

# Doprinos prirodnih eutektičkih otapala u valorizaciji otpadne kore naranče

---

**Jaša-Šangulin, Lucija**

**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:159:281835>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Lucija Jaša-Šangulin

1037/MB

**DOPRINOS PRIRODNIH  
EUTEKTIČKIH OTAPALA U  
VALORIZACIJI OTPADNE KORE  
NARANČE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu podmentorstvom 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

### DOPRINOS PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U VALORIZACIJI OTPADNE KORE NARANČE

*Lucija Jaša-Šangulin 1037/MB*

**Sažetak:** Valorizacija otpadne kore naranče u sklopu koncepta biorafinerije primjer je održivog razvoja te predstavlja moguće rješenje za adekvatno zbrinjavanje agro-industrijskog otpada uz proizvodnju visokovrijednih proizvoda. Kako bi koncept biorafinerije u potpunosti bio u skladu s načelima zelene kemije, sve veći naglasak stavlja se na zamjenu konvencionalnih organskih otapala "zelenijim" alternativama poput primjene prirodnih eutektičkih otapala. U ovom radu istražena je moguća primjena četiri prirodna eutektička otapala u valorizaciji narančine kore kao sirovine unutar koncepta biorafinerije. Ispitana otapala pokazala su se izrazito uspješnima prilikom ekstrakcije ukupnih polifenolnih spojeva, ali i kao pogodan medij za provođenje kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletil acetata pri čemu su pozitivno utjecala na enantioselektivnost biokatalizatora. S druge strane, ekstrakcija proteina i D-limonena iz narančine kore nije bila osobito uspješna u usporedbi s referentnim otapalima što ukazuje na potrebu za dodatnom optimizacijom odabranih otapala.

**Ključne riječi:** kinetička rezolucija, otpadna kora naranče, prirodna eutektička otapala, proizvodi dodane vrijednosti, zelena kemija

**Rad sadrži:** 57 stranica, 19 slika, 5 tablica, 84 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*

**Pomoćpri 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:** 24. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS CONTRIBUTION IN ORANGE PEEL WASTE VALORIZATION

*Lucija Jaša-Šangulin, 1037/MB*

**Abstract:** Valorization of orange peel waste through biorefinery concept is an excellent example of sustainable development. It represents a potential solution for environmentally friendly management of agro-industrial waste while also allowing production of high-value products. In order for biorefinery concept to be in accordance to green chemistry principles it is very important to introduce green solvents such as natural deep eutectic solvents (NaDES) to replace conventional organic solvents. Therefore, possible use of four NaDES in biorefinery of orange peel waste has been studied. NaDES proved to be very efficient in extraction of polyphenolic compounds, and also could be considered as a suitable medium for kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate showing a positive impact on the enantioselectivity of biocatalyst. However, extraction of proteins and D-limonene from orange peel did not meet the desired efficiency when compared to reference solvents suggesting that further optimization of used NaDES is needed.

**Keywords:** green chemistry, kinetic resolution, natural deep eutectic solvents, orange peel waste, value-added products

**Thesis contains:** 57 pages, 19 figures, 5 tables, 84 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*, Associate 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:** 24<sup>th</sup> September 2020

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Koncept biorafinerije.....	3
2.1.1. Definicija.....	3
2.1.2. Klasifikacija.....	5
2.1.2.1. Klasifikacija prema Mađunardnoj agenciji za energiju.....	6
2.1.3. Razvoj biorafinerija i izazovi.....	7
2.1.4. Valorizacija kore naranče kao otpada prehrambene industrije.....	9
2.2. Zelena otapala.....	12
2.2.1. Voda.....	12
2.2.2. Superkritični fluidi.....	12
2.2.2.1. Superkritični ugljikov dioksid.....	13
2.2.3. Ionske kapljevine.....	14
2.2.4. Eutektička otapala.....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
3.1. Materijali.....	18
3.1.1. Biljni materijal.....	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Oprema i uređaji.....	19
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Priprava prirodnih eutektičkih otapala.....	19
3.2.2. Određivanje polarnosti i pH-vrijednosti prirodnih eutektičkih otapala.....	20
3.2.3. Priprava ekstrakta narančine kore.....	21
3.2.4. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteau metodom.....	21
3.2.5. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u.....	23
3.2.6. Određivanje koncentracije D-limonena.....	25
3.2.7. Enantioselektivna hidroliza ( <i>R,S</i> )-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima.....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	32
4.1. Priprava prirodnih eutektičkih otapala.....	33
4.2. Određivanje polarnosti i pH-vrijednosti prirodnih eutektičkih otapala.....	33
4.3. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima narančine kore.....	35
4.4. Određivanje ukupnih proteina u ekstraktima narančine kore.....	37
4.5. Određivanje koncentracije D-limonena u ekstraktima narančine kore.....	39
4.6. Enantioselektivna hidroliza ( <i>R,S</i> )-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima.....	42
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	47
<b>6. LITERATURA</b> .....	49

# 1. UVOD

Porastom svjetske populacije povećava se i potražnja za hranom. Stručnjaci iz Organizacije za prehranu i poljoprivredu procjenjuju kako se trećina hrane proizvedene za prehranu ljudi izgubi kao otpad u lancu opskrbe hranom. Navedena činjenica ukazuje na problem povećanja količine otpada, a povećana količina otpada za sobom povlači i problem njegova odlaganja. Jedna od najčešće korištenih metoda zbrinjavanja otpada od hrane, uz odlaganje na odlagališta otpada, je njegovo spaljivanje skupa sa zapaljivim komunalnim otpadom što za sobom povlači probleme poput zagađenja zraka, ali i visoke kapitalne i operativne troškove. Upravo je zato potrebno razviti ekološki prihvatljivije metode gospodarenja otpadom, a pritom se otpad od hrane sve češće razmatra kao vrijedna sirovina za proizvodnju proizvoda s dodanom vrijednošću (Zhu i sur., 2020; Uçkun Kiran i sur., 2014).

Otpad narančine kore koji nastaje kao nusproizvod proizvodnje sokova jedan je od najistraživanijih agro-industrijskih otpada. Naime, 40 % ukupno proizvedenih naranči iskoristi se za proizvodnju soka pri čemu oko polovine mase ploda zaostaje kao otpad u obliku kore sjemenki i pulpe (Okino-Delgado i Fleuri, 2014). Budući da se godišnje generiraju velike količine otpada od naranče, konvencionalne metode zbrinjavanja poput kompostiranja ili odlaganja na odlagališta otpada nisu dostatne te zbog organske prirode otpada postoji opasnost od zagađenja okoliša (de la Torre i sur., 2019). Problem odlaganja doveo je do razvoja novih, ekološki prihvatljivijih metoda zbrinjavanja otpada narančine kore među kojima je i valorizacija narančine kore u sklopu koncepta biorafinerije. Kora naranče bogata je različitim vrijednim spojevima poput pigmenta, organskih kiselina i bioaktivnih spojeva koji bi se mogli koristiti u proizvodnji visoko vrijednih proizvoda (Okino-Delgado i Fleuri, 2014).

Koncept biorafinerije podrazumijeva procesiranje biomase u širok spektar proizvoda (hrana, stočna hrana, materijali i kemikalije) i energiju (goriva, električnu energiju i toplinu) (de Jong i sur., 2009). Kako bi se sirovine mogle koristiti unutar koncepta biorafinerije trebale bi biti obnovljive, održive i ekološki prihvatljive. Otpad narančine kore zadovoljava sve navedene kriterije (de la Torre i sur., 2019). Kako bi se koncept biorafinerije u potpunosti temeljio na ekološki prihvatljivim načelima potrebno je optimizirati svaki korak procesa s ciljem smanjenja potrošnje energije, ali i generiranja potencijalno štetnog otpada. Pritom je izrazito važno štetna organska otapala i kemikalije zamijeniti neškodljivim alternativama poput



prirodnih eutektskih otapala koja u potpunosti zadovoljavaju principe zelene kemije te su uz to jeftina i lako dostupna (Cvjetko Bubalo i sur., 2018; Morais i Bogel-Lukasik, 2013).

Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal primjene četiri prirodna eutektska otapala s različitim udjelima vode (30 %, 50 % i 80 %, v/v) pri valorizaciji otpadne narančine kore za proizvodnju proizvoda s dodanom vrijednošću unutar koncepta biorafinerije. Stoga je ispitana njihova učinkovitost u ekstrakciji ukupnih polifenolnih spojeva, proteina i D-limonena iz narančine kore. Uz to, istražena je mogućnost primjene kore naranče kao izvora hidrolitičkih enzima za kinetičku rezoluciju (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektskim otapalima kao mediju za provedbu reakcije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KONCEPT BIORAFINERIJE

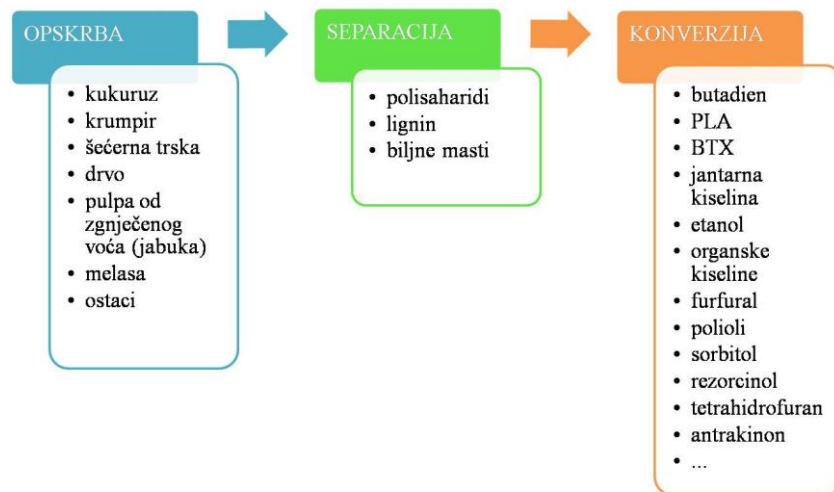
Pojam biorafinerije obuhvaća koncept koji se temelji na konverziji biljne biomase u različite kemikalije, materijale i goriva čime bi se smanjila potreba za fosilnim gorivima (Liu i sur., 2012). Fosilna goriva, posebno nafta i zemni plin, glavni su izvor energije i kao takvi pokrivaju preko 80 % svjetskih potreba za energijom (Bardhan i sur., 2015). Uz to predstavljaju i glavne sirovine iz kojih se dobivaju brojni proizvodi, a najviše kemikalije (Cherubini i sur., 2009). Upravo zbog velike ovisnosti o fosilnim gorivima predviđa se kako će u bliskoj budućnosti društvena potreba za energijom i sirovinama doseći kritičnu točku (Parajuli i sur., 2015). Razlog ovome leži u činjenici da je riječ o neobnovljivim izvorima energije čije se zalihe smanjuju. Osim toga puno je veći problem emisija stakleničkih plinova - ugljikovog dioksida ( $\text{CO}_2$ ), dušikovog (I) oksida ( $\text{N}_2\text{O}$ ) i metana ( $\text{CH}_4$ ) koji nastaju izgaranjem fosilnih goriva i negativno utječu na klimu (Cherubini i sur., 2009). Stoga se javlja sve veća potreba za održivim razvojem u svrhu osiguravanja energije, materijala i kemikalija te ublažavanja klimatskih promjena pri čemu biorafinerije predstavljaju jedno od mogućih rješenja (Diep i sur., 2012). Za razliku od fosilnih goriva, biomasa pripada obnovljivim izvorima energije. Biljke sintetiziraju različite spojeve pri čemu koriste sunčevu energiju, ugljični dioksid iz atmosfere i vodu iz okoliša, a oslobađaju kisik. Nadalje, izgaranjem biomase oslobađa se energija, ali i  $\text{CO}_2$  i voda što mogu koristiti biljke. Prema tome, konverzijom biomase mogle bi se zadovoljiti globalne potrebe za energijom i kemikalijama, a da pritom nema negativnog učinka na okoliš (Liu i sur., 2012).

#### 2.1.1. Definicija

Do danas nije donesena jedinstvena definicija koncepta biorafinerije. Zato su u upotrebi brojne definicije koje uvelike ovise o tipu aktivnosti koja se provodi. Neke od njih biorafineriju definiraju kao veliki proizvodni lanac u koji su uključene brojne tvrtke i tvornice koje mogu biti geografski raspršene, a povezane su kroz lanac vrijednosti od početnih sirovina do gotovog proizvoda. S druge strane, u pojedinim se definicijama biorafinerija interpretira prvenstveno kao tvornica u kojoj se uz različite tehnologije prerade iz biomase dobivaju određeni proizvodi. Osim toga, biorafinerije su u nekim od definicija okarakterizirane kao novi koncept, točnije novi skup znanja i strategija čija je svrha sve veće korištenje biomase kao sirovine (Bauer i sur., 2017). Međutim, definicija koja najsveobuhvatnije objašnjava

djelatnost biorafinerija je ona koju je predložila Međunarodna agencija za energiju (eng. *International energy agency*, IEA) prema kojoj je biorafinerija: "Procesiranje biomase u širok spektar proizvoda (hrana, stočna hrana, materijali i kemikalije) i energiju (goriva, električnu energiju i toplinu)" (de Jong i sur., 2009).

Po principu rada biorafinerije nalikuju naftnim rafinerijama. Cijeli proces može se podijeliti u tri osnovne faze: opskrba sirovinama, separacija i konverzija (slika 1).



Slika 1. Tri faze procesa unutar biorafinerije (Bozell, 2008)

Prva faza uključuje opskrbu biorafinerije sirovinama. Pritom se kao sirovine mogu koristiti različiti materijali koje pronalazimo u prirodi, primjerice drvo, kukuruz ili soja. Iako je broj potencijalnih sirovina jako velik i one su naizgled prilično različite, pokazano je kako gotovo sve obnovljive sirovine sadrže pojedine grupe strukturnih biopolimera koji se izoliraju u slijedećoj fazi procesa - separaciji. Separacijom se uglavnom dobiju tri grupe prirodnih polimera: polisaharidi (škrob, celuloza, hemiceluloza), lignin i biljne masti. Proces separacije usko je povezan s procesima predobrade sirovina. Razvoj koncepta integrirane biorafinerije dovodi do razvoja procesa predobrade koji omogućuju korištenje primarnih komponenti biomase dobivenih separacijom u različitim kemijskim i biokemijskim procesima. Kao zadnja faza procesa biorafinerije navodi se konverzija. Međuprodukti dobiveni separacijom procesiranjem se prevode u različite kemikalije i goriva (Bozell, 2008).

Koncept biorafinerije zadovoljava nekoliko principa zelene kemije tako što omogućava vođenje procesa u vodenim medijima, kao i dizajn proizvoda koji se nakon prestanka djelovanja i upotrebe razgrađuje na okolišu neškodljive produkte. Zadovoljavanjem gore navedenih načela zelene kemije kojima se utječe na životni ciklus proizvoda i smanjuje

utrošak topline i energije, procesi unutar kemijske industrije postaju ekološki prihvatljiviji (Bozell, 2008). Ragauskas i sur. (2006) smatraju kako bi razvoj biorafinerija mogao doprinijeti održivom razvoju ne samo svojom ovisnošću o obnovljivim izvorima, već i recikliranjem otpada pri čemu cijeli proces postaje CO<sub>2</sub> neutralan.

### 2.1.2. Klasifikacija

Standardni sustav klasifikacije biorafinerija još nije definiran. Neki od kriterija koji se koriste za klasifikaciju uključuju upotrijebljene sirovine, vrstu tehnologije, status tehnologije (biorafinerije prve i druge generacije) i dobivene gotove proizvode ili intermedijere (Diep i sur., 2012). Van Ree i Annevelink (2007) u svom radu opisali su sedam koncepata biorafinerije:

1. Konvencionalne biorafinerije – temeljene na postojećim industrijama, primjerice industriji škroba, šećernoj ili prehrambenoj industriji. Njihovom nadogradnjom moguć je razvoj novih tipova biorafinerija poput onih opisanih u nastavku teksta.
2. Zelene biorafinerije – temelje se na prešanju mokre biomase, kao što su zelena trava, lucerna ili djetelina. Kako se koristi svježa biomasa potrebno je što prije procesirati sakupljenu biomasu ili poduzeti određene korake zaštite sirovine od propadanja (npr. silaža).
3. Biorafinerije koje koriste cijeli usjev – kao sirovine koriste žitarice poput pšenice, raži i kukuruza, a temelje se na suhom ili mokrom mljevenju biomase. Pritom je prvo potrebno odvojiti stabljiku od sjemenja, a tako dobivene dvije frakcije se zatim procesiraju zasebno.
4. Biorafinerije lignoceluloznih sirovina – temelje se na frakcioniranju biomase bogate lignocelulozom na intermedijere celulozu, lignin i hemicelulozu koji se zatim dalje procesiraju u širok spektar različitih proizvoda.
5. Biorafinerije s konceptom dvije platforme – uključuju dvije platforme, šećera i sintetičkog plina. Temelje se na frakcioniranju biomase na dvije frakcije, šećerna koja sadrži celulozu i hemicelulozu te frakciju lignina. Šećerna se frakcija preko tzv. šećerne platforme podvrgava biokemijskoj konverziji u širok spektar proizvoda, dok se ligninska frakcija preko platforme sintetičkog plina (eng. *syngas platform*)

termokemijskom konverzijom prevodi u različite proizvode, uključujući i snagu i/ili toplinu.

6. Termokemijske biorafinerije – temelje se na upotrebi nekoliko različitih tehnologija (piroliza, rasplinjavanje, HTU). Biomasa se termokemijskim procesima prevodi u širok spektar proizvoda s dodatnom vrijednošću.
7. Morske biorafinerije – temeljene na biomasi iz mora kao što su mikroalge i makroalge te njihovi nusproizvodi. Morske biorafinerije imaju velik potencijal obzirom da morska biomasa posjeduje sposobnost korištenja CO<sub>2</sub> ali i mogućnost postizanja veće produktivnosti u donosu na kopnene biljke.

Uz prethodno opisan sustav klasifikacije biorafinerija u literaturi je moguće pronaći još primjera, međutim oni se uglavnom odnose na pojedine pogone biorafinerija. Jedan od problema je nepostojanje točno određenih kriterija po kojima bi se mogla vršiti klasifikacija. Neki od sustava klasifikacije se primjerice temelje na sirovini koja se koristi (npr. biorafinerije lignoceluloznih sirovina i morske biorafinerije) dok drugi naglasak stavljaju na tehnologiju koja se primjenjuje (npr. termokemijske, konvencionalne i biorafinerije s konceptom dvije platforme). Ovakvim se pristupom klasifikaciji ograničava moguća upotreba tehnologija na različite tipove sirovina. Osim toga, autori ne uzimaju u obzir mogućnost kombiniranja različitih biorafinerija povezivanjem tehnologija. Primjerice, ako se ugljikohidratna frakcija lignocelulozne sirovine koristi za proizvodnju ksiluloze i celuloze, biorafinerija se klasificira kao biorafinerija lignoceluloznih sirovina. Međutim, ako se frakcija lignina pirolizira isti sustav moguće je klasificirati kao biorafineriju s konceptom dvije platforme. Razlog ovakvim oprečnim rezultatima je prevelika generalizacija kriterija prema kojima je osmišljeno nekoliko generičkih tipova biorafinerija, a svaki pojedinačni sustav bi se onda morao savršeno uklapati u jedan od definiranih sustava (Cherubini i sur., 2009).

#### *2.1.2.1. Klasifikacija prema Međunarodnoj agenciji za energiju*

Prema naputku Međunarodne agencije za energiju (IEA, eng. *International Energy Agency*) kroz zadatak 42 koji se odnosi na razvoj biorafinerije razvijen je sustav klasifikacije prema kojem se biorafinerije mogu klasificirati na temelju četiri glavne karakteristike: platforme, proizvodi, sirovine i procesi pretvorbe. Pritom se klasifikacija provodi navođenjem uključenih platformi, proizvoda, sirovina i po potrebi konverzijskih procesa.

Platforme uključuju intermedijare iz kojih se dobivaju konačni proizvodi, a preko kojih je moguće povezati različite sustave biorafinerija i njihove procese (de Jong i sur., 2009). Cherubini i sur. (2009) smatraju kako su upravo platforme temeljni kriterij za definiranje tipa biorafinerije. Kao jedne od glavnih platformi navode se bioplin, sintetski plin, vodik, C6 (npr. glukoza, fruktoza, galaktoza) i C5 šećeri (npr. ksiloza i arabinoza), lignin, struja i toplina.

Proizvodi biorafinerija mogu se svrstati u dvije glavne grupe: energenti (npr. bioetanol, biodizel i sintetska biogoriva) te materijalni proizvodi (npr. kemikalije, materijali, hrana i stočna hrana).

Sirovine se također mogu grupirati u dvije kategorije: poljoprivredni energetske usjevi (npr. škrobni usjevi i brzorastuće vrste drveća) i ostaci biomase iz poljoprivrede, šumarstva i industrije (npr. slama, kora drveća, otpadno ulje iz domaćinstava, otpad od prerade biomase).

Po pitanju procesa konverzije, Međunarodna agencija za energiju definirala je četiri temeljne grupe procesa: biokemijski procesi (npr. fermentacija, enzimske pretvorbe), termokemijski procesi (npr. piroliza i rasplinjavanje), zatim kemijski procesi (npr. sinteza, esterifikacija, kiselinska hidroliza) i mehanički procesi (npr. prešanje, frakcioniranje) (de Jong i sur., 2009). Mehaničkim procesima se, za razliku od kemijskih, ne mijenja kemijski sastav sirovine, već se ona usitnjava ili razdvaja na komponente. Biokemijski procesi odvijaju se pri blagim uvjetima korištenjem enzima ili mikroorganizama. S druge strane, biomasa se u termokemijskim procesima izlaže ekstremnim uvjetima kao što su visoke temperature i/ili visok tlak, sa ili bez prisustva katalizatora (Cherubini i sur., 2009).

Daljnijim razvojem koncepta biorafinerije moguće je jednostavno ažurirati i sustav klasifikacije dodavanjem novih platformi, procesa ili proizvoda. Također, za razliku od ostalih sustava klasifikacije, ovaj pristup klasifikaciji ne svrstava biorafinerije u prethodno definirane generičke tipove. Sukladno tome pruža se mogućnost povezivanja različitih biorafinerijskih sustava u takozvane 'bio-klastere' (Cherubini i sur., 2009).

### 2.1.3. Razvoj biorafinerija i izazovi

Cilj daljnjeg razvoja biorafinerija trebao bi biti brži razvoj proizvoda koji se mogu dobiti iz biomase te njihova implementacija i usvajanje na tržištu (Dragone i sur., 2020). Stručna literatura smatra kako u biorafinerijama leži ogroman potencijal za razvoj održive ekonomije u bliskoj budućnosti. Primjerice, ugljikohidrati iz biomase mogu se koristiti kao sirovine za proizvodnju različitih alkohola, karboksilnih kiselina i estera, a njihovom bi se upotrebom

izbjeglo i nekoliko skupih oksidativnih procesa. Nadalje, prethodno spomenuti prirodni proizvodi su već stereo- i regiokemijski čisti čime se smanjuje ovisnost o skupim kiralnim katalizatorima i složenim sintezama koje su danas neophodne za dodavanje funkcionalnih skupina gotovim proizvodima. Prirodne sirovine već se koriste u proizvodnji otapala, plastike, maziva i mirisa. Na primjer polilaktična kiselina (PLA), najčešći tip bioplastike, primjenu je već pronašla u industriji odjeće, a koristi se i prilikom pakiranja hrane. Međutim, prethodno navedeni procesi zahtijevaju pročišćene sirovine. Glavna prepreka korištenju biomase je upravo razvoj metoda za njenu separaciju, pročišćavanje i prevođenje u kemikalije i goriva, a separacija je pritom najskuplji korak. Ragauskas i sur. (2006) smatraju kako će u biorafinerijama glavna metoda separacije biti ekstrakcija otapalima zbog nehlapljivosti većine komponenata biomase i činjenice da ostale metode separacije, poput kromatografije, nisu razvijene u većem mjerilu. Općenito, mnogi postupci unutar biorafinerija se i dalje smatraju suboptimalnima međutim poduzeto je malo pokušaja glede njihova optimiranja za rad u većem mjerilu (King i sur., 2010).

Za uspješan razvoj komercijalnih biorafinerija potrebno je prevladati različite izazove poput tehničkih i strateških izazova. Glavni tehnički izazov uključuje postizanje što većeg prinosa sirovine. To za sobom povlači potrebu za poboljšanjem sastava biomase, što je moguće postići oplemenjivanjem. Nadalje, za bolje iskorištenje biomase potreban je i razvoj učinkovitijih enzima, a posebno onih za obradu lignoleluloznih sirovina poput drvene biomase, pšenice, kukuruznih klipova i slično. Još jedan od tehničkih izazova odnosi se na optimizaciju logističkog procesa. Pritom se misli na razvoj i optimizaciju metoda okrupnjivanja sirovine (npr. briketiranje ili peletiranje) koje bi omogućile jeftiniji transport te razvoj metoda kojima bi se spriječile fizikalne i kemijske promjene sirovine prilikom njenog sabiranja, pohrane i transporta. Konačno, potrebno je razviti i distribucijski lanac gotovog proizvoda. U slučaju proizvodnje biogoriva idealna solucija bila bi mogućnost upotrebe već postojeće infrastrukture poput naftovoda ili benzinskih stanica (King i sur., 2010).

Kako bi biorafinerije mogle postati dio svakodnevice potrebno je osim tehničkih prevladati i komercijalne izazove poput pronalaženja investitora te integracije novih proizvoda u postojeći lanac vrijednosti, odnosno preuzimanje rizika koja sa sobom nose novi proizvodi i tehnologije. Prema Svjetskom ekonomskom forumu jedan od glavnih komercijalnih izazova je upravo integracija novih proizvoda. Neki od prirodnih proizvoda kao što je zeleni polietilen (PE) ne zahtijevaju dodatne prilagodbe od strane korisnika ili su prilagodbe minimalne i zato ih je lakše plasirati na tržište. S druge strane proizvodi poput bioetanola ne mogu se jednako

uspješno integrirati u postojeći lanac vrijednosti jer upotreba bioetanola zahtjeva modifikaciju standardnog motora (King i sur., 2010).

Jedan od glavnih pokretača proizvodnje prirodnih proizvoda je zaštita okoliša. Iz tog razloga implementacija biorafinerijane smije ni na koji način ugroziti okoliš. Prenamjena zemljišta i njen utjecaj na emisiju stakleničkih plinova, ali i natjecanje s proizvodnjom hrane mogući su problemi s kojima bi se razvoj biorafinerija mogao suočiti (Diep i sur., 2012). Sveukupan utjecaj prirodnih proizvoda na emisiju stakleničkih plinova uvelike ovisi o sirovini, emisiji iz korištenja zemljišta te učinkovitosti same sinteze. Prenamjena zemljišta na emisiju stakleničkih plinova utječe kroz promjenu prirodnih ekosustava (npr. sječom i paljenjem) te oslobađanjem ugljika iz tla (King i sur., 2010). Razlikujemo dvije vrste promjena u emisiji stakleničkih plinova koje su uzrokovane prenamjenom zemljišta – direktne i indirektno. Izmjena postojeće namjene zemljišta radi uzgoja sirovine za biorafinerije (npr. sječa šuma zbog uzgoja soje) može dovesti do promjena u zalihama ugljika na tom zemljištu. U ovom slučaju radi se o direktnim promjenama. S druge strane, ako prenamjena jednog zemljišta uzrokuje promjene u korištenju drugog zemljišta govorimo o indirektnim promjenama. Osim toga, izmjene u korištenju zemljišta uvelike bi mogle utjecati i na opskrbu hranom te na smanjenje bioraznolikosti ako bi se velik broj poljoprivrednih zemljišta i prirodnih staništa prenamijenilo za uzgoj energetskih usjeva.

Sve prethodno navedene izazove potrebno je uzeti u obzir kako bi se osigurao održivi razvoj koncepta biorafinerije, a u njihovom nadvladavanju važnu ulogu igraju i različiti dioničari, nevladine organizacije kao i sama vlada (Diep i sur., 2012).

#### 2.1.4. Valorizacija kore naranče kao otpada prehrambene industrije

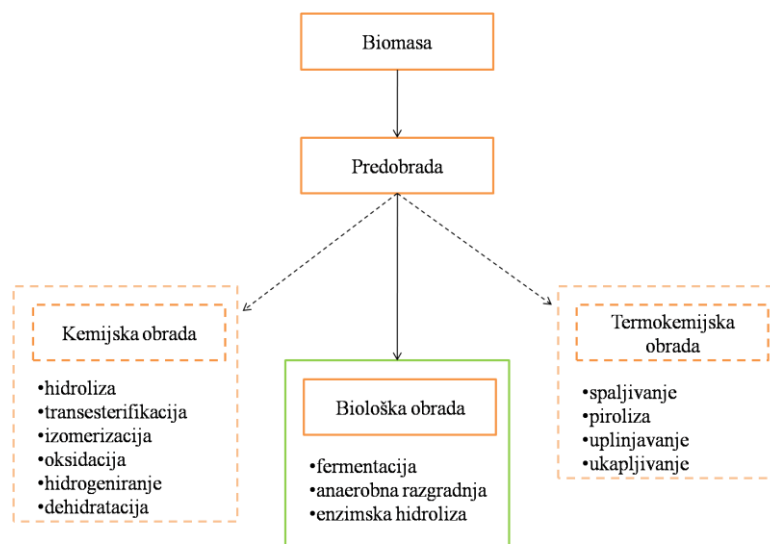
Otpad od hrane naziv je za organski otpad iz tvornica za preradu hrane, kućanstava te ugostiteljstva i maloprodaje. Kako broj stanovništva i ekonomija ubrzano rastu, tako se i količina otpada od hrane povećava. Organizacija za prehranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organization, FAO*) procjenjuje kako jedna trećina hrane proizvedene za prehranu ljudi na globalnoj razini se izgubi kao otpad u lancu opskrbe hranom. Zbrinjavanje ovakvog otpada uglavnom uključuje njegovo spaljivanje skupa s ostalim zapaljivim komunalnim otpadom radi proizvodnje topline i energije. Međutim, ovakav oblik zbrinjavanja nije isplativ zbog visokih kapitalnih i operativnih troškova kao i mogućeg zagađenja zraka uslijed povećane proizvodnje stakleničkih plinova. Zato se sve više razmatra mogućnost



korištenja otpada od hrane kao sirovine za proizvodnju visoko vrijednih kemikalija poput organskih kiselina, biorazgradive plastike te enzima (Uçkun Kıran i sur., 2014).

Jedan od primjera je otpad narančine kore, nedovoljno iskorišten nusproizvod proizvodnje soka od naranče. U svijetu je 2019. godine proizvedeno oko 55 milijuna tona naranči (Shahbandeh, 2019), a pritom se oko 40 % proizvedene količine iskoristi za proizvodnju narančinog soka. Prilikom proizvodnje nastaje velika količina otpada obzirom da se otprilike samo polovina mase ploda prevede u sok (Okino-Delgado i Fleuri, 2014). Većina otpada zbrinjava se kompostiranjem ili odlaganjem na odlagališta otpada što može dovesti do zagađenja okoliša. Naime, otpad narančine kore sadrži velike količine vlage, ali i šećera, soli i proteina zbog čega lako podliježe fermentaciji. Otpad narančine kore dodaje se i hrani za životinje. Međutim lakoća propadanja zbog visokog sadržaja vlage, gorki okus, te izazivanje bolesti stoke ukoliko hrana sadrži previše narančine kore ograničava ovakav oblik zbrinjavanja otpada (de la Torre i sur., 2019).

S druge strane otpad narančine kore sadrži brojne vrijedne tvari poput pigmentata, šećera, organskih kiselina te bioaktivnih spojeva (npr. antioksidansi, enzimi, antimikrobni spojevi i sl.) koji bi se mogli iskoristiti u proizvodnji različitih proizvoda s dodanom vrijednošću (Okino-Delgado i Fleuri, 2014). Sirovine koje se koriste za potrebe biorafinerija trebale bi biti obnovljive, održive i ekološki prihvatljive, a otpad narančine kore zadovoljava sve navedene kriterije.



Slika 2. Valorizacija biomase i otpada biomase unutar biorafinerije (de la Torre i sur., 2019)

Na slici 2 prikazani su mogući načini iskorištavanja otpada kore naranče i drugih sličnih sirovina u sklopu koncepta biorafinerije. Pritom se naglasak stavlja na valorizaciju kroz

biološku konverziju koja se smatra ekološki najprihvatljivijom (de la Torre i sur., 2019). Kako bi se maksimalno iskoristio potencijal sirovine poput otpada narančine kore potrebno je iskoristiti razlike u svojstvima komponenata biomase i međuproizvoda u svrhu dobivanja više različitih proizvoda. Samim time smanjuje se i krajnja količina otpada (Siles López i sur., 2010).

Fermentacijom otpada narančine kore moguće je dobiti različite proizvode kao što su biogoriva (npr. bioetanol i bioplín), ali i druge visoko vrijedne kemikalije (npr. organske kiseline) te biokatalizatore. Prije same fermentacije potrebna je predobrada sirovina. Ovaj korak je bitan za postizanje što većeg prinosa cjelokupnog procesa. Vanjski, obojani dio narančine kore – flavedo bogat je eteričnim uljima, a najzastupljeniji među njima je D-limonen. Eterična ulja, posebno D-limonen, snažni su inhibitor rasta brojnih mikroorganizama te kao takvi inhibiraju proces fermentacije i zato ih je potrebno ukloniti metodama predobrade (de la Torre i sur., 2019). S druge strane, zbog svojih su svojstava pronašli široku primjenu, osobito u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (npr. kao bojila i arome). Osim toga, D-limonen se može koristiti i kao zeleno otapalo za ekstrakciju, odnosno kao zamjena za tradicionalna i često toksična otapala poput toluena (Satari i Karimi, 2018).

Enzimi narančine kore također imaju potencijalnu primjenu u industriji. Općenito, upotreba enzima kao biokatalizatora u industrijskoj proizvodnji s vremenom sve više raste, prvenstveno zbog svojstava poput rada pri blagim reakcijskim uvjetima (niže temperature i tlakovi, neutralan pH) kao i izrazita regio- i enantioselektivnost. Uz to, enzimi su biorazgradivi i netoksični te imaju sposobnost katalize velikog broja različitih reakcija (Chapman i sur., 2018; Maia da Silva i sur., 2017). Zahvaljujući gore navedenim svojstvima, enzimske reakcije imaju prednost pred klasičnim kemijskim reakcijama zbog manjih operativnih troškova uslijed smanjene potrebe za energijom. Također, smanjuje se količina nastalog otpada, a sam proces proizvodnje znatno je pojednostavljen (Chapman i sur., 2018). Danas se većina komercijalnih enzima uglavnom proizvodi fermentacijom. Korištenje enzima iz otpada narančine kore znatno je jeftinije obzirom da se za njihovu ekstrakciju koriste jednostavne i jeftine metode (Okino-Delgado i sur., 2019).

U zaključku, upotreba poljoprivredno-industrijskog otpada poput kore naranče primjer je održivog razvoja. Prije svega dolazi do smanjenja sveukupnih troškova proizvodnje zbog adekvatnog odlaganja otpada i porasta prihoda jer se iz otpada stvaraju novi proizvodi za tržište.

## 2.2. ZELENA OTAPALA

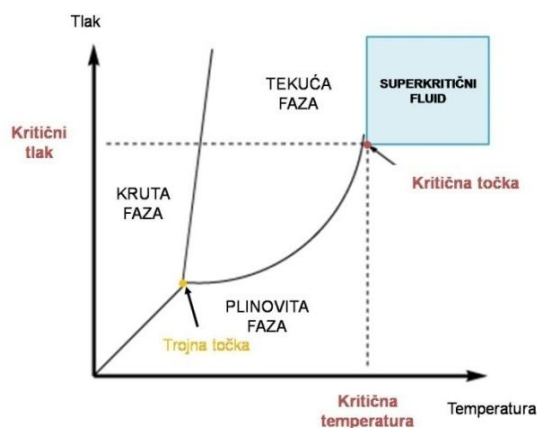
Zelena kemija je pristup koji se temelji na dizajnu ekološki prihvatljivih kemijskih proizvoda i procesa. Glavni cilj zelene kemije je smanjena upotreba ili potpuna eliminacija štetnih tvari unutar procesa, kao i njihovo nastajanje, a sve u svrhu zaštite ljudi i okoliša (EPA, 2017). Paul Anastas and John Warner 1998. godine objavili su 12 načela zelene kemije u kojima opisuju moguće načine smanjenja utjecaja kemijske proizvodnje na okoliš i zdravlje ljudi. Jedan od 12 načela bavi se problemom otapala i pomoćnih sredstava, obzirom da se ona koriste u iznimno velikim količinama tijekom proizvodnje te čine većinu nastalog otpada. Osim toga, klasična otapala često su toksična, zapaljiva i korozivna te kao takva predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi i doprinose onečišćenju zraka, vode i tla (Anastas i Eghbali, 2010). Zato ih je potrebno zamijeniti novim alternativama koje su sigurnije za zdravlje i okoliš. Voda, superkritični fluidi, ionske kapljevine i eutektička otapala primjeri su "zelenih" solucija (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

### 2.2.1. Voda

Voda se smatra "najzelenijim" otapalom prvenstveno zato što nije toksična ni zapaljiva, lako je dostupna i jeftina. Također, pokazala se pogodnim otapalom za pojedine reakcije, posebno za procese koji se provode pri visokoj temperaturi i tlaku (Faisal, 2019). Unatoč navedenim prednostima, voda kao otapalo ima i nedostatke koji ograničavaju njenu upotrebu. Naime, voda je izrazito polarna i to je čini odgovarajućim otapalom za biotransformacije izrazito polarnih supstrata (npr. ugljikohidrata) (Sheldon, 2016), ali većina organskih i organometalnih spojeva je slabo topljiva u vodi. Osim toga, uklanjanje i pročišćavanje vode nakon završenog procesa zahtjeva puno energije i skupo je (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Topivost supstrata mogla bi se povećati upotrebom tradicionalnih organskih otapala kao kootapala. Međutim zbog negativnih svojstava organskih otapala koji se kose s načelima zelene kemije ovakvo rješenje nije idealno (Xu i sur., 2017).

### 2.2.2. Superkritični fluidi

Superkritični fluidi još su jedna alternativa organskim otapalima. Riječ je o fazi tvari koja se javlja iznad određene vrijednosti temperature i tlaka (slika 3). Naime, porastom temperature i tlaka gustoća tekuće faze opada dok gustoća plinovite faze raste. U trenutku kada se gustoće obje faze izjednače nestaje granica među fazama i nastaje superkritični fluid.



Slika 3. Fazni dijagram (Kerton i Marriott, 2013)

Temperatura pri kojoj nastaje superkrični fluid zove se kritična temperatura, a tlak kritični tlak. Oni zajedno definiraju kritičnu točku, odnosno najvišu vrijednost tlaka i temperature pri kojoj tvar može istovremeno postojati kao plin i tekućina u ravnoteži (Kerton i Marriott, 2013). Superkrični fluidi imaju jedinstvena svojstva između tekućina i plinova (npr. svojstvo difuzije i nisku viskoznost kao plinovi te topljivost kao tekućine) koja znatno ovise o tlaku i temperaturi. Zahvaljujući tome superkrične tekućine se lako mogu prilagođavati potrebama procesa. Primjerice, pročišćavanje se može provesti sniženjem tlaka jer se pritom smanjuje i topljivost što rezultira taloženjem produkta (Kerton i Marriott, 2013; Arai i sur., 2002). U teoriji, svaka tekućina može se koristiti kao superkrično otapalo. Međutim, prilikom odabira otapala važno je uzeti u obzir njegove karakteristike kao što su toksičnost, svojstva fluida, troškovi kao i moć otapanja. Danas se najčešće koriste superkrični ugljikov dioksid i superkrična voda (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

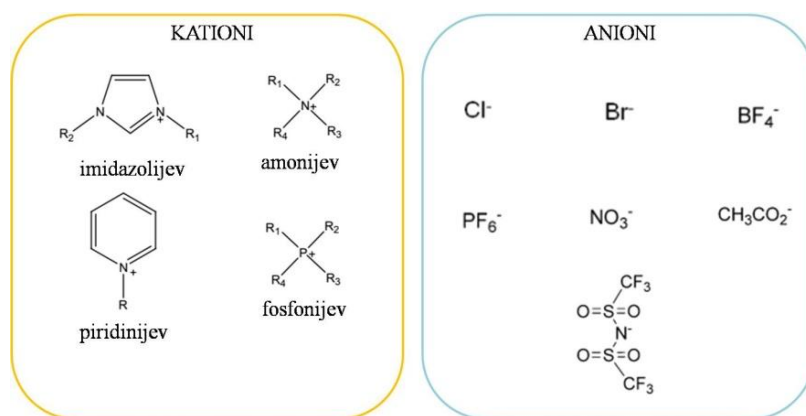
#### 2.2.2.1. Superkrični ugljikov dioksid

Suprekrični ugljikov dioksid (sc-CO<sub>2</sub>) je jeftin i lako dostupan, nije toksičan ni reaktivan, a u superkrično stanje prelazi pri relativno blagim uvjetima ( $T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 7,38 \text{ MPa}$ ). Zbog malog viskoziteta ima veliku sposobnost prodiranja u svaku poru, što ga čini izvrsnim alternativnim otapalom za ekstrakcije. Obzirom da je kritična temperatura blizu sobne temperature moguća je njegova primjena za ekstrakciju tremolabilnih spojeva poput bioaktivnih spojeva, a njegovo uklanjanje nakon završenog procesa je jednostavno. Osim toga, sc-CO<sub>2</sub> smatra se sigurnim otapalom, odnosno ima GRAS status (eng. *Generally Recognised as Safe*). Zahvaljujući navedenim svojstvima smatra se jednim od ekološki najprihvatljivijih otapala među superkričnim fluidima (Chemat i sur., 2019; Arai i sur., 2002). S druge strane, sc-CO<sub>2</sub> je izrazito nepolarno otapalo i u pravilu topivost spojeva opada s

porastom broja polarnih funkcionalnih skupina (hidroksilne, karboksilne, amino i nitro skupine). Zato je superkritični CO<sub>2</sub> nepovoljno otapalo za ekstrakciju polarnih spojeva velike molekulske mase. Međutim, upotrebom polarnih kootapala poput etanola i metanola moguće je povećati topivost spojeva od interesa. Također, zbog prirode procesa potrebno je koristiti skupu opremu koja mora izdržati visoke tlakove kao i veliki utrošak energije za komprimiranje plina. Superkritični CO<sub>2</sub> danas ima široku primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, a možda najpoznatiji primjer industrijske primjene je ekstrakcija kofeina iz zrna kave (Cvjetko Bubalo i sur., 2018; Kerton i Marriott, 2013).

### 2.2.3. Ionske kapljevine

Ionske kapljevine su organske soli koje su u potpunosti građene od iona. Kationi su uglavnom velike organske molekule niske simetrije koje sadrže pozitivno nabijeni atom dušika, sumpora ili fosfora povezan s organskim ili anorganskim anionima. U praksi se najčešće koriste različito supstituirani imidazolijevi, amonijevi, piridinijevi i fosfonijevikationi, dok su najčešći anioni halogenidi, zatim tetrafluorborat [BF<sub>4</sub>], heksafluorfosfat [PF<sub>6</sub>], nitrat [NO<sub>3</sub>], sulfat [SO<sub>4</sub>], acetat [CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>], bis[(trifluormetil)sulfonyl]imid [(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N], alkilsulfati [RSO<sub>4</sub>] i alkilsulfonati [RSO<sub>3</sub>] (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Na slici 4 prikazane su sutrukture pojedinih kationa i aniona.



Slika 4. Primjer tipičnih kationa i aniona koji ulaze u sastav ionskih kapljevina (Peric i sur., 2012)

Fizikalno-kemijska svojstva ionskih kapljevina ovise o strukturi kationa i aniona. Zahvaljujući tome ona se mogu podešavati ovisno o potrebama procesa odabirom odgovarajućih iona. Zato se ionske kapljevine često nazivaju "dizajnerskim otapalima" (Earle i Seddon, 2000). Jedno od najistaknutijih svojstava ionskih kapljevina je nisko talište. Njihova je temperatura tališta niža od 100 °C i pri sobnoj temperaturi su u tekućem stanju. Pretpostavlja se kako je nisko talište

posljedica niske energije kristalne rešetke zbog velikih i asimetričnih kationa te delokalizacije negativnog naboja što rezultira slabijim interakcijama između aniona i kationa (Olivier-Bourbigou i Magna, 2002). Nadalje, ionske kapljevine imaju zanemarivo mali tlak para zbog čega prije dolazi do termičke razgradnje nego isparavanja. Stoga bi zamjena klasičnih organskih otapala ionskim kapljevina smanjila emisiju hlapivih organskih spojeva koji su jedan od glavnih izvora zagađenja okoliša. Općenito, ionske su kapljevine viskoznije od većine organskih otapala, a gustoća im je veća od gustoće vode. Njihova površinska napetost manja je od površinske napetosti vode, ali veća od površinske napetosti alkana. Po pitanju polarnosti ionske se kapljevine ubrajaju u polarna otapala te su izvrsna otapala za razne organske i anorganske tvari te polimere. Navedena svojstva bitno utječu na parametre procesa (npr. na prijenos mase, snagu potrebnu za miješanje i pumpanje). Kako ona znatno ovise o kemijskoj strukturi ionske kapljevine, odabirom odgovarajuće kombinacije kationa i aniona moguće ih je prilagođavati radi postizanja većih prinosa, optimiziranja selektivnosti, topljivosti supstrata i slično (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Rogers i Seddon, 2003). Ionske kapljevine su također termički stabilne te nezapaljive. Prema tome mogu se koristiti u širokom temperaturnom rasponu. Ove i druge karakteristike omogućavaju široku industrijsku primjenu u skladu s načelima zelene kemije (Peric i sur., 2012). Ionske kapljevine mogle bi se koristiti primjerice kao otapala za ekstrakcije ili biokatalitičke procese, ali i u elektrokemiji kao elektroliti u baterijama, supervodiči ili senzori (Paiva i sur., 2014).

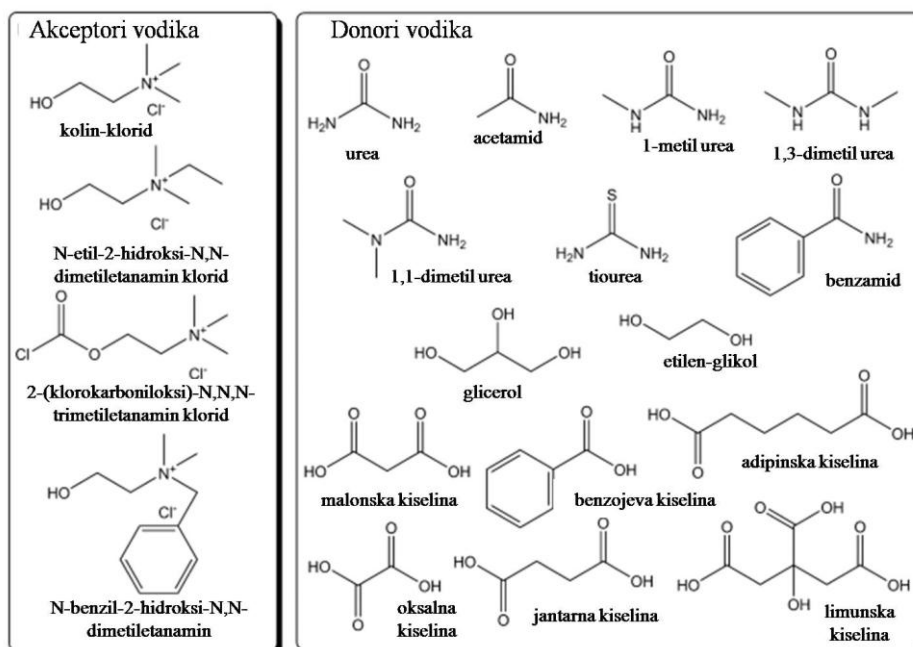
Ipak, unatoč brojnim prednostima ionske kapljevine nisu ostvarile širu komercijalnu primjenu. Jedan od najvećih nedostataka je visoka cijena zbog upotrebe relativno skupih sirovina kao i velike potrošnje energije tijekom proizvodnje. Međutim, troškovi proizvodnje mogu se značajno smanjiti upotrebom jeftinijih kationa i aniona (npr. kolin-klorid) kao i razvojem efikasnijih postupaka koji uključuju energetske učinkovite metode poput mikrovalne i ultrazvučne sinteze ili sinteze unutar mikroreaktora. Također, moguća je i reciklacija ionskih kapljevina koja može dovesti do dodatnog smanjenja ukupnih troškova. Osim toga, primjena ionskih kapljevina nije u potpunosti u skladu s načelima zelene kemije te povlači za sobom određeni stupanj opasnosti za okoliš. Naime, konvencionalni postupci pripreme ionskih kapljevina uključuju upotrebu neobnovljivih sirovina kao i štetnih, lako hlapljivih organskih otapala. Također, provedena su brojna istraživanja s ciljem utvrđivanja ekotoksikološkog učinka ionskih kapljevina. Pritom je dokazan njihov toksični učinak na vodene ali i kopnene organizme, kao i slaba biorazgradivost te duga postojanost u okolišu. Međutim, važno je napomenuti kako utjecaj ionskih kapljevina na okoliš značajno ovisi o njihovoj strukturi i

ulažu se veliki naponi za razvoj ekološki prihvatljivijih ionskih kapljevine (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

#### 2.2.4. Eutektička otapala

Kroz protekla dva desetljeća ionske su kapljevine smatrane potencijalnom zelenom alternativom klasičnim organskim otapalima zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava (nizak tlak pare, termička stabilnost i sl.). Međutim, slaba biorazgradivost, toksičnost i visoka cijena glavne su prepreke koje ograničavaju njihovu širu primjenu. Kao alternativa ionskim kapljevinama često se spominju eutektička otapala.

Eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) definiraju se kao eutektička smjesa dviju ili više komponenata koje mogu međusobno reagirati i povezati se vodikovim vezama. Dobivena smjesa ima niže talište od tališta ishodnih metabolita što omogućuje njeno korištenje kao otapalo pri sobnoj temperaturi (Zhang i sur., 2012). Do sniženja temperature tališta dolazi zbog delokalizacije naboja uslijed formiranja vodikovih veza (Paiva i sur., 2014). DES-ovi se obično pripremaju miješanjem komponenata, točnije akceptora vodika (npr. kvarterne amonijeve soli) i donora vodika (npr. glicerol, urea) u određenom omjeru na umjerenj temperaturi uz stalno miješanje (Xu i sur., 2017). Slika 5 prikazuje strukture nekih spojeva koji se mogu koristiti u pripravi DES-ova.



Slika 5. Primjeri akceptora i donora vodika u pripravi DES-a (Smith i sur., 2014)

Po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima eutektička otapala slična su ionskim kapljevinama. Naime imaju nisko talište, nisu hlapiva, termički su stabilna te imaju veliku sposobnost otapanja različitih supstanci. Osim toga, na njihova se svojstva može utjecati dizajnanjem otapala, tj. odabirom ishodnih metabolita iz kojih se otapala pripremaju, kao i kod ionskih kapljevina (Yang, 2019). Međutim, za razliku od ionskih kapljevina, eutektička otapala u većoj mjeri zadovoljavaju načela zelene kemije. Jedna od glavnih prednosti nad ionskim kapljevinama je jednostavna i ekonomična priprema koja ne uključuje provođenje kemijskih reakcija. Prema tome njihova je sinteza 100 % učinkovita na razini atoma jer se svi atomi supstrata ugrađuju u produkt. Također ne dolazi do nastajanja neželjenih nusproizvoda ni otpada te nije potreban dodatan korak pročišćavanja gotovog otapala (Paiva i sur., 2014). Većina eutektičkih otapala smatra se biorazgradivima jer komponente koje izgrađuju otapala uglavnom su prirodnog porijekla. Ova tvrdnja posebno se odnosi na prirodna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NaDES) u čiji sastav ulaze primarni metaboliti koje pronalazimo u živim stanicama (aminokiseline, šećeri i sl.), a koje kasnije mogu razgraditi različiti organizmi u prirodi. U pravilu se eutektička otapala smatraju manje toksičnima prema okolišu i ljudima u usporedbi s ionskim kapljevinama. Međutim toksičnost kao i biorazgradivost uvelike ovise o strukturi komponenata koje sačinjavaju otapalo (Xu i sur., 2017).

Zahvaljujući velikoj kemijskoj raznolikosti, održivosti, biorazgradivosti i prihvatljivoj toksičnosti eutektička otapala imaju velik potencijal za široku primjenu. Primjerice koriste se kao otapala u organskoj sintezi i biotransformacijama, u proizvodnji polimera, separacijskim procesima i drugim analizama (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). DES-ovi su se zbog odgovarajućih fizikalno-kemijskih svojstava pokazali izrazito učinkovitima u procesima ekstrakcije, a obzirom da imaju sposobnost otapanja polarnih i nepolarnih spojeva mogu se koristiti kao otapala u ekstrakcijama velikog broja prirodnih spojeva. Osim toga, prirodna se eutektička otapala temelje na spojevima koji su sigurni za prehranu ljudi (npr. šećeri) što otvara mogućnost biomedicinske primjene (npr. kao nosači ili sustavi za dostavu lijekova) (Paiva i sur., 2014). Sve u svemu, eutektička, a posebno prirodna eutektička otapala imaju ogroman potencijal i zasigurno će doprinijeti održivom industrijskom razvoju. Međutim, daljnja istraživanja su neophodna kako bi se dodatno proširilo područje primjene.



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu korištena je kora naranči kupljenih na lokalnoj tržnici.

##### 3.1.2. Kemikalije

- Albumin goveđeg seruma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska
- D -(+)-glukoza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etanol (96 %), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Eterično ulje naranče (93 %-tni udio D-limonena (w/w)), Pranarom, Ghislenghen, Belgija
- Etilen-glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Galna kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij natrij tartarat tetrahidrat, Kemika, Hrvatska
- Kalij-fosfatni pufer, pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Fisher Chemical, UK)
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska
- Natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska
- Natrijev karbonat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- *n*-heptan, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Nile crvena solvatokromna proba, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R,S*)-1-feniletil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sorbitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

### 3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Homogenizator s regulacijom temperature, 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 posude (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete, tikvice s okruglim dnom, stakleni lijevak)
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikropipete (20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1 mL, 5 mL )
- Multimetar pH/ion metar S220, Mettler Toledo, Columbus, SAD
- 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. Priprava prirodnih eutektičkih otapala

Za potrebe ovog rada pripremljen je niz prirodnih eutektičkih otapala s različitim udjelima vode koja su navedena u tablici 1. U tikvicama s okruglim dnom pomiješaju se prethodno izračunate i odvagane mase svih potrebnih komponenti u odgovarajućem molarnom omjeru, a zatim se doda i određeni volumen vode kako bi se dobila eutektička otapala s 30 %, 50 % odnosno 80 % vode (v/v). Pripravljene reakcijske smjese se potom zagrijavaju na magnetskoj miješalici pri 50 °C kroz 2 sata, odnosno dok ne nastane homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Pripravljena otapala prebace se u Falcon epruvete i čuvaju se na sobnoj temperaturi do daljnje primjene.

Tablica 1. Pripravljena prirodna eutektička otapala

Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Udio vode [%, v/v]	Kratica
<b>Kolin-klorid:etilen-glikol</b>	1:2	30	ChEG <sub>30</sub>
		50	ChEG <sub>50</sub>
		80	ChEG <sub>80</sub>
<b>Kolin-klorid:glukoza</b>	1:2	30	ChGlc <sub>30</sub>
		50	ChGlc <sub>50</sub>
		80	ChGlc <sub>80</sub>
<b>Sorbitol:etilen-glikol</b>	1:2	30	SorEG <sub>30</sub>
		50	SorEG <sub>50</sub>
		80	SorEG <sub>80</sub>
<b>Glukoza:glicerol</b>	1:2	30	GlcGly <sub>30</sub>
		50	GlcGly <sub>50</sub>
		80	GlcGly <sub>80</sub>

### 3.2.2. Određivanje polarnosti i pH-vrijednosti prirodnih eutektičkih otapala

Polarnost pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala određena je pomoću Nile crvene solvatokromne probe kako je opisano u Jeong i sur. (2017) i Ogihara i sur. (2004). Pripremljena je crvena matična otopina Nile crvene solvatokromne probe koncentracije 1,0 g L<sup>-1</sup> u etanolu koja se čuva u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Za potrebe analize matična otopina je 100 puta razrijeđena u etanolu te zatim dodana prirodnim eutektičkim otapalima. Uzorci su analizirani u kvarcnim kivetama volumena 1 cm<sup>3</sup>. Apsorpcijski spektri pripremljenih uzoraka snimljeni su pomoću spektrofotometra.

pH-vrijednosti prirodnih eutektičkih otapala izmjerene su pomoću pH metra pri temperaturi od 25 °C.

### 3.2.3. Priprava ekstrakta narančine kore

Prije same ekstrakcije naranče je potrebno oprati pomoću detergenta, površinski sterilizirati 70 %-tnim (v/v) etanolom te isprati destiliranom vodom kako bi se uklonile površinske nečistoće. Kora se zatim pažljivo oguli nožićem te nareže na približno iste komadiće veličine 5 x 5 x 2 mm. Na analitičkoj se vagi izvažuje 2,5 g prethodno narezane kore koja se prebaci u tarionik s tučkom. U tarioniku se kora, uz dodatak 10 mL odgovarajućeg otapala mehanički homogenizira pomoću tučka kroz dvije minute (slika 6), a zatim se dobivena smjesa prebaci u Falcon epruvete te ostavi na sobnoj temperaturi kroz sat vremena. Ekstrakcija je provedena u pripremljenim prirodnim eutektičkim otapalima (poglavlje 3.2.1.), kalij-fosfatnom puferu i zakiseljenom etanolu (75 % EtOH, 0,1 % HCl). Nakon sat vremena ekstrakti se filtriraju preko običnog lijevka za filtraciju i filter papira kako bi se uklonilo zaostalo tkivo narančine kore. Izdvojeni filtrati korišteni su prilikom određivanja ukupnih polifenolnih spojeva, ukupnih proteina te D-limonena.



Slika 6. Homogenizacija narančine kore u tarioniku s tučkom (vlastita fotografija)

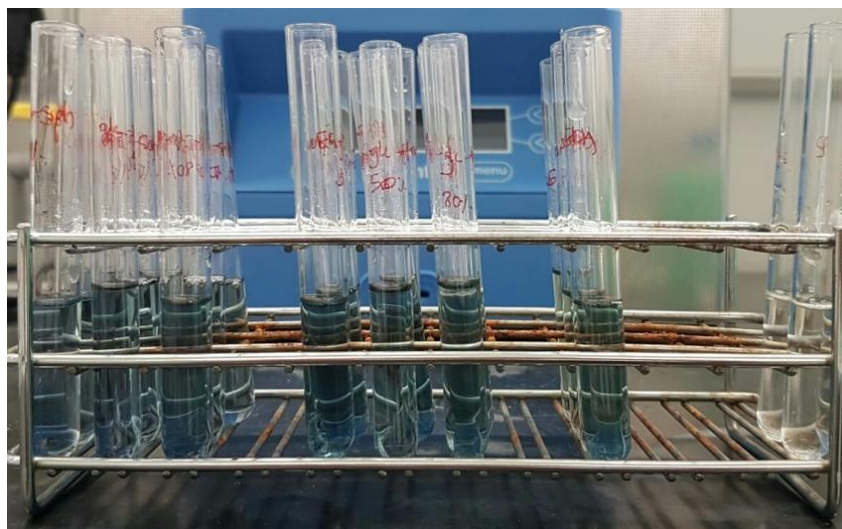
### 3.2.4. Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva Folin-Ciocalteu metodom

Folin–Ciocalteu metoda najčešće je korištena metoda za određivanje ukupnih polifenolnih spojeva, a temelji se na redukciji Folin-Ciocalteu reagensa u prisutnosti polifenola. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline koje se u reakciji s fenolima u lužnatom mediju reduciraju do volframovog i molibdenovog oksida. Nastali

kompleks plave je boje i može se odrediti spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 760 nm. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji polifenola u uzorku (Lamuela-Raventós, 2018).

### ***Postupak određivanja***

Za provođenje analize korišteni su ekstrakti narančine kore pripremljeni u prirodnim eutektičkim otapalima kao i u zakiseljenom etanolu (75 % EtOH, 0,1 % HCl) koji je korišten kao referentno otapalo (poglavlje 3.2.2.). Pripremljene ekstrakte potrebno je razrijediti 20 puta, a komercijalno dostupni Folin-Ciocalteu reagens se također razrijedi 10 puta destiliranom vodom. Za svaki uzorak pripremaju se tri paralele. U epruvete se otpipetira 0,25 mL razrijeđenih uzoraka i 1,25 mL 10 puta razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa te se smjesa ostavi 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se doda 1 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ) nakon čega slijedi termostatisiranje u vodenoj kupelji pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 5 minuta. Reakcija se naglo zaustavlja hlađenjem u ledenoj kupelji te se na UV/VIS-spektrofotometru pripremljenim uzorcima (slika 7) izmjeri apsorbancija pri 760 nm (Singleton i sur., 1999).

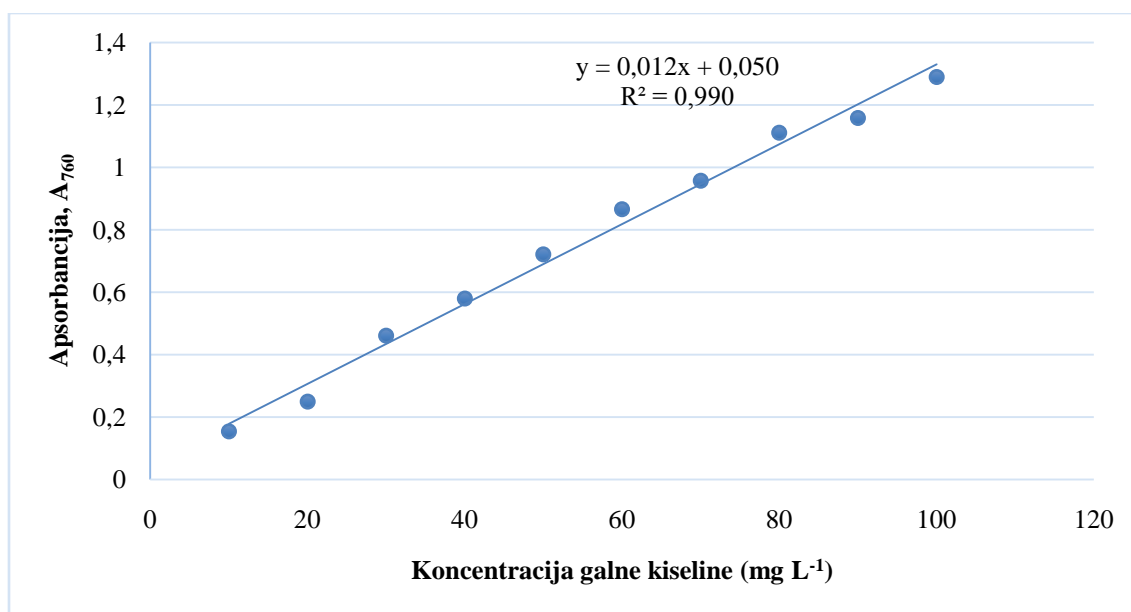


Slika 7. Uzorci za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola (vlastita fotografija)

### ***Izrada baždarnog dijagrama***

Za konstrukciju baždarnog dijagrama kao standard je upotrijebljena otopina galne kiseline ( $\gamma = 500 \text{ mg L}^{-1}$ ). Iz ishodne otopine je pripremljen niz standardnih otopina različitih koncentracija (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 i  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Standardnim otopinama

izmjerena je vrijednost apsorbancije pri 760 nm, a otopine za mjerenje apsorbancije su pripravljene kako je prethodno opisano. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije  $A_{760}$  o koncentraciji galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) konstruirana se na računalo nanošenjem vrijednosti koncentracija otopina galne kiseline na x-os, odnosno odgovarajuće vrijednosti apsorbancije na y-os koordinatnog sustava (slika 8). Iz dobivene jednadžbe pravca računaju se nepoznate koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva u uzorcima.



Slika 8. Baždarni dijagram galne kiseline za određivanje ukupnih polifenola

### 3.2.5. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u

Ukupni proteini u ekstraktima narančine kore određeni su metodom po Lowry-u. Riječ je o kolorimetrijskoj metodi koja se temelji na dvije reakcije. Prvo dolazi do reakcije bakrenih ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iona s peptidnim vezama proteina u lužnatom mediju pri čemu se  $\text{Cu}^{2+}$  reducira do  $\text{Cu}^+$ . Zatim nastali  $\text{Cu}^+$ -protein kompleks, kao i fenolne skupine iz pobočnih ogranaka aminokiselina tirozina, cisteina i triptofana, reagiraju sa Folin-Ciocalteu reagensom stvarajući nestabilni kompleks koji se polako reducira te dolazi do formiranja plavog obojenja s apsorpcijskim maksimumom pri 740 nm (Shen, 2019).

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

**Reagens A:** priprema se otapanjem 2 g natrijeva hidroksida te 10 g natrijeva karbonata u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici volumena 500 mL koja se zatim nadopuni do oznake.

Reagens B1: u odmjernej tikvici od 100 mL otopi se 1 g bakrova sulfata pentahidrata te se odmjernej tikvici nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Reagens B2: u odmjernej tikvici volumena 100 mL otopi se 2 g kalij natrij tartarata te se odmjernej tikvici nadopuni destiliranom vodom do oznake.

Reagens C: u 10 mL reagensa A doda se 0,1 mL reagensa B1 i 0,1 mL reagensa B2. Prije svake analize potrebno je pripremiti svježi reagens C.

Neposredno prije analize potrebno je razrijediti i komercijalno dostupni Folin-Ciocalteu reagens s destiliranom vodom u omjeru 1:2.

### ***Postupak određivanja***

Za provođenje analize korišteni su ekstrakti narančine kore (poglavlje 3.2.2.) koji su razrijeđeni 500 puta. Za svaki uzorak potrebno je pripremiti tri paralele, a za cijelu seriju mjerenja slijepu probu. Pritom je kao slijepa proba korištena destilirana voda. U epruvete se otpipetira 0,2 mL razrijeđenog uzorka odnosno destilirane vode te 1 mL reagensa C. Smjesa se promiješa protresivanjem te inkubira na sobnoj temperaturi 15 minuta. Nakon 15 minuta potrebno je dodati 0,1 mL razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa, uz snažno miješanje na vrtložnoj miješalici. Dobivena se smjesa zatim ponovno inkubira na sobnoj temperaturi 40 – 60 minuta nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri 740 nm. Količina ukupnih proteina u uzorku izračunava se iz baždarnog dijagrama.

### ***Izrada baždarnog dijagrama***

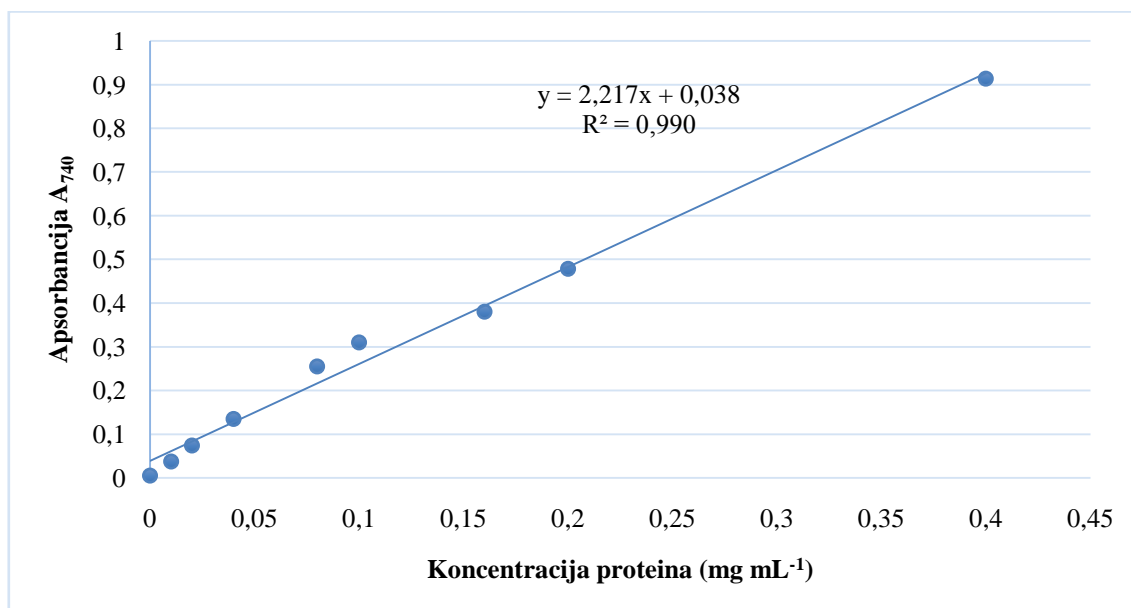
Za konstrukciju baždarnog dijagrama kao standard korišten je protein Albumin iz goveđeg seruma (BSA). Iz otopine BSA masene koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  pripremljen je niz standardnih otopina različitih koncentracijakako je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Priprema standardnih otopina BSA

Oznaka uzorka	Koncentracija ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Volumen BSA (mL)	Volumen vode (mL)
S0	0,00	0,00	1,00
S1	0,01	0,01	0,99
S2	0,02	0,02	0,98
S3	0,04	0,04	0,96

<b>S4</b>	0,08	0,08	0,92
<b>S5</b>	0,1	0,1	0,90
<b>S6</b>	0,16	0,16	0,84
<b>S7</b>	0,20	0,2	0,80
<b>S8</b>	0,40	0,4	0,60

U epruvete se otpipetira 0,2 mL pripremljenih razrjeđenja te 1 mL reagensa C, smjesa se promiješa protresanjem te inkubira na sobnoj temperaturi 15 min. Nakon toga se naglo doda 0,1 mL razrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa uz miješanje na vrtložnoj miješalici te se smjesa ostavi na sobnoj temperaturi 40 – 60 min. Nakon inkubacije mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 740 nm. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije  $A_{740}$  o koncentraciji proteina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) konstruirana se na računaru (slika 9). Pritom se vrijednosti koncentracija nanose na x-os, a izmjerene vrijednosti apsorbancija na y-os koordinatnog sustava. Dobivena jednadžba pravca koristi se za računanje nepoznatih koncentracija proteina u uzorcima.



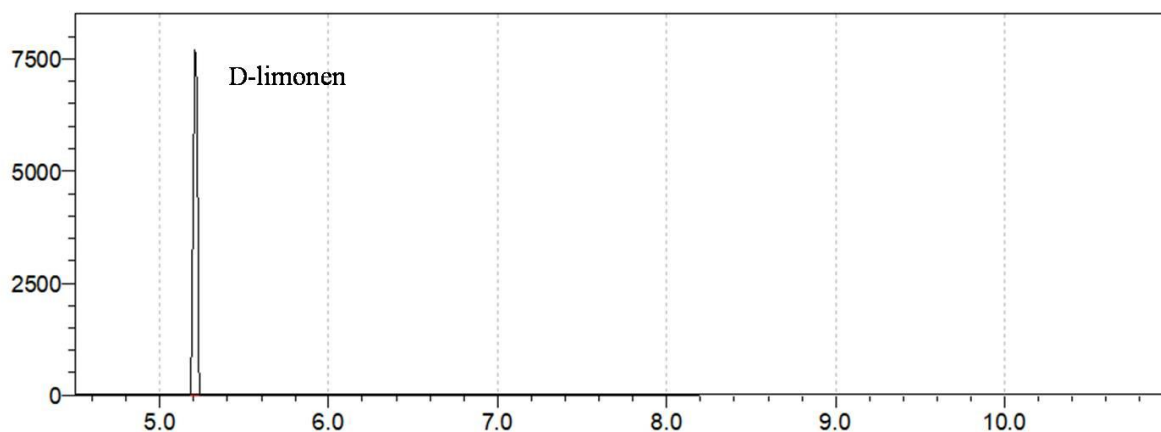
Slika 9. Baždarni dijagram za određivanje ukupnih proteina

### 3.2.6. Određivanje koncentracije D-limonena

D-limonen izdvojen je iz ekstrakata narančine kore (poglavlje 3.2.2.) ekstrakcijom tekuće-tekuće u *n*-heptanu. U Falcon epruvete od 10 mL otpipetira se 0,1 mL ekstrakta i 0,1 mL



destilirane vode. Smjesa se promiješa na vrtložnoj miješalici, a zatim se doda 0,8 mL *n*-heptana. Nakon toga slijedi ekstrakcija uz snažno miješanje tijekom 3 minute nakon čega se izuzme 50  $\mu$ L bistrog heptanskog sloja koji se analizira pomoću plinske kromatografije (slika 10). Kromatografski uvjeti navedeni su u poglavlju 3.2.7.



Slika 10. Tipičan plinski kromatogram D-limonena dobivenog nakon ekstrakcije prirodnim eutektičkim otapalima

### *Izrada baždarnog dijagrama*

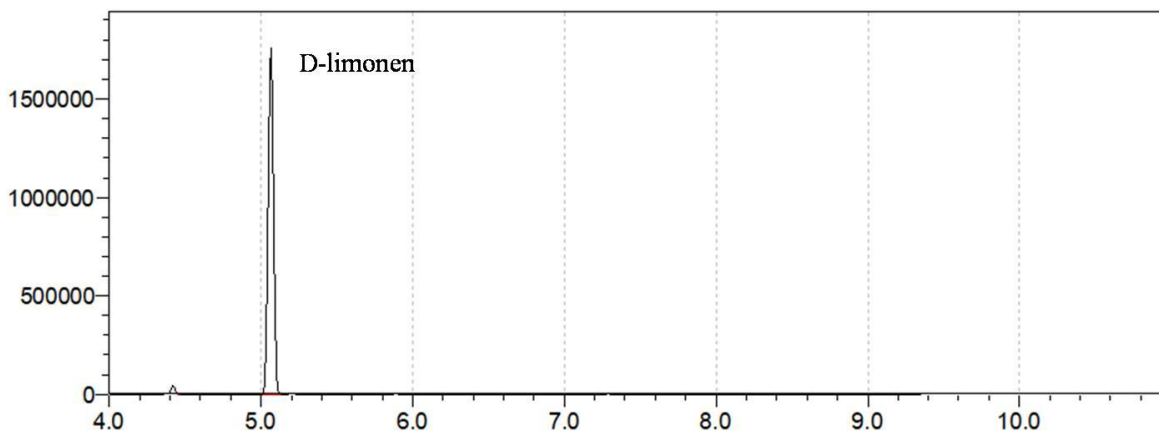
Za konstrukciju baždarnog dijagrama pripremljene su otopine eteričnog ulja naranče u *n*-heptanu različitih koncentracija kako je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Priprema standardnih otopina za konstrukciju baždarnog dijagrama

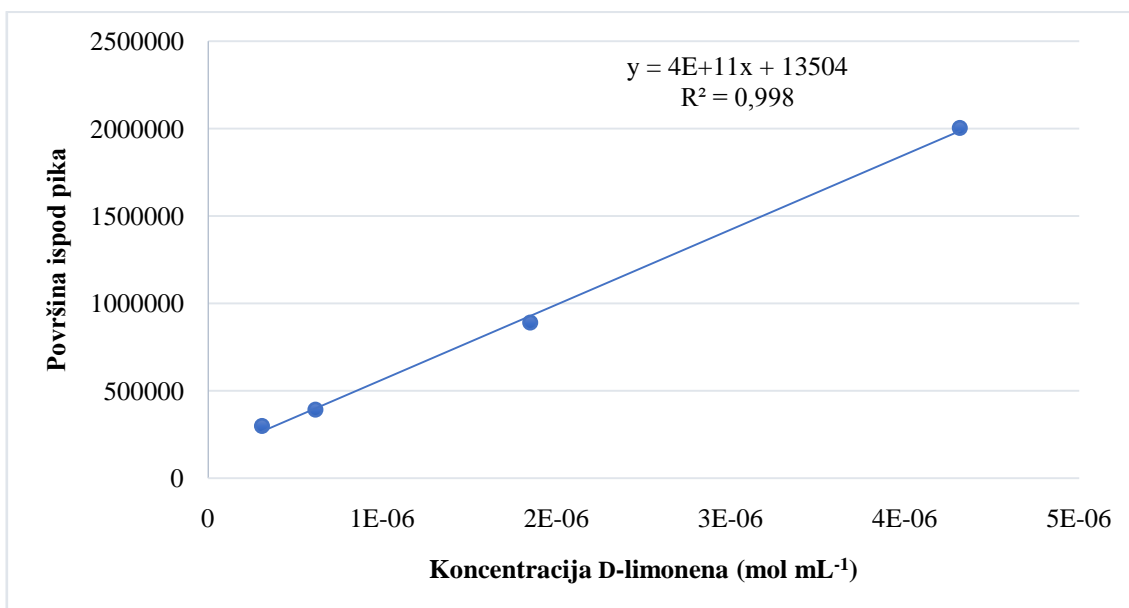
Oznaka uzorka	Koncentracija (mmol L <sup>-1</sup> )	Volumen eteričnog ulja naranče ( $\mu$ L)	Ukupni volumen (mL)
S1	0,31	0,5	10
S2	0,62	1	
S3	1,85	3	
S5	4,32	7	

Iz pripremljenih otopina izuzme se 50  $\mu$ L alikvota koji se zatim analizira plinskom kromatografijom (slika 11). Baždarni dijagram ovisnosti površina ispod kromatografskog pika o koncentraciji D-limonena (mol mL<sup>-1</sup>) se konstruira na računaru i pritom se na x-os nanose vrijednosti koncentracija otopina, a na y-os pripadajuće vrijednosti površina ispod dobivenih

kromatografskih pikova (slika 12). Iz dobivene jednadžbe pravca računaju se nepoznate vrijednosti koncentracija D-limonena u uzorcima ekstrakata narančine kore.



Slika 11. Plinski kromatogram D-limonena dobivenog nakon analize otopina za izradu baždarnog dijagrama

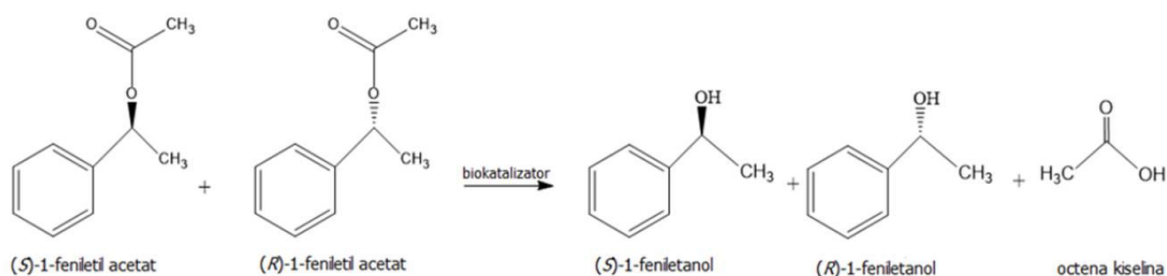


Slika 12. Baždarni dijagram za određivanje D-limonena

### 3.2.7. Enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima

Enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata (slika 13) provedena je u svim pripremljenim prirodnim eutektičkim otapalima (tablica 1), a kao referentno otapalo korišten

je kalij-fosfatni pufer. Pritom su hidrolitički enzimi iz narančine kore upotrijebljeni kao biokatalizatori.



Slika 13. Enzimima katalizirana hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata

Na analitičkoj vagi odvaže se 0,2 g nasjeckane narančine kore koja je prethodno oprana u 70 %-tnom (v/v) etanolu i destiliranoj vodi kako bi se uklonile površinske nečistoće. Izvagana kora prebaci se u Falcon epruvete od 10 mL u koje je otpipetirano 1 mL prirodnih eutektičkih otapala, odnosno pufera. Zatim se u pripremljenu reakcijsku smjesu doda 15  $\mu$ L supstrata (*R,S*)-1-fenilacetata čime započinje reakcija. Reakcija se provodi na sobnoj temperaturi uz miješanje na tresilici, a uzorkovanje se provodi u određenim vremenskim intervalima. Kako bi se uzorak pripremio za analizu dodaje mu se 1 mL destilirane vode, smjesa se promiješa na vortex miješalici nakon čega se doda 8 mL *n*-heptana. Zatim se provodi ekstrakcija nastalih produkata te preostalog supstrata uz snažno miješanje kroz 3 minute. 50  $\mu$ L bistrog heptanskog sloja analizira se pomoću plinske kromatografije.

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

Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletanola, odnosno (*R,S*)-1-feniletil acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

Koncentracija dobivenog produkta,  $c_p$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) računa se prema formuli 1:

$$c_p = c_{s1} - c_{s2} \quad [1]$$

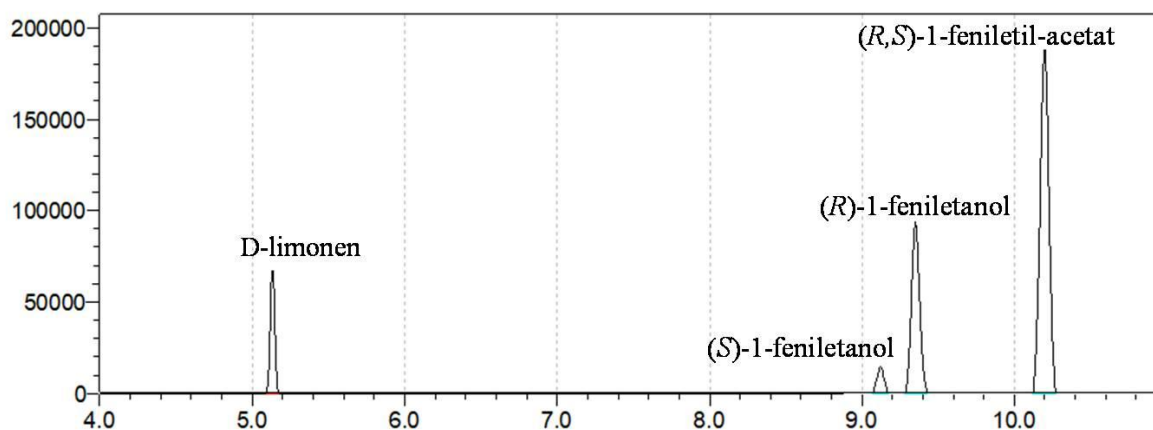
pri čemu  $c_{s1}$  označava početnu koncentraciju supstrata (*R,S*)-1-feniletil acetata ( $\text{mol L}^{-1}$ ), a  $c_{s2}$  koncentraciju supstrata preostalu na kraju reakcije ( $\text{mol L}^{-1}$ ). Nepoznata koncentracija preostalog (*R,S*)-1-feniletil acetata,  $c_{s2}$ , računa se iz baždarnog pravca ovisnosti koncentracije

supstrata o površini ispod kromatografskog pika dobivenog analizom reakcijske smjese plinskom kromatografijom.

### Kromatografski uvjeti:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ )
- Pokretna faza: Helij
- Protok: 36,5 mL  $\text{min}^{-1}$
- Detektor: spektrometar masa
- 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  $^\circ\text{C}$
- Detektor: temperatura ionskog izvora 200  $^\circ\text{C}$ , temperatura sučelja 200  $^\circ\text{C}$
- Vrijeme trajanja analize: 26,37 min

Slika 14 prikazuje tipičan plinski kromatogram analizirane reakcijske smjese. Retencijsko vrijeme ( $R_t$ ) za (*R,S*)-1-feniletil acetat iznosi 10,178 min, za (*R*)-1-feniletanol 9,095 min, a za (*S*)-1-feniletanol  $R_t$  iznosi 9,334 min.



Slika 14. Plinski kromatogram analize reakcijske smjese enzima katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata

Radi usporedbe uspješnosti reakcije hidrolize u prirodnim eutektičkim otapalima s različitim udjelima vode te u puferu potrebno je izračunati iskorištenje procesa kao i enantiomerni višak.

**Iskorištenje procesa hidrolize,  $\eta$  (%)** računa se prema jednadžbi 2:

$$\eta_{hidroliza} = \frac{c_P}{c_T} \times 100 \quad [2]$$

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

**Enantiomerni višak,  $ee$  (%)** računa se prema jednadžbi 3:

$$\% ee = \frac{R_{1-feniletanol} - S_{1-feniletanol}}{R_{1-feniletanol} + S_{1-feniletanol}} \quad [3]$$

pri čemu  $R_{1-feniletanol}$  predstavlja površinu ispod pika koji odgovara (*R*)-1-feniletanolu, a  $S_{1-feniletanol}$  predstavlja površinu ispod pika (*S*)-1-feniletanola.

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

Za konstrukciju baždarnog dijagrama pripremljene su otopine (*R,S*)-1-feniletil acetata u *n*-heptanu različitih koncentracija (tablica 4).

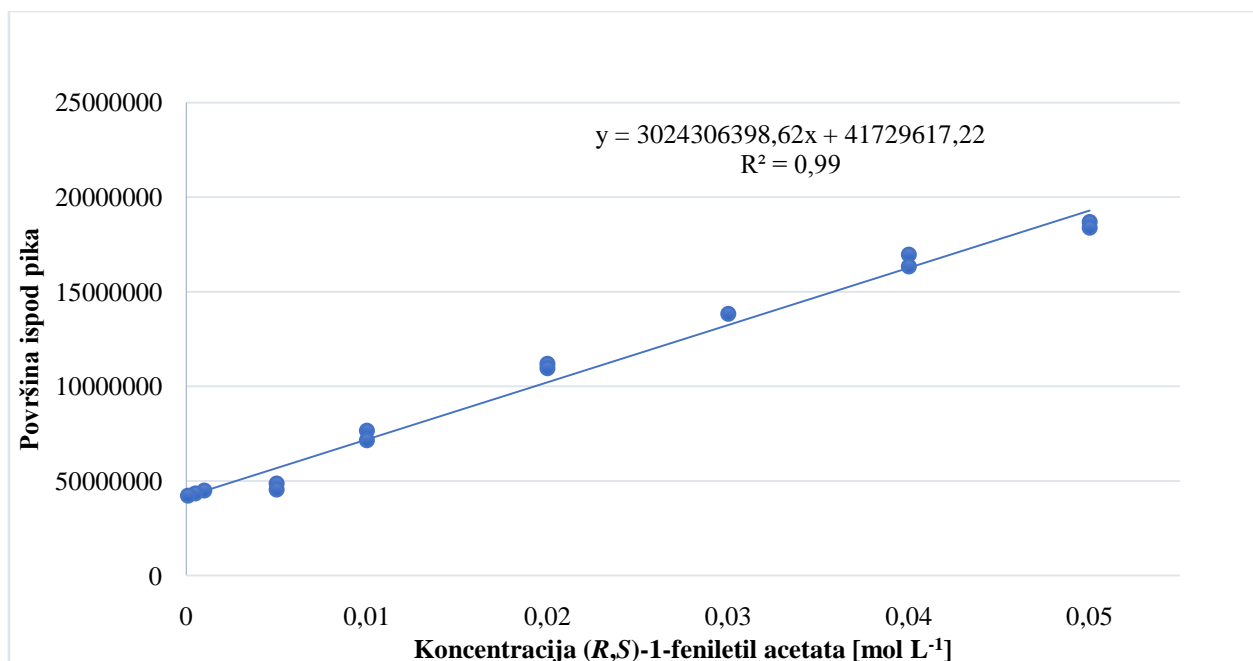
Tablica 4. Priprema standardnih otopina za konstrukciju baždarnog dijagrama

Oznaka uzorka	Koncentracija ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Volumen ( <i>R,S</i> )-1-feniletil acetata ( $\mu\text{L}$ )	Ukupni volumen ( $\text{mL}$ )
S1*	0,0001	-	10
S2**	0,0005	-	
S3	0,001	1,6	
S4	0,005	8	
S5	0,01	16	
S6	0,02	32	
S7	0,03	48	
S8	0,04	64	
S9	0,05	80	

\*Standardna otopina S1 pripremljena je razrijeđenjem standardne otopine S3 10 puta.

\*\*Standardna otopina S2 pripremljena je razrijeđenjem standardne otopine S4 10 puta.

Iz pripremljenih otopina izuzme se 50  $\mu\text{L}$  od ukupnog volumena koji se zatim analizira plinskom kromatografijom. Baždarni dijagram ovisnosti površine ispod kromatografskog pika o koncentraciji supstrata konstruira se na računaru (slika 15). Na x-os nanose se vrijednosti koncentracija pripremljenih otopina, a na y-os pripadajuće vrijednosti površina dobivenih kromatografskih pikova. Nepoznate vrijednosti koncentracija (*R,S*)-1-feniletil acetata u uzorcima računaju se iz dobivene jednadžbe pravca.



Slika 15. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata (*R,S*)-1-feniletil acetata

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Naranče su u komercijalne svrhe najčešće uzgajani citrusi, posebno u tropskim i suptropskim područjima diljem svijeta. Njihovom preradom nastaju velike količine otpada (više od 1 000 000 tona godišnje), obzirom da se više od 50 % mase ploda odbacuje (Chemat i sur., 2019). Otpad narančine kore dobiven proizvodnjom soka od naranče ujedno je i jedan od najistraživanijih agro-industrijskih otpada u posljednjih nekoliko godina. Ovaj otpad sačinjavaju kora (flavedo i albedo), sjemenke te pulpa, a bogat je izvor masti (npr. oleinska, linolna, linoleinska, palmitinska, stearinska), šećera (npr. glukoza, fruktoza, sukroza), netopivih ugljikohidrata (pektin i celuloza), eteričnih ulja (D-limonen), enzima (npr. pektinesteraze, fosfataze i peroksidaze) i pigmenata (Boukroufa i sur., 2015). Upravo zbog visokog udjela organskih spojeva kao i velike količine otpada koja se proizvede godišnje, njegovo odlaganje je veliki problem posebno u zemljama u kojima je uzgoj naranči jedna od glavnih grana gospodarstva. Dosadašnje metode zbrinjavanja otpada narančine kore, poput spaljivanja i odlaganja na odlagališta otpada smatraju se štetnim za okoliš, ali i za ljudsko zdravlje. Osim toga, visoki kapitalni i operativni troškovi još su jedan nedostatak ovakvog oblika zbrinjavanja otpada (Panwar i sur., 2019). Problem odlaganja potaknuo je razvoj novih, ekološki prihvatljivijih metoda zbrinjavanja otpada narančine kore uključujući i valorizaciju narančine kore u sklopu koncepta biorafinerije. Narančina kora posjeduje veliki potencijal za konverziju u proizvode s dodanom vrijednošću i biogoriva zahvaljujući visokom udjelu pektina, proteina, masti i lignoceluloze (Ortiz-Sanchez i sur., 2020).

Razvojem koncepta zelene kemije kroz posljednjih nekoliko godina sve više se ističe potreba za implementacijom ekološki prihvatljivijih industrijskih procesa. Pritom se naglasak posebno stavlja na dizajn novih "zelenih" otapala kako bi se smanjila upotreba organskih otapala koja su iznimno štetna za ljudsko zdravlje i okoliš. Kao jedna od mogućih alternativnih otapala ističu se prirodna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NaDES) koja u potpunosti zadovoljavaju principe zelene kemije, jeftina su i lako dostupna te je njihova priprema jednostavna. Osim toga pokazuju i zadovoljavajuća fizikalno-kemijska svojstva koja se lako mogu prilagoditi za potrebe različitih procesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

U ovom radu istražena je mogućnost primjene četiriju prirodnih eutektičkih otapala (tablica 5, str. 34) s različitim udjelima vode (30 %, 50 % i 80 %, v/v) u valorizaciji otpadne narančine kore kao potencijalne sirovine unutar koncepta biorafinerije. Pritom je ispitana sposobnost

ekstrakcije polifenola, proteina te D-limonena iz narančine kore, kao i uspješnost enantioselektivne hidrolize (kinetičke rezolucije) (*R,S*)-1-feniletil acetata uz hidrolitičke enzime iz narančine kore u navedenim prirodnim eutektičkim otapalima.

#### 4.1. KORIŠTENJA PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Prirodna eutektička otapala sintetizirana su miješanjem polaznih komponenata, odnosno donora i akceptora vodika u molarnom omjeru 1:2. Pritom su kao polazne komponente odabrane lako dostupne, biorazgradive i biokompatibilne tvari (kolin-klorid, šećeri i polioli), što je u skladu s načelima zelene kemije, a sama otapala su zahvaljujući tome znatno jeftinija u usporedbi s klasičnim organskim otapalima. Za potrebe rada sintetizirana su četiri prirodna eutektička otapala s različitim udjelima vode (tablica 1), a sama priprema je izrazito jednostavna te uključuje zagrijavanje polaznih komponenti, sve dok se ne dobije homogena smjesa. Iskorištenje reakcije iznosi 100 % jer se prilikom sinteze svi atomi supstrata ugrađuju u produkt te ne dolazi do nastajanja nusproizvoda.

#### 4.2. POLARNOST I pH-VRIJEDNOSTI PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičkih otapala uvelike ovise o ishodnim komponentama i njihovim svojstvima. Zahvaljujući tome ona se jednostavno mogu prilagođavati potrebama procesa odabirom odgovarajućih ishodnih spojeva kao i njihovih molarnih omjera. Osim toga na fizikalno-kemijska svojstva utječe i udio vode u otapalu (Yang, 2019).

Prirodnim eutektičkim otapalima pripremljenima u ovom radu određenaje polarnost te su im izmjerene i pH-vrijednosti, a pritom dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.



Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala

Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Udio vode [%, v/v]	Kratica	Polarnost [kcal mol <sup>-1</sup> ]	pH
<b>Kolin-klorid:etilen-glikol</b>	1:2	30	ChEG <sub>30</sub>	50,37	5,7
		50	ChEG <sub>50</sub>	50,28	5,7
		80	ChEG <sub>80</sub>	49,93	5,6
<b>Kolin-klorid:glukoza</b>	1:2	30	ChGlc <sub>30</sub>	50,63	7,4
		50	ChGlc <sub>50</sub>	50,10	4,0
		80	ChGlc <sub>80</sub>	49,84	5,2
<b>Sorbitol:etilen-glikol</b>	1:2	30	SorEG <sub>30</sub>	50,54	4,8
		50	SorEG <sub>50</sub>	50,37	4,8
		80	SorEG <sub>80</sub>	50,28	4,9
<b>Glukoza:glicerol</b>	1:2	30	GlcGly <sub>30</sub>	50,45	6,2
		50	GlcGly <sub>50</sub>	50,36	6,3
		80	GlcGly <sub>80</sub>	50,18	6,0

Polarnost prirodnih eutektičkih otapala iznimno je važno svojstvo, jer ono utječe na sposobnost otapanja različitih organskih i anorganskih spojeva (Dai i sur., 2013). Polarnost pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala određena je pomoću Nile crvene solvatokromne probe, a vrijednosti su izražene u kcal mol<sup>-1</sup>. Dobivene vrijednosti kreću se u rasponu od 49,84 do 50,63 kcal mol<sup>-1</sup> (tablica 5) pri čemu niže vrijednosti ukazuju na veću polarnost otapala. Polarnosti ispitanih prirodnih eutektičkih otapala međusobno se ne razlikuju značajno. Razlika u polarnosti između najpolarnijeg otapala (ChGlc<sub>80</sub>) i najmanje polarnog otapala (ChGlc<sub>30</sub>) iznosi svega 0,79 kcal mol<sup>-1</sup>. Slične rezultate dobili su Dai i sur. (2013) koji su ispitali fizikalno-kemijska svojstva 13 najčešće korištenih prirodnih eutektičkih otapala, kao i Craveiro i sur. (2016) koji su u svom istraživanju odredili polarnost 11 prirodnih eutektičkih otapala. U oba slučaja je primijećeno kako su prirodna eutektička otapala na bazi organskih kiselina najpolarnija, dok su ona na bazi šećera i poliola najmanje polarna u usporedbi s ostalima. Kao što je prethodno spomenuto, na fizikalno-kemijska svojstva, pa tako i polarnost, znatno utječe i udio vode u otapalu. Usporedbom vrijednosti polarnosti pojedinih otapala s različitim udjelima vode uočeno je kako s porastom sadržaja vode raste i polarnost samog otapala. Također dobivene vrijednosti slične su vrijednosti polarnosti vode

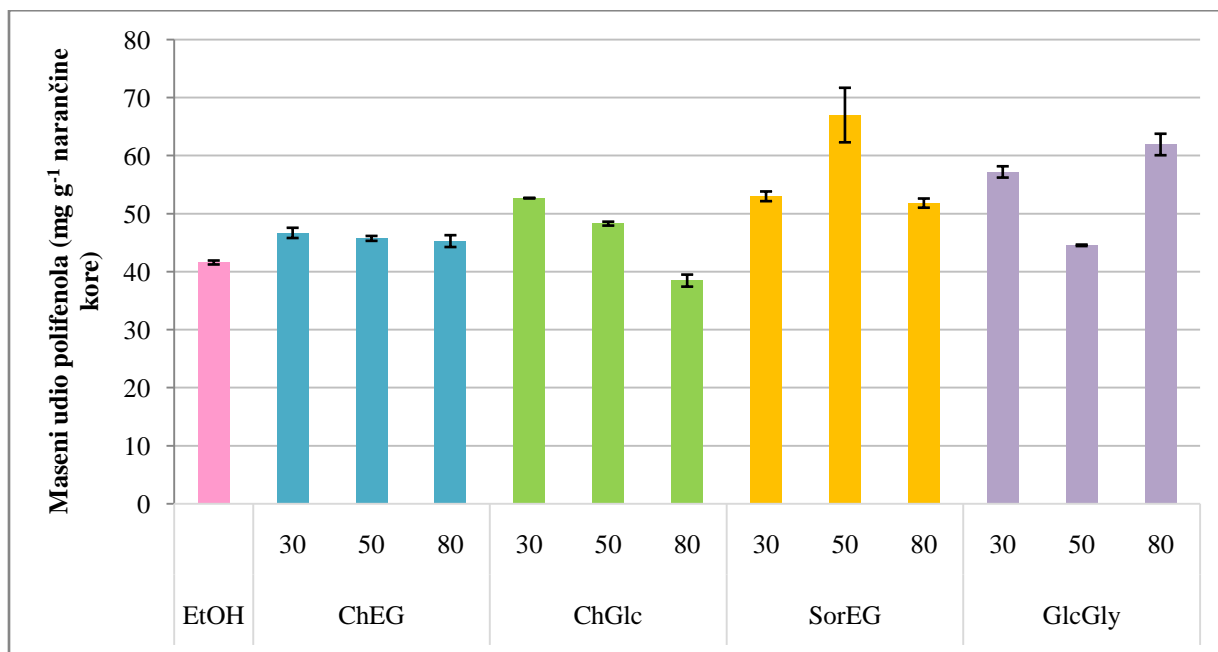
(48,37 kcal mol<sup>-1</sup>). Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima iz literature (Craveiro i sur., 2016; Dai i sur., 2013).

Iz tablice 5. vidljivo je kako pH vrijednosti prirodnih eutektičkih otapala ovise o sastavu istih te o udjelu vode te su otapala blago kisela do neutralna. Izmjerene vrijednosti kreću se u rasponu od 4,0 (ChGlc<sub>50</sub>) do 7,4 (ChGlc<sub>30</sub>). Hayyan i sur. (2013) u svom su radu odredili fizikalno-kemijska svojstva prirodnih eutektičkih otapala koja sadrže glukozu. Njihovo je istraživanje pokazalo kako su prirodna eutektička otapala na bazi D-glukoze uglavnom neutralna te se pH vrijednosti kreću oko 7 pri sobnoj temperaturi. Većina prirodnih eutektičkih otapala pripremljenih za potrebe ovog rada, a koja sadrže D-glukozu, gotovo su neutralna što je u skladu s rezultatima koje su dobili Hayyan i sur. (2013). Iz izmjerenih vrijednosti pH moguće je zaključiti kako ispitana prirodna eutektička otapala predstavljaju pogodan medij za provođenje biokatalitičkih reakcija budući da enzimi optimalnu aktivnost postižu pri blagim reakcijskim uvjetima, što uključuje i neutralan pH (Maia da Silva i sur., 2017). Osim toga neutralan i blago kiseli pH otapala pogoduje i ekstrakciji prirodnih spojeva kao što su polifenoli (Jeong i sur., 2017).

#### 4.3. UKUPNI POLIFENOLNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE

Fenolni spojevi najveća su grupa fitokemikalija te ujedno i najčešće zastupljeni sekundarni metaboliti u gotovo svim biljnim vrstama. Riječ je o spojevima čiju osnovnu strukturu sačinjava aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Zbog svojih poželjnih svojstava poput antioksidativnog, antimikrobnog, antiviralnog, protuupalnog i analgetskog djelovanja predmet su brojnih istraživanja te posjeduju veliki potencijal za primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (npr. kao konzervansi) (Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Kora agruma izrazito je bogata polifenolnim spojevima, a samim time i potencijalna sirovina za proizvodnju visokovrijednih proizvoda. Ekstrakcija kruto-tekuće standardna je metoda koja se koristi za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnog materijala. Ona uključuje korištenje toksičnih i lako hlapljivih organskih otapala poput etanola, metanola i acetona koja ne zadovoljavaju principe zelene kemije. Iz tog razloga se sve više istražuje mogućnost upotrebe alternativnih "zelenih" otapala poput prirodnih eutektičkih otapala (Ozturk i sur., 2018b; Putnik i sur., 2017).

U ovom radu ispitana je sposobnost ekstrakcije polifenolnih spojeva pomoću različitih prirodnih eutektičkih otapala, a kao referentno otapalo upotrijebljen je zakiseljeni etanol (75 % EtOH, 0,1 % HCl). Ukupni polifenolni spojevi određeni su spektrofotometrijski, uz upotrebu Folin-Ciocalteu reagensa. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije  $A_{760}$  o koncentraciji galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ) korišten je za računanje nepoznatih koncentracija ukupnih polifenola u uzorku. Rezultati mjerenja prikazani su na slici 16, a izraženi su kao mg galne kiseline po g narančine kore.



Slika 16. Maseni udjeli ukupnih polifenolnih spojeva u ekstraktima narančine kore. Uvjeti ekstrakcije: 2,5 g narančine kore u 10 mL otapala; 25 °C; 1 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n=3)

Iz priloženih rezultata vidljivo je kako je ekstrakcija ukupnih polifenola iz naračine kore uspješno provedena u svim ispitanim otapalima. Pritom su prirodna eutektička otapala pokazala veću sposobnost ekstrakcije u usporedbi s referentnim otapalom, zakiseljenim etanolom ( $41,59 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). Najveću selektivnost prema polifenolnim spojevima pokazalo je prirodno eutektičko otapalo SorEG<sub>50</sub> pomoću kojeg je ekstrahiran najveći udio polifenolnih spojeva ( $66,99 \pm 4,7 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). Prirodno eutektičko otapalo GlcGly<sub>80</sub> također se pokazalo iznimno učinkovito prilikom ekstrakcije ukupnih polifenolnih spojeva ( $61,92 \pm 1,8 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). S druge strane, prirodno eutektičko otapalo ChGlc<sub>80</sub> pokazalo je najmanju sposobnost ekstrakcije polifenolnih spojeva ( $38,47 \pm$

1,0 mg g<sup>-1</sup> narančine kore), te je udio ekstrahiranih polifenolnih spojeva manji u usporedbi sa zakiseljenim etanolom.

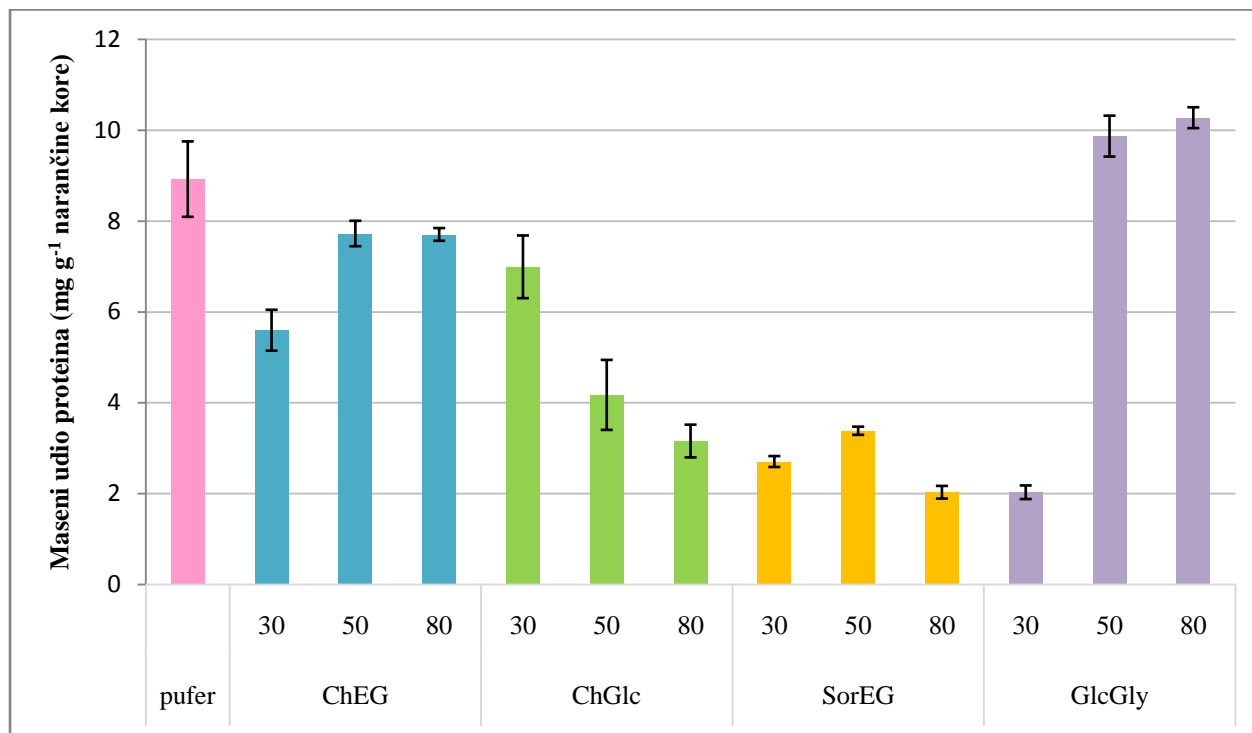
Budući da je većina ispitanih prirodnih eutektičkih otapala pokazala bolji prinos ekstrakcije u odnosu na referentno otapalo, moguće je zaključiti kako su prirodna eutektička otapala odgovarajuća alternativa standardnim otapalima koji se koriste za ekstrakciju. Tome u prilog idu i brojne prednosti prirodnih eutektičkih otapala prema konvencionalnim organskim otapalima poput biorazgradivosti, nehlapljivosti kao i manja toksičnost prema okolišu i ljudima (Xu i sur., 2017). U literaturi postoje brojni primjeri istraživanja koja se bave ekstrakcijom ukupnih polifenolnih spojeva iz različitih biljnih materijala (Pal i Jadeja, 2019; Ozturk i sur., 2018b; Yang i sur., 2018; Peng i sur., 2016; Radošević i sur., 2016). Rezultati navedenih istraživanja također su pokazali kako je učinkovitost ekstrakcije prirodnim eutektičkim otapalima veća u usporedbi s ekstrakcijom konvencionalnim otapalima poput etanola. Zahvaljujući svojoj raznolikosti prirodna eutektička otapala mogu se koristiti za ekstrakciju različitih prirodnih spojeva, ne samo polifenola. Pritom je učinkovitost ekstrakcije moguće dodatno povećati optimizacijom različitih parametara poput viskoznosti, molarnog omjera komponenti i sadržaja vode (Ruesgas-Ramón i sur., 2017).

#### 4.4. UKUPNI PROTEINI U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE

Proteini su biološke makromolekule prisutne u svim živim stanicama. Čine osnovu ljudske i životinjske prehrane, a uz to predstavljaju i važnu sirovinu u farmaceutskoj te kozmetičkoj industriji gdje služe kao emulgatori i aditivi (Xiu i Shahbazi, 2015). Smatra se kako će porastom svjetske populacije potražnja za proteinima nadmašiti čak i potražnju za hranom. Iz tog razloga se sve više javlja potreba za pronalaženjem alternativnih izvora proteina kao što je primjerice agro-industrijski otpad (Wahlström i sur., 2017). Danas su u upotrebi brojne metode ekstrakcije proteina i drugih bioaktivnih spojeva iz biomase poput ekstrakcije kruto-tekuće, Soxhlet ekstrakcije i ekstrakcije tekuće-tekuće. Međutim uz ove konvencionalne metode vežu se brojni nedostaci kao što su visoka potrošnja otapala i energije, razgradnja termolabilnih komponenti, dugo trajanje postupka ali i niski prinosi ekstrakcije (Lin i sur., 2020; Banerjee i sur., 2017). Kako bi se prevladali navedeni problemi potrebno je razviti nove efikasnije i ekološki prihvatljivije metode (Hernández-Corroto i sur., 2020), a jedan od mogućih rješenja je upotreba prirodnih eutektičkih otapala (Lin i sur., 2020).

Ukupni proteini određeni su metodom po Lowry-u uz upotrebu kalij-fosfatnog pufera kao referentnog otapala. Nepoznate koncentracije proteina u uzorcima izračunate su pomoću jednadžbe pravca baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije  $A_{740}$  o koncentraciji proteina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

Rezultati mjerenja izraženi su kao mg proteina po g narančine kore te su prikazani na slici 17.



Slika 17. Maseni udjeli ukupnih proteina u ekstraktima narančine kore. Uvjeti ekstrakcije: 2,5 g narančine kore u 10 mL otapala; 25 °C; 1 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n=3)

Iz priloženih je rezultata vidljivo kako je ekstrakcija proteina iz narančine kore uspješno provedena u svim prirodnim eutektičkim otapalima. Međutim većina ispitanih otapala pokazuje manju selektivnost prema ekstrakciji proteina u odnosu na referentno otapalo, pufer. Izuzetak su prirodno eutektičko otapalo GlcGly<sub>80</sub> pomoću kojeg je ekstrahirano najveći udio proteina ( $10,27 \pm 0,23 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore), a njega slijedi prirodno eutektičko otapalo GlcGly<sub>50</sub> ( $9,86 \pm 0,45 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). Kod oba otapala količina ekstrahiranih proteina nadmašuje udio proteina ekstrahirano pomoću pufera ( $8,92 \pm 0,83 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). Otapala SorEG<sub>80</sub> te GlcGly<sub>30</sub> pokazala su se najmanje učinkovita prilikom ekstrakcije proteina iz narančine kore. Kod navedenih otapala udio ekstrahiranih proteina iznosi  $2,03 \pm 0,14 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore (SorEG<sub>80</sub>) odnosno  $2,03 \pm 0,15 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore (GlcGly<sub>30</sub>). pH

vrijednost prirodnih eutektičkih otapala uvelike može utjecati na sposobnost ekstrakcije zbog svog utjecaja na elektrostatske interakcije te vodikove veze između otapala i ciljanih spojeva. Naime pH vrijednosti mogu utjecati na konformaciju ciljanih spojeva što na kraju utječe na njegovu topljivost u prirodnim eutektičkim otapalima (Skarpalezos i Detsi, 2019; Xu i sur., 2019). Međusobnom usporedbom svih prirodnih eutektičkih otapala primijećeno je kako su otapala s nižim pH vrijednostima (oko 5 ili niže) manje uspješna prilikom ekstrakcije proteina. Jedini izuzetak je prirodno eutektičko otapalo GlcGly<sub>30</sub>, međutim u ovom slučaju na smanjenu sposobnost ekstrakcije mogu utjecati i drugi faktori poput veće viskoznosti otapala.

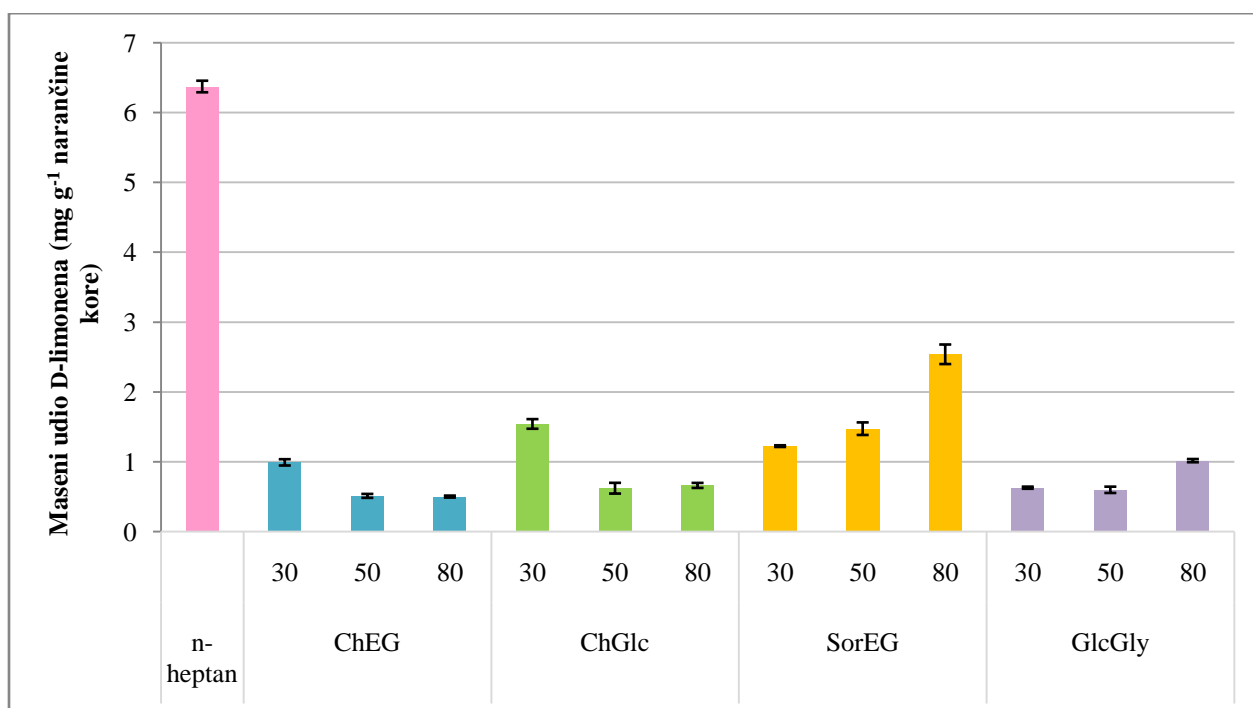
Rezultati dobiveni u ovom radu navode na zaključak kako prirodna eutektička otapala nisu osobito uspješna zamjena konvencionalnim otapalima kada je u pitanju ekstrakcija proteina. Međutim do danas nije objavljeno mnogo radova koji se bave ekstrakcijom proteina iz narančine kore te je primjena prirodnih eutektičkih otapala i dalje nedovoljno istraženo područje. Između ostalog važno je napomenuti kako uspješnost ekstrakcije uvelike ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima otapala na koja se lako može utjecati dizajniranjem otapala (Xu i sur., 2019). Stoga postoji mogućnost dodatne optimizacije parametara (npr. polarnosti, molarnog omjera komponenti ili viskoznosti) kako bi se eventualno povećao prinos ekstrakcije. Također, prirodna eutektička otapala uspješno su korištena za ekstrakciju proteina iz kore šipka (Hernández-Corroto i sur., 2020), bambusovih klica (Lin i sur., 2020), nusproizvoda prerade uljane repice (Grudniewska i sur., 2018) kao i nusproizvoda proizvodnje piva (Wahlström i sur., 2017). Nadalje, za razliku od konvencionalnih otapala, prirodna su eutektička otapala u skladu s principima zelene kemije te kao takva predstavljaju bolji izbor otapala za procese ekstrakcije prirodnih spojeva.

#### 4.5. D-LIMONEN U EKSTRAKTIMA NARANČINE KORE

Narančina kora izrazito je bogata eteričnim uljima među kojima prevladavaju D-limonen (73,9 – 97,0 % ukupnog sadržaja eteričnog ulja), ciklični terpen koji je pri sobnoj temperaturi bezbojna tekućina snažnog citrusnog mirisa (Satari i Karimi, 2018; Siles López i sur., 2010). Eterična ulja, a posebno D-limonen, posjeduju snažno antioksidacijsko, antibakterijsko te insekticidno djelovanje kao i snažnu aromu zbog čega su pronašli široku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj te prehrambenoj industriji, uglavnom kao bojila i arome (Ozturk i sur., 2018a). D-limonen se također sve češće koristi kao zamjena za konvencionalna organska otapala poput toluena, heksana i diklormetana koja su štetna za okoliš i ljudsko zdravlje, ali i

kao sirovina u kemijskoj industriji za proizvodnju polimera i drugih monomera (Paggiola i sur., 2016). Standardne metode ekstrakcije D-limonena iz narančine kore uključuju hladno prešanje, destilaciju ili ekstrakciju otapalima pri čemu se kao otapalo najčešće koristi heksan. Međutim, tradicionalne metode ekstrakcije zahtijevaju veliki utrošak energije, a ekstrakcija organskim otapalima poput heksana predstavlja problem i s ekološkog stajališta jer se koriste hlapljivi organski spojevi koji dokazano štetno djeluju na okoliš i zdravlje ljudi (Ma i sur., 2019; Siles López i sur., 2010). Navedeni nedostaci potaknuli su razvoj novih ekološki prihvatljivijih metoda ekstrakcije s većim prinosima ali i manjim utroškom energije (Mamma i Christakopoulos, 2014).

Uz polifenolne spojeve i proteine, u ovom je radu ispitana isposobnost ekstrakcije D-limonena iz narančine kore pomoću prirodnih eutektičkih otapala. Udio D-limonena u ekstraktima narančine kore određen je pomoću plinske kromatografije nakon ekstrakcije tekuće-tekuće u *n*-heptanu. Baždarni dijagram ovisnosti površine ispod kromatografskog pika o koncentraciji D-limonena ( $\text{mol mL}^{-1}$ ) korišten je za računanje nepoznatih koncentracija D-limonena u uzorcima. Pritom dobiveni rezultati prikazani su na slici 18 te su izraženi kao mg D-limonena po g narančine kore.



Slika 18. Maseni udjeli D-limonena u ekstraktima narančine kore. Uvjeti ekstrakcije: 2,5 g narančine kore u 10 mL otapala; 25 °C; 1 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n=3)

Ekstrakcija D-limonena iz narančine kore uspješno je provedena u svim ispitanim otapalima. Međutim, iz priloženih rezultata vidljivo je kako je uspješnost ekstrakcije prirodnim eutektičkim otapalima znatno manja u usporedbi s referentnim otapalom, *n*-heptanom. Najmanju učinkovitost ekstrakcije pokazalo je prirodno eutektičko otapalo ChEG<sub>80</sub> ( $0,50 \pm 0,01$  mg g<sup>-1</sup> narančine kore). S druge strane, prirodno eutektičko otapalo SorEG<sub>80</sub> pokazalo je najveću selektivnost prema D-limonenu uz ekstrahiranih  $2,54 \pm 0,14$  mg D-limonena po g narančine kore. No, količina ekstrahiranog spoja od interesa gotovo je trostruko manja od količine ekstrahirane pomoću *n*-heptana ( $6,37 \pm 0,08$  mg g<sup>-1</sup> narančine kore). Uzimajući u obzir fizikalno-kemijska svojstva ispitanih prirodnih eutektičkih otapala (poglavlje 4.2.) ovakvi rezultati ne iznenađuju. Naime D-limonen je po svojoj prirodi nepolaran spoj koji je slabo topljiv u vodi (Ciriminna i sur., 2014), a polarnost prirodnih eutektičkih otapala pripremljenih za potrebe ovog rada slična je polarnosti vode. Stoga vodeći se principom "slično se otapa u sličnome" dobiveni rezultati u skladu su s očekivanjima.

Ma i sur. (2019) u svom su radu ispitali mogućnost ekstrakcije D-limonena iz narančine kore primjenom prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida. Pritom je većina ispitanih otapala pokazala visoku učinkovitost ekstrakcije uz prinose i do 17,8 mg D-limonena po g narančine kore. Prirodno eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen-glikol autori su istaknuli kao jedno od najuspješnijih otapala kada je u pitanju ekstrakcija D-limonena. Za razliku od rezultata dobivenih u ovom radu gdje koncentracija D-limonena u otapalima kolin-klorid:etilen-glikol s različitim udjelima vode ne prelazi 1 mg g<sup>-1</sup> narančine kore, Ma i sur. (2019) zabilježili su preko 17 mg D-limonena po g narančine kore u prirodnom eutektičkom otapalu sastavljenom od istih komponenti. Međutim i sami autori ističu kako udio D-limonena u narančinoj kori znatno varira među različitim sortama te također ovisi i o uvjetima čuvanja naranči. Osim toga, uspješnost ekstrakcije mogla bi se povećati dizajniranjem pogodnijih otapala te optimizacijom uvjeta samog postupka (Xu i sur., 2019). Ozturk i sur. (2018a) uspješno su proveli ekstrakciju limonena i linaoola uz primjenu prirodnog eutektičkog otapala kolin:klorid:glicerol, a uz to su dokazali i kako razrjeđivanje prirodnih eutektičkih otapala vodom smanjuje njihovu sposobnost ekstrakcije zbog povećanja polarnosti otapala.

Unatoč tome što su prirodna eutektička otapala ispitana u ovom radu pokazala smanjenu selektivnost prema D-limonenu u odnosu na *n*-heptan, njihove brojne prednosti s ekonomskog i ekološkog aspekta opravdavaju njihovu primjenu umjesto konvencionalnih organskih otapala. Primjerice, ekstrakti D-limonena pripremljeni primjenom prirodnih eutektičkih otapala mogli bi se koristiti u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji bez potrebe za skupim i



zahtjevnim koracima pročišćavanja budući da komponente koje sačinjavaju prirodna eutektička otapala imaju GRAS status (eng. *Generally Recognised As Safe*) te se smatraju netoksičnima (Ozturk i sur., 2018a). Nadalje, kako bi proces ekstrakcije bio što učinkovitiji iznimno je važno odabrati odgovarajuće ishodne metabolite za pripremu prirodnih eutektičkih otapala te optimizirati njihova fizikalno-kemijska svojstva uzimajući u obzir prirodu spojeva od interesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

#### 4.6. ENANTIOSELEKTIVNA HIDROLIZA (*R,S*)-1-FENILETIL ACETATA U PRIRODNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

U posljednje vrijeme priprava enantiomerno čistih spojeva područje je od posebnog interesa, posebno u farmaceutskoj industriji kao i industriji finih kemikalija. Naime, enantiomerno čisti spojevi potencijalni su kiralni građevni blokovi za sintezu farmaceutski važnih molekula, agrokemikalija, aroma te asimetričnih kiralnih liganada. Pritom je važno napomenuti kako enantiomeri istog spoja često ispoljavaju različita biološka svojstva uslijed različitih strukturnih karakteristika. Prema tome velik broj kiralnih lijekova znatno se razlikuje obzirom na svoja toksikološka svojstva te farmakokinetiku i farmakodinamiku. Obično samo jedan od enantiomera posjeduje željenu aktivnost dok je drugi inaktivan ili čak toksičan. Upravo zato je enantiomerna čistoća gotovih proizvoda izrazito važna (Vandenberghes i sur., 2013; Chua i Sarmidi, 2004). Kiralni alkoholi jedan su od važnih intermedijera za sintezu brojnih kiralnih lijekova, pesticida, mirisa te kiralnih pomoćnih sredstava. Primjerice, (*R*)-1-feniletanol široku je primjenu pronašao u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji kao kiralni građevni blok i kao sintetski intermedijer za fine kemikalije, a oba enantiomera često se koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerne čistoće i asimetrično otvaranje cikličnih anhidrida i epoksida (Fan i sur., 2011).

Enantiomerno čisti spojevi mogu se dobiti kemijskim ili biološkim metodama. Tradicionalna kemijska sinteza uključuje primjenu organometalnih katalizatora koji ne pokazuju visoku enantioselektivnost, a osim toga moguće je i zaostajanje metalnih katalizatora u gotovom proizvodu čime se narušava njegova kvaliteta (Liang i sur., 2016). Iz tog razloga sve više se razmatra primjena bioloških metoda poput biotransformacija, kemijskih reakcija kataliziranim enzimima, mikroorganizmima ili staničnim kulturama. Biotransformacije uz visoku regio- i stereoselektivnost omogućavaju i vođenje procesa pri blagim uvjetima što čini proces ekološki prihvatljivijim, a korišteni biokatalizatori su jeftini, netoksični i biorazgradivi. Jedna

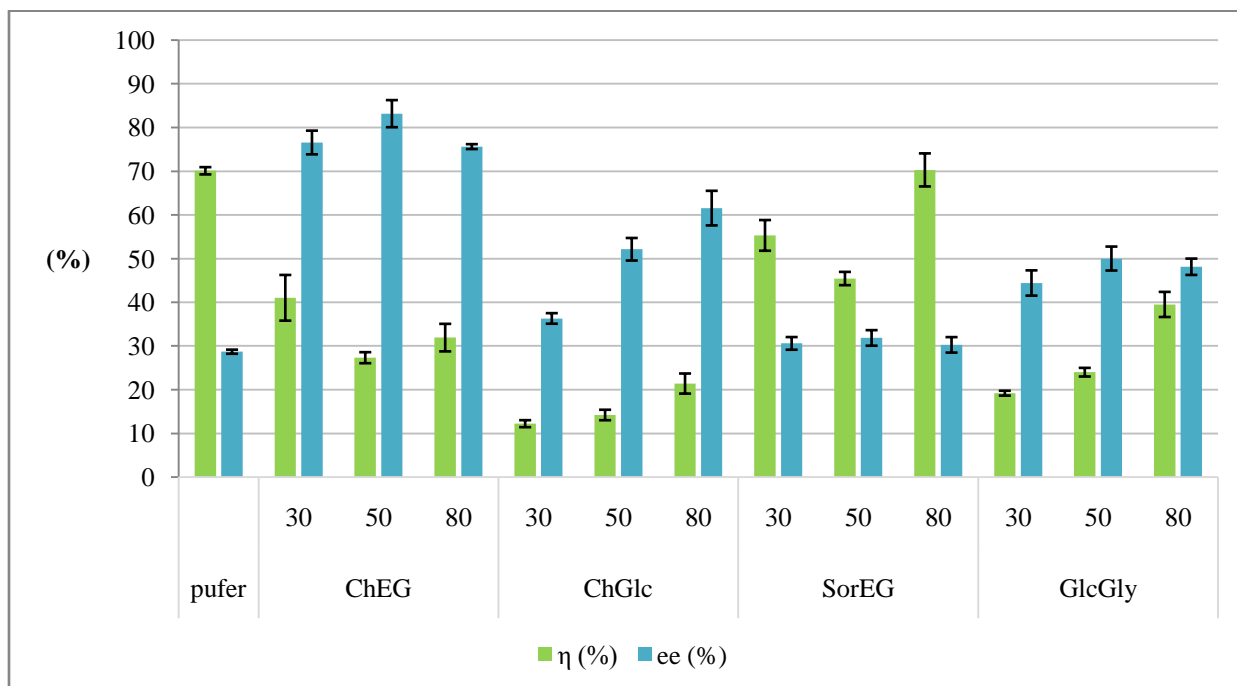
od najčešćih metoda dobivanja kiralnih spojeva je kinetička rezolucija racemata. Riječ je o reakciji tijekom koje se enantiomeri unutar racemične smjese prevode u odgovarajuće produkte različitim brzinama. Pritom se jedan od enantiomera brže prevodi u željeni produkt, a drugi enantiomer zaostaje (Pellissier, 2011). Usprkos tome što je kinetička rezolucija vrlo učinkovita i relativno jednostavna metoda pripreme enantiomerno čistih spojeva, maksimalni teorijski prinos reakcije od 50 % glavni je nedostatak koji ograničava njenu primjenu u industrijskom mjerilu. Iz tog razloga razvijeno je nekoliko metoda pomoću kojih se može prevladati navedeni problem, a među njima je i dinamička kinetička rezolucija. Dinamička kinetička rezolucija također uključuje prevođenje jednog od enantiomera u odgovarajući proizvod uz dodatan korak *in situ* racemizacije zaostalog, neizreagiranog enantiomera. Prema tome primjenom dinamičke kinetičke rezolucije moguće je dobiti enantiomerno čisti spoj uz 100 %-tni teorijski prinos reakcije (Humphrey i sur., 2014; Ahmed i sur., 2012).

Unatoč brojnim prednostima biološke metode imaju ograničenu primjenu u industrijskom mjerilu zbog cijene ili složene pripreme biokatalizatora (Vandenberghe i sur., 2013). Kako bi se uspješno prevladali navedeni problemi sve više se istražuje upotreba cijelih stanica iz dijelova voća ili povrća kao biokatalizatora. Jedna od brojnih prednosti ovakvih biokatalizatora je njihova laka dostupnost i niska cijena, kao i jednostavno postavljanje reakcije. Osim toga, upotrebom cijelih stanica sprječava se denaturacija i inaktivacija enzima budući da se enzimi nalaze u svom prirodnom okruženju u kojemu je osigurana i regeneracija potrebnih kofaktora (Pavković i sur., 2017; Yang i sur., 2017). Uz odabir odgovarajućeg biokatalizatora, za uspješno provođenje biokatalize iznimno je važan i izbor otapala s obzirom da njegova svojstva poput polarnosti i hidrofobnosti znatno utječu na aktivnost i selektivnost enzima. Budući da su prirodna eutektička otapala netoksična, biorazgradiva te jeftina i lako dostupna, ona imaju ogroman potencijal za primjenu u biotransformacijama (Yang i sur., 2017; Frings i sur., 1999).

Obzirom da biokataliza s vremenom pobuđuje sve veći interes u znanstvenim krugovima, u ovom je radu ispitana uspješnost enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima s različitim udjelima vode (tablica 1) te u kalij-fosfatnom puferu kao referentnom otapalu uz primjenu enzima narančine kore kao biokatalizatora. Reakcija je započeta dodatkom supstrata (*R,S*)-1-feniletil acetata (15  $\mu$ L) te narezane narančine kore (0,2 g) u 1 mL odgovarajućeg prirodnog eutektičkog otapala, odnosno pufera te se provodila 7 dana pri sobnoj temperaturi na tresilici. Tijek reakcije praćen je izuzimanjem uzoraka iz reakcijske smjese koji su potom analizirani plinskom kromatografijom. Kako bi se

odredile nepoznate koncentracije supstrata u analiziranim uzorcima konstruiran je baždarni dijagram ovisnosti površine ispod kromatografskog pika o koncentraciji supstrata (*R,S*)-1-feniletil acetata.

Radi usporedbe uspješnosti enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u sintetiziranim prirodnim eutektičkim otapalima te u puferu, izračunati su iskorištenje reakcije ( $\eta$ , %) te enantiomerni višak ( $ee$ , %). Pritom dobiveni rezultati prikazani su na slici 19.



Slika 19. Enantiomerni višak ( $ee$ ) te iskorištenje reakcije hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata ( $\eta$ ) katalizirane enzimima iz narančine kore u puferu te prirodnim eutektičkim otapalima.

Reakcijski uvjeti:  $0,015 \text{ mol L}^{-1}$  (*R,S*)-1-feniletil acetata; 0,2 g narančine kore;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 7 dana.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D ( $n=3$ )

Iz priloženih je rezultata moguće zaključiti kako su hidrolitički enzimi iz narančine kore aktivni u svim ispitanim otapalima kao i u puferu, međutim, s različitim uspjehom. Enantiomerni višak ( $ee$ ) kojim se iskazuje optička čistoća smjese glavni je kriterij za usporedbu uspješnosti reakcije kinetičke rezolucije. Pritom vrijednosti  $ee$  od 100 % odgovaraju enantiomerno čistim spojevima, dok je za racemične smjese  $ee$  vrijednost jednaka 0 %. Iz slike 19 vidljivo je kako vrijednosti enantiomernog viška dobivene u ovom radu variraju među različitim prirodnim eutektičkim otapalima te se kreću u rasponu od 30,26 % (SorEG<sub>80</sub>) do 83,15 % (ChEG<sub>50</sub>), a u svim slučajevima kao dominantni produkt nastaje (*R*)-1-feniletanol. Obzirom na širok raspon dobivenih vrijednosti moguće je zaključiti kako sastav

prirodnih eutektičkih otapala te sadržaj vode u otapalu znatno utječu na enantioselektivnost enzima iz narančine kore. Kod otapala ChGlc najuočljiviji je utjecaj sadržaja vode na enantioselektivnost biokatalizatora pri čemu *ee* vrijednosti rastu porastom udjela vode u otapalu te se kreću u rasponu od 36,30 % (CgGlc<sub>30</sub>) do 61,54 % (CgGlc<sub>80</sub>). Dodatak vode prirodnim eutektičkim otapalima važan je za aktivnost enzima, a osim toga pozitivno utječe i na prijenos mase smanjenjem viskoznosti otapala (Panić i sur., 2018). Međutim, kod ostalih ispitanih otapala nije primijećena povezanost *ee* vrijednosti sa sadržajem vode što bi značilo da sam sastav prirodnih eutektičkih otapala značajnije utječe na enantioselektivnost biokatalizatora. Primjerice, prirodna eutektička otapala na bazi kolin-klorida pokazala su se pogodnijima za provođenje enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata, posebno u usporedbi sa SorEG kod kojeg postignute *ee* vrijednosti ne prelaze 32 %. Pritom se kao najuspješnije otapalo pokazalo ChEG s *ee* vrijednostima u rasponu od 75,61 % do 83,15 %. Uočene razlike u enantioselektivnosti biokatalizatora u ispitivanim otapalima moguća su posljedica selektivne inhibicije različitih hidrolitičkih enzima prisutnih u narančinoj kori pojedinim komponentama prirodnih eutektičkih otapala. Do istog zaključka došli su i Panić i sur. (2018) koji su u svom radu proveli hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata pomoću enzima iz korijena mrkve u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida. Nadalje, Maugeri i Domínguez De María (2014) koji su ispitali mogućnost redukcije etil acetoacetata pomoću pekarskog kvasca, uočili su potpunu inverziju enantioselektivnosti u prirodnim eutektičkim otapalima s različitim udjelima vode. Autori su zaključili kako je promjena u enantioselektivnosti posljedica inhibicije ili potpune inaktivacije pojedinih enzima, dok drugi ostaju aktivni.

Iskorištenja reakcije hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima kreću se u rasponu od 12,22 % (ChGlc<sub>30</sub>) do 70,28 % (SorEG<sub>80</sub>), dok iskorištenje reakcije u referentom otapalu, puferu, iznosi 70,08 %. Unatoč najvišem iskorištenju reakcije, enantiomerni višak u puferu iznosi svega 28,69 % što je ujedno i najniža vrijednost u usporedbi s ostalim ispitivanim otapalima. Iz priloženih je rezultata vidljivo kako je veće iskorištenje reakcije usko povezano s manjim *ee* vrijednostima što je ujedno u skladu s očekivanjima. Naime, u slučaju kada je biokatalizator u potpunosti enantioselektivan maksimalna vrijednost iskorištenja reakcije iznosi 50 %. Iskorištenja veća od 50 % upućuju na smanjenu enantioselektivnost enzima, odnosno to znači da enzimi prevode i (*R*)- i (*S*)-enantiomer u odgovarajuće produkte (Vandenberghe i sur., 2013). Vandenberghe i sur. (2013) također su uočili kako prilikom provođenja reakcije u vodi ili puferu hidrolitički enzimi iz

biljnih tkiva nisu u potpunosti stereoselektivni te prevode i (*R*) i (*S*)-1-feniletil acetat u odgovarajuće sekundarne alkohole.

Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti kako prirodna eutektička otapala predstavljaju pogodniji medij za provođenje biokatalitičkih reakcija u odnosu na pufer zbog njihovog pozitivnog utjecaja na enantioselektivnost biokatalizatora što je vidljivo iz dobivenih većih *ee* vrijednosti. Pritom se otapalo ChEG<sub>50</sub> pokazalo najučinkovitijim za provođenje enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata, uz *ee* vrijednost gotovo tri puta veću u usporedbi s puferom. Prema tome, odabirom odgovarajućeg prirodnog eutektičkog otapala kao i optimalnog udjela vode u otapalu moguće je pozitivno utjecati na ishod biokatalize, odnosno može se postići veća optička čistoća gotovog proizvoda.

U zaključku, rezultati prikazani u ovom radu ukazuju na veliki potencijal primjene prirodnih eutektičkih otapala u valorizaciji otpadne narančine kore unutar koncepta biorafinerije. Pritom su se ispitana prirodna eutektička otapala pokazala izvrsnom alternativom konvencionalnim organskim otapalima poput etanola za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz narančine kore. S druge strane, ekstrakcija proteina i D-limonena bila je nešto manje uspješna u usporedbi s referentnim otapalima. Međutim, to ne umanjuje njihove brojne prednosti nad konvencionalnim organskim otapalima čija je upotreba problematična prvenstveno s ekološkog stajališta. Prema tome, potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se optimizirao proces ekstrakcije prethodno navedenih spojeva iz narančine kore primjenom prirodnih eutektičkih otapala, s naglaskom na optimizaciju fizikalno-kemijskih svojstava koja u velikoj mjeri utječu na efikasnost ekstrakcije. Nadalje, u ovom je radu uspješno provedena enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima iz narančine kore kao biokatalizatora. Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti kako upotreba otpadne narančine kore kao biokatalizatora u reakcijama hidrolize estera predstavlja ekološki prihvatljivu alternativu za proizvodnju kiralnih alkohola. Uz to prirodna su se eutektička otapala pokazala boljim medijem za provođenje ove reakcije te je enantioselektivnost biokatalizatora bila znatno veća u usporedbi s puferom kao referentnim otapalom. Vodeći se dosad navedenim zaključcima, neosporivo je da prirodna eutektička otapala imaju velik potencijal kao zamjena konvencionalnim otapalima koja se trenutno koriste u industriji, a koja predstavljaju opasnost za okoliš i ljudsko zdravlje. Međutim, kako je i u ovom radu pokazano potrebno je prevladati još brojne izazove te optimizirati različite procese kako bi prirodna eutektička otapala pronašla primjenu u industrijskom mjerilu.

## 5. ZAKLJUČCI

Svrha ovog rada bila je istražiti potencijal otpadne narančine kore kao sirovine za dobivanje visokovrijednih proizvoda kao i mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala u valorizaciji otpadne narančine kore u sklopu koncepta biorafinerije.

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. Ekstrakcija ukupnih polifenolnih spojeva iz narančine kore uspješno je provedena u svim ispitanim otapalima. Pritom se učinkovitost ekstrakcije prirodnim eutektičkim otapalima pokazala nešto većom u usporedbi sa zakiseljenim etanolom kao referentnim otapalom. Najveći udio ukupnih polifenolnih spojeva ekstrahirani je pomoću prirodnog eutektičkog otapala SorEG<sub>50</sub> ( $66,99 \pm 4,7 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore) što je gotovo dvostruko više u odnosu na količinu ekstrahiranu zakiseljenim etanolom ( $41,59 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). Prema tome, prirodna eutektička otapala predstavljaju izvrsnu "zelenu" alternativu organskim otapalima poput etanola koji se danas koriste za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz biljnih tkiva.
2. Ispitana prirodna eutektička otapala nisu bila osobito uspješna prilikom ekstrakcije proteina iz narančine kore, te je kod većine ispitanih otapala udio ekstrahiranih proteina vidno manji u odnosu na referentno otapalo, pufer. Iznimka su prirodna eutektička otapala GlcGly<sub>80</sub> ( $10,27 \pm 0,23 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore) te GlcGly<sub>50</sub> ( $9,86 \pm 0,45 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore) koja su se pokazala učinkovitija za ekstrakciju proteina u usporedbi s puferom ( $8,92 \pm 0,83 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). Iz navedenog je vidljivo kako prirodna eutektička otapala svakako imaju potencijal zamijeniti konvencionalna otapala za ekstrakciju proteina iz biljnih tkiva poput narančine kore uz odabir odgovarajućih komponenti za sintezu prirodnih eutektičkih otapala i sadržaja vode u otapalu.
3. Uspješnost ekstrakcije D-limonena prirodnim eutektičkim otapalima znatno je manja u usporedbi s *n*-heptanom koji je korišten kao referentno otapalo. Prirodno eutektičko otapalo SorEG<sub>80</sub> pokazalo se najučinkovitijim za ekstrakciju D-limonena iz narančine kore uz ekstrahiranih  $2,54 \pm 0,14 \text{ mg}$  D-limonena po g narančine kore. Međutim, navedena količina i dalje je gotovo trostruko manja od količine D-limonena ekstrahirane pomoću *n*-heptana ( $6,37 \pm 0,08 \text{ mg g}^{-1}$  narančine kore). Prema tome, prirodna eutektička otapala ispitana u ovom radu nisu pogodna za ekstrakciju nepolarnih spojeva poput D-limonena.

4. Prirodna eutektička otapala pokazala su se znatno učinkovitijim medijem za provođenje enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u usporedbi s puferom kao referentnim otapalom. Među ispitanim otapalima najučinkovitijm se pokazalo prirodno eutektičko otapalo ChEG<sub>50</sub> uz enantiomerni višak od 83,15 % nakon 7 dana reakcije, dok je *ee* vrijednost za reakciju u puferu iznosila svega 28,69 %. Prema tome moguće je zaključiti kako ispitana prirodna eutektička otapala pozitivno utječu na enantioselektivnost primijenjenog biokatalizatora za razliku od pufera.

## 6. LITERATURA

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.

Arai, Y., Sako, T., Takebayashi, Y. (2002) *Supercritical Fluids*, Springer-Verlag, Heidelberg.

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

Bardhan, S. K., Gupta, S., Gorman, M. E., Haider, M. A. (2015) Biorenewable chemicals: Feedstocks, technologies and the conflict with food production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **51**, 506–520.

Bauer, F., Coenen, L., Hansen, T., McCormick, K., Palgan, Y. V. (2017) Technological innovation systems for biorefineries: a review of the literature. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **11**, 534–548.

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

Bozell, J. J. (2008) Feedstocks for the Future – Biorefinery Production of Chemicals from Renewable Carbon. *Clean* **36**, 641 – 647.

Chapman, J., Ismail, A. E., Dinu, C. Z. (2018) Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* **8**, 238.

Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., Cravotto, G. (2019) Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **118**, 248-263.



- Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R., de Jong, E. (2009) Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **3**, 534–546.
- Chua, L. S., Sarmidi, M. R. (2004) Immobilised lipase-catalysed resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **20**, 111-119.
- Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Demma Carà, P., Lopez-Sanchez, J. A., Pagliaro, M. (2014) Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chem. Commun.* **50**, 15288-15296.
- Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M. T., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R. L., Duarte, A. R. C., Paiva, A. (2016) Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J. Mol. Liq.* **215**, 534-540.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 1631–1639.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food. Bioprod. Process.* **109**, 52-73.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* **766**, 61-68.
- de Jong, E., Langeveld, H., van Ree, R. (2009) IEA Bioenergy Task 42 biorefinery, <[https://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/upload\\_mm/5/8/2/a47bd297-2ace-44d0-92bb-cb7cc02f75de\\_Brochure\\_Totaal\\_definitief\\_webs.pdf](https://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/upload_mm/5/8/2/a47bd297-2ace-44d0-92bb-cb7cc02f75de_Brochure_Totaal_definitief_webs.pdf)> Pristupljeno 12. svibnja 2020
- de la Torre, I., Martin-Dominguez, V., Acedos, M. G., Esteban, J., Santos, V. E., Ladero, M. (2019) Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 5975–5991.
- Diep, N. Q., Sakanishi, K., Nakagoshi, N., Fujimoto, S., Minowa, T., Tran, X. D. (2012) Biorefinery: Concepts, Current Status, and Development Trends. *Int. J. Biomass Renew.* **1**, 1-8.

Dragone, G., A. J. Kerssemakers, A., L. S. P. Driessen, J., Yamakawa, C. K., Brumano, L. P., Mussatto, S. I. (2020) Innovation and strategic orientations for the development of advanced biorefineries. *Bioresource Technol.* **302**, 122847.

Earle, M. J., Seddon, K. R. (2000) Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure Appl. Chem.* **72**, 1391-1398.

EPA (2017) Basics of Green Chemistry. EPA - Environmental Protection Agency, <<https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry>> Pristupljeno 14. svibnja 2020

Faisal, M. (2019) Water in Organic Synthesis as a Green Solvent. U: Industrial Applications of Green Solvents – Volume I, (Inamuddin, Ahamed, M. I., Asiri, M. A., ured.), Materials Research Forum LLC, Millersville, str. 61-106.

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.

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

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.

Hayyan, A., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Wahaibi, T., Hashim, M. A. (2013) Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *J. Mol. Liq.* **178**, 137-141.

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.* **60**, 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.

Kerton, F. M., Marriott, R. (2013) *Alternative Solvents for Green Chemistry*, 2. izd., The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

King, D., Inderwildi, O. R., Williams, A. (2010) *The Future Of Industrial Biorefineries*, <[https://www.iwbio.de/fileadmin/Publikationen/IWBio-Publikationen/WEF\\_Biorefineries\\_Report\\_2010.pdf](https://www.iwbio.de/fileadmin/Publikationen/IWBio-Publikationen/WEF_Biorefineries_Report_2010.pdf)> Pristupljeno 12. svibnja 2020

Lamuela-Raventós, R. M. (2018) Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. U: *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*, (Apak, R., Capanoglu, E., Shahidi, F., ured.), John Wiley & Sons Ltd, Hoboken. str. 107-115.

Liang, J., Zhang, Y., Sun, A., Deng, D., Hu, Y. (2016) Enantioselective Resolution of (±)-1-Phenylethanol and (±)-1-Phenylethyl Acetate by a Novel Esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **178**, 558–575.

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

Liu, S., Abrahamson, L. P., Scott, G. M. (2012) Biorefinery: Ensuring biomass as a sustainable renewable source of chemicals, materials, and energy. *Biomass Bioenerg.* **39**, 1-4.

Ma, Y., Li, P., Li, Y., Willot, S. J. P., 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 valorisation of agricultural wastes. *ChemSusChem* **12**, 1310-1315.

- Maia da Silva, F. F., Ferreira, D. A., Monte, F. J. Q., de Mattos, M. C., de Lemos, T. L. G. (2017) Synthesis of chiral esters and alcohols via enantioselective esterification with *Citrus aurantium* peels as biocatalyst. *Ind. Crop. Prod.* **96**, 23-29.
- Mamma, D., Christakopoulos, P. (2014) Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. *Waste Biomass Valor.* **5**, 529-549.
- Maugeri, Z., Domínguez de María, P. (2014) Whole-Cell Biocatalysis in Deep-Eutectic-Solvents/Aqueous Mixtures. *ChemCatChem* **6**, 1535-1537.
- Morais A. R. C., Bogel-Lukasik R. (2013) Green chemistry and the biorefinery concept. *Sustain. Chem. Process.* **1**, 18.
- Ogihara, W., Aoyama, T., Ohno, H. (2004) Polarity Measurement for Ionic Liquids Containing Dissociable Protons. *Chem. Lett.* **33**, 1414-1415.
- Okino-Delgado, C. H., Fleuri, L. F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. *Food Chem.* **163**, 103-107.
- Okino-Delgado, C. H., Pereira, M. S., da Silva, J. V. I., Kharfan, D., do Prado, D. Z., Fleuri, L. F. (2019) Lipases Obtained from Orange Wastes: Commercialization Potential and Biochemical Properties of Different Varieties and Fractions. *Biotechnol. Prog.* **35**, e2734.
- Olivier-Bourbigou, H., Magna, L. (2002) Ionic liquids: perspectives for organic and catalytic reactions. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **182-183**, 419-437.
- Ortiz-Sanchez, M., Solarte-Toro, J. C., Orrego-Alzate, C. E., Acosta-Medina, C. D., Cardona-Alzate, C. A. (2020) Integral use of orange peel waste through the biorefinery concept: an experimental, technical, energy, and economic assessment. *Biomass Conv. Bioref.* (objavljeno online 08. veljače 2020.). doi: 10.1007/s13399-020-00627-y
- 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 21<sup>st</sup> Century. *ACS Sustainable 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 Agr.* **99**, 1969-1979.
- Panić, M., Majerić Elenkov, M., Roje, M., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2018) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process. Biochem.* **66**, 133-139.
- Panwar, D., Panesar, P. S., Chopra, H. K. (2019) Recent Trends on the Valorization Strategies for the Management of Citrus By-products. *Food. Rev. Int.* (objavljeno online 08. prosinca 2019.). doi: 10.1080/87559129.2019.1695834
- Parajuli, R., Dalgaard, T., Jørgensen, U., Adamsen, A. P. S., Knudsen, M. T., Birkved, M., Gylling, M., Schjørring, J. K. (2015) Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **43**, 244–263.
- 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.
- Peng, X., Duan, M. H., Yao, X. H., Zhang, Y. H., Zhao, C. J., Zu, Y. G., Fu, Y. J. (2016) Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. *Sep. Purif. Technol.* **157**, 249-257.
- Peric, B., Martí, E., Sierra, J., Cruañas, R., Garau, M. A. (2012) Green chemistry: Ecotoxicity and biodegradability of ionic liquids. U: Recent Advances in Pharmaceutical

Sciences II (Muñoz-Torrero, D., Haro, D., Vallès, J., ured.), Transworld Research Network, Trivandrum, str. 89-113.

Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Lorenzo J. M., Shpigelman, A. (2017) Innovative “Green” and Novel Strategies for the Extraction of Bioactive Added Value Compounds from Citrus Wastes – A Review. *Molecules* **22**, 680. doi: 10.3390/molecules22050680

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.

Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick Jr., W. J., Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, C. L., Mielenz, J. R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T. (2006) The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* **311**, 484-489.

Rogers, R. D., Seddon, K. R. (2003) Ionic Liquids – Solvents of the Future?. *Science* **302**, 792-793.

Ruesgas-Ramón, 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.

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

Shahbandeh, M. (2019) Global orange production 2012/13-2018/2019, <<https://www.statista.com/statistics/577398/world-orange-production/>> Pristupljeno 13. svibnja 2020

Sheldon, R. A. (2016) Biocatalysis and Biomass Conversion in Alternative Reaction Media. *Chem. Eur. J.* **22**, 12984 – 12999.

Shen, C. H. (2019) Diagnostic Molecular Biology, Academic Press, London, str. 187-214.

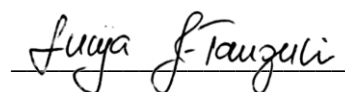
- Siles López, J. A., Li, Q., Thompson, I. P. (2010). Biorefinery of waste orange peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 63-69.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela – Raventós, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
- Skarpalezos, D., Detsi, A. (2019) Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources. *Appl. Sci.* **9**, 4169. doi: 10.3390/app9194169
- Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082.
- Uçkun Kıran, E., Trzcinski, A. P., Liu, Y. (2014) Platform chemical production from food wastes using a biorefinery concept. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 1364-1379.
- van Ree R., Annevelink B. (2007) Status Report Biorafinery 2007, <<https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/42141>> Pristupljeno 12. svibnja 2020
- Vandenbergh, A., Markó, I. E., Lucaccioni, F., Lutts, S. (2013) Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Ind. Crop. Prod.* **42**, 380-385.
- Wahlström, R., Rommi, K., Willberg-Keyriläinen, P., Ercili-Cura, D., Holopainen-Mantila, U., Hiltunen, J., Mäkinen, O., Nygren, H., Mikkelsen, A., Kuutti, L. (2017) High Yield Protein Extraction from Brewer's Spent Grain with Novel Carboxylate Salt - Urea Aqueous Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect* **2**, 9355 – 9363.
- Xiu S., Shahbazi A. (2015) Development of Green Biorefinery for Biomass Utilization: A Review. *Tr. Ren. Energy* **1**, 4-15.
- 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.* **297**, 124970.
- Xu, P., Zheng, G. W., Zong, M. H., Li, N., Lou, W. Y. (2017) Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.* **4**, 34.

- 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, 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.
- Yang, Z. (2019) Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. U: Application of Ionic Liquids in Biotechnology (Itoh, T., Koo, Y. M., ured.), Springer Nature Switzerland AG, Cham, str. 31-60.
- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108–7146.
- Zhu, Z., Gavahian, M., Barba, F.J., Roselló-Soto, E., Bursac Kovačević, D., Putnik, P., Denoya, G.I. (2020). Valorization of waste and by-products from food industries through the use of innovative technologies. U: Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability (Barba, F.J., Putnik, P., Bursac Kovačević, D., ured.), Academic Press, London, str. 249-266.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in black ink, reading "Lucija Jaša-Šangulin", written over a horizontal line.

Lucija Jaša-Šangulin