaciju kao mogućnost ponovne upotrebe tog otpada specifičnih karakteristika i sadržaja. U skladu sa navedenim utemeljen je koncept valorizacije otpada nastalog preradom citrusa koji uključuje i narančinu koru, a podrazumijeva pretvaranje velikog raspona različitih sirovina na bazi biomase u širok spektar proizvoda (hrana, stočna hrana, kemikalije), materijala i energije (gorivo, el.energije i toplina).

Cilj ovog rada jest ispitati mogućnost primjene eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol s 30%, 50 % i 80 % vode (w/w) u iskorištavanju potencijala otpadne narančine kore kao sirovine za dobivanje proizvoda sa dodanom vrijednošću. 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 je ispitano 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. Valorizacija kore citrusa kao otpada prehrambene industrije

2.1.1. Otpad nastao tijekom prerade citrusa

Agrumi, koji se uzgajaju u cijelom svijetu, prepoznati su kao proizvod visoke prehrambene vrijednosti, bogatog nutritivnog sadržaja i pogodnog učinka na ljudsko zdravlje. Štoviše, mnogi od tih plodova su korišteni kao tradicionalno ljekovito bilje za liječenje bolesti u nekoliko azijskih zemalja. Brojna istraživanja usredotočena su na sekundarne metabolite iz agruma (citrusa) zbog kojih je otpad citrusa dobiven iz prehrambene industrije sve zanimljiviji materijal tj. sirovina. Sekundarni metaboliti dobiveni iz citrusa, koji uključujući flavonoide, alkaloidne, limonoide, kumarine, karotenoide, fenolne kiseline i eterična ulja, od vitalnog su značaja za ljudsko zdravlje zbog svojih aktivnih svojstava. Ove karakteristike uključuju antioksidativne, protuupalne, antikancerogene, kao i kardiovaskularne zaštitne i neuroprotektive učinke (Lv i sur., 2015).

Brazil, Kina, Indija, Meksiko, Španjolska i SAD proizvode više od dvije trećine citrusa u cijelom svijetu (Paggiola i sur., 2016). Rod Citrus sadrži nekoliko važnih plodova, s dominantno slatkom narančom, mandarinom, grejpom, limetom i limunom (Mamma i Christakopoulos, 2014; Zheng i sur., 2016). Godišnje se na svjetskoj razini proizvede približno 71 000 000 tona naranče. Također tijekom prerade naranča koje su najzastupljeniji citrus prehrambene industrije oko 40% ukupnih naranči prerađuje se u sokove i konzerviranu hranu nakon čega 40 – 50 % ukupne mase naranči zaostaje kao otpad u obliku kore. Većina plodova citrusa nakon berbe i obrade na tržište izlazi kao svježi proizvod te se kao takav konzumira. Otprilike 1/3 citrusa upotrebljava se u industriji proizvodnje sokova prilikom koje dolazi do nakupljanja 50-60% organskog otpada (Ngoc i Schnitzer, 2009; Taghizadeh-Alisaraei i sur., 2017). Dobiveni organski otpad karakteriziran je niskom pH vrijednošću (3-4), visokim udjelom organske tvari (95% ukupne količine) i visokim sadržajem vode (80 – 90 %).

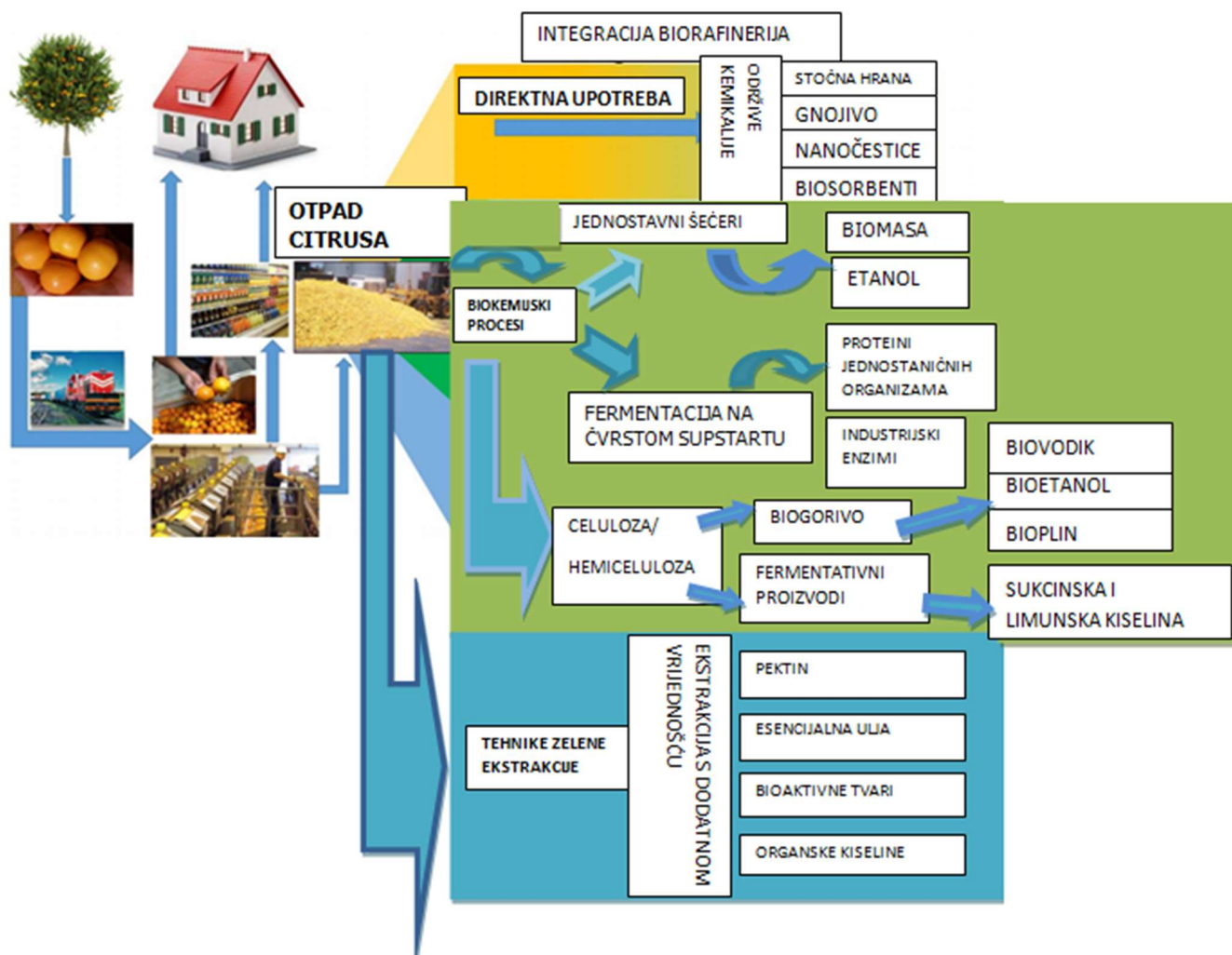
Nusproizvodi tijekom industrije prerade citrusa su brojni, a uključuju neke masti, slobodne šećere (npr. glukoza, fruktoza i saharoza), organske kiseline, ugljikohidratne polimere (celuloza, hemiceluloza i pektin), enzime (pektinesteraza, fosfataza i peroksidaza), flavonoide, eterična ulja (uglavnom limonen) i pigmente (Boukroufa i sur., 2015). Takav otpad koji nastaje u prehrambenoj industriji smatra se obnovljivim izvorom funkcionalnih

komponentata s dodanom vrijednošću, poput vlakana, proteina, ulja, voskova, boja i biološki aktivnih komponenata (npr. polifenola). Pošto je sveukupna proizvodnja prehrambene industrije uključujući i nastali otpad strogo kontrolirana, tok ove vrste otpada i sastav otpada trebao bi biti što ujednačeniji i definiran standardnim propisima. Zbog svega navedenog otpad nastao iz prehrambene industrije prerade citrusa postaje potencijal kao sirovina koja se može ponovo upotrijebiti.

2.1.2.Važnost valorizacije organskog otpada citrusa

Najnovija dostignuća i buduće perspektive u potpunoj valorizaciji otpada za preradu citrusa (engl. Citrus processing waste, CPW) i nusprodukata industrije prerade citrusa doprinose razvoju *zelene ekonomije* i smanjenju negativnih utjecaja na okoliš. Važno je ublažiti negativne učinke na okoliš uvođenjem shema valorizacije koje vode do integrirane platforme za biorafineriju. *Zelena ekonomija* je novi koncept u razvoju koji je 2012. godine potaknut od strane Europske komisije, a zasniva se na mogućnosti pretvorbe obnovljivih bioloških resursa u ekonomski održive proizvode i bioenergiju (Ravindran i Jaiswal, 2016b). U zelenoj ekonomiji, osnovni gradivni element tj. sirovina za dobivanje energije je obnovljiv biološki resurs, npr. biomasa (Joshi i sur., 2015a; McCormick i Kautto, 2013; Ravindran i Jaiswal, 2016b). U rujnu 2015. na vrhu UN-a o održivom razvoju odlučeno je usvajanje dokumenta „Transformacija našeg svijeta: Program za održivi razvoj do 2030.“ koji proširuje 17 ciljeva održivog razvoja za zaštitu planeta (Matharu i sur., 2016).

Cilj valorizacije narančine kore kao i valorizacije otpada u osnovi u bilo kojoj prerađivačkoj industriji, usmjeren je na ponovnu upotrebu, recikliranje ili kompostiranje otpada u korisne proizvode ili izvore energije. Valorizacija narančine kore kao otpada prehrambene industrije provodi se kroz tri platforme: (1) izravna upotreba kore kao stočne hrane, gnojiva, biosorbensa ili nanočestica; (2) primjena kore kao supstrata za biokemijske procese dobivanja biogoriva, proteina i industrijskih enzima te drugih važnih fermentativnih proizvoda (3) izdvajanje bioloških spojeva kore s dodanom vrijednošću (npr. pektin, esencijalna ulja, nutriceutici, organske kiseline). Zbog pozitivnog učinka na okoliš i mogućnosti dobivanja korisnih spojeva iz organskog otpada dobivenog prerađivanjem citrusa valorizacija u ovakvoj prehrambenoj industriji je nužna i ulaže se sve više resursa u istraživanje i poboljšanje postupaka upotrebe tog otpada.



Slika 1. Prikaz sheme opskrbe citrusa i valorizacije otpada (Satari i Karimi, 2018)

2.1.3. Ekološka opterećenja industrije prerade citrusa

Tijekom proizvodnje voća glavni faktori kod uzgoja biljaka su održavanje pogodnih uvjeta za što bolji rast i što veći prinos plodova. Potrebno je znanje i poznavanje kulture koja se uzgaja, ali također i poznavanje regije i klimatskih uvjeta uzgoja neke kulture. Smatra se da je najveći ekološki teret upravljanje zaštitom kulture od štetoina i bolesti koje joj mogu naštetiti, opskrba vodom tj. navodnjavanje, upotreba gnojiva i opskrba tla svim potrebnim nutrijentima te zaštita kulture od vremenskih neprilika (Cerutti i sur., 2015).

Da bi se dobila procjena ekološkog opterećenja upotrebom pesticida, herbicida i gnojiva provode se studije o životnom ciklusu uzgajane kulture uz koje se prati i najveće opterećenje na okoliš, a vezano je uz utrošak energije koja se ulaže tijekom procesa prerade (Coltro i sur., 2009). Energija koja se koristi u poljoprivredno-prehrambenom sektoru tijekom

cijelog životnog ciklusa proizvodnje procjenjuje se na 20 % ukupne potrošene energije u razvijenim zemljama. Potrošnja primarne energije i posljedično tome nastanak efekta emisije stakleničkih plinova zabilježene su kao glavni doprinositelji potencijala globalnog zatopljenja (Beccali i sur., 2009). Potrošena energija je uzrok velikog opterećenja okoliša u prerađivačkoj industriji citrusa. Analiza energije za proizvodni pogon naranče pokazala je da je potrebna ukupna energetska potrošnja od $1,12 \text{ MJ kg}^{-1}$ narančinog soka, uglavnom u obliku električne energije i pare. Najveći udio te energije troši se tijekom pasterizacije soka gdje se mora postići određena temperatura kako bi se proveo taj postupak ,a nakon toga prilikom pakiranja soka u ambalažu energija se troši za rad strojeva (Waheed i sur., 2008).

Osim toga, još jedan glavni ekološki problem kod proizvodnog pogona tehnologije prerade citrusa u sok je njegova velika količina nastale otpadne vode, npr. tijekom aktivnosti čišćenja pogona (Guzmán i sur., 2015). Međutim, karakterizacijom otpadnih voda dobivenih iz postrojenja prerađivačke industrije citrusa otkriveno je da sadrže znatne količine vrijednih spojeva kao što su vlakna, fenolni spojevi, šećeri i organske kiseline koji se mogu korisno upotrijebiti ako se izdvoje ekstrakcijom (Viuda-Martos i sur., 2011).

Najvažnija briga u prerađivačkoj industriji citrusa je gospodarenje čvrstim otpadom koji nastaje tijekom procesa prerade. Ovaj kruti otpad tipično se sastoji od kore, sjemena i ostataka listova koji zaostaju nakon postupka cijedenja soka. Dio čvrstog otpada također proizlazi iz materijala za pakiranje (ambalaža) i otpada koji ne odgovara specifikacijama postrojenja za proizvodnju soka, no ovdje se navodi glavni otpad prilikom procesiranja citrusa, u naravi, organski otpad. Primarni problem organskog otpada nastalog tijekom prerade citrusa je visoka fermentabilnost, zbog visokog sadržaja ugljikohidrata, što može ubrzati njegovu degradaciju (Lin i sur., 2013). Tradicionalna strategija smanjenja otpada organskog porijekla spaljivanjem ili odlaganjem danas su nedovoljne i problematične u smislu utjecaja na okoliš i energetske učinkovitosti (Wei i sur., 2017). Dio organskog otpada dobivenog tijekom prerade citrusa također se koristi za ishranu stoke kao hranjivo s niskom vrijednošću (ima nizak sadržaj proteina). Zbog visokog sadržaja organske tvari u otpadu koji nastaje u prehrambenoj industriji prerade citrusa direktiva Europske Unije utvrđuje da se takav otpad kao i sve druge vrste organskog otpada, ne mogu zbrinuti na odlagalište otpada ako se prethodno ne podvrgnu procesima energetske obnove (Negro i sur., 2017; Negro i sur., 2016a).

Ipak , nastali otpad tijekom prerade citrusa može se valorizirati kako bi se dobili derivati koji će se koristiti kao izvor energije, npr. fermentacijom, i druge korisne kemikalije

pomoću fizikalnih tretmana. Primjenom valorizacije postigla bi se mogućnost da Europska Unija zadovolji oko 20% svojih potreba za energijom iz obnovljivih izvora bioloških resursa. Još jedna važna primjena otpada nastalog preradom citrusa je upotreba tog otpada kao gnojivo, što se postiže podešavanjem omjera C / N, pH vrijednosti i sadržaja vode do 60% pri čemu se dobiva zreli kompost (Angel Siles Lopez i sur.,2010). Još je moguća upotreba pulpe citrusa za proizvodnju biogoriva (Panuccio i sur., 2016).

2.1.4. Zelena ekstrakcija za izolaciju visokovrijednih biološki aktivnih ekstrakata

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari (kruta ili kapljevita faza) koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima te se smatra jednim od najčešće korištenih procesa u industriji i upotrebljava u gotovo svim proizvodnim procesima (Chemat i sur., 2012). Kod konvencionalnih procesa ekstrakcije u industrijskom mjerilu postoje veliki nedostaci kao što su nepotpuno iskorištenje procesa, upotreba velike količine hlapljivih organskih otapala, dugo vrijeme ekstrakcije te visoka potrošnja energije zbog intenzivnog zagrijavanja i/ili miješanja tijekom ekstrakcije (Rombaut i sur., 2014; Chemat i sur., 2012). U želji poboljšanja energetske učinkovitosti, istražuju se bolji načini ekstrakcije aktivnih tvari iz bioloških izvora sa ciljem industrijske primjene. Tako je 2012. godine, uveden pojam zelene ekstrakcije (Chemat i sur., 2012).

Zelena ekstrakcija bazira se na pronalasku i uspostavi ekstrakcijskog procesa koji će omogućiti upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurati siguran i visokokvalitetan ekstrakt. Osim učinkovitosti tih metoda, prednosti zelene ekstrakcije su selektivnost, ekološka prihvatljivost, upotreba manjih količina otapala, veći prinos od klasične ekstrakcije, mogućnost kontrole temperature prilikom ekstrakcije te smanjena potrošnja energije i smanjena emisija stakleničkih plinova (Chemat i sur., 2012; Rostagno i Prado, 2013; Banerjee i sur., 2017). Stoga, u posljednjih nekoliko godina kako bi se smanjilo korištenje konvencionalnih procesa ekstrakcije, koji zbog već navedenih nedostataka imaju nepoželjne učinke na okoliš, interes za tehnologije zelene ekstrakcije je povećan. Osim prednosti koje se odnose na korištenje zelenih otapala, razvijene su i nove tehnologije ekstrakcije, kao što su upotreba ultrazvuka i mikrovalova. Selektivna ekstrakcija različitih bioaktivnih spojeva u slučaju najsuvremenijih tehnologija ekstrakcije omogućena je jednostavnim promjenom procesnih parametara (snaga zračenja, temperatura, tlak, protok, snaga, itd. (Gil-Chávez i sur., 2013). Također se razmatraju otapala bazirana na organskim solima (ionske kapljevine i eutektička otapala) i agro-otapalima (npr. etanol, glicerol, metilni

esteri masnih kiselina biljnog ulja, terpeni) te sve popularnije superkritične tekućine kao što su CO₂ i voda.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenta djelovanjem ultrazvuka visokog intenziteta (frekvencija 20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koja omogućuje visoku reproducibilnost u kraćem vremenu, ograničava se povišenje temperature tijekom tretmana te se dobiva veći prinos bioaktivnih tvari (Caili i sur., 2006). Metodom ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih tvari nastoji se smanjiti upotreba otapala ili u potpunosti izbjeći. Tijekom tretiranja ultrazvukom dolazi do pojave kavitacije i stvaranja mjehurića plina koji implodiraju i uzrokuju bubrenje stanica te probijanje stanične stjenke što omogućuje visoku brzinu difuzije kroz staničnu stjenku. Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacije na stanični materijal, točnije staničnu stjenku, omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te također povećava prijenos mase (Vinatoru, 2001). Na taj način se ubrzava ekstrakcija te se povećava njena učinkovitost. Industrijska važnost primjene ultrazvukom potpomognute ekstrakcije u tehnologiji prerade citrusa jest od interesa u smislu povećanja ekstrakcije određenih komponenata kao što su polifenoli (Springett, 2001), antocijani (Springett, 2001), aromatske tvari (Vinatoru, 2001) i ulja (Chemat i sur., 2004) iz biljnog materijala.

Upotreba dielektričnog zagrijavanja u laboratorijima, koristeći mikrovalove započela je kasnih 70-tih, te je prvo upotrijebljena u prehrambenoj industriji, a danas se često primjenjuje za analizu tragova organskih spojeva kod krutih uzoraka. Mikrovalovima se postižu visoke, ali kontrolirane stope zagrijavanja koje omogućuju selektivno i ciljano zagrijavanje medija te se zbog toga toplina iz sustava gotovo ne gubi (Mandal i sur., 2007). Pod utjecajem mikrovalova molekule u biljnom tkivu titraju, a tkivo se zagrijava. Tijekom mikrovalnog zagrijavanja mehanizam djelovanja možemo podijeliti na dva simultana načina. Prvi je rotacija dipola uslijed djelovanja elektromagnetskog zračenja, a drugi je ionska vodljivost, tj. zamjena iona između otopljene tvari i otapala (Favretto, 2004). Energija mikrovalova zagrijava polarno otapalo koje je u kontaktu s čvrstim uzorkom i na taj način smanjuje količinu potrebnog otapala i vrijeme ekstrakcije što je zbog uštede na energiji (nema dodatnog zagrijavanja) ekonomski isplativo (Veggi i sur., 2013). Visok sadržaj vode u otpadu koji nastaje tijekom prerade citrusa ne može ograničiti primjenu tehnike ekstrakcije mikrovalovima zbog njihove dobre interakcije s vodom koja ima visoku dielektričnu konstantu (Pfaltzgraff i sur., 2013).

Osim ekstrakcije pomoću ultrazvuka i mikrovalova sve se više istraživanja fokusira na pronalazak novih i efikasnijih metoda s ciljem poboljšanja razvoja proizvoda. Štoviše, kombinacije ekstrakcije uz pomoć ultrazvuka s nekim inovativnim tehnikama, tj. mikrovalovima, ekstrakcijom superkritičnim fluidom i ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom zabilježeni su kao jedan od najperspektivnijih hibridnih tehnika (Chemat i sur., 2017).

U nastavku je dan kratak pregled osnovnih saznanja o zelenim otapalima kao što su ionske kapljevine i eutektička otapala.

2.2 ZELENA OTAPALA

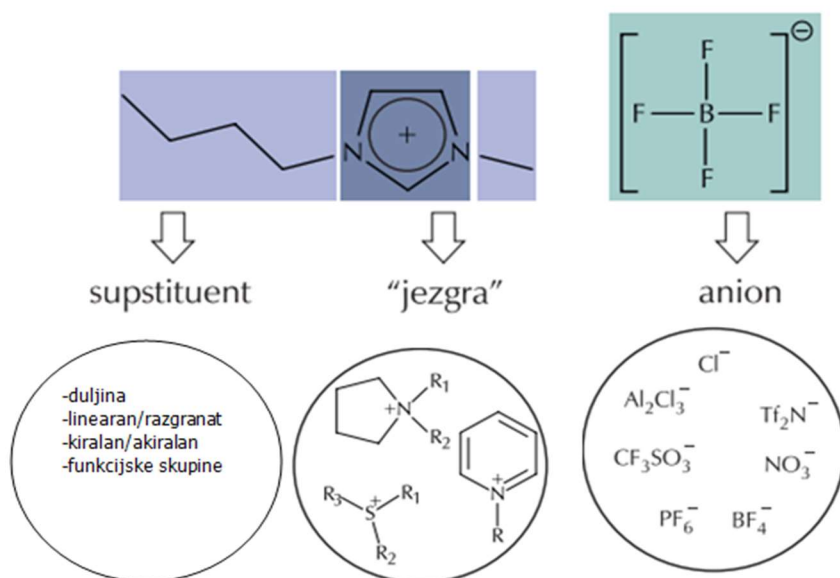
Otapala se svakodnevno koriste u brojnim industrijskim procesima zbog njihove ključne uloge u otapanju krutih tvari, prijenosu mase i topline te postupcima pročišćavanja i izdvajanja proizvoda. Većina konvencionalnih otapala je toksična, zapaljiva i nagrizaјуća, a njihova topljivost i hlapivost doprinijele su poluciji zraka, vode i zemlje. Recikliranje i ponovna uporaba takvih otapala, kada je to moguće, zahtjeva energetske snažnu destilaciju uz znatne gubitke te unakrsnu kontaminaciju. Povećanjem svijesti o štetnosti i nedostacima postojećih otapala kemičari su započeli potragu za sigurnijim rješenjima zbog čega počinje razvoj zelenih otapala (Anastas i Eghbali, 2010). Prema tome dvije glavne strategije razvoja zelenih otapala su (1) zamjena otapala dobivenih kao naftni derivati otapalima iz obnovljivih izvora proizvedenih od biomasa poput drva, ulja voća i povrća i (2) zamjena opasnih otapala s onim otapalima koja pokazuju bolju zaštitu okoliša. Također svojstva tih otapala su velika moć otapanja, biorazgradivost, netoksičnost i nezapaljivost. Idealna zelena otapala moraju zadovoljavati sljedeće kriterije: moraju biti sigurna za zdravlje ljudi, smanjiti opasnost, lako razgradiva te pružiti visoki prinos produkta (Chemat i sur., 2012). Kao nova zelena otapala podrazumijevaju se biootapala, ionske kapljevine, voda, superkritične tekućine, reakcijski sustavi bez prisustva otapala i eutektična otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

2.2.1. Ionske kapljevine

Ionske kapljevine su organske otopine soli koje su u tekućem stanju na sobnoj temperaturi. Gotovo da nemaju tlak pare i zapaljivost im je vrlo niska, a po definiciji točka taljenja im mora biti ispod 100 °C (Anastas i Eghbali, 2010). Njihova je specifičnost što su građene od aniona i kationa, to jest njihovih slabo koordinirajućih otopina. U njima, kationi najčešće dolaze iz različito supstituiranih velikih organskih molekula male simetrije koji

sadrže pozitivno nabijen dušikov, sumporov ili fosforov atom kao što su *N*, *N'*-dialkilimidazolijev, *N*-alkilpiridinijev, *N*-alkilmorfolinijev, *N*-alilpikolinijev, *N*, *N'*-dialkilpirazolijev, alkilamonijev kation. Tipični anioni su anioni halogenidi, tetrafluorborat, heksafluorofosfat, nitrat, sulfat, bis[(trifluormetil)-sulfonil]imid, acetat, dicijanamid, alkilsulfati, alkilsulfonati, p-toluensulfonat i trifluoracetat (Cvjetko Bubalo i sur., 2014; Janiak, 2013). Sama priprava ionskih kapljevina najčešće se odvija u dva koraka: priprava željenog kationa reakcijom kvaternizacije tercijarnog amina odgovarajućim alkilirajućim reagensom te izmjena aniona solima ili kiselinama koje sadrže željeni anion (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

Zbog različitih kombinacija aniona i kationa postoji velik broj strukturno različitih ionskih kapljevina. Budući da fizikalno-kemijska svojstva ionskih kapljevina ovise o strukturi kationa (npr. simetrija kationa, duljina alkilnih supstituenata, prisutnost funkcijske skupine), kao i o stupnju delokalizacije naboja na anionu, svojstva ove skupine spojeva međusobno se razlikuju (Zhao i sur., 2002). Upravo je to jedno od najvažnijih svojstava ionskih kapljevina koje omogućava dizajniranje njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava modifikacijom odnosno izmjenom aniona i/ili kationa. Modifikacijama kemijske strukture ionskih kapljevina može se utjecati na talište, topljivost određenih komponenti, kiselost, gustoću, viskoznost, topljivost u vodi ili organskim otapalima i ekstrakcijski kapacitet te tako izravno utjecati na uspješnost primjene ionske kapljevine (Kärkkäinen, 2007).



Slika 2. Dizajniranje svojstava ionskih kapljevina (Cvjetko Bubalo i sur., 2014)

Na temelju dosadašnjih istraživanja vidljivo je da jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva te mogućnosti dizajniranja za specifične namjene predstavljaju prekretnicu u

kemijskoj i procesnoj tehnologiji te biotehnologiji. Primjenom ovih spojeva omogućeno je poboljšanje postojećih i uspostavljanje novih visokoučinkovitih procesa. Općenito, ključna prednost primjene odgovarajuće ionske kapljevine kao otapala u odnosu na klasična organska otapala jest u promjeni reakcijskih odnosa, izvrsnom otapanju supstrata te poboljšanoj aktivnosti, selektivnosti i stabilnosti (bio)katalizatora (Yang, 2009). Također kada se govori o primjeni ionskih kapljevine, vrlo je važno istaknuti da se ionske kapljevine zbog niskog tlaka para i toplinske stabilnosti mogu relativno jednostavno regenerirati nakon procesa uz neznatne gubitke. Zbog visoke cijene i nedostatka podataka o njihovom utjecaju na ljude i okoliš ionske kapljevine za sada nisu našle širu komercijalnu primjenu (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

2.2.2. Eutektička otapala

Eutektička otapala (eng. Deep Eutectic Solvents, DES) su nova generacija otapala koja se otkrivaju 2011. godine, a svrstavaju se u 4. generaciju ionskih kapljevine. To su smjese dviju ili više komponenata koje se povezuju intermolekularnim vodikovim vezama tvoreći eutektičku smjesu koja ima niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Zhang i sur., 2012). Najčešća eutektička otapala temelje se na kolin kloridu, karboksilnim kiselinama i drugim donorima vodikovih veza, poput uree, limunske kiseline, sukcininske kiseline i glicerola. Imaju slične karakteristike kao ionske kapljevine, ali su u prednosti zbog niske cijene, biorazgradivosti i niske toksičnosti (Kudlak i sur., 2015). 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 zagrijevaju do 50° C (Paiva i sur., 2014).

Tablica 1: Tipovi eutektičkih otapala (Kudlak i sur., 2015)

TIPOVI	SASTAV	PRIMJER
Tip I	Kombinacija metalne soli i organske soli	ZnCl ₂ + kolin klorid
Tip II	Kombinacija hidrata metalne soli i organske soli	CoCl ₂ *6H ₂ O + kolin klorid
Tip III	Komponenta koja je donator vodika u kombinaciji s organskom soli	kolin klorid + urea
Tip IV	Kombinacija metalnog klorida s komponentom koja je donator vodikove veze	MCl _x + urea / etilen-glikol / acetamid

Eutektička otapala su stekla veliki znanstveni interes, a pažnja znanstvene zajednice usmjerena je prema razumijevanju njihovih karakteristika, faznog ponašanja komponenti i interakcija uspostavljenih između donora i akceptora vodikove veze koji čine eutektičku smjesu te mogućnosti njihove brojne primjene kao što je u ekstrakciji biološko aktivnih spojeva ili kao otapala za biokatalizu.

Eutektičke otopine imaju sposobnost doniranja i prihvaćanja protona i elektrona, što im daje sposobnost stvaranja vodikovih veza te se time povećava njihova sposobnost otapanja. Fizikalno-kemijska svojstva otapala su vrlo bitna za postupak ekstrakcije jer je učinkovitost ekstrakcije prije svega ovisna o svojstvima otapanja željene tvari u odabranom otapalu. Ovdje vrijedi pravilo „slično se otapa u sličnom“. U većini radova, kao negativan utjecaj se spominje viskoznost ovih otapala koja utječe na prijenos mase svih reaktanata te mijenja brzinu reakcije (Zhang i sur., 2012). Dai i suradnici su promatrali ekstrakciju fenolnih spojeva šafranike, koristeći različita prirodna eutektička otapala (mliječna kiselina:glukoza, glukoza:kolin-klorid i fruktoza:glukoza:saharoza) gdje je zapažena velika sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva upravo zbog vodikovih veza koje se ostvaruju između fenolnih spojeva i molekula eutektičkog otapala. Međutim, viskoznost se smanjuje dodatkom određenog postotka vode prilikom pripreme otapala.

Također i polarnost značajno utječe na učinkovitost ekstrakcije. Optimiziranjem svih parametara (viskoznost, polarnost i parametri ekstrakcije-temperatura, vrijeme ekstrakcije), ovi su autori zabilježili veći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva korištenjem prirodnih eutektičkih otapala u usporedbi s uobičajenim klasičnim otapalima kao što su voda i etanol. Također, Paiva i sur., 2014. su primjetili da je topivost slabo topljivih molekula kao što je benzojeva kiselina, grizeo-fulvin, danazol i itrakonazol, prijavljena 5 do 20 000 puta veća u eutektičkim otapalima nego u vodi.

Gill i sur. (1994) su primjetili da eutektička otapala mogu biti i supstrat za enzimске reakcije. Također, došli su do saznanja da enzimi mogu zadržati svoju aktivnost kada su u eutektičkim otapalima, osiguravajući bolji reakcijski medij od uobičajenih organskih otapala. Također zabilježen je i utjecaj eutektičkih otapala na strukturu i aktivnost biokatalizatora što posljedično povećava ili smanjuje efikasnost biokatalize. Zbog različitih karakteristika eutektičkih otapala vrlo je bitan odabir donora i akceptora vodikove veze. Zbog važnosti biokatalize i potrebe za poboljšanjem imobilizacije, stabilizacije i recikliranja biokatalizatora kako bi se troškovi procesa smanjili eutektička otapala smatraju se zelenim otapalima koja se mogu primijeniti kao otapala u biokatalizi (Clouthier i sur., 2012.).

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, SAD
- 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 (KH₂PO₄, 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, GENESYSTM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.2. Metode

3.2.1. Priprema eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol (ChClGly)

Molarni omjer kolin-klorida i glicerola za pripremu eutektičkog otapala je korišten kao i u Panić i sur., (2017). Za pripremu eutektičkog otapala korištena su 3 različita udjela vode 30, 50 i 80 % (w/w). U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se kolin-klorid i glicerol u molarnom omjeru 1:2. Zatim se u tikvicu doda određen volumen vode kako bi se dobilo prirodno eutektičko otapalo s 30, 50 i 80 % vode (w/w). Mase potrebnih sirovina su prikazane u tablici 2. Sinteza otapala je provedena na magnetskoj mješalici zagrijavanjem na 50 °C tijekom 2 sata, nakon čega je dobivena homogena, prozirna i bezbojna tekućina.

Tablica 2. Mase sirovina potrebnih za pripremu prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol

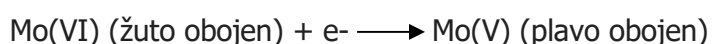
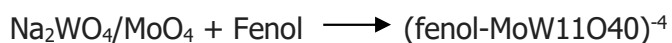
EUTEKTIČKO OTAPALO	m (kolin- klorid) [g]	m(glicerol) [g]	m (voda) [g]
Kolin-klorid:glicerol sa 30 % vode (ChClGly30%)	7	9,235	6,958
Kolin-klorid:glicerol sa 50 % vode (ChClGly50%)	7	9,235	16,235
Kolin-klorid:glicerol sa 80 % vode (ChClGly90%)	7	9,235	64,94

3.2.2. Priprava ekstrakata kore naranče

Ekstrakcija je provedena pomoću prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerola s 30 , 50 i 80% vode (w/w) , kalij-fosfatnog pufera (pH-vrijednost 7) ili zakiseljenog etanola (75 % EtOH, 0,1 % HCl) u tarioniku s tučkom. Nakon što se naranče operu pomoću detergenta, površinski steriliziraju etanolom i potom isperu demineraliziranom vodom, ogule se nožićem te se kora nareže na komadiće približne veličine 5 mm x 5 mm x 2 mm . 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 reakcijska smjesa centrifugira 15 min na 5000 rpm. Nakon centrifuge provodi se filtracija pomoću običnog lijevka za filtraciju i filter papira kako bi se u potpunosti odijelili zaostali krupni dijelovi. 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

Ukupni polifenoli određeni su u ekstraktima narančine kore koji su pripremljeni u prirodnom eutektičkom otapalu ChClGly sa 30 %, 50 % i 80 % vode te zakiseljenom etanolu (75 % EtOH, 0,1 % HCl) koji je korišten kao referentno otapalo. Princip određivanja se temelji na kolornoj reakciji, koja je posljedica reakcije polifenola s Folin-Ciocalteu-ovim reagensom. Folin- Ciocalteu metoda se temelji na reakciji oksidacije fenolnih spojeva u lužnatoj sredini smjesom fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline pri čemu se fosfovolframova i fosfomolibdenova kiselina reduciraju u plavo obojeni volframov i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog obojenja je proporcionalan udjelu polifenolnih spojeva.



Postupak provođenja analize

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 upotrebljava 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} . Izmjerene vrijednosti apsorbancija razrijeđenih otopina galne kiseline nanese na ordinatu koordinatnog sustava, dok se koncentracije razrijeđenih otopina galne kiseline nanese na apscisu. Baždarni dijagram se konstruira pomoću računala unosom dobivenih apsorbancija poznate koncentracije galne kiseline. Prema dobivenoj jednadžbi pravca uvrštavanjem apsorbancija mjerenih otopina izračunaju se nepoznate koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva u uzorcima ekstrakata narančine kore.

3.2.4. Određivanje proteina metodom po Bradfordu

Jednostavna i brza kolorimetrijska metoda širokog opsega proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina. Ova kolorimetrijska metoda se temelji na reakciji proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno sa pobočnim grupama 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. Pri tome se apsorpcijski maksimum boje pomiče s valne duljine 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski.

Postupak provođenja analize

Ukupni proteini u ekstraktima narančine kore pripremljenima u eutektičkom otapalu CHCl_3/Gly sa 30, 50 i 80 % vode te puferu (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2) određeni su metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). U kivete se otpipetira $40 \mu\text{L}$ uzorka te $1200 \mu\text{L}$ 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

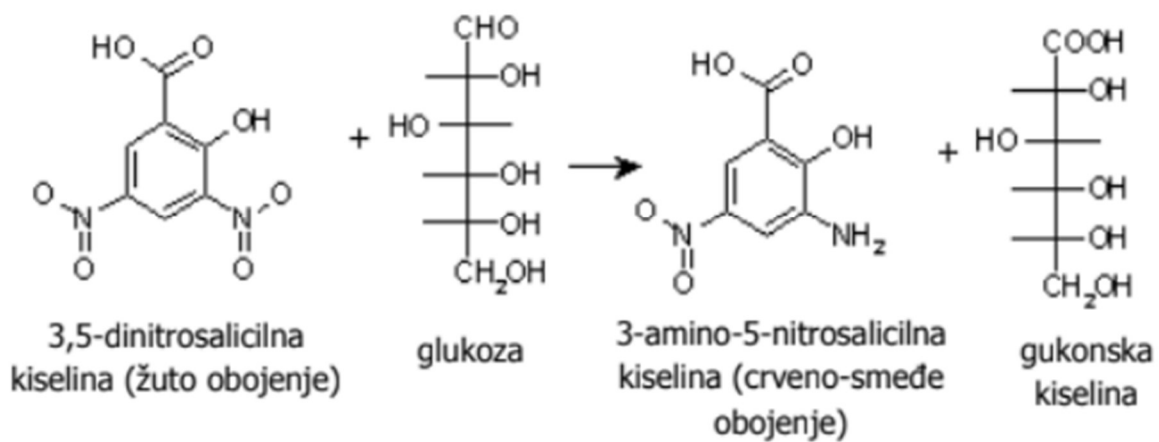
Kao standard za izradu baždarnog dijagrama koristi se albumin iz goveđeg seruma (BSA). Potrebno je pripremiti otopine proteina albumina iz goveđeg seruma koncentracija 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1 i $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$. U kivete se otpipetira $40 \mu\text{L}$

otopine goveđeg albumina te se doda 1200 μ L 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 jednadžbe pravca izračunaju se koncentracije ukupnih proteina u uzorcima ekstrakata narančine kore.

3.2.5. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče

Aktivnost pektin-esteraze određivana je Millerovom kolorimetrijskom metodom mjerenjem količine otpuštenih reduciranih grupa pektina (polisaharida) izraženih kao jedinice galakturonske kiseline. Aktivnost se određuje 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. Razvijeno obojenje otopine mjereno je spektrofotometrom pri valnoj duljini od 575 nm.



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 odmjerne tikvici od 100 mL.

Postupak određivanja

Ekstrakti narančine kore u prirodnom 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 sadržavaju samo 1 mL demineralizirane vode. Zatim se vrši inkubacija tijekom 30 minuta na termomikseru pri 40 °C i 900 rpm. Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju 5 minuta na 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 °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 nanese na ordinatu koordinatnog sustava, a koncentracije otopina galakturonske kiseline se nanese na apscisu.

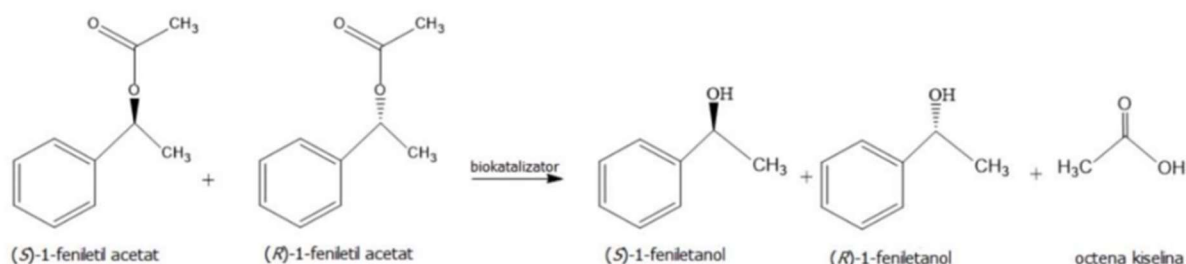
Prikaz rezultata

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:

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

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 prirodnom eutektičkom otapalu ChClGly s 30 , 50 i 80 % vode te u puferu kao referentnom otapalu. Najprije se na analitičkoj vagi 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. Od trenutka započinjanja reakcije prati se vrijeme te se uzorkovanje vrši nakon 48, 96 i 168 sati. 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 prirodnom eutektičkom otapalu ChClGly 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:

$$C_p = C_{S1} - C_{S2} \quad [2]$$

U navedenoj jednadžbi C_{S1} predstavlja početnu koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil-acetata

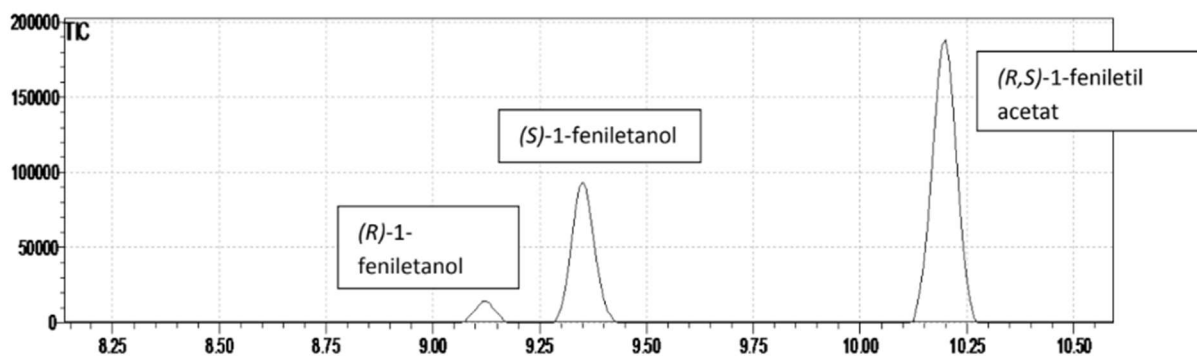
(mol L⁻¹), a C_{S2} koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil-acetata izmjerenu na kraju reakcije (mol L⁻¹).

Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletil-acetata odnosno (*R,S*)-1-feniletanola provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom. Pomoću računala se nacrtala dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata o površini ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata u uzorcima.

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

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).



Slika 5. Tipičan GC kromatogram analize reakcijske smjese enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata

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. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanesu se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrtaju dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata o površini ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata u uzorcima.

Iskorištenje procesa hidrolize η (%) izračuna se prema jednadžbi 3:

$$\eta_{hidroliza} = \frac{C_p}{C_T} \times 100 \quad [3]$$

U navedenoj jednadžbi C_p predstavlja izmjerenu (stvarnu) 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:

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

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

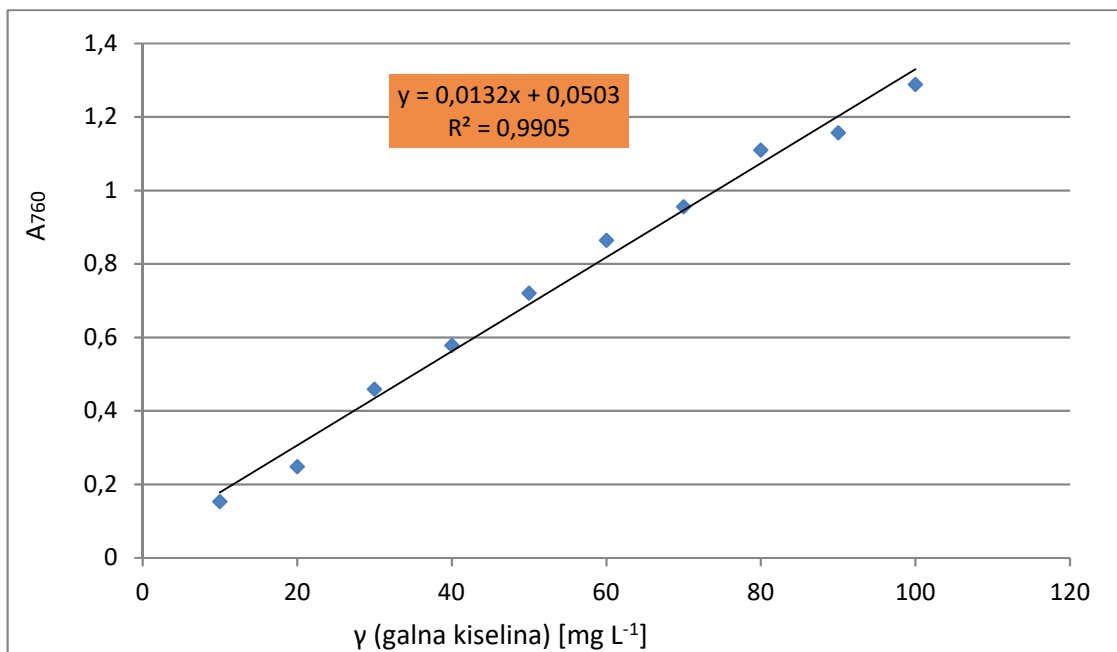
Na svjetskoj razini svake se godine proizvede oko 140 bilijuna tona biomase u poljoprivrednom sektoru, a velik dio se smatra otpadom (Zuin i Ramin, 2018). Narančina kora jest izvrstan primjer poljoprivrednog otpada koji u velikoj količini zaostaje nakon proizvodnje sokova, a može poslužiti kao sirovina te obnovljiv izvor funkcionalnih komponenata s dodanom vrijednošću, poput vlakana, proteina, ulja, voskova, boja i biološki aktivnih komponenata (npr. polifenola). Upravo zbog tih vrijednosti koje su sadržane u narančinoj kori, poželjno ih je izdvojiti u što većim količinama. Konvencionalne metode ekstrakcija zasnivaju se na utrošku velike količine organskih otapala i energije što ne čini sustav održivim. Upoznati s tim problemima, znanstvenici istražuju brojne metode i otapala koja su u skladu s principima zelene kemije (Chemat i sur., 2012).

U ovom eksperimentalnom radu kao zeleno otapalo korišteno je prirodno eutektičko otapalo kolin-klorid:glicerol s različitim udjelima vode. 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.

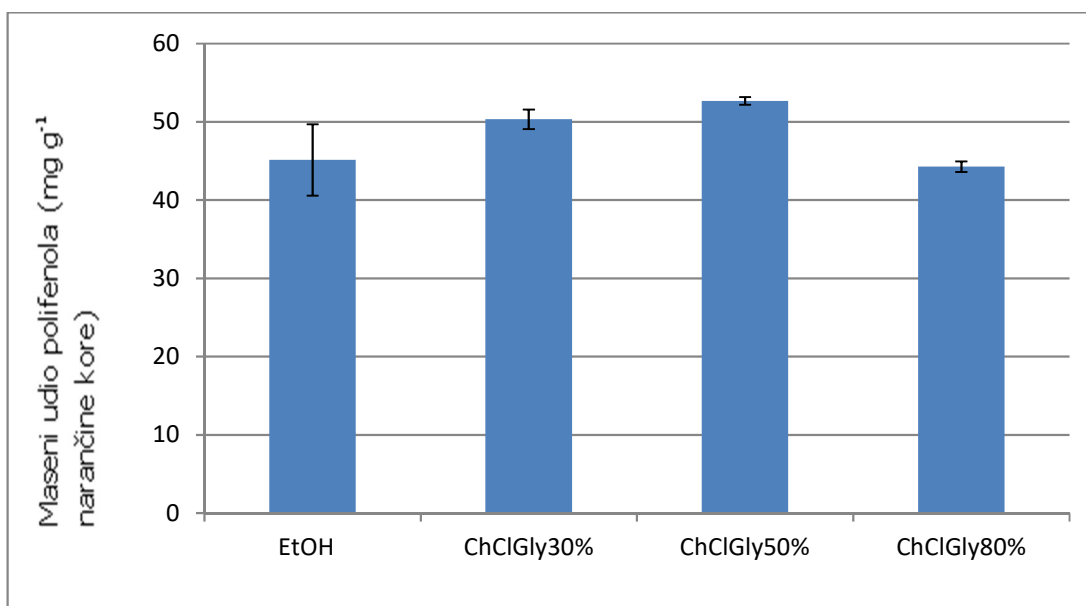
4.1. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

Polifenoli su spojevi prepoznati po svojoj biološkoj aktivnosti zbog koje imaju važnu ulogu u očuvanju zdravlja organizma jer djeluju kao antioksidansi te inhibiraju slobodne radikale.

Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima otpadne narančine kore pripremljenima s eutektičkim otapalom kolin-klorid:glicerol 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

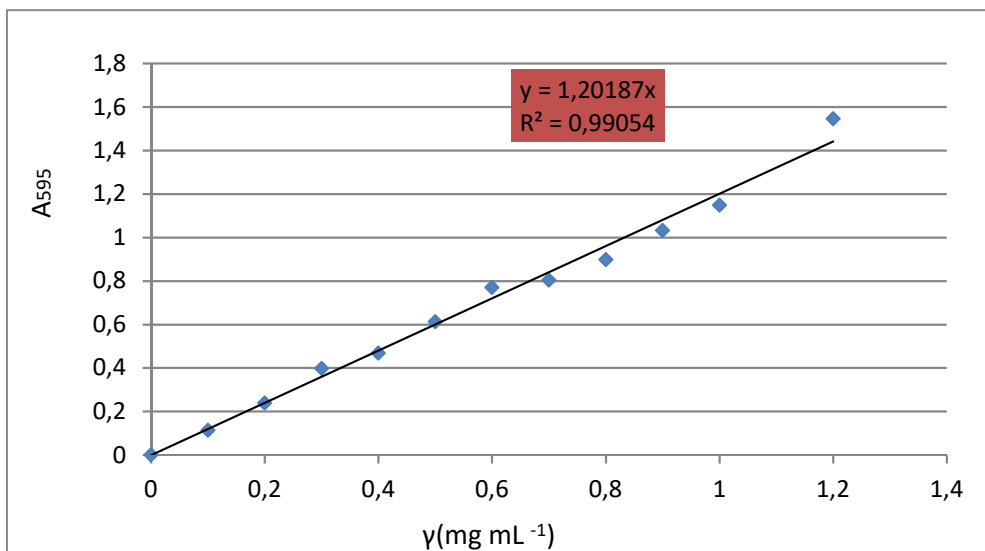
Otkrićem i razvojem eutektičnih otapala, kao zelenije verzije ionskih kapljevina, uočena je njihova prednost naspram ionskih kapljevina, a osobito naspram konvencionalnih organskih otapala. Istaknut je potencijal njihove primjene u sintezi te procesima razdvajanja i analize. Istraživanjem Paive i sur., 2014. utvrdili su da eutektička otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva, što se pripisuje uspostavljanju vodikovih veza između fenolnih spojeva i komponenata otapala. Ukupni fenoli se mogu kvalitativno i kvantitativno određivati primjenom različitih metoda, u ovom su radu ukupni fenolni spojevi

u ekstraktima narančine kore koji su pripremljeni u eutektičkom otapalu ChClGly sa 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) te zakiseljenom etanolu (75 % EtOH, 0,1 % HCl) koji je korišten kao referentno otapalo analizirani UV/Vis spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom. Iz rezultata prikazanih na slici 7 može se zaključiti da pripravljeno eutektičko otapalo ChClGly sa 30 % i 50 % vode pokazuje veću selektivnost prema ekstrakciji polifenolnih spojeva, dok ChClGly sa 80 % vode pokazuje manju selektivnost od referentnog otapala (zakiseljeni etanol). Eutektičko otapalo ChClGly svakako predstavlja bolji izbor otapala za ekstrakciju polifenolnih spojeva budući da su eutektička otapala biorazgradiva, stabilnija te su manje toksična prema okolišu i ljudima u usporedbi s organskim otapalima kao što je etanol.

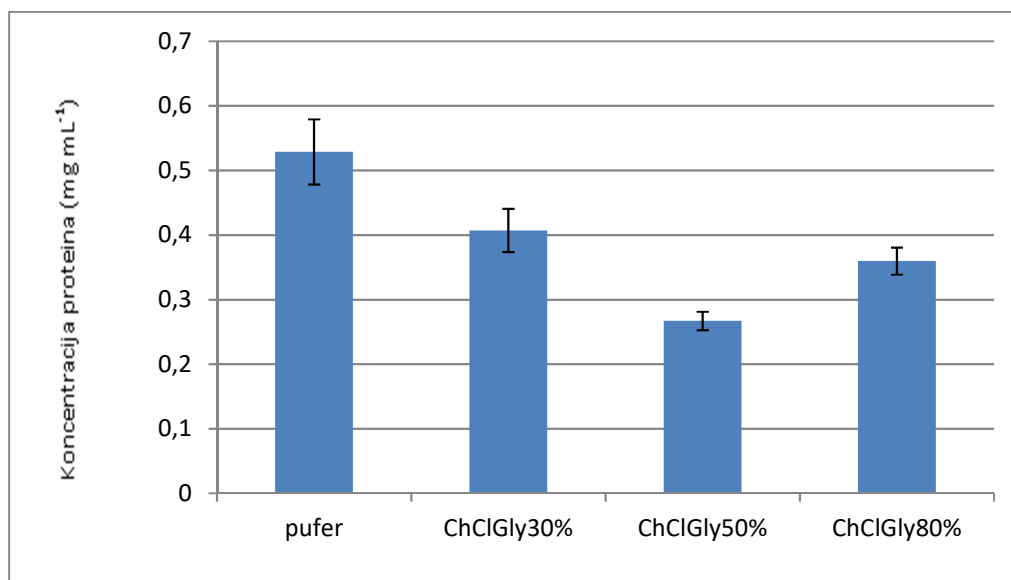
Radošević i sur. (2016) su proveli ekstrakciju polifenolnih spojeva iz pokožice grožđa, a ekstrakti su promatrani s obzirom na ekstrakciju pojedinačnih polifenola. Najveća efikasnost ekstrakcije (+) katehina postignuta je s otapalom kolin-klorid:fruktoza a zatim slijede kolin-klorid:jabučna kiselina > kolin-klorid:ksiloza > kolin-klorid:glukoza > kolin-klorid:glicerol. Istraživanjem je utvrđeno da su DES-ovi dostojna zamjena konvencionalnim otapalima s tim da je barem jedan DES postigao veće iskorištenje ekstrakcije polifenolnih spojeva u odnosu na metanol. Može se zaključiti da se ti rezultati podudaraju s našima gdje se otapalo kolin-klorid:limunska kiselina pokazalo selektivnije od zakiseljenog etanola (70 %, v/v) dok druga otapala pokazuju sličnu ili nižu selektivnost. Naime, DES-ovi imaju sposobnost tvorbe vodikovih veza između komponenata otapala i polifenolnih spojeva i posljedično se povećava kapacitet otapanja istih (Zhang i sur., 2012; Radošević i sur., 2016).

4.2. Određivanje proteina metodom po Bradfordu

Fizikalno-kemijske metode za određivanje koncentracije proteina se dijele na apsorpcijske i kolorimetrijske metode. Kolorimetrijske metode se baziraju na kemijskoj reakciji proteina sa različitim reagensima pri čemu se razvija karakteristično obojenje otopine. Intenzitet razvijene boje je u određenom opsegu koncentracija proteina proporcionalan koncentraciji proteina, a najpreciznija su mjerenja u središnjem dijelu područja proporcionalnosti. 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

Na temelju prikazanih rezultata (slika 9) može se zaključiti da prirodno eutektičko otapalo ChClGly pokazuje nisku selektivnost prema ekstrakciji proteina u odnosu na pufer. Najmanja koncentracija proteina je ekstrahirana pomoću ChClGly sa 50 % vode, dok je vidljivo da je koncentracija proteina ekstrahirana pomoću pufera gotovo dvostruko veća. Od ispitanih eutektičkih otapala najboljim se pokazalo ChClGly s 30 % vode.

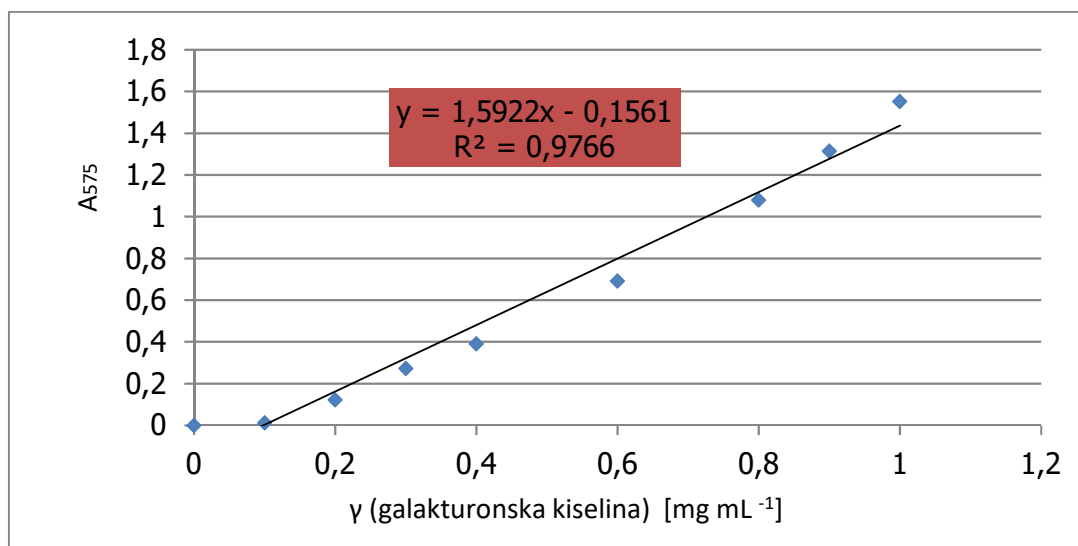
Zeng i sur. (2014) pripremili su 4 vrste prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida s kojima su proveli ekstrakciju albumina iz goveđeg seruma te su dokazali da na samu ekstrakciju utječu parametri poput vremena i temperature ekstrakcije. Rezultati su pokazali da hidrofobne interakcije i vodikove veze igraju važnu ulogu u prijenosu tvari ,a

DES-ovi pokazuju potencijal u pružanju novih mogućnosti u ekstrakciji proteina. Iako u ovom radu prema dobivenim rezultatima, referentno otapalo pufera ekstrahiralo je 0,53 mg proteina po mL otapala što je veća koncentracija proteina od ekstrahiranih proteina u eutektičkom otapalu ChClGly30% koja iznosi 0,41 mg po mL otapala.

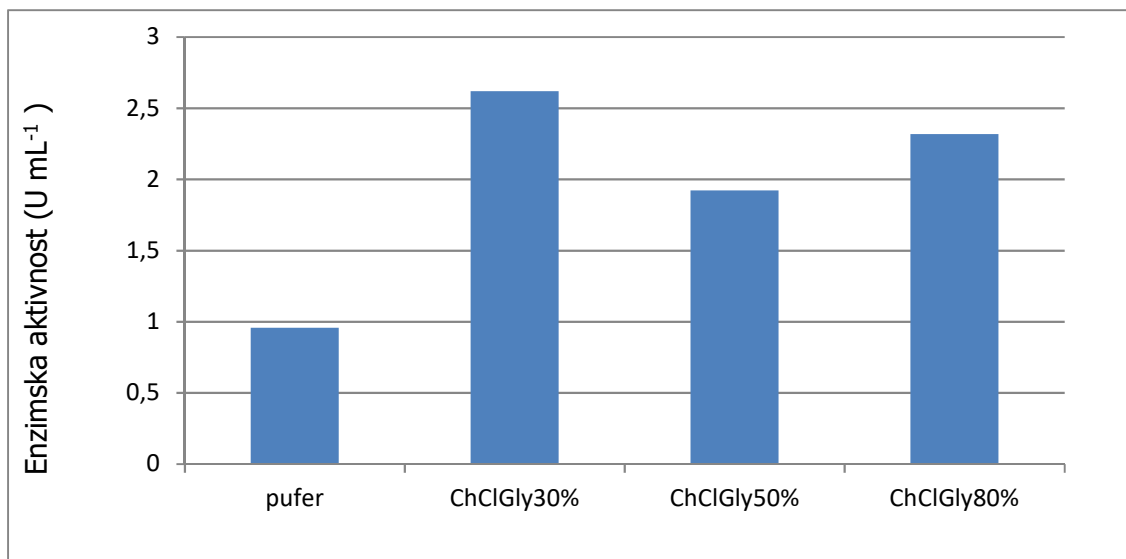
4.3. Određivanje aktivnosti pektin-esteraze u ekstraktima kore naranče

Pektin je ugljikohidrat, polisaharid (poligalaktouronid) i prisutan je gotovo u svim vrstama voća. Najčešće se nalazi u kori (pokožici) ploda i srži ploda. Prosječni udio pektinskih tvari u voću kreće se oko 0,1 – 0,3 %, a pojedine vrste voća bogate su pektinskim tvarima poput kore naranče koja sadrži 3 – 5 %. Zbog velikog udjela pektina u narančinoj kori koja zaostane u procesu proizvodnje može se upotrijebiti kao sirovina za proizvodnju pektina.

Aktivnost enzima pektin-esteraze u ekstraktima narančine kore određuje na osnovi određivanja koncentracije reducirajućih šećera koji se oslobode nakon inkubacije enzima sa pektinom pomoću 3,5-dinitrosalicilne kiseline čija boja otopine se mijenja iz svijetlo žute u crveno-smeđu. 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

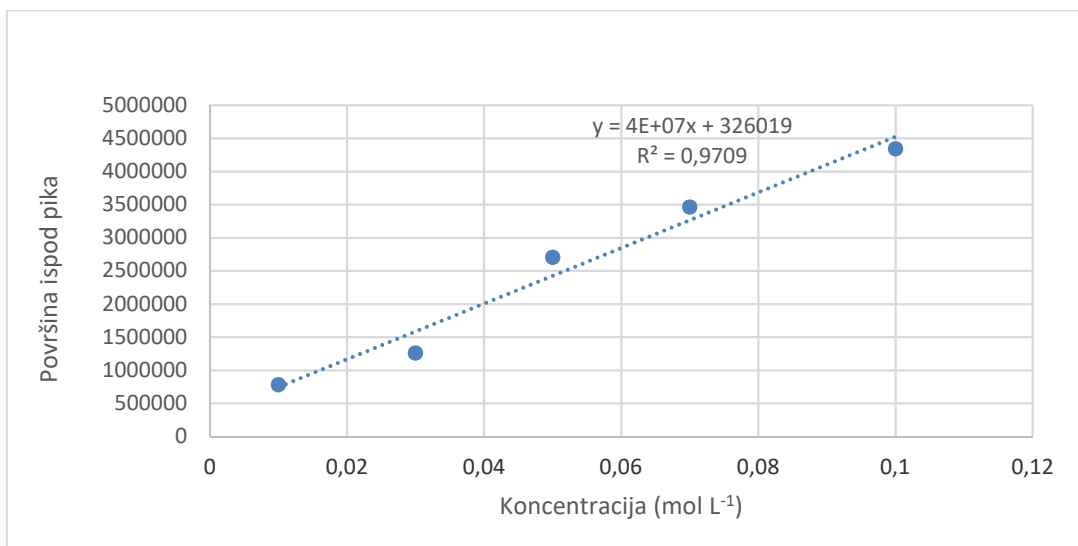
Iz rezultata prikazanih na slici 11 može se zaključiti da je aktivnost enzima pektin-esteraze značajno veća u eutektičkom otapalu ChClGly sa sva 3 udjela vode, nego u puferu. Pektin-esteraza pokazuje najveću aktivnost u eutektičkom otapalu ChClGly sa 30 % vode.

Xu i sur. (2017) objašnjavaju veću aktivnost enzima u eutektičkom otapalu kao posljedicu utjecaja eutektičkog otapala na sekundarnu strukturu enzima.

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

Upotreba zelenih otapala sve se više istražuje u pripravi komercijalno zanimljivih organskih spojeva poput kiralnih alkohola, a koji su važni međuprodukti za sintezu mnogih kiralnih lijekova i kiralnih pomoćnih sredstava (Yadav i sur., 2001). Izazov u njihovoj pripremi vezan je uz činjenicu da postoje *R* i *S* enantiomerna oblika ovih alkohola koji imaju različite strukturne karakteristike te zbog toga mogu imati različite biološke aktivnosti (Liang i sur., 2015). Primjerice, oba enantiomerna oblika koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerske čistoće i asimetrično otvaranje cikličnih anhidrida i epoksida (Frings i sur., 1999), dok se (*R*)-1-feniletanol koristi se kao kiralni građevni blok i kao sintetski intermedijer za fine kemikalije u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji (Suan i Sarmidi, 2004). Takve optički čiste spojeve možemo dobiti kemijskom sintezom ili primjenom enzima kao biokatalizatora (Habulin i Knez, 2009). Enzimi su u prednosti zbog efikasnosti, enantio-

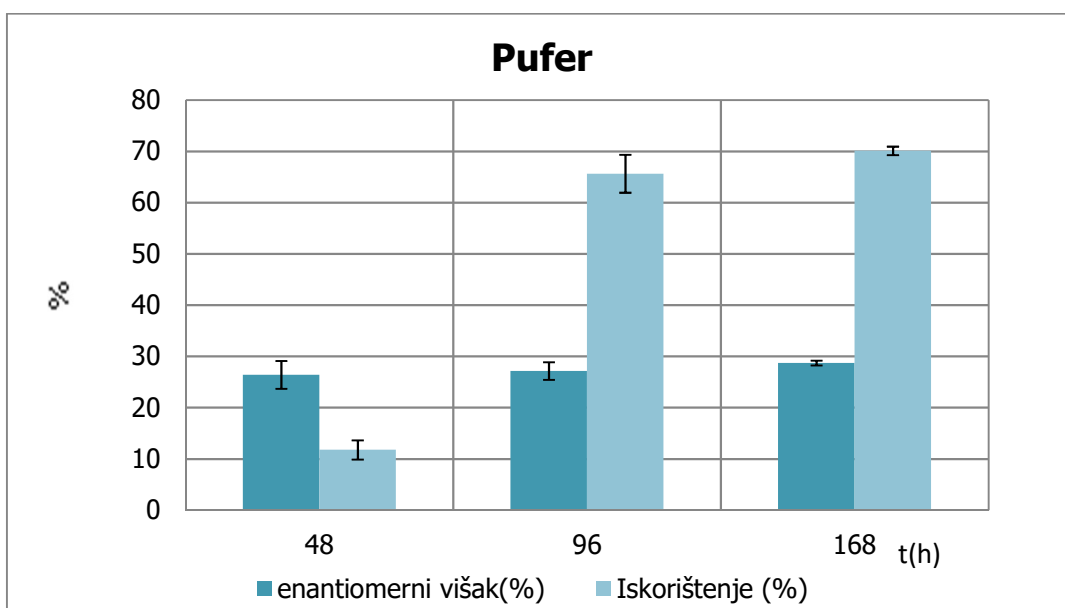
regioselektivnosti te ekološke prihvatljivosti (Cheng i sur., 1996). Reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u eutektičkom otapalu ChClGly sa 30 %, 50 % i 80 % vode i kalij-fosfatnom puferu praćena je ekstrakcijom zaostalog supstrata i nastalih produkata u *n*-heptanu uz snažno miješanje nakon čega je heptanski ekstrakt analiziran plinskom kromatografijom. Dobiveni baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata prikazan je na slici 12.



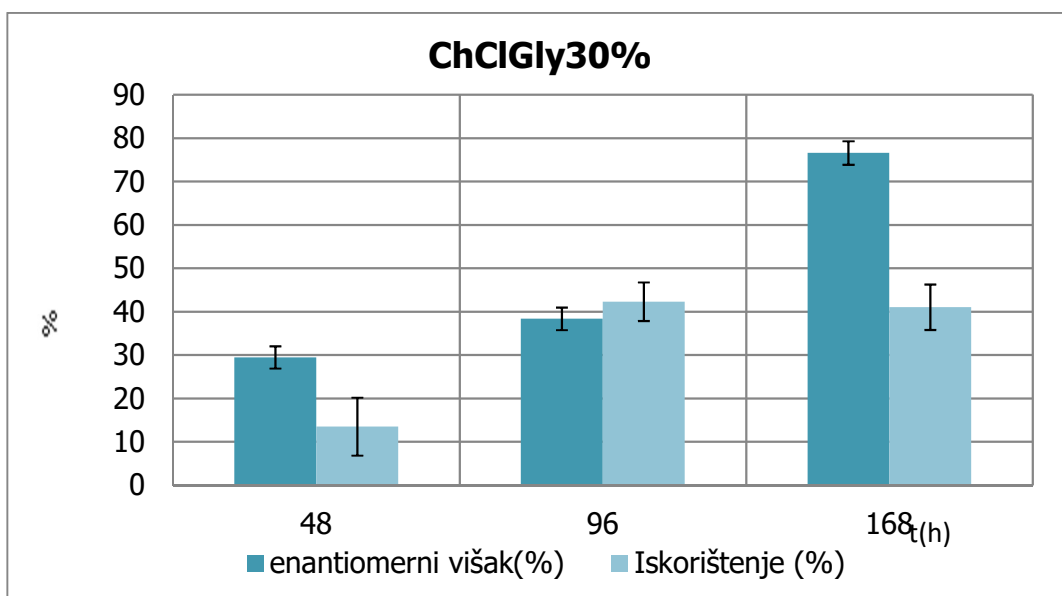
Slika 12. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata

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.

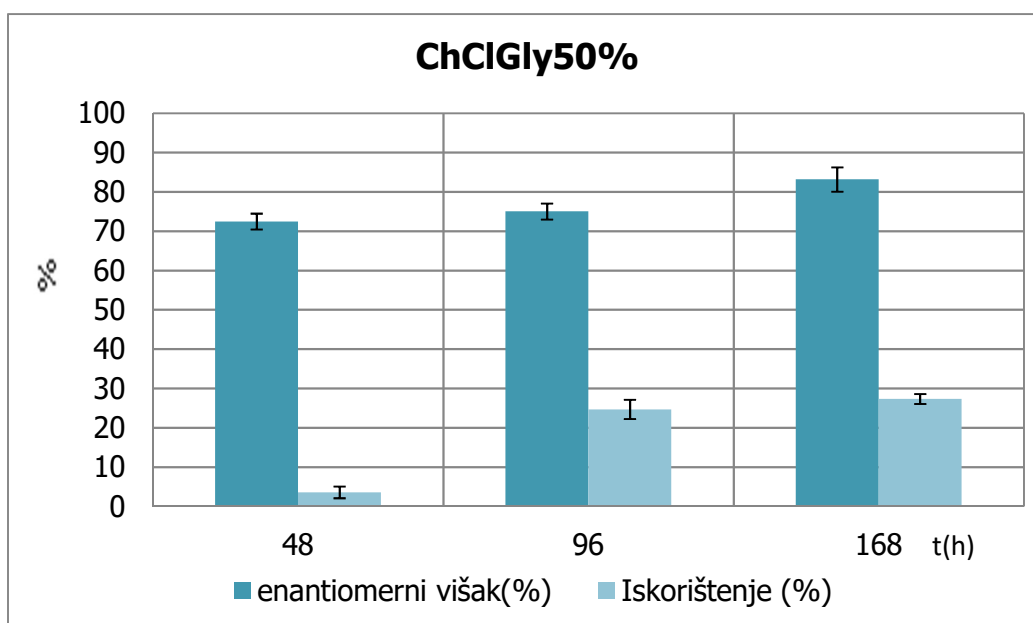
a)



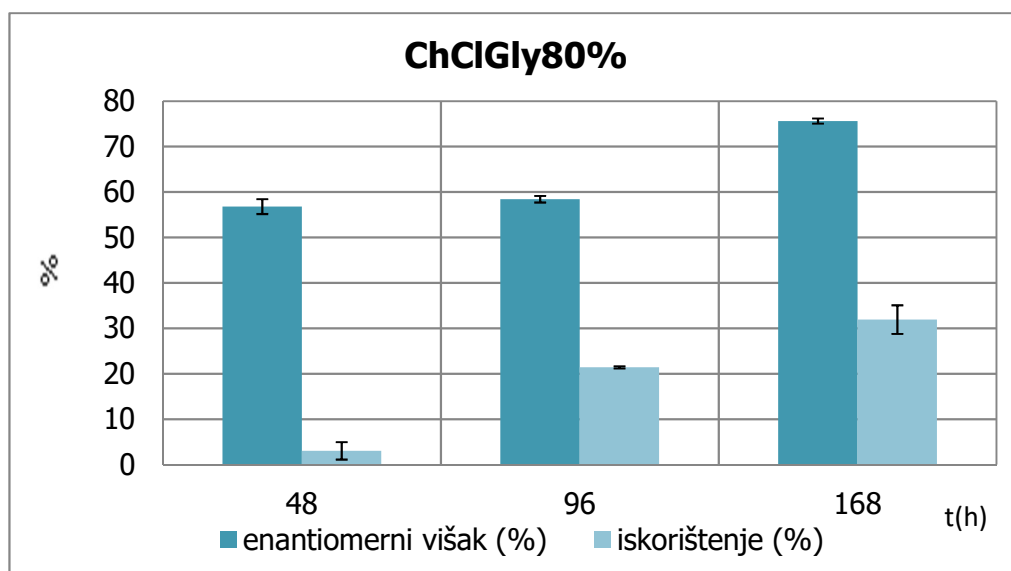
b)



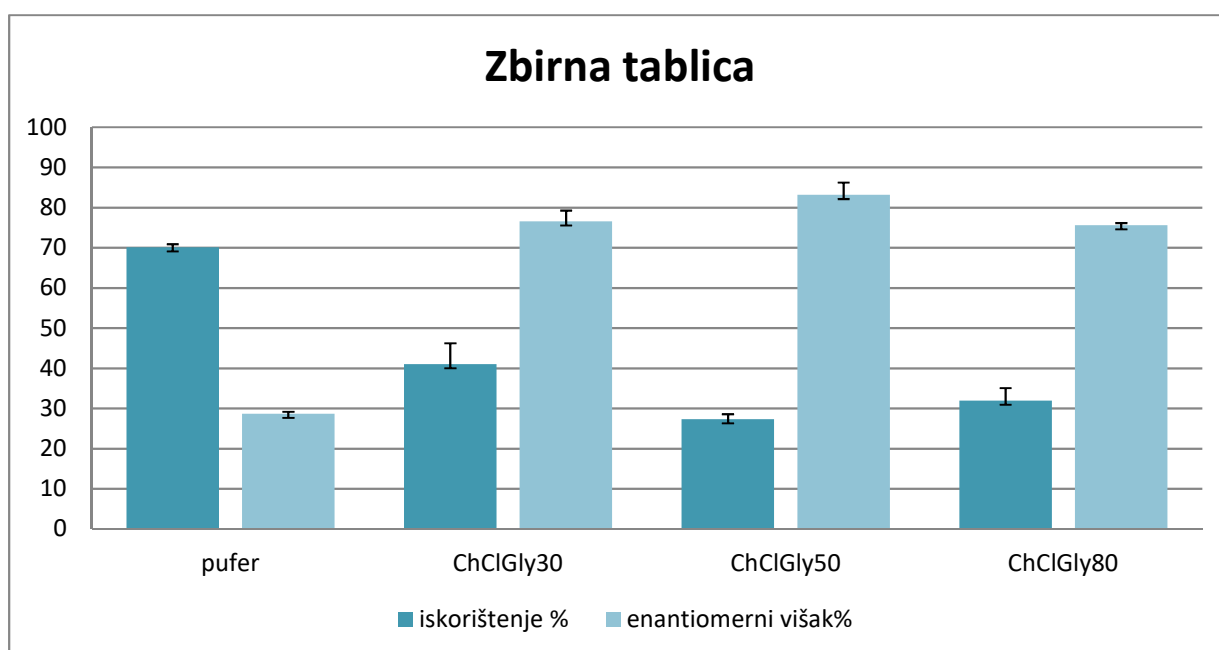
c)



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 ChClGly s 30% vode, c) eutektičkom otapalu ChClGly s 50% vode i d) eutektičkom otapalu ChClGly 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 ChClGly 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).

U kontekstu primjene otpadne narančine kore kao izvora bogatog hidrolitičkim enzimima u ovom radu istražio se potencijal mogućnosti dobivanja (*R*)- odnosno (*S*)-1-feniletanola hidrolizom racemičnog 1-feniletil-acetata. Uspoređujući enantiomerni višak hidrolize u eutektičkom otapalu ChClGly i puferu (slika 14), vidljivo je da se otapalo ChClGly pokazalo učinkovitijim za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata. Različita enantioselektivnost u puferu i eutektičkom otapalu se može objasniti prisutnošću nekoliko hidrolitičkih enzima u narančinoj kori koji su različito inhibirani u eutektičkom otapalu ovisno o karakteristikama eutektičkog otapala te zbog toga imaju različitu enantioselektivnost prema pretvorbi ili (*R*) ili (*S*) ester (Panić i sur., 2018). 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 eutektičkom otapalu ChClGly je značajno viši (>75 %), pri čemu iskorištenje hidrolize ne prelazi 50 %.

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti da zeleno otapalo kolin-klorid:glicerol sa 30 , 50 i 80 % vode (w/w) ima velik potencijal u valorizaciji otpadne narančine kore. Ispitano prirodno eutektičko otapalo je pokazalo pozitivan utjecaj na aktivnost pektin-esteraze što ukazuje na potencijalnu primjenu ovog otapala u enzimski kataliziranim reakcijama. Također ispitano eutektičko 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. Iako je sam koncept valorizacije otpada nastalog preradom naranče kao prehrambene namirnice kao i brojnog organskog otpada sličnih karakteristika područje koje je tek u razvoju, brojni znanstvenici smatraju da će daljnjim istraživanjem i napretkom ta „grana“ *zelene ekonomije* uvelike pridonijeti željenim promjenama smanjenja otpada i očuvanju okoliša.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu je ispitana mogućnost primjene eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol sa 30 , 50 i 80 % vode (w/w) u iskorištavanju potencijala otpadne narančine kore kao sirovine za dobivanje proizvoda sa dodanom vrijednošću. Na osnovi dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Ekstrakcija polifenolnih spojeva iz narančine kore eutektičkim otapalom kolin-klorid:glicerol 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:glicerol. Vidljivo je da pripravljeno prirodno eutektičko otapalo ChClGly sa 30 % i 50 % vode pokazuje veću selektivnost ekstrakcije polifenolnih spojeva, dok ChClGly sa 80 % vode (ekstrahirano 44,26 mg polifenola po gramu narančine kore) pokazuje manju selektivnost od referentnog otapala (zakiseljeni etanol, ekstrahirano 45,13 mg polifenola po gramu narančine kore).

2. Ekstrakcija proteina eutektičkim otapalom kolin-klorid:glicerol sa 30 %, 50 % i 80 % vode pokazala se značajno lošijom u odnosu na pufer što ne ukazuje na mogućnost primjene ispitanog eutektičkog otapala pri ekstrakciji proteina iz narančine kore. Vidljivo je da je koncentracija proteina ekstrahirana pomoću pufera gotovo dvostruko veća, a od ispitanih eutektičkih otapala najboljim se pokazalo ChClGly s 30 % vode.

3. Enzim pektin-esteraza pokazuje značajno veću aktivnost u ispitanom eutektičkom otapalu ChClGly sa sva 3 udjela vode, nego u puferu. Pektin-esteraza pokazuje najveću aktivnost u eutektičkom otapalu ChClGly sa 30 % 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:glicerol veći od 75%.

6.LITERATURA

Anastas P., Eghbali N. (2010) Green Chemistry: Principles and practice. Chemical Society Reviews **39**: str. 301–312.

Angel Siles Lopez, J., Li, Q., Thompson, I.P., 2010. Biorefinery of waste orange peel. Crit. Rev. Biotechnol. **30**, 63–69.

Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A.F., Arora, A., 2017. Bioactives from fruit processing wastes: green approaches to valuable chemicals. Food Chem. **225**, 10–22.

Beccali, M., Cellura, M., Iudicello, M., Mistretta, M., 2009. Resource consumption and environmental impacts of the agrofood sector: life cycle assessment of Italian citrusbased products. *Environ. Manage.* **43**, 707–724.

Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat, F., 2015. Biorefinery of orange peels waste: a new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrason. Sonochem.* **24**, 72–79.

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.

Cerutti, A.K., Beccaro, G.L., Bosco, S., De Luca, A.I., Falcone, G., Fiore, A., et al., 2015. Life cycle assessment in the fruit sector. In: Notarnicola, B., Salomone, R., Petti, L., Renzulli, P.A., Roma, R., Cerutti, A.K. (Eds.), Life Cycle Assessment in the Agri-food Sector: Case Studies, Methodological Issues and Best Practices. *Springer International Publishing, Cham*, pp. 333–388.

Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008) Ultrasound assisted extraction in food analysis. In: Handbook of food analysis instruments, Boca Raton, Florida, USA, Semih Ötleş, str. 85- 103.

Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N. Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 2012, **41**, 1585–1605.

Coltro, L., Mourad, A.L., Kletecke, R.M., Mendonça, T.A., Germer, S.P.M., 2009. Assessing the environmental profile of orange production in Brazil. *Int. J. Life Cycle Assess.* **14**, 656–664.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) Ionske kapljevine – razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem. Ind.* **63** (5-6), 163–171.

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.

Favretto, L. (2004) Basic guidelines for microwave organic chemistry applications. Milestone, Bergamo

Gil- Chávez, J. G., Villa, J.A., Fernando Ayala- Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E.M., González- Aguilar, G.A., 2013. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **12**, 5-23.

Gill, I.; Vulfson, E. Enzymatic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. *Trends Biotechnol.* 1994, **12**, 118–122

Guzmán, J., Mosteo, R., Ormad, M.P., Ovelleiro, J.L., 2015. Combined photo-fenton–SBR processes for the treatment of wastewater from the citrus processing industry. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 391–397.

Janiak, C. (2013) Ionic Liquids for the Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Zeitschrift für Naturforschung B: Journal of Chemical Science* 68b: 1059–1089.

Joshi, O., Grebner, D.L., Khanal, P.N., 2015a. Status of urban wood-waste and their potential use for sustainable bioenergy in Mississippi. *Resour. Conserv. Recyc.* **102**, 20–26

Kärkkäinen J., Preparation and characterization of some ionic liquids and their use in the dimerization reaction of 2-methylpropene, doktorska disertacija, University of Oulu, 2007

Lin, C.S.K., Pfaltzgraff, L.A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E.B., Abderrahim, S., Clark, J.H., et al., 2013. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels: current situation and global perspective. *Energy Environ. Sci.* **6**, 426–464.

Lopezfandino, R.; Gill, I.; Vulfson, E. N. Protease-catalyzed synthesis of oligopeptides in heterogeneous substrate mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, **43**, 1024–1030.

Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., et al., 2015. Citrus fruits as a treasure

Mamma, D., Christakopoulos, P., 2014. Biotransformation of citrus by-products into value added products. *Waste Biomass Valorization* **5**, 529–549.

Matharu, A.S., de Melo, E.M., Houghton, J.A., 2016. Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes. *Bioresour. Technol.* **215**, 123–130.

McCormick, K., Kautto, N., 2013. The bioeconomy in Europe: an overview. *Sustainability* **5**, 2589

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

Negro, V., Mancini, G., Ruggeri, B., Fino, D., 2016a. Citrus waste as feedstock for biobased products recovery: review on limonene case study and energy valorization. *Bioresour. Technol.* **214**, 806–815.

Ngoc, U.N., Schnitzer, H., 2009. Sustainable solutions for solid waste management in Southeast Asian countries. *Waste Manage.* **29**, 1982–1995.

Paggiola, G., Stempvoort, S.V., Bustamante, J., Barbero, J.M.V., Hunt, A.J., Clark, J.H., 2016. Can bio-based chemicals meet demand? Global and regional case-study around citrus waste-derived limonene as a solvent for cleaning applications. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* **10**, 686–698.

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.

Pfaltzgraff, L.A., De bruyn, M., Cooper, E.C., Budarin, V., Clark, J.H., 2013. Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. *Green Chem.* **15**, 307–314.

Radošević K., Ćurko N., Gaurina Srček V., Cvjetko-Bubalo M., Tomašević M., Kovačević Ganić K., Radojčić-Redovniković, I. (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extracants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT Food Science and Technology* **73**: 45 – 51.

Ravindran, R., Jaiswal, A.K., 2016a. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* **199**, 92–102.

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

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.

Taghizadeh-Alisaraei, A., Hosseini, S.H., Ghobadian, B., Motevali, A., 2017. Biofuel production from citrus wastes: a feasibility study in Iran. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **69**, 1100–1112.

Veggi, P. C., Martinez, J., Meireles, M. A. A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Microwave - assisted extraction for bioactive compounds: Theory and practice (Chemat, F., Cravotto, G., ured.), Springer Science+Business Media, New York, str.15-52.

Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.

Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., 2011. Physicochemical characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. *J. Food Process. Preserv.* **35**, 264–271.

Waheed, M.A., Jekayinfa, S.O., Ojediran, J.O., Imeokparia, O.E., 2008. Energetic analysis of fruit juice processing operations in Nigeria. *Energy* **33**, 35–45

Wei, Y., Li, J., Shi, D., Liu, G., Zhao, Y., Shimaoka, T., 2017. Environmental challenges impeding the composting of biodegradable municipal solid waste: a critical review. *Resour. Conserv. Recy.* **122**, 51–65.

Yang J., Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis, *J. Biotechnol.* **144** (2009) 12–22.

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

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.

Zhang, Q. H.; Vigier, K. D.; Royer, S.; Jerome, F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* 2012, **41**, 7108–7146.

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 koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Novak

ime i prezime studenta