

Valorizacija otpadne kore naranče primjenom prirodnih eutektskih otapala

Grubišić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:253673>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Ana Grubišić

1016/MB

**VALORIZACIJA OTPADNE KORE
NARANČE PRIMJENOM
PRIRODNIH EUTEKTIČKIH
OTAPALA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Marine Cvjetko Bubalo te uz pomoć dr.sc. Manuele Panić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (br. 7712) pod nazivom „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

VALORIZACIJA OTPADNE KORE NARANČE PRIMJENOM PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Ana Grubišić, 1016/MB

Sažetak: Valorizacija otpada nastalog preradom agruma, koji uključuje i otpadnu koru naranče, predstavlja održiv način dobivanja proizvoda dodane vrijednosti. Kako bi ekstrakcija bioaktivnih spojeva bila ekološki prihvatljiva, poželjna je upotreba zelenih otapala poput prirodnih eutektičkih otapala. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene četiri prirodna eutektička otapala s udjelima vode od 30, 50 i 80 % (v/v) u valorizaciji otpadne kore naranče. Prirodna eutektička otapala pokazala su se učinkovitijim za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz kore naranče u odnosu na zakiseljeni etanol, no nedovoljno učinkovitim za ekstrakciju D-limonena u usporedbi s *n*-heptanom korištenim kao referentno otapalo. Osim toga, pokazalo se da je ekstrakcija proteina iz kore naranče primjenom prirodnih eutektičkih otapala učinkovita uz izbor otapala odgovarajućeg sastava i udjela vode. Ispitana je i mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala kao otapala za enantioselektivnu hidrolizu (kinetičku rezoluciju) (*R,S*)-1-feniletil-acetata uz primjenu kore naranče kao izvora hidrolitičkih enzima, pri čemu su hidrolitički enzimi pokazali znatno veću enantioselektivnost u prirodnim eutektičkim otapalima u odnosu na pufer kao referentno otapalo.

Ključne riječi: *valorizacija otpada, prirodno eutektičko otapalo, kora naranče, (R,S)-1-feniletil-acetat, proizvodi dodane vrijednosti*

Rad sadrži: 53 stranice, 20 slika, 2 tablice, 104 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *Dr.sc. Manuela Panić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. *Kristina Radošević*
2. Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo*
3. Izv.prof.dr.sc. *Danijela Bursać Kovačević*
4. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek* (zamjena)

Datum obrane: 17. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

VALORIZATION OF ORANGE PEEL WASTE USING NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Ana Grubišić, 1016/MB

Abstract: Valorization of citrus processing waste, which includes orange peel waste, is a sustainable way to obtain value-added products. To make the extraction of bioactive compounds environmentally friendly, the use of green solvents such as natural deep eutectic solvents (NADES) is preferred. In this paper, the possibility of using four NADES with 30, 50, and 80 % of water (w/w) in the valorization of orange peel waste has been investigated. NADES proved to be more efficient for the extraction of polyphenolic compounds from orange peel compared to acidified ethanol, however they were not efficient enough for the extraction of D-limonene compared to *n*-heptane used as a reference solvent. In addition, the extraction of proteins from orange peel using NADES has proved to be efficient by using NADES with appropriate composition and water content. The possibility of using NADES as solvents for enantioselective hydrolysis (kinetic resolution) of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate with the use of orange peel as a source of hydrolytic enzymes was also examined, where hydrolytic enzymes showed significantly higher enantioselectivity in NADES compared to the buffer used as a reference solvent.

Keywords: *valorization of waste, natural deep eutectic solvent, orange peel, (*R,S*)-1-phenylethyl acetate, value-added products*

Thesis contains: 53 pages, 20 figures, 2 tables, 104 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

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

Technical support and assistance: *PhD. Manuela Panić*

Reviewers:

1. PhD. *Kristina Radošević*, Assistant professor
2. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
3. PhD. *Danijela Bursać Kovačević*, Associate professor
4. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 17 July 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. VALORIZACIJA KORE AGRUMA KAO OTPADA PREHRAMBENE INDUSTRIJE	2
2.1.1. Otpad kore agruma	2
2.1.2. Važnost valorizacije otpada citrusa	3
2.1.3. Primjena otpada kore agruma kao ekološki održivog materijala	4
2.1.4. Prednost zelene ekstrakcije nad tradicionalnim metodama ekstrakcije za dobivanje visokovrijednih spojeva	5
2.2. ZELENA OTAPALA	7
2.2.1. Ionske kapljevine	8
2.2.2. Eutektička otapala	9
2.3. KINETIČKA (DINAMIČKA) REZOLUCIJA	12
2.3.1. Primjena hidrolitičkih enzima u kinetičkoj (dinamičkoj) rezoluciji	14
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Biljni materijal	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Oprema i uređaji	18
3.2. METODE	18
3.2.1. Priprema prirodnih eutektičkih otapala	18
3.2.2. Priprema ekstrakata kore naranče	19
3.2.3. Određivanje pH-vrijednosti i polarnosti pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala	20
3.2.4. Hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz otpadne narančine kore	20
3.2.5. Određivanje proteina metodom po Lowryju	23
3.2.6. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom	24
3.2.7. Određivanje sadržaja D-limonena u ekstraktima narančine kore	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. PRIPREMA PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA	27
4.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE	29
4.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE	32
4.4. UDIO D-LIMONENA U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE	34
4.5. KINETIČKA REZOLUCIJA (<i>R,S</i>)-1-FENILETIL-ACETATA PRIMJENOM HIDROLITIČKIH ENZIMA IZ KORE NARANČE	37
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Porast svjetske populacije dovodi do povećane potrebe za hranom i energijom, pri čemu glavni problem predstavljaju iscrpljivanje fosilnih resursa kao primarnog izvora energije te stvaranje ogromnih količina otpada iz prehrambene industrije. Neučinkovito gospodarenje otpadom i upotreba energije iz fosilnih goriva dovode do zagađenja okoliša te doprinose globalnom zatopljenju i klimatskim promjenama (Panuccio i sur., 2016). Stoga su s ciljem zaštite okoliša znanstvenici razvili pristup zelene kemije koja je posvećena razvoju kemijskih procesa i proizvoda koji će smanjiti ili eliminirati upotrebu i stvaranje opasnih tvari (Anastas i Eghbali, 2010). Otpad prehrambene industrije predstavlja obnovljiv izvor energije te ima potencijal kao sirovina za proizvodnju goriva i kemikalija. Valorizacija ovog otpada ima veliku važnost u smanjenju njegovog negativnog utjecaja na okoliš. Na svjetskoj razini godišnje se proizvede preko 70 milijuna tona naranči, a njihovom preradom nastaju značajne količine otpada, posebice otpadne kore naranče (Ozturk i sur., 2018b).

Kora naranče bogata je bioaktivnim spojevima poput pektina, esencijalnih ulja, proteina i antioksidativnih spojeva poput polifenola i karotenoida, čija se ekstrakcija uz pristup zelene kemije može provesti na ekološki prihvatljiv način. Kako bi ekstrakcija bila u skladu s principima zelene kemije potrebno je koristiti ekološki prihvatljiva zelena otapala. Među zelenim otapalima posebno se ističu prirodna eutektička otapala koja su nehlapljiva, netoksična, biorazgradiva i jednostavna za pripremu (Paiva i sur., 2014). Kora naranče također sadrži hidrolitičke enzime koji kataliziraju enantioselektivnu hidrolizu (kinetičku rezoluciju) racemičnih estera pri čemu se dobivaju enantiomerno čisti sekundarni alkoholi od industrijskog značaja. Primjena prirodnih eutektičkih otapala kao medija za provođenje reakcije, uz hidrolitičke enzime kore naranče kao biokatalizatore, predstavlja zeleni pristup za dobivanje enantiomerno čistih spojeva (Panić i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene četiri prirodna eutektička otapala s udjelima vode od 30, 50 i 80 % (v/v) u valorizaciji otpadne kore naranče kako bi se dobili proizvodi dodane vrijednosti. U tu svrhu ispitana je mogućnost ekstrakcije proteina, polifenola i D-limonena iz narančine kore primjenom prirodnih eutektičkih otapala. Također je ispitan potencijal primjene kore naranče kao izvora hidrolitičkih enzima za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata uz primjenu prirodnih eutektičkih otapala kao medija za provođenje reakcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VALORIZACIJA KORE AGRUMA KAO OTPADA PREHRAMBENE INDUSTRIJE

2.1.1. Otpad kore agruma

Agrumi su najkonzumiranije voće na svijetu zahvaljujući njihovoj bogatoj prehrambenoj vrijednosti i pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Štoviše, oni sadrže niz sekundarnih metabolita poput flavonoida, alkaloida, kumarina, limonoida, karotenoida, fenolnih kiselina i esencijalnih ulja. Ovi sekundarni metaboliti od vitalnog su značaja za ljudsko zdravlje zbog svojih aktivnih svojstava koji uključuju antioksidativne, protuupalne, antikancerogene, neuroprotektivne učinke te kardiovaskularne zaštitne učinke (Lv i sur., 2015). Agrumi pripadaju rodu Citrus koji uključuje nekoliko važnih plodova poput slatke naranče (koja čini preko 61 % svjetske proizvodnje), mandarine, limuna, limete i grejpa (Mamma i Christakopoulos, 2014; Lin i sur., 2013).

Citrusi (agrumi) se uzgajaju u više od 100 zemalja diljem svijeta, no Brazil, Kina, Indija, Meksiko, Španjolska i SAD proizvode preko dvije trećine agruma u svijetu (Köse i Bayraktar, 2018; Zema i sur., 2018; Paggiola i sur., 2016). Godišnje se proizvede preko 100 milijuna tona agruma pri čemu nastane preko 15 milijuna tona otpada (Lin i sur., 2013). U 2016. proizvedeno je više od 124 milijuna tona citrusa, od čega se oko 50-60 % konzumiralo kao svježe voće, a preostalih 40-50 % namijenjeno je industrijskom procesiranju (Zema i sur., 2018). Agrumi se uglavnom konzumiraju kao svježe voće ili kao prerađeni sok (Köse i Bayraktar, 2018). Osim toga, mogu se koristiti i u prehrambenoj industriji, pićima, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji kao aditivi, začini, kozmetički sastojci i kemoprofilaktički lijekovi (Lv i sur., 2015).

Za preradu se koristi otprilike 1/3 agruma, a pritom nastaje oko 50-60 % otpada citrusa (Siles-López i sur., 2010). Ovaj otpad uglavnom se sastoji od kore, pulpe i sjemenki, a karakteriziran je niskom pH vrijednošću (3-4), visokim udjelom organske tvari (95 % ukupne količine) i visokim udjelom vode (80-90 %) (Boukroufa i sur., 2014; Ruiz i Flotats, 2014; Siles-López i sur., 2010). Otpad agruma izvor je niza vrijednih nusproizvoda, uključujući neke masti, slobodne šećere (glukoza, fruktoza, saharoza), organske kiseline, polimere ugljikohidrata (celuloza, hemiceluloza i pektin), enzime (pektin-esteraza, fosfataza, peroksidaza), flavonoide, esencijalna ulja (uglavnom D-limonen), pektin i pigmente (karotenoidi, ksantofili) (Boukroufa i sur. 2014). Takav otpad i nusproizvodi nastali u prehrambenoj industriji smatraju se dobrim

izvorom prirodnih spojeva s visokom dodanom vrijednošću, poput vlakana, aditiva, boja, proteina i biološki aktivnih spojeva (npr. polifenoli, karotenoidi, esencijalna ulja) (Putnik i sur., 2017).

2.1.2. Važnost valorizacije otpada citrusa

Proizvodnja i potrošnja hrane uzrokuju znatna opterećenja za okoliš tijekom životnog ciklusa proizvoda. Smatra se da najveći ekološki teret u proizvodnji voća predstavlja upravljanje štetočinama i bolestima, navodnjavanje, žetva, upravljanje tlom, gnojidba te zaštita kultura od vremenskih nepogoda. Osim toga, poljoprivredno-prehrambeni sektor dovodi i do velike potrošnje resursa (energije i vode) te emisije stakleničkih plinova, što je potrebno smanjiti radi stabilizacije klimatskih promjena (Cerutti i sur., 2015; Beccali i sur., 2009).

Industrija prerade agruma stvara značajne količine otpadnih voda i otpada te dovodi do emisije tvari koje zagađuju atmosferu. Jedan od velikih ekoloških problema kod postrojenja za preradu agruma je što ta postrojenja zahtijevaju velike količine vode (primjerice prilikom čišćenja pogona), čime se posljedično stvaraju velike količine otpadne vode (Guzmán i sur., 2014). Međutim, karakterizacijom otpadnih voda iz postrojenja za preradu agruma otkriveno je da sadrže znatne količine vrijednih spojeva, poput vlakana, fenolnih spojeva, šećera i organskih kiselina, koji ekstrakcijom postaju korisni nusproizvodi (Viuda-Martos i sur., 2010). Nadalje, energija koja se koristi u poljoprivredno-prehrambenom sektoru obično iznosi oko 20 % ukupno potrošene energije u razvijenim zemljama. Istraživanja su pokazala da je ovaj sektor pri vrhu s obzirom na potrošnju energije, a time i po doprinosu na potencijal globalnog zagrijavanja budući da dovodi do emisije stakleničkih plinova (Beccali i sur., 2009). Potrošena energija uzrokuje veliko opterećenje okoliša i u industriji za preradu citrusa. Analiza energije za proizvodni pogon naranče pokazala je da je ukupni energetska intenzitet potreban za proizvodnju narančinog soka $1,12 \text{ MJ kg}^{-1}$ i to uglavnom u obliku električne energije i pare. Pri tome se najveći udio energije troši tijekom pasterizacije soka, a zatim prilikom pakiranja soka u ambalažu (Waheed i sur., 2008).

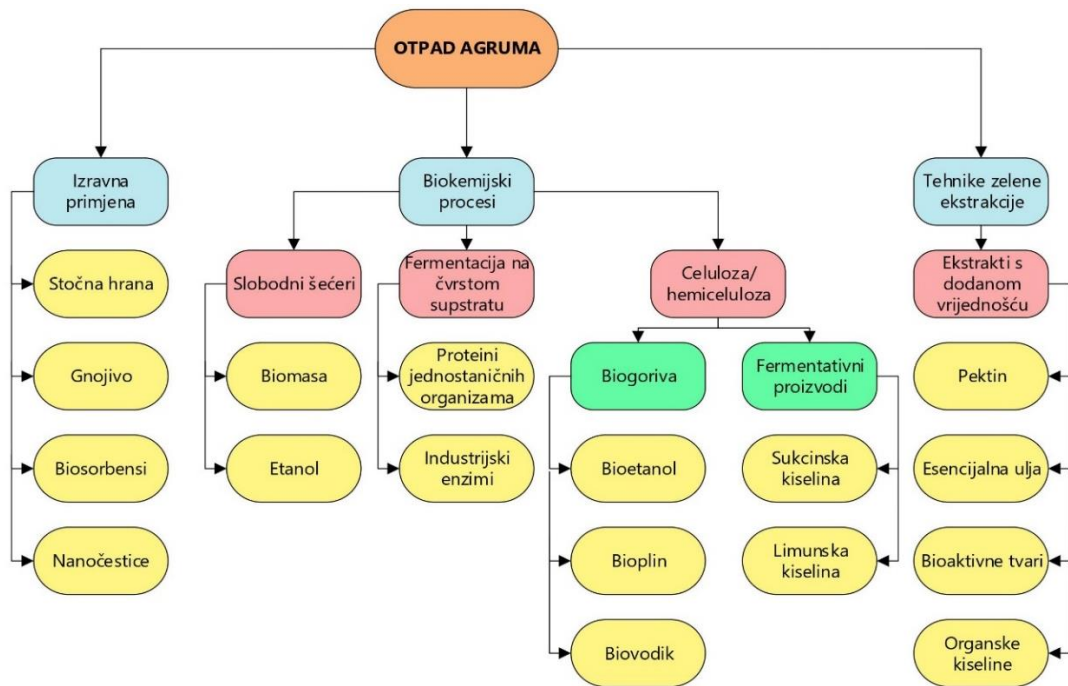
Rastuća svjetska populacija dovodi do sve veće potražnje za proizvodnjom hrane i prerađivačkom industrijom koja je povezana s njom, a posljedično i do stvaranja velikih količina prehrambenog otpada (Ravindran i Jaiswal, 2015). Stoga je i u prerađivačkoj industriji agruma najvažnija briga gospodarenje čvrstim otpadom agruma. Iako dio čvrstog otpada proizlazi iz materijala za pakiranje i materijala koji ne odgovara specifikacijama postrojenja za

proizvodnju soka, glavni otpad nastao prilikom prerade agruma je organske prirode, a sastoji se od kore, sjemenki i ostataka lišća (Satari i Karimi, 2018). Glavni ekološki problem otpada kore agruma je visoka fermentabilnost zbog visokog sadržaja ugljikohidrata, što može ubrzati njegovu razgradnju ako se njime pažljivo ne upravlja (Lin i sur., 2013). Budući da tradicionalne prakse gospodarenja otpadom poput spaljivanja i odlaganja otpada nisu ekonomski privlačne, sve veću pažnju dobivaju alternativne metode usmjerene na dobivanje energije i resursa (Negro i sur., 2017; Wei i sur., 2017).

2.1.3. Primjena otpada kore agruma kao ekološki održivog materijala

Pitanja zaštite okoliša i rastuća svjetska populacija u kombinaciji sa sve većom svjetskom potražnjom za energijom, kemikalijama i materijalima izazvali su ogroman interes za valorizaciju otpada iz lanca prehrambene industrije (Ravindran i Jaiswal, 2015; Lin i sur., 2013). Stvaranje prehrambenog otpada je neizbježno, ali šteta okoliša uzrokovana stvaranjem stakleničkih plinova i onečišćenjem podzemnih voda uslijed razgradnje otpada hrane na odlagalištima može se u velikoj mjeri izbjeći (Ravindran i Jaiswal, 2015). Važno je ublažiti negativne učinke otpada agruma na okoliš uvođenjem shema valorizacije koje vode do integrirane platforme za biorafineriju. Valorizacijom otpadne kore agruma dobivaju se derivati koji će se moći koristiti kao izvor energije (npr. fermentacijom) te druge korisne kemikalije pomoću fizikalnih tretmana (Satari i Karimi, 2018). Osim toga, valorizacija otpada kore agruma može doprinijeti razvoju bioekonomije. Bioekonomija je novi koncept koji je skovala Europska komisija 2012. godine, a zasniva se na mogućnostima pretvorbe obnovljivih bioloških resursa u ekonomski održive proizvode i bioenergiju. Zbog negativnih učinaka proizvodnje velike količine otpada kore agruma na okoliš te zbog doprinosa proizvoda dobivenih iz tog otpada na bioekonomiju, valorizacija otpada kore agruma je nužna (Satari i Karimi, 2018).

Valorizacija narančine kore kao otpada prehrambene industrije provodi se kroz tri platforme: 1) izravna primjena kore kao nanočestica, biosorbensa, stočne hrane i gnojiva; 2) primjena kore kao supstrata za biokemijske procese dobivanja biogoriva, proteina, industrijskih enzima i drugih važnih fermentativnih proizvoda (npr. limunske kiseline); 3) ekstrakcija prirodnih spojeva s dodanom vrijednošću (npr. esencijalna ulja, pektin, organske kiseline, flavonoidi, karotenoidi) (slika 1) (Satari i Karimi, 2018).



Slika 1. Shema valorizacije otpada agruma (prilagođeno prema Satari i Karimi, 2018)

Primjenom biorafinerijskog pristupa može se u potpunosti iskoristiti potencijal otpada agruma. Biorafinerija se definira kao postrojenje koje integrira procese pretvorbe biomase i opremu za proizvodnju goriva, energije i kemikalija iz otpadne biomase. Budući da otpadna kora agruma sadrži mnogo spojeva s dodanom vrijednošću, biorafinerija može valorizirati ovaj poljoprivredni otpad – proizvodnjom više proizvoda biorafinerija može maksimizirati vrijednosti dobivene iz biomase kao sirovine, istodobno stvarajući manje količine otpada (Mamma i Christakopoulos, 2014; Siles-López i sur., 2010). Primjer biorafinerije opisali su Boukroufa i sur. (2014) koji su proveli ekstrakciju esencijalnih ulja, polifenola i pektina iz otpada narančine kore integracijom zelenih procesa poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom, tako kombinirajući ekološki održive procese i procese koji daju visok prinos spojeva.

2.1.4. Prednost zelene ekstrakcije nad tradicionalnim metodama ekstrakcije za dobivanje visokovrijednih spojeva

Ekstrakcija je postupak koji ima široku primjenu u raznim proizvodnim procesima u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, a definira se kao tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima (Chemat i sur., 2012). Uobičajeni procesi ekstrakcije u industrijskom mjerilu imaju

velike nedostatke kao što su nedovoljno iskorištenje procesa, dugo vrijeme ekstrakcije, visoka potrošnja energije uslijed intenzivnog miješanja i/ili zagrijavanja te upotreba hlapivih organskih otapala (Rombaut i sur., 2014). Zbog toga se uvodi pristup zelene ekstrakcije koji može prevladati navedene nedostatke i osigurati uštedu energije te veće prinose (Putnik i sur., 2017; Chemat i sur., 2012).

Zelena ekstrakcija temelji se na pronalasku i uspostavi ekstrakcijskih procesa koji će smanjiti potrošnju energije, omogućiti upotrebu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih proizvoda te osigurati siguran i visokokvalitetan ekstrakt (Chemat i sur., 2012). Zelene metode ekstrakcije uključuju ekstrakciju superkritičnim fluidima, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima te ekstrakciju primjenom enzima (Filly i sur., 2016). Također, zbog brojnih nedostataka organskih otapala, za primjenu u ekstrakciji sve se više razmatraju zelena otapala poput agro-otapala (etanol, glicerol, metil esteri masnih kiselina) te ionskih kapljevina i eutektičkih otapala (Sharma i sur., 2017; Chemat i sur., 2012). Primjerice, Ozturk i sur. (2018b) su za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz narančine kore koristili eutektička otapala kolin-klorid: glicerol i kolin-klorid: etilen glikol pri čemu su ta otapala pokazala bolji prinos ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim otapalima (30 %-tna vodena otopina etanola).

Ekstrakcija superkritičnim fluidima najčešće se koristi za ekstrakciju esencijalnih ulja i bioaktivnih spojeva iz biljaka. Među korištenim superkritičnim otapalima najveću primjenu ima CO₂ jer je netoksičan, lako dostupan te ima nisku kritičnu temperaturu (30.9 °C), što je posebice pogodno za ekstrakciju termolabilnih spojeva (Lopresto i sur., 2019; Suetsugu i sur., 2013). Primjenom superkritičnog CO₂ za ekstrakciju esencijalnih ulja iz japanskog citrusa, Suetsugu i sur. (2013) su dobili 13 puta veći prinos ekstrakcije u odnosu na konvencionalnu metodu hladnog prešanja. U sličnom istraživanju, ekstrakcija superkritičnim CO₂ se pokazala boljom za ekstrakciju esencijalnih ulja iz narančine kore u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju zbog boljeg prinosa i kraćeg vremena ekstrakcije (Xhaxhiu i Wenclawiak, 2015).

Metode zelene ekstrakcije, posebice ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ili ultrazvukom koriste se za ekstrakciju prirodnih spojeva iz raznih izvora. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima koristi mikrovalnu energiju za zagrijavanje otapala koje je u kontaktu s čvrstim uzorkom kako bi se analiti iz uzorka razdijelili u otapalo. Glavne prednosti upotrebe ove metode su kraće vrijeme ekstrakcije, manja potrošnja otapala, ušteda energije i bolji prinos proizvoda uz niže troškove (Zema i sur., 2018; Sharma i sur., 2017). Ekstrakcija

potpomognuta mikrovalovima primijenjena je za ekstrakciju polifenola iz narančine kore, pri čemu je dobiven veći prinos polifenola u odnosu na druge korištene metode zelene ekstrakcije (Nayak i sur., 2015). Nadalje, primjenom metode hidrodestilacije potpomognute mikrovalovima, Bustamante i sur. (2016) pokazali su da je ta metoda učinkovita alternativa i za ekstrakciju esencijalnih ulja iz otpada kore citrusa.

Ultrazvučna ekstrakcija se zasniva na principu akustične kavitacije koja može oštetiti stanične stijenke biljnog materijala i tako potaknuti ubrzanje unutarnje difuzije i povećanje prijenosa mase što dovodi do oslobađanja bioaktivnih spojeva (Medina-Torres i sur., 2017; Putnik i sur., 2017). Ekstrakcije potpomognute ultrazvukom nude prednosti u pogledu iskorištenja i selektivnosti, s kraćim vremenom i boljom kvalitetom ekstrakcije, visokom reproducibilnošću, manjom potrošnjom otapala i primjenom nižih temperatura ekstrakcije (Chemat i sur., 2017; Esclapez i sur., 2011). Polanco-Lugo i sur. (2019) su primjenom ultrazvučne ekstrakcije dobili visokokvalitetan pektin iz mandarine i grejpa, a ista metoda se pokazala učinkovitom i za ekstrakciju flavonoida iz otpada grejpa u usporedbi s konvencionalnom metodom ekstrakcije (kruto-tekuće), pri čemu je dobiven veći prinos ekstrakcije uz nižu temperaturu i kraće vrijeme ekstrakcije (Garcia-Castello i sur., 2015).

Osim ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima, razvijaju se i nove hibridne metode s ciljem poboljšanja prinosa ekstrakcije. Primjerice, kombinacije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom s nekim inovativnim tehnikama, poput mikrovalova, ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom i ekstrakcijom superkritičnim fluidom, smatraju se jednim od najperspektivnijih hibridnih tehnika (Chemat i sur., 2017).

2.2. ZELENA OTAPALA

U mnogim se industrijskim procesima svakodnevno koriste velike količine hlapivih organskih otapala za koje se procjenjuje da čine gotovo 2/3 svih industrijskih emisija širom svijeta. Primjena otapala u raznim reakcijskim sustavima je neizbježna zbog njihove ključne uloge u otapanju krutih tvari, prijenosu mase i topline, utjecaja na viskoznost te postupcima izdvajanja i pročišćavanja proizvoda (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Cvjetko Bubalo i sur., 2014b). Međutim, većina konvencionalnih organskih otapala je toksična, zapaljiva i korozivna, a njihova hlapivost i topljivost doprinijele su zagađenju zraka, vode i tla. Uz to, njihovo recikliranje i ponovna upotreba često su povezani s energetski zahtjevnom destilacijom uz znatne gubitke (Anastas i Eghbali, 2010). Zbog negativnih učinaka ovih otapala na okoliš i

zdravlje ljudi, sve više istraživanja je usmjereno na dobivanje novih, neškodljivih i ekološki prihvatljivijih otapala koja su u skladu s principima zelene kemije (Cvjetko Bubalo i sur., 2014b; Patel i Lee, 2012). Osnove zelene kemije sažete su u dvanaest načela, a sugeriraju da kemijski proizvodi i procesi trebaju biti dizajnirani tako da smanje ili potpuno uklone primjenu i stvaranje opasnih tvari (Panić i sur., 2017; Anastas i Eghbali, 2010).

Prema dvanaest načela zelene kemije zeleno otapalo treba zadovoljiti brojne kriterije, kao što su netoksičnost, biorazgradivost, nezapaljivost, nehlapivost, dostupnost, a uz to moraju biti i jeftini i jednostavni za rukovanje i recikliranje (Gu i Jérôme, 2013). S obzirom na navedeno, prvi izbor za otapalo je voda koja se već koristi u brojnim industrijskim procesima. Međutim, slaba topivost mnogih organskih i organometalnih spojeva u vodi, kao i visoki zahtjevi za energijom za uklanjanje vode nakon završetka procesa u kojima se koristi, ograničavaju njenu primjenu. Stoga se sve više pažnje posvećuje razvoju novih zelenih otapala, među kojima se ističu ionske kapljevine, superkritični fluidi, otapala dobivena iz prirodnih i obnovljivih izvora te eutektička otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.2.1. Ionske kapljevine

Ionske kapljevine (eng. *Ionic liquids*, ILs) su organske soli koje se u potpunosti sastoje od iona te imaju talište ispod 100 °C. Svojstva koja čine ionske kapljevine zelenim otapalima uključuju njihovu zanemarivu hlapivost, nezapaljivost, visoku ionsku vodljivost te izvrsnu stabilnost (toplinsku, kemijsku i elektrokemijsku) koja omogućava njihovo recikliranje i ponovnu uporabu (Cvjetko Bubalo i sur., 2014a; Patel i Lee, 2012; Chiappe i sur., 2010). Kationi u ionskim kapljevinama obično su različito supstituirane velike organske molekule niske simetrije koje sadrže pozitivno nabijen atom dušika, sumpora ili fosfora (npr. *N*, *N*-dialkilimidazolijev, *N*-alkilpiridinijev, *N*, *N'*-dialkilpirazolijev, alkilamonijev, alkil fosfonijev, alkilsulfonijev kation) povezan s organskim ili anorganskim anionima. Tipični anioni su halogenidi, tetraflourborat, heksafluorfosfat, nitrat, sulfat, alkilsulfati, alkilsulfonati i drugi. Postupak pripreme ionskih kapljevinama 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., 2014b).

Zbog velikog broja različitih kombinacija aniona i kationa postoji veliki broj strukturno različitih ionskih kapljevinama. Osim toga, fizikalno-kemijska svojstva ionskih kapljevinama mogu se mijenjati jednostavnim promjenama iona, pri čemu su kationi odgovorni za fizikalna

svojstva kapljevine poput tališta, viskoznosti i gustoće, a anioni utječu na kemijska svojstva i reaktivnost (Plechkova i Seddon, 2008; Earle i Seddon, 2002). Zahvaljujući ovim izmjenama kationa i aniona, a time i fizikalno-kemijskih svojstava otapala, ionske kapljevine se mogu dizajnirati za određenu primjenu ili mogu imati određeni skup svojstava. Modifikacijama strukture ovih otapala može se utjecati na talište, topljivost određenih komponenti, kiselost, hidrofobnost, gustoću, viskoznost, topljivost u vodi i organskim otapalima i ekstrakcijski kapacitet te tako izravno utjecati na uspješnost primjene ionske kapljevine. Ionske kapljevine nazivaju se i dizajniranim otapalima (eng. *Designer solvents*), a to znači da se njihova svojstva mogu prilagoditi potrebama određenog procesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2014b; Earle i Seddon, 2002).

Primjena ionskih kapljevine ne samo da omogućava poboljšanje postojećih i uspostavljanje novih visokoučinkovitih procesa, već i vođenje procesa koji su sigurniji za ljude i okoliš (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Chiappe i sur., 2010). Ionske kapljevine imaju primjenu u elektrokemiji, organskoj sintezi i (bio) katalizi, analitičkoj kemiji, nanotehnologiji, separacijskim postupcima te u razvoju farmaceutika i funkcionalnih kapljevine (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Ferlin i sur., 2013). Prednost primjene ionskih kapljevine kao otapala u odnosu na klasična organska otapala je u poboljšanoj aktivnosti, selektivnosti i stabilnosti (bio) katalizatora, izvrsnom otapanju supstrata te promjeni reakcijskih odnosa (Yang, 2009). Osim toga, ionske kapljevine se zbog niskog tlaka para i toplinske stabilnosti mogu relativno jednostavno regenerirati nakon procesa uz neznatne gubitke (Cvjetko Bubalo i sur., 2014b). Međutim, „zeleni“ aspekt ovih otapala često se osporava budući da su mnoga istraživanja pokazala toksičnost i vrlo slabu biorazgradivost većine ionskih kapljevine. Ovi nedostaci, zajedno s visokom cijenom ionskih kapljevine, ometaju njihovu širu komercijalnu primjenu. (Kim i sur., 2016; Durand i sur., 2013; Tang i Row, 2013).

2.2.2. Eutektička otapala

Kako bi se prevladali nedostaci ionskih kapljevine došlo je do razvoja nove generacije otapala koja se zovu jaka eutektička otapala. Eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic solvents*, DES) su smjesa dviju ili više komponenti koje se povezuju intermolekularnim vodikovim vezama, tvoreći tako eutektičku smjesu koja ima talište niže od onog svake pojedinačne komponente (Dai i sur., 2013a; Hayyan i sur., 2013; Zhang i sur., 2012). Ova otapala najčešće se temelje na kolin-kloridu i spojevima koji su donori vodikove veze poput karboksilnih kiselina, amida, alkohola i ugljikohidrata (npr. urea, glicerol, limunska kiselina, sukcininska

u biokatalizi. Štoviše, pokazalo se da su aktivnost, stabilnost i selektivnost enzima poput lipaza, proteaza i epoksid hidrolaza poboljšani korištenjem eutektičkih otapala kao reakcijskog medija (Kim i sur., 2016). Zbog važnosti biokatalize i potrebe za poboljšanjem imobilizacije, stabilizacije i recikliranja biokatalizatora kako bi se smanjili troškovi procesa, eutektička otapala se smatraju zelenim otapalima koja se mogu koristiti kao otapala u biokatalizi (Clouthier i Pelletier, 2012).

Komponente eutektičkih otapala mogu donirati ili prihvatiti elektrone ili protone kako bi tvorili vodikove veze, što povećava njihovu sposobnost otapanja (Durand i sur., 2013). Zahvaljujući ovoj činjenici, eutektička otapala, posebice prirodna eutektička otapala (eng. *Natural deep eutectic solvents*, NADES) koja se sastoje od prirodnih metabolita (npr. šećera, organskih kiselina, aminokiselina), koriste se kao otapala za ekstrakciju mnogih prirodnih spojeva različite polarnosti. Učinkovitost ekstrakcije otapala ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, posebice polarnosti i viskoznosti (Achkar i sur., 2019; Dai i sur., 2014). Glavni nedostatak prirodnih eutektičkih otapala u usporedbi s konvencionalnim otapalima je njihova velika viskoznost koja ometa učinkovitost ekstrakcije otapala jer dovodi do usporenog prijenosa mase. Budući da na viskoznost utječu udio vode i temperatura (viskoznost se smanjuje porastom temperature), ovaj nedostatak može prevladati dodatkom određene količine vode (Dai i sur., 2013b; Durand i sur., 2013). Dai i sur. (2013b) proučavali su ekstrakciju fenolnih spojeva iz šafranike koristeći različita prirodna eutektička otapala pri čemu su otkrili da ta otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva zbog vodikovih veza koje nastaju između fenolnih spojeva i molekula eutektičkog otapala. Optimiziranjem svih parametara (poput viskoznosti, polarnosti i temperature) autori su također zabilježili veći prinos ekstrakcije fenolnih spojeva primjenom prirodnih eutektičkih otapala u odnosu na konvencionalna otapala poput vode i etanola. Također, Morrison i sur. (2009) primijetili su da je topljivost slabo topljivih spojeva poput benzojeve kiseline, grizeofulvina, danazola, itrakonazola 5 do 22 000 puta veća u eutektičkim otapalima nego u vodi. Ovo pokazuje potencijal primjene eutektičkih otapala u ekstrakciji bioaktivnih molekula za njihovu primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, agrokemijskoj i farmaceutskoj industriji (Paiva i sur., 2014; Dai i sur., 2013b).

2.3. KINETIČKA (DINAMIČKA) REZOLUCIJA

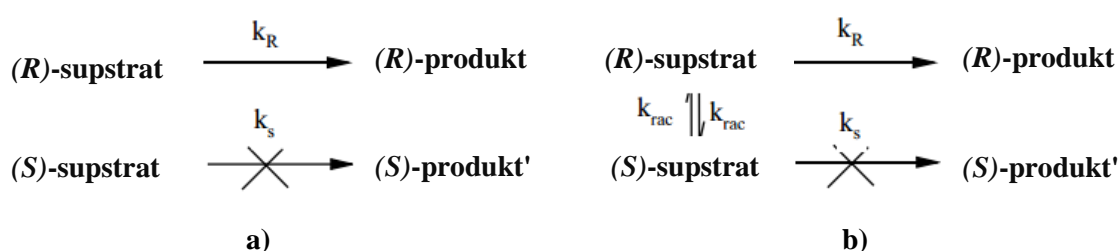
Priprava enantiomerno obogaćenih ili enantiomerno čistih spojeva poput amina, alkohola, epoksida i karboksilnih kiselina, jedno je od glavnih područja istraživanja zbog različite bioaktivnosti i bioraspoloživosti enantiomera istog spoja, a što je od izrazite važnosti u farmaceutskoj i poljoprivrednoj industriji te industriji finih kemikalija (Varga i sur., 2017; Martín-Matute i Bäckvall, 2007). Iako je dostupno nekoliko kemijskih metoda za proizvodnju optički aktivnih kiralnih spojeva, biološki pristupi kao što su biokataliza i biokonverzija povoljniji su zbog njihove visoke učinkovitosti, blagih reakcijskih uvjeta, stereospecifičnosti i malog utjecaja na okoliš (Varga i sur., 2017).

Jedna od metoda dobivanja enantiomerno čistih spojeva je rezolucija racemata, odnosno razdvajanje enantiomera iz njihove ekvimolarne smjese fizikalnim ili kemijskim metodama. U industrijskim procesima upravo je rezolucija racemata dominantna metoda za dobivanje enantiomerno čistog produkta u industrijskoj sintezi, a može provesti neposrednom kristalizacijom, kristalizacijom diastereomera, kromatografskim metodama te kinetičkom rezolucijom (Ghanem, 2004).

Kinetička rezolucija (eng. *Kinetic resolution*, KR) se definira kao proces u kojem se dva enantiomera racemične smjese prevode u produkt različitim brzinama (Pellissier, 2011). Dakle, racemična smjesa se podvrgava razdvajanju primjenom kiralnog sredstva pri čemu jedan od enantiomera racemata reagira brže od drugog i selektivno se prevodi u produkt, dok drugi enantiomer zaostaje. Kiralno sredstvo trebalo bi biti prisutno u katalitičkim količinama, a može biti biokatalizator (enzim ili mikroorganizam) ili kemokatalizator (kiralna kiselina ili baza ili čak kiralni metalni kompleks) (Ghanem, 2004). Tijekom kinetičke rezolucije enantiomerna čistoća supstrata i produkta se mijenja kako reakcija napreduje (De Miranda i sur., 2015; Ahmed i sur., 2012).

Ovakva konvencionalna kinetička rezolucija često osigurava učinkovit put za dobivanje enantiomerno čistih ili obogaćenih spojeva. Međutim, taj postupak ima ograničenje maksimalnog teorijskog prinosa od 50 % jer reagira samo jedan od dva enantiomera (De Miranda i sur., 2015; Ahmed i sur., 2012; Gotor-Fernández i Gotor, 2007). Postoji nekoliko načina za prevladavanje tog ograničenja, kao što su primjena prokiralnih ili meso spojeva, stereoinverzija neželjenog enantiomera (preostalog neizreagiranog supstrata), racemizacija i reciklacija neželjenog enantiomera te dinamička kinetička rezolucija (Ghanem, 2004).

Dinamička kinetička rezolucija (eng. *Dynamic kinetic resolution*, DKR) kombinira kinetičku rezoluciju s *in situ* racemizacijom neželjenog neizreagiranog enantiomera (slika 3). Proces započinje s kinetičkom rezolucijom gdje se jedan od enantiomera brzo prevodi u proizvod ostavljajući drugi enantiomer neizreagiranim. Potom, kako se tijekom enantioselektivne reakcije brzo reagirajući enantiomer troši, ravnoteža (R)-/(S)- se stalno ponovno podešava racemizacijom sporo reagirajućeg enantiomera. Proces je „nestatičan“ zbog čega se primjenjuje izraz dinamička kinetička rezolucija. Za razliku od kinetičke rezolucije, DKR može dati enantiomerno čisti spoj u 100 %-tnom teorijskom prinosu i s enantiomernim viškom (*ee*) od 100 % (De Miranda i sur., 2015; Humphrey i sur., 2014; Ahmed i sur., 2012).



Slika 3. a) Konvencionalna kinetička rezolucija (maksimalni prinos -50 %); b) Dinamička kinetička rezolucija s teorijskim 100 %-tnim prinosom (Ghanem, 2004)

Da bi DKR bila učinkovita, korak kinetičke rezolucije mora biti ireverzibilan i mora imati visok enantiomerni omjer ($K_R \gg K_S$, $E > 20$), a brzina reakcije racemizacije mora biti jednaka ili veća od brzine reakcije kinetičke rezolucije ($K_{rac} > 10 K_R$). Racemizacija supstrata može se provesti termički, kemijski, biokatalitički ili spontano, a metode racemizacije koje se u blagim uvjetima mogu provesti u jednom koraku pogodne su za DKR (De Miranda i sur., 2015; Humphrey i sur., 2014).

Enzimi su izvrsni katalizatori budući da su sposobni prihvatiti niz složenih molekula kao supstrate te su jako selektivni jer kataliziraju reakcije s jedinstvenim enantio- i regio-selektivnostima. Tako visoka selektivnost omogućuje učinkovite reakcije s malo nusproizvoda, što čini enzime ekološki prihvatljivim alternativama konvencionalnim kemijskim katalizatorima (Schmid i sur., 2001). Za organske reakcije kao što je rezolucija racemičnih spojeva, koriste se biokatalizatori i to uglavnom hidrolitički enzimi i oksidoreduktaze, upravo zbog svoje izvrsne selektivnosti i ekološke prihvatljivosti (Nakamura i Matsuda, 2004).

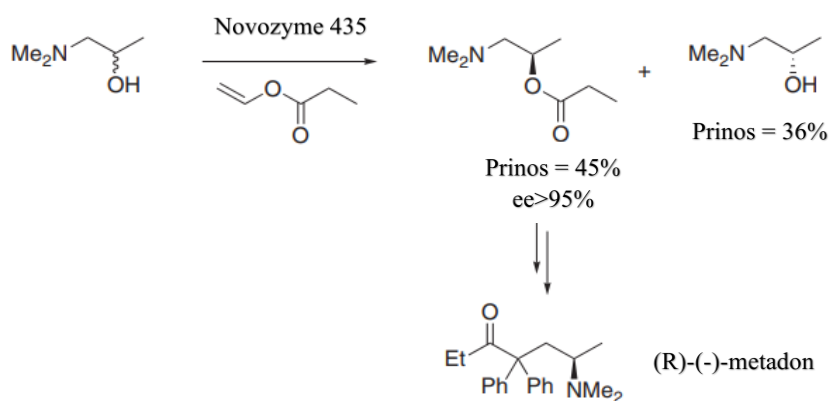
2.3.1. Primjena hidrolitičkih enzima u kinetičkoj (dinamičkoj) rezoluciji

Hidrolitički enzimi poput lipaza, esteraza i proteaza naširoko se koriste kao katalizatori u enantioselektivnim sintezama. Kao što im sam naziv govori, hidrolaze kataliziraju hidrolizu, ali i stvaranje/sintezu estera i amida (Nakamura i Matsuda, 2004; Hanefeld, 2003). Ovi enzimi imaju široku primjenu zbog svoje visoke stabilnosti, široke supstratne specifičnosti, visoke raspoloživosti te zato što ne zahtijevaju prisutnost kofaktora (Gotor-Fernández i Gotor, 2007; Nakamura i Matsuda, 2004).

Među hidrolazama, lipaze (EC 3.1.1.3) se smatraju najpopularnijim i najkorisnijim enzimima za asimetrične sinteze zbog svoje visoke enantioselektivnosti i komercijalne dostupnosti (Gotor-Fernández i Gotor, 2007; Nakamura i Matsuda, 2004). Lipaze su hidrolaze sveprisutne u živim organizmima gdje kataliziraju hidrolizu estera masnih kiselina. Osim toga kataliziraju i reverzne reakcije poput esterifikacije, transesterifikacije, aminolize i amidacije (Koeller i Wong, 2001). Lipaze se koriste u kinetičkim rezolucijama racemičnih alkohola, kiselina, estera ili amina te za desimetrizaciju prokiralnih spojeva (Gotor-Fernández i Gotor, 2007). Kinetička rezolucija ima široku primjenu, a u nastavku su prikazane neke od reakcija u kojima dolazi do kinetičke (dinamičke) rezolucije.

2.3.1.1. Kinetička rezolucija alkohola

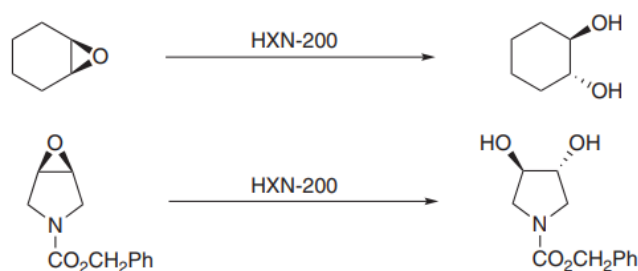
Trenutno postoji na stotine primjera upotrebe lipaza i esteraza za KR racemičnih alkohola, posebice lipaza koje imaju široku supstratnu specifičnost koja im omogućuje sintezu enantiočistih primarnih, sekundarnih ili tercijarnih alkohola s alifatskim, aromatskim i alilnim strukturama (Humphrey i sur., 2014). Sekundarni alkoholi se najčešće koriste kao ciljevi u rezolucijama kataliziranim lipazama. Razlog tome je njihova važnost u organskoj sintezi, ali i zato što lipaze obično pokazuju mnogo veću enantioselektivnost u rezolucijama sekundarnih alkohola u usporedbi s onima primarnih i tercijarnih alkohola, koje je teže postići (Ghanem, 2007; Ghanem i Aboul-Enein, 2005). Primjer upotrebe hidrolaza u rezoluciji sekundarnih alkohola je primjena lipaze B iz *Candida antarctica* (CALB, poznata i kao Novozyme 435) za rezoluciju intermedijara u sintezi (*R*)-metadona (slika 4). Racemični supstrat 1-dimetilamino-propan-2-ol tretiran je s CALB u prisutnosti vinil propionata, koji je služio ne samo kao donor acila, nego i kao otapalo. Reakcijom u preparativnom mjerilu na kraju se dobio (*R*)-ester u prinosu od 45 % i s *ee* od 95 %, a (*S*)-alkohol je dobiven u 36 %-tnom prinosu. Daljnje stereoselektivne transformacije (*R*)-estera rezultirale su učinkovitom sintezom (*R*)-metadona, farmakološki aktivnog enantiomera (Humphrey i sur., 2014).



Slika 4. Lipazom katalizirana rezolucija intermedijara u sintezi (*R*)-metadona (Humphrey i sur., 2014)

2.3.1.2. Hidroliza epoksida

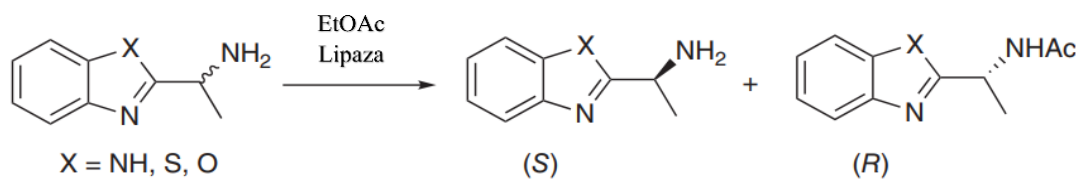
Epoksid hidrolaze pojavile su se kao važni enzimi za asimetričnu sintezu enantiočistih epoksida i diola. Primjerice, epoksid-hidrolaza HXN200 katalizira enantioselektivnu hidrolizu meso epoksida da bi se dobili optički aktivni dioli (slika 5) (Humphrey i sur., 2014).



Slika 5. Enantioselektivna hidroliza epoksida (Humphrey i sur., 2014)

2.3.1.3. Acilacija amina te hidroliza nitrila i amida

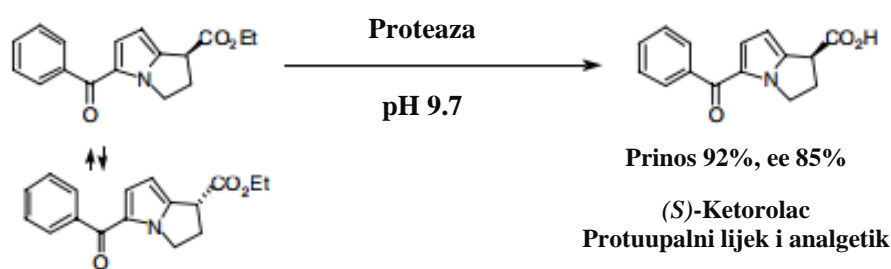
Enantiočisti amini su važni u organskoj sintezi kiralnih građevnih blokova za farmaceutike i agrokemikalije (Ahmed i sur., 2012). Reakcije enantioselektivne acilacije amina te hidrolize amida kataliziraju acilaze, amidaze i lipaze (Nakamura i Matsuda, 2004). Tako se rezolucijom 1-(heteroaril)etamina kataliziranom različitim lipazama dobivaju (*R*)-acetamidi i (*S*)-amini (slika 6) (Humphrey i sur., 2014; Ahmed i sur., 2012).



Slika 6. Enzimski kinetička rezolucija amina (Humphrey i sur., 2014)

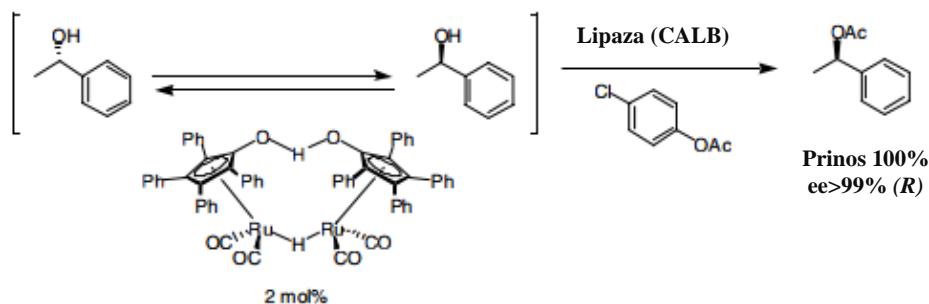
2.3.1.4. Reakcije dinamičke kinetičke rezolucije

Postoje različiti primjeri hidrolize i esterifikacije u kojima je primijenjena dinamička kinetička rezolucija. Primjerice, ova metoda primijenjena je za sintezu (*S*)-Ketorolaca, protuupalnog lijeka i analgetika, enantioselektivnom hidrolizom njegovog etil estera primjenom proteaze dobivene iz *Streptomyces griseus* u blago lužnatim uvjetima (slika 7). Kao produkt reakcije nastao je (*S*)-Ketorolac u prinosu od 92 % i s *ee* od 85 % (Nakano i Kitamura, 2014; Nakamura i Matsuda, 2004).



Slika 7. Sinteza ketorolaca dinamičkom kinetičkom rezolucijom kataliziranom proteazom (Nakamura i Matsuda, 2004)

Kombinacija enzima (biokatalizator) i metalnih katalizatora racemizacije korisna je metoda za dinamičku kinetičku rezoluciju racemičnih spojeva, posebice alkohola i amina (De Miranda i sur., 2015; Kim i sur., 2003). Bäckvall i suradnici proveli su kemoenzimatsku dinamičku kinetičku rezoluciju 1-feniletanola i drugih sekundarnih alkohola kombinacijom imobilizirane *C. antarctica* B lipaze (Novozyme 435) te rutenijevog (II) kompleksa (Shvö katalizator) (slika 8). Rutenijev katalizator je korišten za racemizaciju supstrata, a lipaza za enantioselektivnu esterifikaciju. Prinos je poboljšán s 50 % u kinetičkoj rezoluciji bez racemizacije supstrata na 100 % s racemizacijom kataliziranom metalom (De Miranda i sur., 2015; Nakamura i Matsuda, 2004).



Slika 8. Dinamička kinetička rezolucija 1-feniletanola katalizirana kombinacijom lipaze CALB i Shvö katalizatora (Nakamura i Matsuda, 2004)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

Kora naranči kupljenih na lokalnoj tržnici.

3.1.2. Kemikalije

- (*R*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R,S*)-1-feniletetil-acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Albumin goveđeg seruma, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Demineralizirana voda
- Etanol (96 %), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Eterično ulje naranče (93 %-tni udio D-limonena (v/v)), Pranarom, Ghislenghen, Belgija
- Etilen-glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Fruktaza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij-fosfatni pufer, pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF (KH₂PO₄, Fisher Chemical, UK)
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- *n*-heptan, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Nile crvena solvatokromna proba, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Saharoza, 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
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer 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
- Multimetar pH/ion metar S220, Mettler Toledo
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Tarionik s tučkom
- UV–Vis spektrofotometar, GENESYS 10S, Thermo Fisher Scientific, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, tip SUB 14, Cambridge, UK

3.2. METODE

3.2.1. Priprema prirodnih eutektičkih otapala

U ovom radu sintetizirana su četiri prirodna eutektička otapala s tri različita udjela vode (30, 50 i 80 % (v/v)) tako što su u tikvicu s okruglim dnom dodane preračunate količine komponenti prema određenim molarnim omjerima (tablica 1). Zatim je u tikvicu dodan određeni volumen vode kako bi se dobila prirodna eutektička otapala s 30 %, 50 % i 80 % vode (v/v). Reakcijska smjesa je zagrijana do 50 °C na magnetskoj miješalici te je nakon 2 sata miješanja dobivena homogena, prozirna i bezbojna tekućina.

Tablica 1. Pripravljena prirodna eutektička otapala

Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Udio vode (% , v/v)	Kratica
Kolin-klorid: etilen glikol (ChEG)	1:2	30	ChEG30%
		50	ChEG50%
		80	ChEG80%
Kolin-klorid: glicerol (ChGly)	1:2	30	ChGly30%
		50	ChGly50%
		80	ChGly80%
Glukoza: etilen glikol (GlcEG)	1:2	30	GlcEG30%
		50	GlcEG50%
		80	GlcEG80%
Glukoza: fruktoza: saharoza (GlcFruSah)	1:1:1	30	GlcFruSah30%
		50	GlcFruSah50%
		80	GlcFruSah80%

3.2.2. Priprema ekstrakata kore naranče

Naranče je potrebno prvo oprati pomoću detergenta, površinski sterilizirati 70 %-tnim (v/v) etanolom i zatim isprati demineraliziranom vodom kako bi se uklonile sve površinske nečistoće s kore. Nakon toga naranče se ogule nožićem te se kora nareže na komadiće veličine 5 x 5 x 2 mm. Na analitičkoj vagi odvaži se 2,5 g isjeckane kore naranče te se prenese u tarionik s tučkom u koji se doda 10 mL pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala, kalij-fosfatnog pufera (pH=7) odnosno zakiseljenog etanola (75 % EtOH, 0,1 % HCl). Homogenizacija se vrši pomoću tarionika i tučka 5-10 minuta (slika 9). Nakon toga, dobivena smjesa se filtrira pomoću običnog lijevka za filtraciju i filter papira kako bi se uklonili krupni dijelovi kore naranče. Dobiveni ekstrakti korišteni su za određivanje ukupnih proteina, ukupnih polifenolnih spojeva i D-limonena.



Slika 9. Priprema ekstrakata narančine kore mehaničkom homogenizacijom primjenom tarionika i tučka (vlastita fotografija)

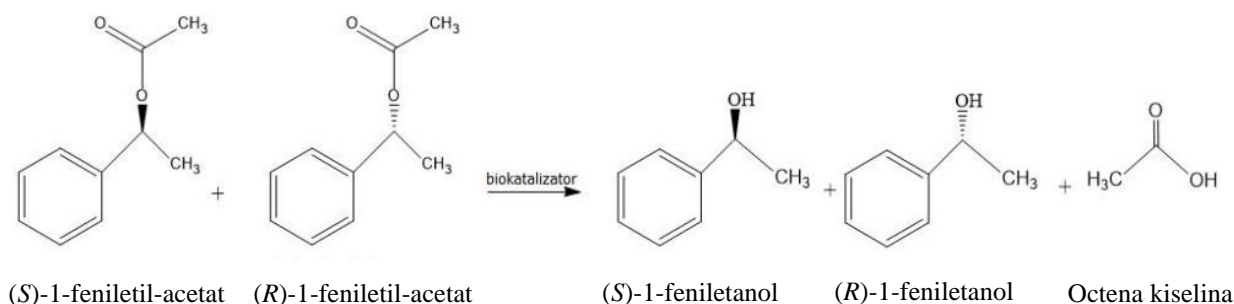
3.2.3. Određivanje pH-vrijednosti i polarnosti pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala

pH-vrijednosti pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala izmjerene su pomoću pH metra pri temperaturi od 25 °C. Polarnost prirodnih eutektičkih otapala određena je pomoću Nile crvene solvatokromne probe prema opisu u Jeong i sur. (2017) i Ogihara i sur. (2004). Ukratko, pripremljena je matična otopina Nile crvene solvatokromne probe koncentracije 1,0 g L⁻¹ u etanolu te je pohranjena na 4 °C. Matična je otopina 100 puta razrijeđena u etanolu i zatim dodana u prirodno eutektičko otapalo, nakon čega se uzorak stavlja u kvarcnu kivetu volumena 1 cm³. Apsorpcijski spektri uzoraka snimljeni su pomoću spektrofotometra.

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

Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata (slika 10) provedena je primjenom hidrolitičkih enzima iz kore naranče u prirodnim eutektičkim otapalima i puferu kao referentnom otapalu. Na analitičkoj vagi odvaži se 0,2 g isjeckane narančine kore te se prenese u Falcon epruvetu zajedno s 1 mL otapala. Reakcija se započne dodavanjem 15 µL supstrata (*R,S*)-1-feniletil-acetata te se provodi pri sobnoj temperaturi na tresilici tijekom 7 dana. Prilikom provođenja reakcije u odabranim vremenskim intervalima izuzimaju se uzorci za analizu koji se pripreme tako da se reakcijskoj smjesi doda 1 mL demineralizirane vode te se smjesa promiješa na vorteksu. Zatim se doda 8 mL *n*-heptana te se provede ekstrakcija preostalog supstrata i nastalih

produkata snažnim miješanjem tijekom 3 minute. Iz heptanskog dijela izuzme se alikvot od 50 μL te se analizira na plinskom kromatografu.



Slika 10. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u puferu te u prirodnim eutektičkim otapalima, izračuna se iskorištenje procesa hidrolize (η) te enantiomerni višak (ee).

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

$$\eta = \frac{c_P}{c_T} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje 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 (%) računa se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{R_{1\text{-feniletanol}} - S_{1\text{-feniletanol}}}{R_{1\text{-feniletanol}} + S_{1\text{-feniletanol}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [2]$$

gdje $R_{1\text{-feniletanol}}$ predstavlja površinu ispod pika (*R*)-1-feniletanola, a $S_{1\text{-feniletanol}}$ površinu ispod pika (*S*)-1-feniletanola.

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

Koncentracija dobivenog produkta (*R,S*)-1-feniletanola c_p (mol L^{-1}) računa se prema jednadžbi:

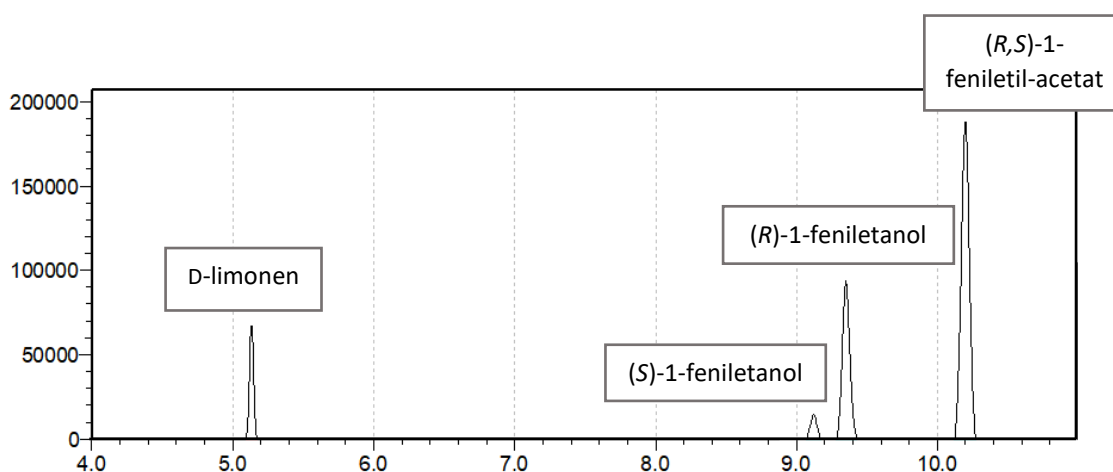
$$c_p = c_{S1} - c_{S2} \quad [3]$$

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-feniletanola i (*R,S*)-1-feniletil-acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom. Na slici 11 prikazan je tipičan plinski kromatogram enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane hidrolitičkim enzimima iz narančine kore.

Kromatografski uvjeti za određivanje:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
- Pokretna faza: Helij (He)
- Protok: 36,5 ml min^{-1}
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura - kolona: gradijentno ($T_1=80\text{ }^\circ\text{C}$, $T_2=120\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta t=15\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), $T_3=125\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta t=2\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), $T_4=140\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta t=1\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$)
- Temperatura injektora $200\text{ }^\circ\text{C}$
- Detektor: temperatura ionskog izvora $200\text{ }^\circ\text{C}$, temperatura sučelja $200\text{ }^\circ\text{C}$
- Vrijeme trajanja analize: 26,37 min



Slika 11. Prikaz tipičnog plinskog kromatograma narančinom korom katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata

Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije (R,S)-1-feniletil-acetata

Pripreme se otopine (R,S)-1-feniletil-acetata u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 i 0,05 mol L⁻¹. 50 μL pripremljenih otopina analizira se na plinskom kromatografu, a zatim se izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanese na ordinatu, dok se na apscisu nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se konstruira dijagram ovisnosti množinske koncentracije (R,S)-1-feniletil-acetata o površini ispod pika te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunaju nepoznate koncentracije (R,S)-1-feniletil-acetata u uzorcima.

3.2.5. Određivanje proteina metodom po Lowryju

Ukupni proteini u ekstraktima narančine kore pripremljenim u četiri prirodna eutektička otapala te puferu kao referentnom otapalu određeni su metodom po Lowryju. Metoda po Lowryju je kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije proteina u otopini. Zasniva se na reakciji Cu²⁺ iona s peptidnim vezama proteina pri čemu dolazi do redukcije Cu²⁺ u Cu⁺. Zatim se u reakcijsku smjesu dodaje Folin-Ciocalteu reagens koji reagira s Cu⁺-protein kompleksom, kao i s pobočnim lancima tirozina, triptofana i cisteina pri čemu se stvara plavo obojenje otopine s apsorpcijskim maksimumom pri 740 nm.

Izrada baždarnog dijagrama

Kako bi se konstruirao baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina uzoraka nepoznate koncentracije, iz otopine BSA ($\gamma = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) pripremljeno je po 1 mL otopina standardnog niza koncentracija 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,16; 0,2 i 0,4 mg mL⁻¹. Baždarni dijagram se konstruira pomoću računala tako što se koncentracije razrijeđenih otopina goveđeg albumina nanese na apscisu, a izmjerene vrijednosti apsorbancija na ordinatu koordinatnog sustava. Iz dobivene jednadžbe pravca izračunaju se koncentracije ukupnih proteina u uzorcima ekstrakata narančine kore.

Postupak određivanja

U epruvete se otpipetira po 200 μL otopina standardnog niza ili uzorka (ekstrakata narančine kore razrijeđenih 500x demineraliziranom vodom) i doda se 1 mL reagensa C te se

smjesa promiješa na vortex miješalici i ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 15 minuta inkubacije u svaku epruvetu se naglo doda 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa na vortexu te se smjesa inkubira 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije se očita apsorbancija otopina standardnog niza ili uzorka pri valnoj duljini od 740 nm, uz slijepu probu.

3.2.6. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

Ukupan udio polifenolnih spojeva određen je reakcijom s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. U blago lužnatim uvjetima dolazi do oksidacije fenolnih spojeva smjesom fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline pri čemu se one reduciraju u plavo obojeni volframov i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 760 nm, a proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva.

Postupak određivanja

Ukupni polifenolni spojevi određeni su u ekstraktima kore naranče koji su pripremljeni u četiri prirodna eutektička otapala te zakiseljenom etanolu (75 % EtOH, 0,1 % HCl) koji je korišten kao referentno otapalo. Zakiseljeni etanol korišten je kao referentno otapalo jer je pokazano da kiseli medij pogoduje ekstrakciji polifenolnih spojeva iz kore agruma (Mushtaq i sur., 2015). Pripremljeni ekstrakti narančine kore prvo 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 je prethodno razrijeđen 10 puta. Nakon 5 minuta na sobnoj temperaturi doda se 1 mL Na_2CO_3 (75 g L^{-1}), a zatim slijedi termostatanje u vodenoj kupelji na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 minuta. Reakcija se brzo zaustavlja hlađenjem u ledenoj kupelji, nakon čega se na UV/VIS spektrofotometru mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 760 nm (Singleton i sur., 1999).

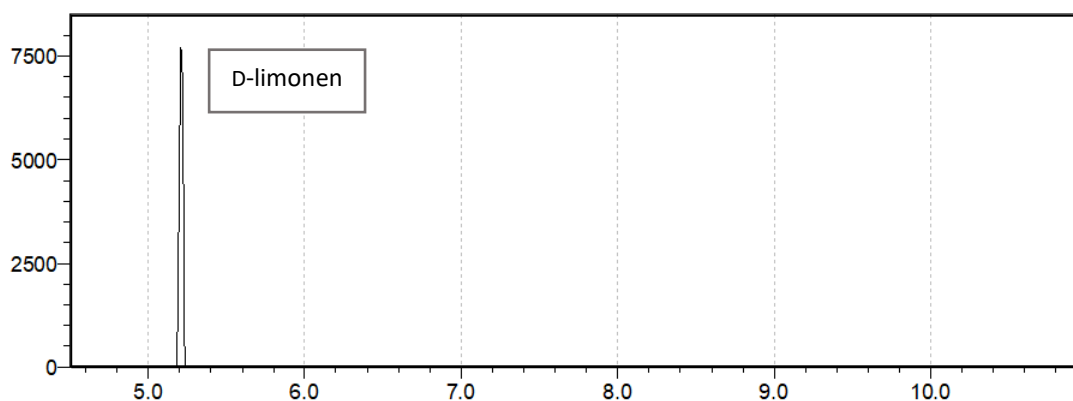
Izrada baždarnog dijagrama

Kao standard za izradu baždarnog dijagrama koristi se otopina galne kiseline koncentracije 500 mg L^{-1} . Iz ishodne otopine galne kiseline pripreme se razrjeđenja tako da koncentracije redom iznose 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 i 100 mg L^{-1} . Izmjerene vrijednosti apsorbancije razrijeđenih otopina galne kiseline nanesu se na ordinatu, a

koncentracije razrijeđenih otopina galne kiseline na apscisu koordinatnog sustava. Pomoću računala se konstruira baždarni dijagram, a prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunaju se koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva u uzorcima ekstrakata narančine kore.

3.2.7. Određivanje sadržaja D-limonena u ekstraktima narančine kore

Udio D-limonena u ekstraktima narančine kore pripremljenim u prirodnim eutektičkim otapalima određen je ekstrakcijom otapalom primjenom heptana kao otapala. U 100 μL uzorka doda se 100 μL demineralizirane vode te se smjesa promiješa na vortexu. Zatim se doda 800 μL heptana te se smjesa snažno miješa 3 minute. Iz heptanskog dijela se izuzme alikvot od 50 μL koji se analizira na plinskom kromatografu (slika 12). Kromatografski uvjeti za određivanje D-limonena jednaki su onima opisanim u poglavlju 3.2.4.



Slika 12. Prikaz tipičnog plinskog kromatograma D-limonena dobivenog nakon ekstrakcije iz narančine kore pomoću prirodnih eutektičkih otapala

Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama koristi se eterično ulje naranče tako da se pripreme otopine eteričnog ulja u heptanu pri čemu koncentracije pripremljenih otopina iznose 0,31; 0,62; 1,85 i 4,32 mmol L^{-1} . Iz pripremljenih otopina izuzme se alikvot od 50 μL koji se zatim analizira na plinskom kromatografu. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanese se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se konstruira dijagram ovisnosti množinske koncentracije D-limonena o površini

ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunaju nepoznate koncentracije D-limonena u uzorcima ekstrakata narančine kore.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Industrija prerade agruma ima važnu ulogu u poljoprivredno-industrijskom sektoru, dok preko 61 % svjetske proizvodnje agruma čini naranča (Zema i sur., 2018). Nakon ekstrakcije soka iz naranče zaostaje velika količina otpadne kore naranče koja predstavlja velike probleme zbrinjavanja i dodatna ekonomska opterećenja za industriju prerade agruma (Putnik i sur., 2017). Međutim, kora naranče bogat je izvor vrijednih spojeva visoke dodane vrijednosti poput polifenola, proteina, pektina i D-limonena. Potencijalna vrijednost otpadne kore naranče potaknula je potragu za boljim načinima gospodarenja otpadom naranče, kao što je valorizacija narančine kore i njezinih nusproizvoda (Zema i sur., 2018). Zbog visoke vrijednosti nusproizvoda kore naranče, poželjno ih je ekstrahirati u što većim količinama. Tradicionalne metode ekstrakcije zasnivaju se na utrošku velike količine hlapivih organskih otapala i energije što nije ekonomski održivo. Stoga se sve više istražuje primjena prirodnih eutektičkih otapala kao zelenih otapala za valorizaciju otpadne kore naranče. Osim toga, kora naranče sadrži hidrolitičke enzime koji mogu hidrolizirati racemični (*R,S*)-1-feniletil-acetat u odgovarajući enantiomerno čisti (*S*)- ili (*R*)-1-feniletanol. Kako bi proizvodnja enantiomerno čistih spojeva bila u skladu s principima zelene kemije, istražuje se učinkovitost primjene zelenih otapala poput prirodnih eutektičkih otapala u procesima organske sinteze i (bio) katalize (Yang i sur., 2017; Zhang i sur., 2012).

U ovom radu je uz primjenu NADES-a kao otapala provedena valorizacija kore naranče kako bi se dobili proizvodi dodane vrijednosti. U cilju pronalaska najboljeg NADES-a za ekstrakciju proteina i bioaktivnih spojeva (polifenola i D-limonena) iz narančine kore, ispitana su četiri NADES-a s različitim udjelima vode (30, 50 i 80 % (v/v)). Također je ispitana mogućnost primjene kore naranče kao izvora hidrolitičkih enzima za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata.

4.1. PRIPREMA PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

U svrhu ovog rada pripravljena su četiri prirodna eutektička otapala s udjelima vode od 30, 50 i 80 % (v/v) (tablica 2). Priprema otapala provodila se jednostavnim postupkom u kojem se polazne sirovine pomiješaju u određenom molarnom omjeru te se lagano zagrijavaju uz miješanje dok se ne dobije homogena kapljevinna. Iskorištenje ovog postupka je 100 %, što je značajna prednost kod pripreme prirodnih eutektičkih otapala. Pripremljenim otapalima

također su određena fizikalno-kemijska svojstva, odnosno pH vrijednost i polarnost otapala, što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Pripremljena prirodna eutektička otapala i njihova fizikalno-kemijska svojstva

Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Udio vode (% v/v)	Kratica	Polarnost (kcal mol⁻¹)	pH
Kolin-klorid: etilen glikol (ChEG)	1:2	30	ChEG30%	50,37	5,7
		50	ChEG50%	50,28	5,7
		80	ChEG80%	49,93	5,6
Kolin-klorid: glicerol (ChGly)	1:2	30	ChGly30%	50,28	4,6
		50	ChGly50%	50,10	4,9
		80	ChGly80%	49,41	4,1
Glukoza: etilen glikol (GlcEG)	1:2	30	GlcEG30%	50,54	6,4
		50	GlcEG50%	50,37	5,2
		80	GlcEG80%	50,28	6,7
Glukoza: fruktoza: saharoza (GlcFruSah)	1:1:1	30	GlcFruSah30%	50,63	5,2
		50	GlcFruSah50%	50,10	3,9
		80	GlcFruSah80%	49,88	4,5

Usporedbom pH vrijednosti odabranih prirodnih eutektičkih otapala može se uočiti da su sva otapala blago kisela u rasponu pH od 3,9 kod GlcFruSah50% do 6,7 kod GlcEG80%. Ovakve blago kisele pH vrijednosti otapala čine ih dobrim medijem za provođenje biokatalitičkih reakcija budući da je dobro poznato da biljni enzimi mogu provoditi reakcije u blagim uvjetima (pH i temperature), s izvrsnim kemo-, regio- i stereoselektivnostima (Gašo-Sokač i sur., 2014). Također, blago kiseli uvjeti povoljni su za izolaciju polifenola iz biljnog matriksa, što je također bio jedan od ciljeva diplomskog rada.

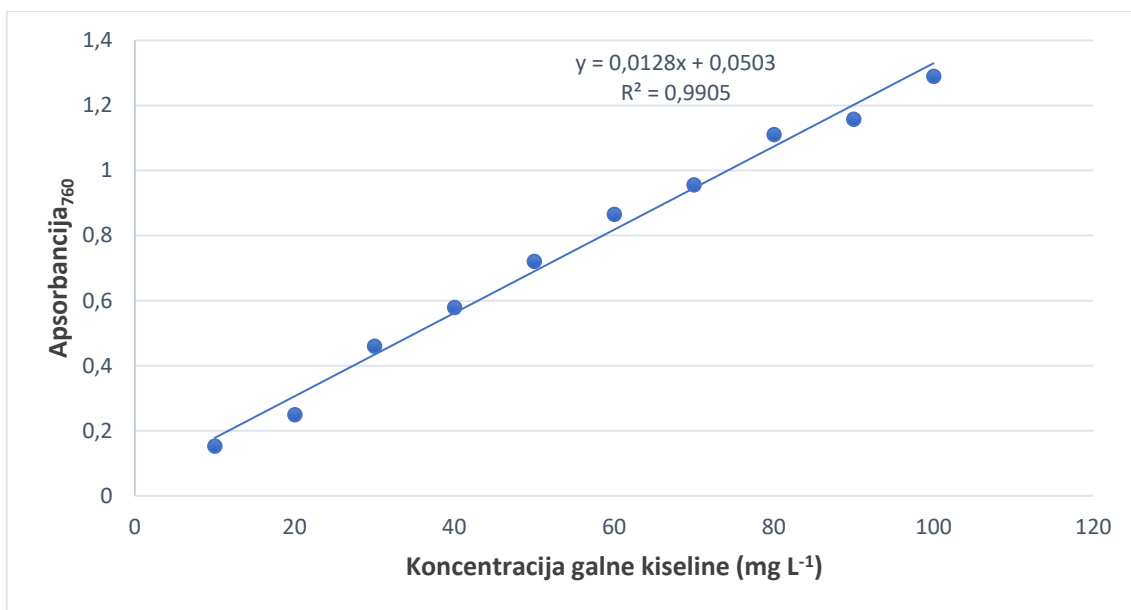
Polarnost je određena primjenom Nile crvene solvatokromne probe te su dobivene vrijednosti izražene u kcal mol⁻¹. Polarnosti ispitanih prirodnih eutektičkih otapala uvelike se ne razlikuju, a kreću se u rasponu od 49,41 do 50,63 kcal mol⁻¹. Slične vrijednosti dobili su Dai

i sur. (2013a) koji su ispitivali polarnost 13 različitih prirodnih eutektičkih otapala. Dobivene vrijednosti kretale su se u rasponu od 44,81 do 50,07 kcal mol⁻¹, pri čemu su najpolarnija bila otapala na bazi organskih kiselina, zatim na bazi aminokiselina te na bazi šećera i poliola, s polarnostima sličnim onima od vode (48,21 kcal mol⁻¹) i metanola (51,89 kcal mol⁻¹). Na polarnost otapala utječe i udio vode tako što se polarnost povećava dodatkom vode, što su primijetili Dai i sur. (2013a) te Craveiro i sur. (2016) ispitujući fizikalno-kemijska svojstva, a među njima i polarnost različitih eutektičkih otapala. Isti trend može se uočiti i kod svih ispitivanih prirodnih eutektičkih otapala u ovom radu gdje se polarnost povećava s povećanjem sadržaja vode (niže vrijednosti upućuju na višu polarnost otapala).

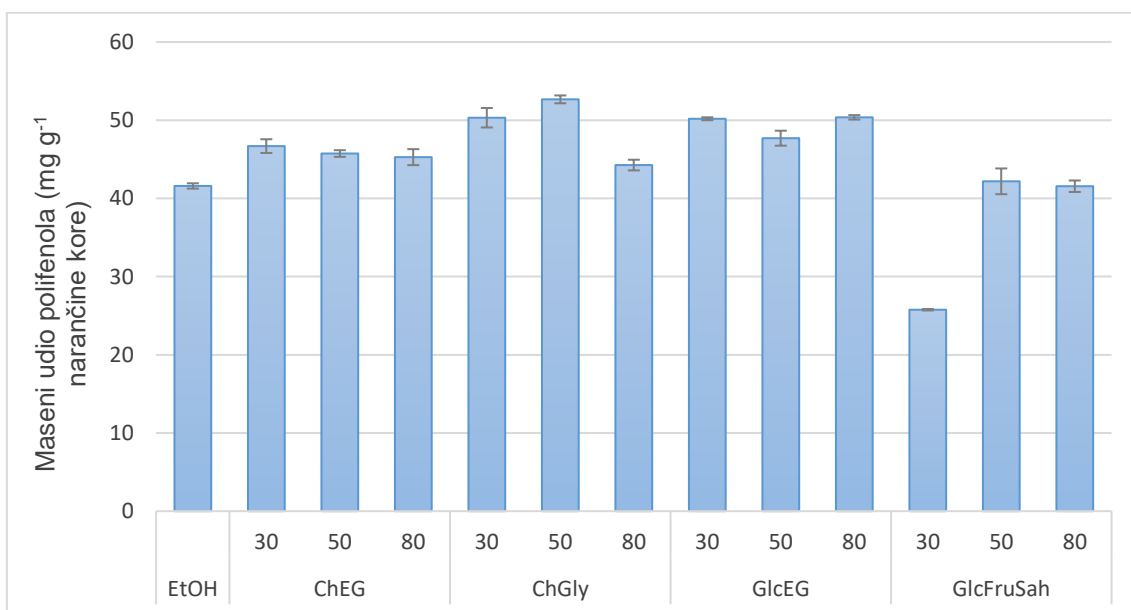
4.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE

Polifenolni spojevi su bioaktivne tvari sveprisutne u biljkama kao sekundarni metaboliti, a poznato je da mogu pomoći u prevenciji različitih bolesti budući da mnogi od njih imaju antikancerogena, antivirusna i protuupalna svojstva (Ruesgas-Ramon i sur., 2017). Korisna svojstva polifenolnih spojeva najviše se pripisuju njihovom antioksidativnom djelovanju, zbog čega imaju i široku primjenu u različitim industrijama (Putnik i sur., 2017; Mamma i Christakopoulos, 2014). Kora agruma bogat je izvor polifenola koji se mogu koristiti za produljenje roka trajanja hrane i pića (Ravindran i Jaiswal, 2015). Konvencionalne metode ekstrakcije polifenolnih spojeva obično uključuju primjenu etanola, metanola ili drugih organskih otapala, no zbog njihove toksičnosti i hlapivosti sve češće se koriste alternative poput prirodnih eutektičkih otapala (Ruesgas-Ramon i sur., 2017).

U ovom radu ukupni polifenolni spojevi u ekstraktima narančine kore pripremljenim u prirodnim eutektičkim otapalima te zakiseljenom etanolu (75 % EtOH, 0,1 % HCl) koji je korišten kao referentno otapalo, određeni su spektrofotometrijski u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom. Na slici 13 prikazan je baždarni dijagram koji predstavlja ovisnost apsorbancije A₇₆₀ o koncentraciji galne kiseline (mg L⁻¹), a rezultati mjerenja izraženi su kao mg galne kiseline po gramu narančine kore te su prikazani na slici 14.



Slika 13. Baždarni dijagram galne kiseline



Slika 14. Maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima narančine kore. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3).

Iz grafa na slici 14 može se iščitati da sva tri dvokomponentna NADES-a imaju bolju sposobnost ekstrakcije polifenola u odnosu na zakiseljeni etanol koji je korišten kao referentno otapalo. Najveći udio polifenolnih spojeva ekstrahiran je otapalom ChGly s 50 % vode ($52,67 \pm 0,50$ mg g⁻¹ narančine kore), pri čemu je udio ekstrahiranih polifenolnih spojeva veći

nego u zakiseljenom etanolu ($41,59 \pm 0,34 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore). S druge strane, trokomponentno otapalo GlcFruSah pokazalo je najmanju selektivnost prema ekstrakciji polifenolnih spojeva, s tim da je s GlcFruSah50% ekstrahirano nešto veći udio polifenola ($42,18 \pm 1,65 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore) u usporedbi sa zakiseljenim etanolom ($41,59 \pm 0,34 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore). U odnosu na sve ispitane NADES-e, GlcFruSah s 30 % vode pokazuje najmanji udio ekstrahiranih polifenolnih spojeva ($25,76 \pm 0,09 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore), a uz to pokazuje i manju selektivnost ekstrakcije u odnosu na referentno otapalo. Razlog manje učinkovitosti ekstrakcije kod ovog otapala može biti njegova visoka viskoznost, budući da viskoznost ometa učinkovitost ekstrakcije otapala jer dovodi do sporog prijenosa mase (Dai i sur., 2013b). Sveukupno su se NADES-i pokazali učinkovitijim za ekstrakciju polifenolnih spojeva u odnosu na otapalo koje se obično koristi u tu svrhu (etanol) te ujedno predstavljaju bolji izbor otapala za ekstrakciju zbog njihovih brojnih prednosti poput nehlapivosti, biorazgradivosti i ekološke prihvatljivosti.

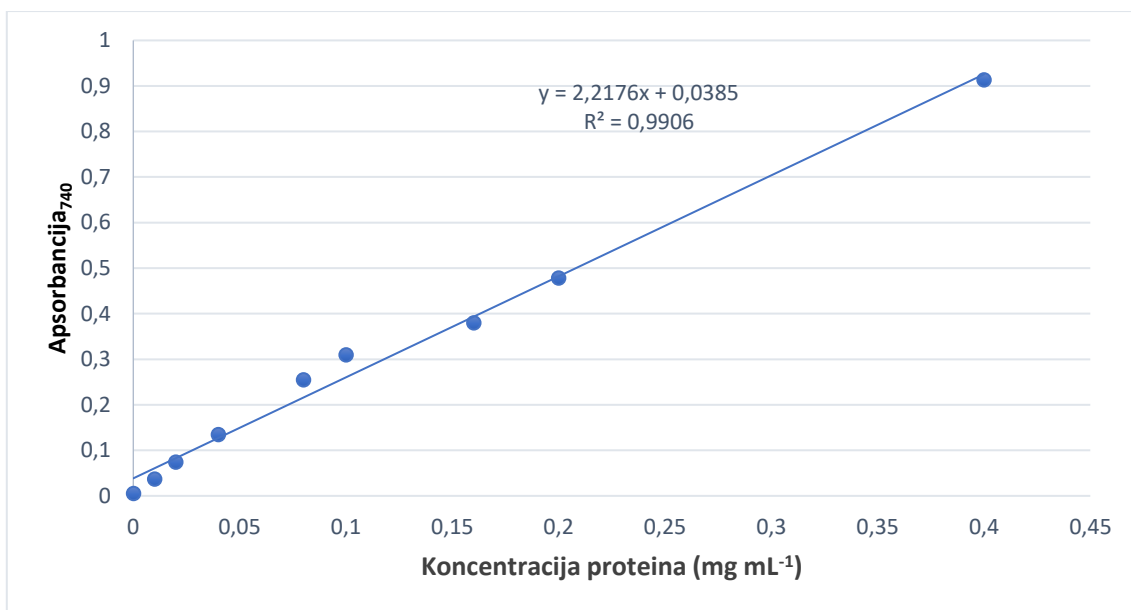
Postoje brojna istraživanja koja su pokazala uspješnost primjene NADES-a kao otapala za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz različitih biljnih izvora, kao i njihovu superiornost u odnosu na konvencionalna otapala (Pal i Jadeja, 2019; Yang i sur., 2018; Paradiso i sur., 2016). García i sur. (2016) proveli su ekstrakciju fenolnih spojeva iz maslinova ulja primjenom 11 različitih NADES-a. Njihovi rezultati pokazali su veću učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva pomoću NADES-a u odnosu na klasičnu metodu ekstrakcije (metanol/voda). Nadalje, Radošević i sur. (2016) u svom radu su pomoću NADES-a na bazi kolin-klorida proveli ekstrakciju polifenola iz pokožice grožđa, pri čemu su se dobivene vrijednosti ukupnih polifenolnih spojeva kretale od 18 do 100 mg g^{-1} . Od pet ispitivanih otapala (kolin-klorid: glukoza, kolin-klorid: glicerol, kolin-klorid: ksiloza, kolin-klorid: jabučna kiselina i kolin-klorid: fruktoza) najveća učinkovitost ekstrakcije postignuta je s otapalom kolin-klorid: fruktoza, a utvrđeno je da su DES-ovi dobra alternativa konvencionalnim otapalima gdje je barem jedan DES postigao veće iskorištenje ekstrakcije polifenolnih spojeva u odnosu na metanol. U već spomenutom radu, Ozturk i sur. (2018b) proveli su ekstrakciju polifenolnih spojeva iz otpadne kore naranče primjenom NADES-a. Korištena su otapala kolin-klorid: glicerol i kolin-klorid: etilen glikol s 10, 30 i 50 % vode, a kao referentno otapalo korištena je 30 %-tna vodena otopina etanola. Budući da je većina ispitivanih NADES-a pokazala veću učinkovitost ekstrakcije od referentnog otapala, zaključeno je da su NADES-i bolji za ekstrakciju ukupnih polifenolnih spojeva u odnosu na konvencionalna otapala.

Rezultati dobiveni u ovom radu odgovaraju prethodnim istraživanjima koja su pokazala da su NADES-i dobra zamjena za konvencionalna otapala za ekstrakciju polifenolnih spojeva, budući da je većina ispitanih NADES-a pokazala bolji prinos ekstrakcije u odnosu na zakiseljeni etanol. Za ovu visoku sposobnost ekstrakcije polifenolnih spojeva primjenom NADES-a zaslužne su vodikove veze koje se stvaraju između molekula NADES-a i fenolnih spojeva (Dai i sur., 2013b).

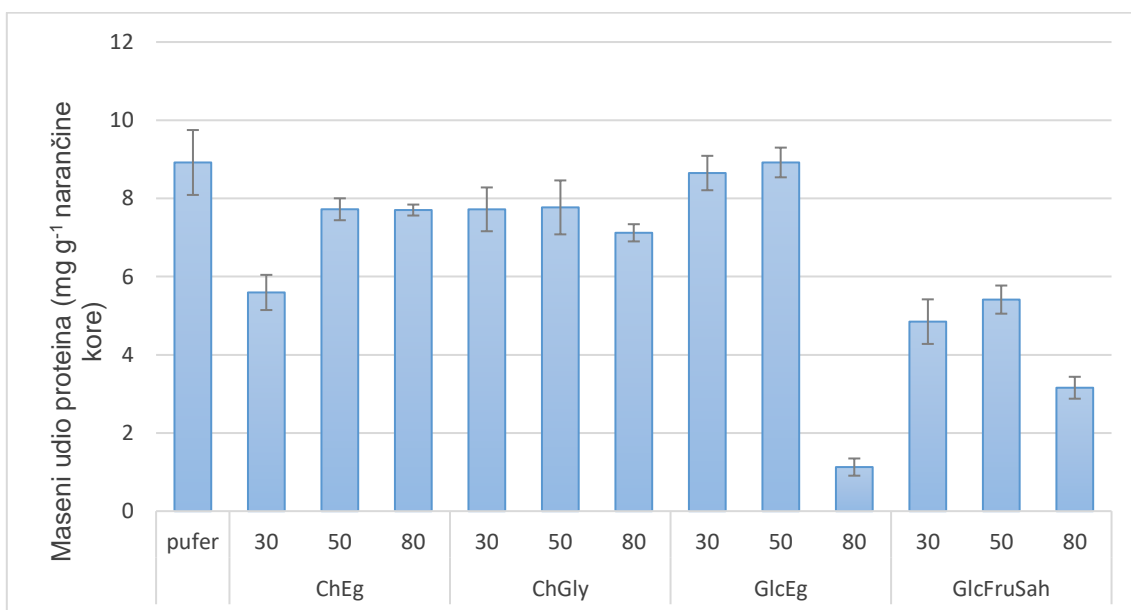
4.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE

Proteini su bioaktivne molekule koje imaju važnu ulogu u životnim procesima stanice te imaju široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Zbog toga je posebno važna izolacija i priprema čistih proteina (Meng i sur., 2019). Zbog nedostataka konvencionalnih metoda ekstrakcije proteina i drugih bioaktivnih spojeva, poput niskih prinosa ekstrakcije, dugog vremena ekstrakcije te velike potrošnje otapala i energije, postoji veliki interes za razvoj učinkovitijih metoda ekstrakcije koje su ujedno i ekološki prihvatljive (Hernández-Corroto i sur., 2020; Lin i sur., 2020). Jedna od tih metoda je primjena prirodnih eutektičkih otapala.

Udio proteina određen je u ekstraktima narančine kore pripremljenim u NADES-ima te u puferu kao referentnom otapalu primjenom metode po Lowryju koja se zasniva na reakciji proteina s Cu^{2+} ionima i Folin-Ciocalteu reagensom. Tijekom reakcije dolazi do stvaranja plavog obojenja otopine, a intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji proteina u otopini. Kako bi se mogao odrediti udio proteina u ekstraktima narančine kore, prvo je konstruiran baždarni dijagram s poznatim koncentracijama goveđeg albumina (BSA) (slika 15).



Slika 15. Baždarni dijagram za određivanje proteina po Lowryju



Slika 16. Maseni udio proteina u ekstraktima kore naranče. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3).

Rezultati prikazani na slici 16 pokazuju da svi NADES-i, izuzev GlcEG50% imaju manji udio ekstrahiranih proteina u odnosu na pufer koji je korišten kao referentno otapalo ($8,92 \pm 0,83$ mg g⁻¹ narančine kore). Najveću učinkovitost ekstrakcije pokazalo je otapalo GlcEG50% ($8,92 \pm 0,38$ mg g⁻¹ narančine kore), pri čemu je udio ekstrahiranih proteina jednak

kao kod pufera ($8,92 \pm 0,83 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore). Otapalo GlcFruSah pokazalo je najmanju selektivnost prema ekstrakciji proteina u odnosu na ostala otapala, no najmanji udio proteina ekstrahiran je otapalom GlcEG80% ($1,13 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore). Kao i kod ekstrakcije polifenola, trokomponentno otapalo GlcFruSah pokazalo je najmanju učinkovitost ekstrakcije, vjerojatno zbog veće viskoznosti otapala budući da je poznato da su NADES-i na bazi šećera viskozni u odnosu na one na bazi alkohola ili organskih kiselina, zbog čega se i rjeđe koriste u svrhu ekstrakcije (Xu i sur., 2019). U literaturi ne postoji puno istraživanja u kojima je provedena ekstrakcija proteina iz narančine kore primjenom prirodnih eutektičkih otapala, međutim provedena je iz drugih biljnih izvora, primjerice iz šipka (Hernández-Corroto i sur., 2020), klica bambusa (Lin i sur., 2020) i nusprodukata (sačme) nastalih preradom uljane repice i noćurka (Grudniewska i sur., 2018). U ovim istraživanjima DES-ovi su se pokazali učinkovitim otapalima za ekstrakciju proteina te potencijalnom zamjenom za konvencionalna otapala. Iako kora naranče ima mali udio proteina od samo 6 % s. tv. (Rivas i sur., 2008; Bampidis i Robinson, 2006), mogućnost primjene NADES-a za pripremu ekstrakata bogatih specifičnim proteinima, poput enzima (npr. pektin metilesteraze ili drugih hidrolitičkih enzima poput onih korištenih u ovom radu za kinetičku rezoluciju racemične smjese), vrijedi dodatno istražiti.

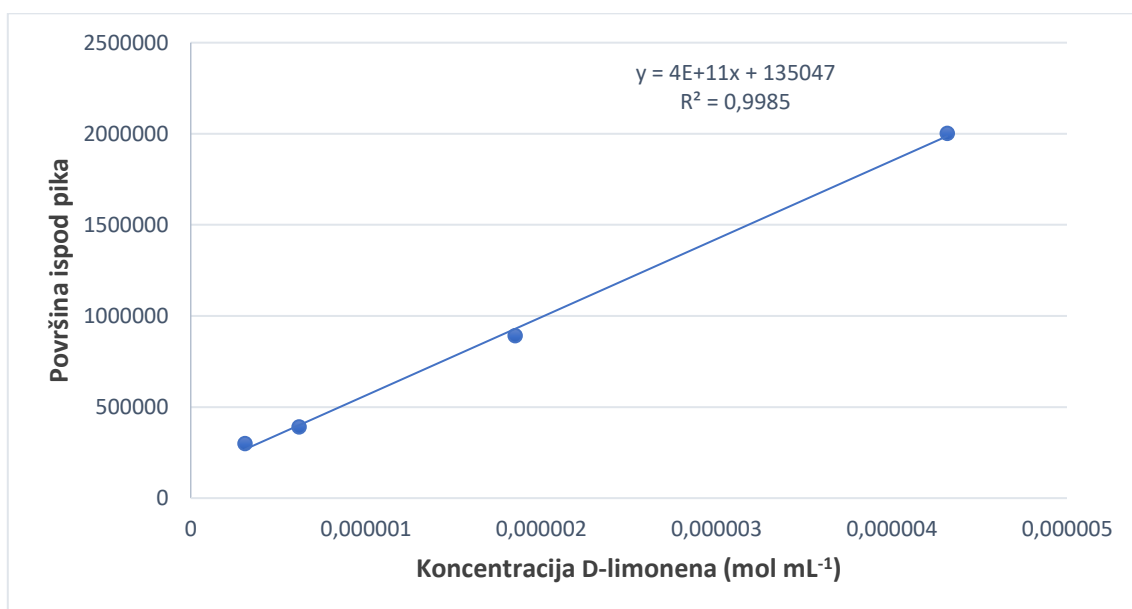
Unatoč tome što je u ovom radu ekstrakcija proteina pomoću prirodnih eutektičkih otapala bila slabija u odnosu na referentno otapalo (fosfatni pufer), primjena ovih otapala je poželjna s obzirom da su to otapala koja su u skladu s principima zelene kemije.

4.4. UDIO D-LIMONENA U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE

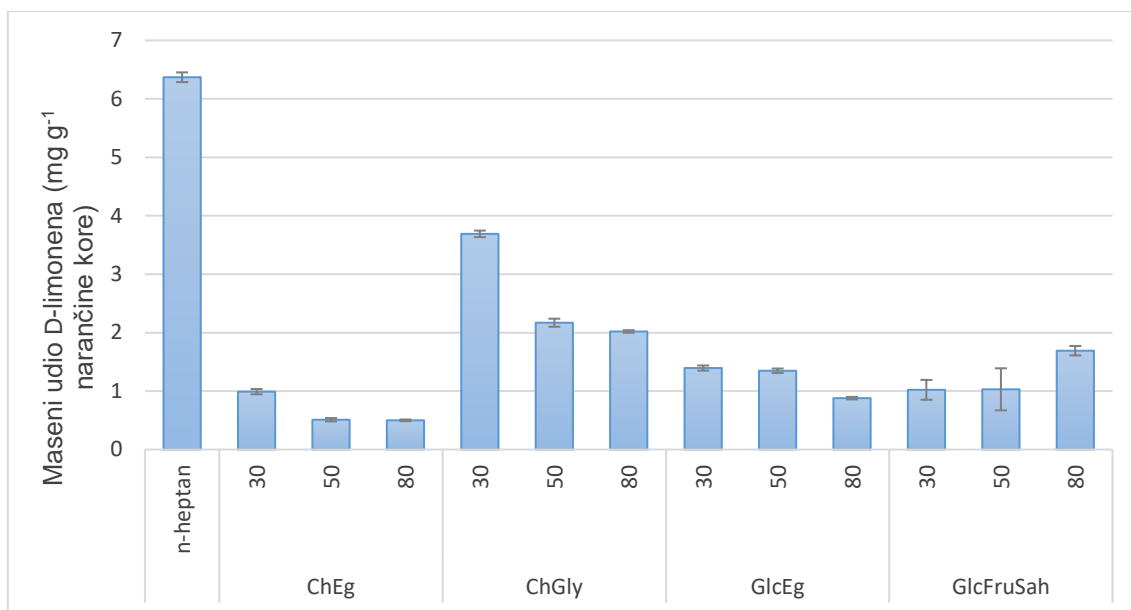
Kora naranče dobar je izvor eteričnog ulja, čija je ekstrakcija ekonomski isplativa budući da taj nusprodukt ima visoku dodanu vrijednost. Preko 90 % ukupnog sadržaja eteričnog ulja agruma predstavlja ciklički terpen D-limonen (Siles-López i sur., 2010). D-limonen se koristi u proizvodnji hrane i lijekova kao aroma, a ima i brojne primjene u kemijskoj industriji, kozmetici i proizvodima za kućanstvo (Mamma i Christakopoulos, 2014; Siles-López i sur., 2010). Također, novija istraživanja su pokazala mogućnost primjene limonena kao zelenog otapala koje bi zamijenilo široki spektar hidrofobnih otapala poput heksana, heptana i toluena, koja nisu ekološki prihvatljiva (Paggiola i sur., 2016). Tradicionalne metode ekstrakcije limonena (npr. hladno prešanje, destilacija) iz narančine kore su energetski zahtjevnije što negativno utječe na ekonomičnost procesa, dok je ekstrakcija hidrofobnim

otapalima poput heksana i heptana upitna s ekološkog aspekta. Kao dobre alternative tradicionalnim metodama ekstrakcije pokazala su se prirodna eutektička otapala (Ma i sur., 2019).

Udio D-limonena u ekstraktima pripremljenim u prirodnim eutektičkim otapalima određen je ekstrakcijom otapalom uz primjenu *n*-heptana kao otapala, a zatim je dobiveni uzorak analiziran plinskom kromatografijom. Na slici 17 prikazan je baždarni dijagram koji predstavlja ovisnost površine kromatografskog pika o koncentraciji D-limonena (mol mL^{-1}), a rezultati mjerenja izraženi su kao mg D-limonena po gramu narančine kore te su prikazani na slici 18.



Slika 17. Baždarni dijagram za određivanje D-limonena



Slika 18. Maseni udio D-limonena u ekstraktima kore naranče. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3).

Dobiveni rezultati pokazuju da su ispitani NADES-i uspješni ekstrahirati zadovoljavajuću količinu D-limonena iz ekstrakata narančine kore, pri čemu se najuspješnijim NADES-om pokazao ChGly30% ($3,69 \pm 0,06 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore). U usporedbi s *n*-heptanom koji je korišten kao referentno otapalo ($6,37 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore), najmanju učinkovitost ekstrakcije pokazalo je otapalo ChEG s 80 % vode ($0,5 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore). Visoku učinkovitost ekstrakcije limonena iz otpadne kore naranče primjenom nekoliko NADES-a na bazi kolin-klorida pokazali su Ma i sur. (2019), pri čemu su dobiveni prinosi do 17,8 mg limonena po gramu narančine gore. Isto tako, Ozturk i sur. (2018a) u svom su radu pokazali izvrsnu sposobnost NADES-a kolin-klorid: glicerol za ekstrakciju terpena i terpenoida (limonena i linaloola). U istom radu pokazano je i da razrjeđivanje NADES-a dovodi do njihove manje sposobnosti ekstrakcije, budući da dodatak vode povećava polarnost otapala, a time dovodi do nižih koeficijenata distribucije terpena i terpenoida.

Iako su NADES-i ispitani u ovom radu pokazali slabiju sposobnost ekstrakcije D-limonena u odnosu na referentno otapalo, NADES-i se uglavnom sastoje od komponenti koje imaju GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*), odnosno bezopasne su za zdravlje ljudi, pa bi se ekstrakti D-limonena dobiveni primjenom NADES-a mogli primjenjivati u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji bez potrebe za dodatnim koracima uklanjanja otapala,

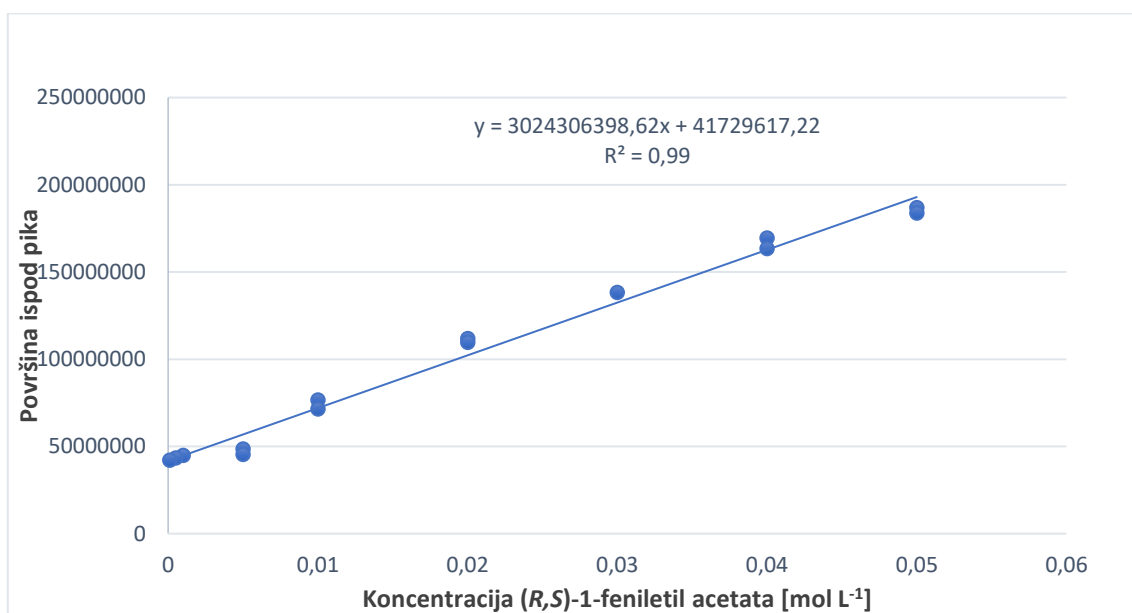
što može predstavljati značajnu prednost u odnosu na druga otapala za ekstrakciju (Ozturk i sur., 2018a).

4.5. KINETIČKA REZOLUCIJA (*R,S*)-1-FENILETIL-ACETATA PRIMJENOM HIDROLITIČKIH ENZIMA IZ KORE NARANČE

Kiralni alkoholi koji su važni intermedijari za sintezu brojnih kiralnih lijekova, pesticida i aroma mogu se dobiti kemijskim ili biološkim metodama (Fan i sur., 2011). U odnosu na kemijske metode, biološke metode poput biokatalize primjenom izoliranih enzima, mikroorganizama ili biljnih tkiva imaju prednosti poput blagih uvjeta reakcije, visoke regio- i stereospecifičnosti i ekološke prihvatljivosti, a korišteni biokatalizatori su jeftini, netoksični i biorazgradivi (Pavoković i sur., 2017; Liang i su., 2015; Vandenberghe i sur., 2013). Posebnu pažnju privukle su biokatalize u kojima se za dobivanje enantiomerno čistih spojeva kao biokatalizatori koriste cijele stanice dobivene iz dijelova voća ili povrća. Glavna prednost primjene cijelih stanica kao biokatalizatora je što stanice osiguravaju prirodno okruženje za enzime, omogućuju regeneraciju kofaktora i sprječavaju denaturaciju i inaktivaciju enzima. Kod provođenja biokatalize važan je i izbor otapala, a s obzirom da su NADES-i netoksični, biorazgradivi, jeftini i široko dostupni, nedavno su pronašli svoju primjenu u biokatalizi (Yang i sur., 2017). Stoga je u ovom radu ispitana mogućnost primjene NADES-a u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz kore naranče kao biokatalizatora. Hidrolitički enzimi iz kore naranče mogu hidrolizirati ester (*R,S*)-1-feniletil-acetat u odgovarajući (*R*)- odnosno (*S*)-1-feniletanol. Postoji velika potražnja za enantiomerno čistim spojevima u industriji finih kemikalija te farmaceutskoj i kemijskoj industriji zbog različitih strukturnih karakteristika enantiomera zbog kojih imaju različite biološke aktivnosti. To je ujedno i razlog zašto je enantiomerna čistoća krajnjeg proizvoda od iznimne važnosti (Pavoković i sur., 2017; Liang i sur., 2015). Tako se optički čisti (*R*)-1-feniletanol koristi kao kiralni građevni blok i sintetski intermedijar u industriji finih kemikalija te farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji, dok se oba enantiomera koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerne čistoće te za asimetrično otvaranje cikličkih anhidrida i epoksida (Fan i sur., 2011).

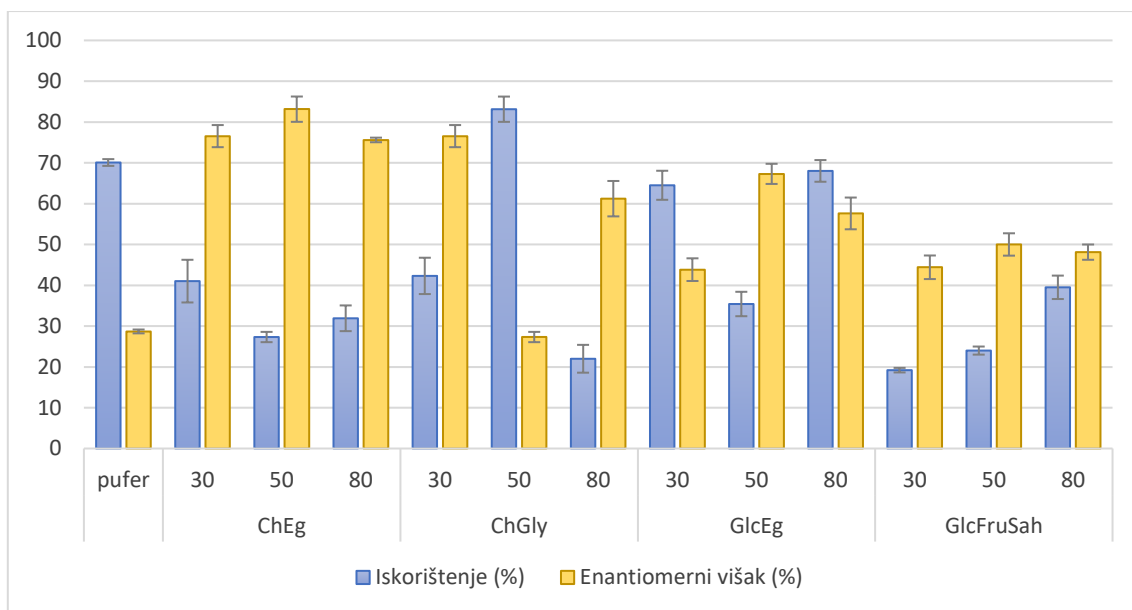
Reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata provedena je u prirodnim eutektičkim otapalima s udjelima vode od 30, 50 i 80 % (tablica 1) te puferu kao referentnom otapalu, pri čemu su ulogu katalizatora reakcije imali hidrolitički enzimi iz kore naranče. U reakcijsku

smjesu (0,2 g narančine kore u 1 mL NADES-a ili pufera) dodano je 15 μ L supstrata (*R,S*)-1-feniletil-acetata te se reakcija provodila 7 dana pri sobnoj temperaturi na tresilici. Tijek reakcije praćen je izdvajanjem uzoraka koji su analizirani pomoću plinske kromatografije. Prethodno je konstruiran baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata, koji je prikazan na slici 19.



Slika 19. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata (*R,S*)-1-feniletil-acetata

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u puferu i NADES-ima, izračunati su iskorištenje procesa hidrolize (η) te enantiomerni višak (*ee*). Dobiveni rezultati prikazani su na slici 20.



Slika 20. Enantiomerni višak te iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane enzimima otpadne kore naranče u puferu te prirodnim eutektičkim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C; 7 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3).

Kao najvažniji pokazatelj uspješnosti reakcije kinetičke rezolucije smatra se enantiomerni višak (*ee*) koji izražava čistoću nekog spoja, pri čemu *ee* od 100 % označava enantiomerno čisti spoj, dok vrijednost 0 označava racemičnu smjesu. Rezultati na slici 20 pokazuju da se enantiomerni višak hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u ispitivanim NADES-ima kreće u rasponu od 27,3 % (ChGly50%) do 83,2 % (ChEG50%), pri čemu se kao dominantni produkt dobiva (*R*)-1-feniletanol. Može se vidjeti i da na enantioselektivnost hidrolitičkih enzima iz kore naranče utječu udio vode, a posebice sastav NADES-a. Primjerice, bez obzira na udio vode, ChEG se pokazao kao najbolje otapalo s *ee* vrijednostima koje se kreću od 75,6 do 83,2 %. Dodatak vode NADES-ima je važan budući da je za aktivnost enzima potrebna određena količina vode, a osim toga pomaže u boljem prijenosu mase kojeg ometa relativno velika viskoznost NADES-a (Panić i sur., 2017). Utjecaj vode na enantioselektivnost najuočljiviji je kod otapala ChGly gdje *ee* vrijednost varira od 27,3 do 76,6 %. Kod provođenja reakcije u puferu *ee* vrijednost iznosila je samo 28,7 %, što znači da korišteni biokatalizator u puferu nije stereoselektivan prema (*R*)-enantiomeru. Vandenberghe i sur. (2013) koji su također proučavali hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata primjenom različitih biljnih tkiva, uočili su da enzimi odgovorni za tu reakciju nisu stereoselektivni te prevode i (*R*)- i (*S*)-enantiomer u

odgovarajući sekundarni alkohol. Različite enantioselektivnosti u ispitivanim NADES-ima mogu se objasniti prisutnošću nekoliko hidrolitičkih enzima u narančinoj kori koji su različito inhibirani u korištenim NADES-ima ovisno o njihovim karakteristikama te zbog toga imaju različitu enantioselektivnost prema pretvorbi (*R*)- ili (*S*)-estera (Panić i sur., 2017). Do sličnog zaključka došli su Maugeri i Domínguez De María (2014) koji su proučavajući redukciju etil acetoacetata primjenom pekarskog kvasca zaključili da je različita enantioselektivnost enzima u NADES-ima s različitim udjelom vode rezultat inhibicije pojedinih enzima, dok drugi enzimi ostaju aktivni. Iskorištenja reakcije u NADES-ima kreću se od 19,2 % kod GlcFruSah30% do 83,14 % za ChGly50%, dok iskorištenje reakcije u puferu iznosi 70,1 %. Općenito, iskorištenje hidrolize veće od 50 % ukazuje na to da enzimi iz kore naranče provode hidrolizu i (*R*)- i (*S*)-1-feniletalacetata u odgovarajuće alkohole.

Usporedbom enantiomernog viška hidrolize u NADES-ima i puferu, može se zaključiti da je otapalo ChEG50% najučinkovitije za provođenje reakcije enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletalacetata. Sveukupno su se NADES-i pokazali pogodnim zelenim otapalima za provođenje biokatalize, što se vidi po većoj stereoselektivnosti biokatalizatora u NADES-ima u odnosu na pufer.

Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u ovom radu može se zaključiti da ispitivani NADES-i imaju veliki potencijal u valorizaciji otpadne kore naranče. Ispitivani NADES-i pokazali su se odličnim otapalima za ekstrakciju polifenolnih spojeva, pri čemu je najveći prinos ekstrakcije u odnosu na sve NADES-e, ali i zakiseljeni etanol, dobiven otapalom ChGly50%. Uspješnost ekstrakcije proteina i D-limonena primjenom NADES-a bila je nešto slabija u odnosu na ekstrakciju polifenolnih spojeva, no brojne prednosti NADES-a kao zelenih otapala poticaj su za daljnja istraživanja i optimizaciju procesa ekstrakcije primjenom NADES-a. Veći prinos ekstrakcije možda je moguće postići kombinacijom NADES-a s drugim metodama zelene ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima ili ultrazvukom, ali i racionalnim dizajnom novih NADES-a primjenom računalnih metoda kojim bi se moglo uz manje eksperimenata dizajnirati „idealni“ NADES za ekstrakciju proteina i bioaktivnih spojeva. Usporedbom *ee* vrijednosti NADES-a i pufera, ispitivani NADES-i pokazali su se boljim otapalima za provođenje enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletalacetata primjenom hidrolitičkih enzima iz narančine kore. Kombinacija NADES-a kao ekološki prihvatljivih otapala i biokatalize primjenom cijelih stanica iz narančine kore predstavlja zanimljiv „zeleni“ pristup za dobivanje enantiomerno čistih spojeva kao što je (*R*)-1-feniletanol.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene četiri prirodna eutektička otapala s 30, 50 i 80 % vode (v/v) u valorizaciji otpadne kore naranče, nusproizvoda koji nastaje preradom agruma. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Ispitivana prirodna eutektička otapala pokazala su se jednako učinkovitim za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz kore naranče kao zakiseljeni etanol koji je korišten kao referentno otapalo. To ukazuje na potencijalnu zamjenu organskih otapala poput etanola, koji se inače koristi za ekstrakciju polifenolnih spojeva, prirodnim eutektičkim otapalima. Najveću učinkovitost ekstrakcije pokazalo je otapalo ChGly50% ($52,67 \pm 0,50 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore) s udjelom ekstrahiranih polifenolnih spojeva većim nego kod zakiseljenog etanola ($41,59 \pm 0,34 \text{ mg g}^{-1}$ narančine kore).
2. Ekstrakcija proteina ispitivanim prirodnim eutektičkim otapalima pokazala se lošijom u odnosu na pufer, budući da su sva prirodna eutektička otapala imala manji udio ekstrahiranih proteina, izuzev GlcEG50% kod kojeg je udio ekstrahiranih proteina jednak kao kod pufera ($8,92 \text{ mg g}^{-1}$). Ovi rezultati pokazuju da bi se prirodna eutektička otapala mogla koristiti za ekstrakciju proteina iz narančine kore uz pravilan izbor otapala odgovarajućeg sastava i udjela vode.
3. Ekstrakcija D-limonena prirodnim eutektičkim otapalima pokazala se manje učinkovitom u odnosu na *n*-heptan korišten kao referentno otapalo, pri čemu se udio ekstrahiranog D-limonena u prirodnim eutektičkim otapalima kreće u rasponu od 0,5 do $3,69 \text{ mg g}^{-1}$, dok u *n*-heptanu iznosi $6,37 \text{ mg g}^{-1}$. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal primjene ispitivanih prirodnih eutektičkih otapala u ekstrakciji D-limonena iz narančine kore, uz potragu za novim prirodnim eutektičkim otapalima kojima bi se ostvarilo veće iskorištenje ekstrakcije D-limonena.
4. Ispitana prirodna eutektička otapala pokazala su se učinkovitijim u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata kataliziranoj hidrolitičkim enzimima iz kore naranče u odnosu na pufer. Najboljim se pokazalo otapalo ChEG50% gdje je enantiomerni višak nakon 7 dana reakcije iznosio 83,2 % u odnosu na pufer gdje je iznosio 28,7 %.

6. LITERATURA

Achkar, T. E., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. (2019) Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *J. Mol. Liq.* **288**, 111028.

Ahmed, M., Kelly, T., Ghanem, A. (2012) Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. *Tetrahedron.* **68**, 6781-6802.

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green chemistry: principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301-312.

Bampidis, V., Robinson, P. H. (2006) Citrus by-products as ruminant feeds: A Review. *Anim. Feed Sci. Tech.* **128**, 175-217.

Beccali, M., Cellura, M., Iudicello, M. Mistretta, M. (2009) Resource Consumption and Environmental Impacts of the Agrofood Sector: Life Cycle Assessment of Italian Citrus-Based Products. *Environ. manage.* **43**, 707-724.

Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat, F. (2014) Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrason. sonochem.* **24**, 72-79.

Bustamante, J., Stempvoort, S. V., García-Gallarreta, M., Houghton, J. A., Briers, H. K., Budarin, V. L., Matharu, A. S., Clark, J. H. (2016) Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *J. Clean. Prod.* **137**, 598-605.

Cerutti, A. K., Beccaro, G. L., Bosco, S., De Luca, A. I., Falcone, G., Fiore, A., Iofrida, N., Giudice, A. L., Strano, A. (2015) Life Cycle Assessment in the Fruit Sector. U: Life Cycle Assessment in the agri-food sector: an overview of its key aspects, international initiatives, certification, labelling schemes and methodological issues. (Notarnicola, B., Salomone, R., Petti, L., Renzulli, P.A., Roma, R., Cerutti, A.K., ured.), Springer, Cham, str. 333-388.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 540-560.

Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G. (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 8615-8627.

Chiappe, C., Marra, A., Mele, A. (2010) Synthesis and applications of ionic liquids derived from natural sugars. *Top. Curr. Chem.* **295**, 177-195.

Clouthier, C. M., Pelletier, J. N. (2012) Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem Soc Rev.* **41**, 1585-1605.

Craveiro, R. P., Aroso, I. M., Flammia, V. P., Carvalho, T., Viciosa, M. T., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R. L., Duarte, A. R., Paiva, A. (2016) Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq.* **215**, 534-540.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014a) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **99**, 1-12.

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

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 1631-1639.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61-68.

Dai, Y., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2014) Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chem.* **159**, 116-121.

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

De Miranda, A., Miranda, L., de Souza, R. (2015) Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1-22.

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.

Earle, M. J., Seddon, K. (2002) Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure Appl. Chem.* **72**, 1391-1398.

Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J. A. (2011) Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food. Eng. Rev.* **3**, 108-120.

Fan, Y., Xie, Z., Zhang, H., Qian, J. (2011) Kinetic resolution of both 1-phenylethanol enantiomers produced by hydrolysis of 1-phenylethyl acetate with *Candida antarctica* lipase B in different solvent systems. *Kinet. Catal.* **52**, 686-690.

Ferlin, N., Courty, M., Gatard, S., Spulak, M., Quilty, B., Beadham, I., Ghavre, M., Haiß, A., Kümmerer, K., Gathergood, N., Bouquillon, S. (2013) Biomass derived ionic liquids: Synthesis from natural organic acids, characterization, toxicity, biodegradation and use as solvents for catalytic hydrogenation processes. *Tetrahedron.* **69**, 6150-6161.

Filly, A., Fabiano-Tixier, A. S., Louis, C., Fernández, X. S., Chemat, F. (2016) Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Cr. Chim.* **19**, 707-717.

García, A. F., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Ríos, J. J., Fernández-Bolaños, J. (2016) Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food chem.* **197**, 554-61.

Garcia-Castello, E., Rodriguez López, A. D., Mayor López, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A. (2015) Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT Food Sci. Technol.* **64**, 1114-1122.

Gašo-Sokač, D., Nujić, M., Bušić, V., Habuda-Stanić, M. (2014) Biocatalytic reductions by plant tissue - Green alternative to alcohol production. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **6**, 51-60.

Ghanem, A. (2004) Lipase-catalyzed kinetic resolution of racemates: a versatile method for the separation of enantiomers. U: *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods* (Toda, F., ured.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, str. 193-231.

Ghanem, A. (2007) Trends in Lipase-Catalyzed Asymmetric Access to Enantiomerically Pure/Enriched Compounds. *Tetrahedron.* **63**, 1721-1754.

Ghanem, A., Aboul-Enein, H. (2005) Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. *Chirality.* **17**, 1-15.

Gotor-Fernández, V., Gotor, V. (2007) Use of Lipases in Organic Synthesis. U: *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (Polaina, J., MacCabe, A. P., ured.), Springer, Dordrecht, str. 301-316.

Grudniewska, A., Melo, E. M., Chan, A., Gniłka, R., Boratyński, F., Matharu, A. S. (2018) Enhanced Protein Extraction From Oilseed Cakes Using Glycerol-Choline Chloride Deep Eutectic Solvents: A Biorefinery Approach. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 15791-15800.

Gu, Y., Jérôme, F. (2013) Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 9550-9570.

Guzmán, J., Mosteo, R., Ormad, M. P., Ovelleiro, J. L. (2014) Combined Photo-Fenton–SBR Processes for the Treatment of Wastewater from the Citrus Processing Industry. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 391-397.

Hanefeld, U. (2003) Reagents for (Ir)reversible Enzymatic Acylations. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 2405-2415.

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

Hernández-Corroto, E., Plaza, M., Marina, M. L., García, M. C. (2020) Sustainable extraction of proteins and bioactive substances from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) using pressurized liquids and deep eutectic solvents. *Innov. Food Sci. Emerg.* (objavljeno online 13. veljače 2020.). doi: 10.1016/j.ifset.2020.102314.

Humphrey, C. E., Ahmed, M., Ghanem, A., Turner, N. J. (2014) Application of Enzymes in Kinetic Resolutions, Dynamic Kinetic Resolutions and Deracemization Reactions. U: Separation of Enantiomers: Synthetic methods (Todd, M., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, str. 123-160.

Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Yoo, D. E., Han, S. Y., Lee, J. (2017) Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J.Cleaner Prod.* **151**, 87-95.

Kim, M., Ahn, Y., Park, J. (2003) Dynamic kinetic resolutions and asymmetric transformations by enzymes coupled with metal catalysis. *Curr. Opin. Biotech.* **13**, 578-87.

Kim, S. H., Park, S., Yu, H., Kim, J. H., Kim, H. J., Yang, Y.-H., Kim, Y. H., Kim, K. J., Kan, E., Lee, S. H. (2016) Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **128**, 65-72.

Koeller, K. M., Wong, C. H. (2001) Enzymes for chemical synthesis. *Nature.* **409**, 232-240.

Köse, M. D., Bayraktar, O. (2018) Valorization of Citrus Peel Waste. *Nat. Volatiles and Essent. Oils.* **5**, 10-18.

Kudłak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 11975-11992.

Liang, J., Zhang, Y., Sun, A., Deng, D., Hu, Y. (2015) Enantioselective Resolution of (±)-1-Phenylethanol and (±)-1-Phenylethyl Acetate by a Novel Esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121. *Appl. Biochem. Biotech.* **178**, 558-575.

Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., Koutinas, A. A., Kopsahelis, N., Stamatelatou, K., Dickson, F., Thankappan, S., Mohamed, Z., Brocklesby, R., Luque, R. (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.

Lin, Z., Jiao, G., Zhang, J., Celli, G. B., Brooks, M. (2020) Optimization of protein extraction from bamboo shoots and processing wastes using deep eutectic solvents in a biorefinery approach. *Biomass Conv. Bioref.* (objavljeno online 18. veljače 2020.). doi: 10.1007/s13399-020-00614-3.

Lopresto, C. G., Meluso, A., Di Sanzo, G., Chakraborty, S., Calabrò, V. (2019) Process-intensified waste valorization and environmentally friendly D-limonene extraction. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration.* **4**, 1-12.

Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., Xiao, C., Lu, A., Liu, Y. (2015) Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chem. Cent. J.* **9**, 1-14.

Ma, Y., Li, P., Li, Y., Willot, S. J., Zhang, W., Ribitsch, D., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Zhang, T., Hollmann, F., Wang, Y. (2019) Natural Deep Eutectic Solvents as Multifunctional Media for the Valorization of Agricultural Wastes. *Chemsuschem.* **12**, 1310-1315.

Mamma, D., Christakopoulos, P. (2014) Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. *Waste Biomass. Valor.* **5**, 529-549.

Martín-Matute, B., Bäckvall, J. E. (2007) Dynamic kinetic resolution catalyzed by enzymes and metals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 226-232.

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

Medina-Torres, N., Ayora, T., Espinoza-Andrews, H., Sanchez-Contreras, A., Pacheco, N. (2017) Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy.* **7**, 47-66.

Meng, J., Wang, Y., Zhou, Y., Chen, J., Wei, X., Ni, R., Liu, Z., Xu, F. (2019) Development of different deep eutectic solvent aqueous biphasic systems for the separation of proteins. *RSC Adv.* **9**, 14116-14125.

Morrison, H. G., Sun, C. C., Neervannan, S. (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int. J. Pharm.* **378**, 136-139.

Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Batool, S. (2015) Antimutagenic and antioxidant potential of aqueous and acidified methanol extracts from citrus limonum fruit residues. *J. Chil. Chem. Soc.* **60**, 2979-2983.

Nakamura, K., Matsuda, T. (2004) Enzymatic kinetic resolution. U: Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods (Toda, F., ured.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, str. 231-267.

Nakano, K., Kitamura, K. (2014) Dynamic Kinetic Resolution (DKR). U: Separation of Enantiomers: Synthetic methods (Todd, M., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, str. 161-216.

Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Khodir, M. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem.* **187**, 507-516.

Negro, V., Ruggeri, B., Fino, D., Tonini, D. (2017) Life cycle assessment of orange peel waste management. *Resour. Conserv. Recycl.* **127**, 148-158.

Ogihara, W., Aoyama, T., Ohno, H. (2004) Polarity Measurement for Ionic Liquids Containing Dissociable Protons. *Chem. Lett.* **33**, 1414-1415.

Ozturk, B., Esteban, J., Gonzalez-Miquel, M. (2018a) Deterpenation of Citrus Essential Oils Using Glycerol-Based Deep Eutectic Solvents. *J. Chem. Eng. Data.* **63**, 2384-2393.

Ozturk, B., Parkinson, C., Gonzalez-Miquel, M. (2018b) Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Sep. Purif. Technol.* **206**, 1-13.

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. Bioref.* **10**, 686-698.

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063-1071.

Pal, C. B. T., Jadeja, G. C. (2019) Deep eutectic solvent-based extraction of polyphenolic antioxidants from onion (*Allium cepa* L.) peel. *J. Sci. Food. Agric.* **99**, 1969-1979.

Panić, M., Majerić Elenkov, M., Roje, M., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2017) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process Biochem.* **66**, 133-139.

Panuccio, M. R., Attinà, E., Basile, C., Mallamaci, C., Muscolo, A. (2016) Use of Recalcitrant Agriculture Wastes to Produce Biogas and Feasible Biofertilizer. *Waste Biomass Valor.* **7**, 267-280.

Paradiso, V. M., Clemente, A., Summo, C., Pasqualone, A., Caponio, F. (2016) Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: Extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection. *Food Chem.* **212**, 43-47.

Patel, D. D., Lee, J. M. (2012) Applications of ionic liquids. *Chem. Record.* **12**, 329-355.

Pavoković, D., Buđa, R., Andrašec, F., Roje, M., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2017) Plant-mediated asymmetric reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanone. *Tetrahedron-asymmetr.* **28**, 730-733.

Pellissier, H. (2011) Recent Developments in Dynamic Kinetic Resolution. *Tetrahedron.* **67**, 3769-3802.

Plechkova, N. V., Seddon, K. R. (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 123-150.

Polanco-Lugo, E., Martínez-Castillo, J. I., Cuevas-Bernardino, J. C., González-Flores, T., Valdez-Ojeda, T., Pacheco, N., Ayora-Talavera, T. (2019) Citrus pectin obtained by ultrasound-assisted extraction: Physicochemical, structural, rheological and functional properties, *CyTA J. Food.* **17**, 463-471.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Shpigelman, A. (2017) Innovative “green” and novel strategies for extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes– A review. *Molecules.* **22**, 680-704.

Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **112**, 46-53.

Radošević, K., Čurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT-Food Sci. Technol.* **73**, 45-51.

Ravindran, R., Jaiswal, A. (2015) Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends Biotechnol.* **34**, 58-69.

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.

Rombaut, N., Tixier, A.-S., Bily, A., Chemat, F. (2014) Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **8**, 530-544.

Ruesgas-Ramon, M., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E. (2017) Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 3591-3601.

Ruiz, B., Flotats, X. (2014) Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste Manage.* **34**, 2063-2079.

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

Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature.* **409**, 258-268.

Sharma, K., Mahato, N., Cho, M. H., Lee, Y. R. (2017) Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environment friendly approaches. *Nutrition.* **34**, 29-46.

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

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.

Suetsugu, T., Tanaka, M., Iwai, H., Matsubara, T., Kawamoto, Y., Saito, C., Sasaki, Y., Hoshino, M., Quitain, A.T., Sasaki, M., Sakamoto, J., Goto, M. (2013) Supercritical CO₂ extraction of essential oil from Kabosu (*Citrus sphaerocarpa* Tanaka) peel. *Flavour*. **2**, 1-8.

Tang, B., Row, K. H. (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh. Chem.* **144**, 1427-1454.

Vandenberghe, A., Marko, I. E., Lucaccioni, F., Lutts, S. (2013) Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Ind. Crop. Prod.* **42**, 380-385.

Varga, Z., Kmezc, I., Szécsényi, Á., Székely, E. (2017) Neat lipase-catalysed kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol and a straightforward modelling of the reaction. *Biocatal Biotransfor.* **35**, 1-7.

Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J. A. (2010) 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. Recycl.* **122**, 51-65.

Xhaxhiu, K., Wenclawiak, B. (2015) Comparison of Supercritical CO₂ and Ultrasonic Extraction of Orange Peel Essential Oil from Albanian Moro Cultivars. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **18**, 289-299.

Xu, M., Ran, L., Chen, N., Fan, X., Ren, D., Yi, L. (2019) Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent. *Food chem.* (objavljeno online 10. lipnja 2019.). doi: 10.1016/j.foodchem.2019.124970.

Yang, M., Cao, J., Cao, F., Lu, C., Su, E. (2018) Efficient Extraction of Bioactive Flavonoids from Ginkgo biloba Leaves Using Deep Eutectic Solvent/Water Mixture as Green Media. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32**, 315-324.

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

Yang, T. X., Zhao, L. Q., Wang, J., Song, G. L., Liu, H. M., Cheng, H., Yang, Z. (2017) Improving Whole-Cell Biocatalysis by Addition of Deep Eutectic Solvents and Natural Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 5713-5722.

Zema, D. A., Calabrò, P. S., Folino, A., Tamburino, V., Zappia, G., Zimbone, S. M. (2018) Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Manage.* **80**, 252-273.

Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108-7146.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ana Grubišić

Ana Grubišić