

**MANDARIINIMAHLA PRESSIJÄÄKIDE KASKAADSE VÄÄRINDAMISE
TEHNOLOOGIA VÄLJAARENDAMINE**

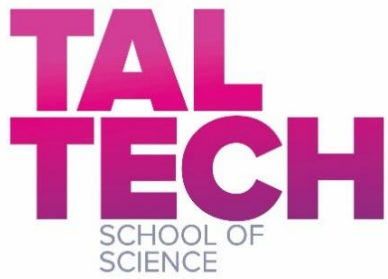
Magistritöö

Üliõpilane: Marlen Leemet

Juhendaja: Maria Kuhtinskaja, TalTech, KBI dotsent

Kaasjuhendaja: Merike Vaher, TalTech, KBI juhtivteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja biotehnoloogia



DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR CASCADE VALORIZATION OF MANDARIN JUICE PRESS RESIDUES

Master's thesis

Student: Marlen Leemet

Supervisor: Maria Kuhtinskaja, TalTech, KBI Associate Professor

Co-supervisor: Merike Vaher, TalTech, KBI Lead Research Scientist

Study program: Applied Chemistry and Biotechnology

Tallinn 2023

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisel esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Marlen Leemet

(allkiri ja kuupäev)

Töö vastab magistritööle esitatud nõuetele.

Juhendaja: Maria Kuhtinskaja

(allkiri ja kuupäev)

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Prof. Ott Scheler

(allkiri ja kuupäev)

Sisukord

Lühendid.....	6
Sissejuhatus.....	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Rohepööre ja ringmajandus	8
1.2. Tsitruseliste kasvatamine ja töötlemine maailmas	9
1.2.1. Mandariinide kasvatamine.....	11
1.3. Tsitrusviljade töötlemise jääde ja mõju keskkonnale	11
1.4. Mandariinide töötlemise kõrvalsaadustes sisalduvad komponendid.....	12
1.4.1. Limoneen.....	13
1.4.2. Hesperidiin	14
1.5. Mandariinide kõrvalsaaduse kaskaadne väärindamine	14
1.6. Mandariini eeterliku õli saamise meetodid	16
1.6.1. Hüdrodestillatsioon	17
1.7. Hesperidiini ekstraktsiooni meetodid	17
1.7.1. Ultraheli ekstraktsioon	18
1.8. Analüüsimeetodid	19
1.8.1. Gaasikromatograafia massispektromeetrilise detekteerimisega	19
1.8.2. Kõrgsurvevedelikkromatograafia UV kiirguse neelduvuse detekteerimisega	21
1.8.3. Statistilise katseplaneerimise olemus	23
2. Töö eesmärgid	24
3. Eksperimentaalne osa	25
3.1. Seadmed ja töövahendid	25
3.2. Analüüsi meetodikad	26
3.2.1. GC-MS meetodika	26
3.2.2. HPLC-UV meetodika	26
3.3. Biomass ja kemikaalid	26
3.4. Tarkvara.....	26
3.5. Katsete läbiviimise tingimused.....	27
3.5.1. Kaskaadse väärindamise etapid	27
3.5.2. Mandariinimahla pressijäägi valmistamine.....	27
3.5.3. Eeterliku õli hüdrodestillatsioon ja proovi valmistamine	28

3.5.4.	Ultraheli ekstraktsiooni ettevalmistus, teostamine ja proovi valmistamine	29
4.	Tulemused ja arutelu	31
4.1.	Eeterliku õli eraldumise dünaamika hüdrodestillatsioonil.....	31
4.1.1.	Satsuma mandariinide eeterliku õli koostis	32
4.2.	Hüdrodestillatsiooni jääkvesi	33
4.3.	Ultraheli ekstraktsiooni optimeerimine	34
4.3.1.	Optimaalne etanooli sisaldus ekstrahendis	34
4.3.2.	Optimaalsed ultraheli ekstraktsiooni tingimused	35
4.3.3.	Matsereerimise ja ultraheli vajalikkus ekstraktsioonil	36
4.3.4.	Aluselise keskkonna loomine – Na ₂ CO ₃ või NaOH	37
4.3.5.	Optimaalne biomassi ja solvendi suhe	38
4.3.6.	Optimaalsed ultraheli ekstraktsiooni ja matsereerimise tingimused	39
4.3.7.	Ultraheli ekstraktsiooni optimeeritud eeskiri ja tulemus	40
	Kokkuvõte.....	42
	Abstract	43
	Tänuavaldused	44
	Kasutatud kirjandus.....	45
	Lisad.....	49
	Lisa 1. HPLC-UV meetodika gradient elueerimise režiim.....	49
	Lisa 2. HD 1-4 eeterliku õli eraldumise statistiliste näitajate muutused ajas	50
	Lisa 3. Satsuma mandariinide eeterliku õli peamiste komponentide struktuurid.....	51
	Lisa 4. Satsuma mandariinide eeterliku õli GC-MS kromatogramm.....	52
	Lisa 5. Ultraheli ekstraktsioonil saadud ekstrakti HPLC-UV kromatogramm.....	53

Lühendid

Lühend	Inglise keeles	Eesti keeles
ACN	<i>Acetonitrile</i>	atsetonitriil
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>	dimetüülsulfoksiid
DOE	<i>Design of Experiment</i>	katseplaneerimine
DW	<i>Dry Weight</i>	kuivkaal
EtOH	<i>Ethanol</i>	etanool
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>	Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon
GC	<i>Gas Chromatography</i>	gaasikromatograafia
GLC	<i>Gas-Liquid Chromatography</i>	gaasi-vedelik kromatograafia
HD	<i>Hydrodistillation</i>	hüdrodestillatsioon
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	kõrgsurvevedelikkromatograafia
IS	<i>Internal Standard</i>	sisestandard
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	massispektromeetria
m/z	<i>Mass to charge ratio</i>	massi ja laengu suhe
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>	suhteline tsentrifugaaljõud
rpm	<i>Revolutions per minute</i>	pööret minutis
RP	<i>Reversed Phase</i>	pööratud faas
sh	<i>Standard Deviation (SD)</i>	standardhälve
ssh	<i>Relative Standard Deviation (RSD)</i>	suhteline standardhälve
UAE	<i>Ultrasound Assisted Extraction</i>	ultraheli ekstraktsioon
UH	Ultrasound	ultraheli
UV	<i>Ultraviolet</i>	ultraviolet

Sissejuhatus

Kliimamuutused ja keskkonnaseisundi halvenemine ohustavad aina rohkem maailma kestma jäämist. Tulenevalt sellest on Euroopa Liit võtnud eesmärgiks saavutada 2050. aastaks kliimaneutraalsus. Ka käesoleval magistritööl on kliima eesmärkide saavutamises oma osa, andes panuse Keskkonnainvesteeringute keskuse projekti KIK21023, mille sisuks on „Mandariinimahla pressijääkide väärimise tehnoloogiate väljaarendamine eesmärgiga leevendada Gruusia puuviljamahla tööstuste keskkonna jalajälge, kasutades ringmajanduse põhimõtteid“.

Tulenevalt oma ainulaadsetest sensorsetest omadustest ja mitmekesisest toitainete sisaldusest, on tsitrusviljadest saanud ühed maailma enim kultiveeritud, tarbitud ja töödeldud puuviljakultuure. Tsitruselisi kasvatatakse enam kui 140 riigis üle maailma ja 2021. aastal toodeti neid kokku ligi 148 miljonit tonni. Suurem osa tsitruselistest tarbitakse värskelt, ent 25-33% toodangust läheb ka töötlemisse, valmistades põhiliselt mahla. Töödeldud viljadest omakorda 55-60% moodustab tsitrusviljade jääde, mis teeb terveniisti 20-29 miljonit tonni tsitrusjäätmegi aastas. Tekkinud jääde ladustatakse peamiselt prügilatesse, põldudele ja jõgedesse, aga ka põletatakse ning kasutatakse loomasöödana. Paraku need jäätmegi vähendamise strateegiad ei ole enam piisavad, põhjustades keskkonna- ja veereostust, samuti kasvuhooonegaaside emissiooni.

Vaatamata sellele, et tsitrusviljade töötlemisel saadud kõrvalsaadust nimetatakse sageli jäätmegi, sisaldab see rikkalikult väärtuslikke komponente nagu C-vitamiini, suhkruid, kiudaineid, flavonoide ja eeterlikku õli. Tänu kõrvalsaaduse koostisele, on selle väärimisega võimalik luua märkimisväärt majanduslikku kasu, vähendades seejuures ka keskkonna jalajälge.

Kuigi magistritöös keskendutakse mandariinimahla pressijääkide väärimisele, on töös palju juttu ka tsitruselistest üldiselt. Kuna aga erinevate tsitruseliste koostis on laias laastus suhteliselt sarnane, on enamik väärimise meetodeid üsna lihtsasti ülekantavad ühelt sordilt teisele.

Käesolev magistritöö koosneb neljast peatükist, mis on esitatud 48 leheküljel, ja lisadest. Esimeses peatükis on toodud kirjandusele tuginev ülevaade teema aktuaalsusest ja olulisusest. Lisaks antakse ülevaade mandariini töötlemise kõrvalsaadustes leiduvatest komponentidest, kirjeldades lähemalt limoneeni ja hesperidiini ning nende saamise meetodeid. Samuti tuuakse mandariinijäägi kaskaadse väärimise näiteid kirjandusest ja kirjeldatakse töös kasutatud analüüsimeetodeid. Teises peatükis tuuakse esile töö eesmärgid. Kolmandas peatükis antakse ülevaade eksperimentaalse osa jaoks vajalikest vahenditest, meetodikatest ja katsete läbiviimise tingimustest. Neljandas peatükis on toodud läbiviidud eksperimentide tulemused ja arutelu.

Magistritöö tulemusena töötati välja kahest etapist koosnev optimeeritud kaskaadne mandariinimahla pressijäägi väärimise tehnoloogia. Esimese etapina eraldati hüdroadestillatsioonil mandariini eeterlik õli, keskmise saagisega $0,7 \pm 0,1\%$ ja limoneeni sisaldusega $77 \pm 1\%$. Teise etapina eraldati eelnevalt osaliselt ammendunud biomassist ultraheli ekstraktsioonil hesperidiini, keskmise saagisega $6,10 \pm 0,01\%$ ja hesperidiini osakaaluga $92,2 \pm 0,1\%$.

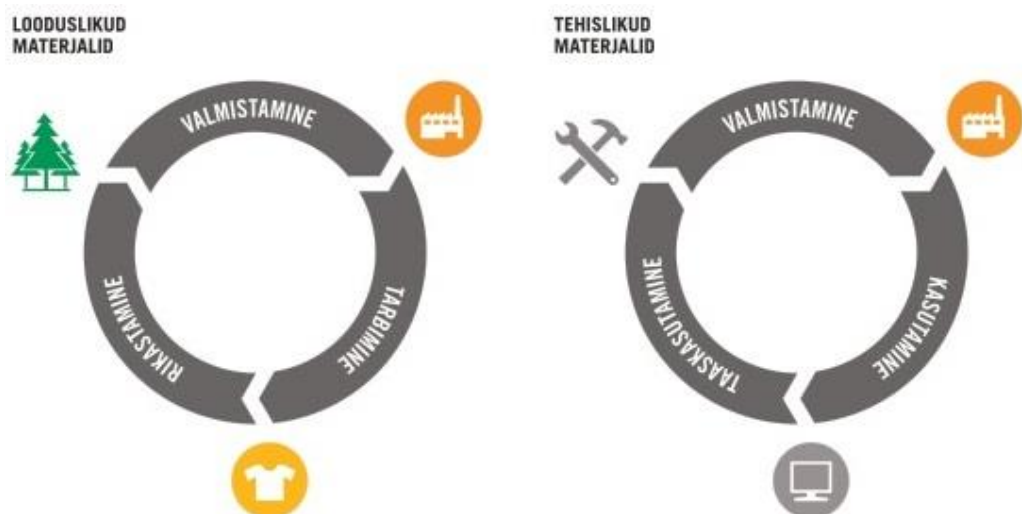
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Rohepööre ja ringmajandus

Kliimamuutused ja keskkonnaseisundi halvenemine ohustavad üha enam kogu maailma kestma jäämist. Tulenevalt olukorra tõsidusest, koostasid Euroopa Liit ja Euroopa Komisjon 2019. aastal poliitikaalgatuste paketi „Euroopa roheline kokkulepe“, mille lõppeesmärgiks on saavutada 2050. aastaks kliimaneutraalsus. 2021. aasta Euroopa kliimaseaduse määrusega muudeti kliimaneutraalsuse saavutamine Euroopa Liidus ka juriidiliseks kohustuseks. Sellega sai Euroopa Liidus alguse rohepööre. Kokkulepe kujutab endast uut majanduskasvu strateegiat, mis hõlmab nii kliimat, keskkonda, energiat, transporti, tööstust, põllumajandust kui ka kestlikku rahandust, mis on kõik omavahel tihedalt seotud. Ühtlasi omab eesmärgi saavutamisel võtmetähtsust ka ringmajanduse tegevuskava.¹ Seoses sellega töötas Eesti 2022. aasta alguses välja ringmajanduse arengudokumendi „Ringmajanduse valge raamat“, mis koondab ministeeriumite ja huvirühmade arutelude tulemusel kokku lepitud visiooni, ringmajanduse aluspõhimõtted ja arengusuunad.²

Ringmajandus on süsteemne lähenemine majandusarengule, mille eesmärk on tuua kasu nii ettevõtetele, ühiskonnale kui ka keskkonnale. Erinevalt lineaarsest mudelist „tooda-tarbi-viska minema“, on ringmajandus oma ülesehituselt taastav ja selle eesmärk on järk-järgult lahutada majanduskasv piiratud ressursside tarbimisest. See tugineb kolmele põhimõttele: jäätmete ja reostuse kõrvaldamine; toodete ja materjalide ringlemine ning looduse taastamine.³

Ringmajanduse mudeli (joonis 1) puhul eraldatakse üksteisest looduslikud ja tehnilised materjalid, loomaks head eeldused nende taaskasutamiseks. Kui materjalid segatakse tootmise käigus omavahel kokku, on neid hiljem praktiliselt võimatu uuesti eraldada ja seetõttu läheb enamus jäätmetest prügilatesse või põletamisele.⁴



Joonis 1. Looduslike ja tehnilike materjalide ringmajanduse mudel.⁴

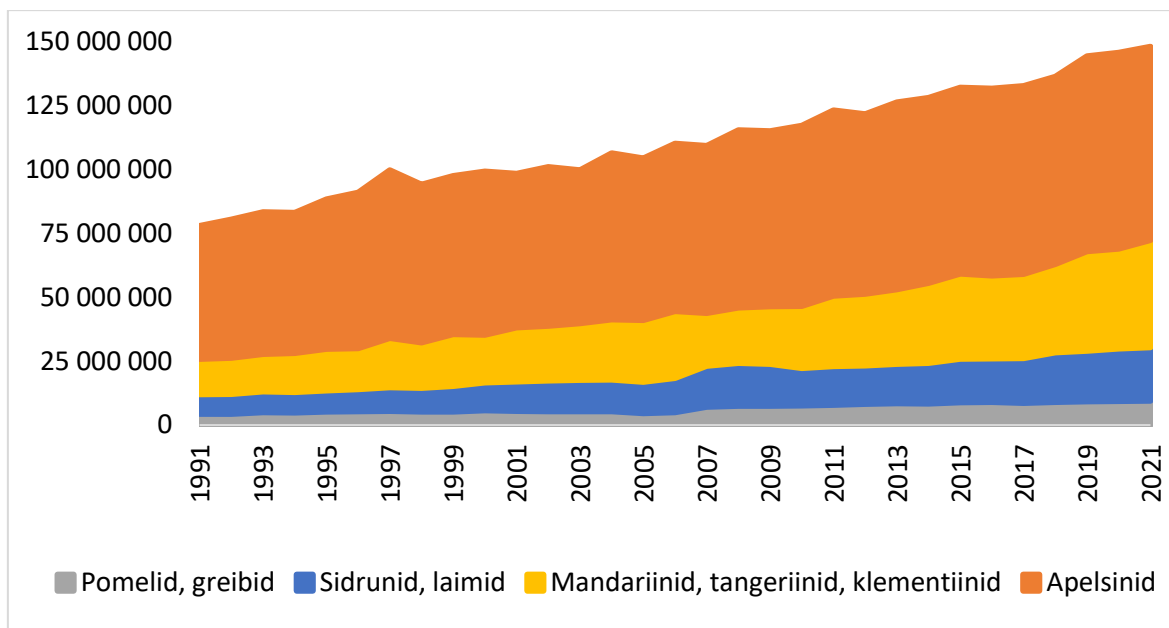
Biojätmete nt tsitrusemahla pressijääkide korral aitab ringmajanduse põhimõtete järgimisele enim kaasa kaskaadne lähenemine. See hõlmab bioloogilises tsüklis kasutatud materjalide ja komponentide erinevaid kasutusviise ning aja jooksul salvestatud energia ja materjalide ekstraheerimist. Piki kaskaadi materjal väheneb, kuni lõpuks tuleb see toitaineena looduskeskkonda tagasi viia.³

Näitlikustamaks teema olulisust ja aktuaalsust, võib tuua Keskkonnainvesteeringute keskuse finantseeritava projekti (KIK21023) „Mandariinimahla pressijääkide väärandamise tehnoloogiate väljaarendamine eesmärgiga leevendada Gruusia puuviljamahla tööstuste keskkonna jalajälge, kasutades ringmajanduse põhimõtteid“. Projekti eesmärgiks on aidata arenguriikidel täita kliimaeesmärke. Massiline mandariinimahla pressijääkide ladustamine aunadena põhjustab suuri keskkonnaprobleeme tulenevalt keskkonda imbutavatest happelistest laguproduktidest ja eeterlikest õlidest. Samas on pressijäägi näol tegemist rikkaliku väärtuslike kemikaalide allikaga.⁵ Seda enam on projekt väga tänuväärne, võimaldades vähendada keskkonna jalajälge, aga ühtlasi luua arenguriikidel ka majanduslikku kasu.

1.2. Tsitruseliste kasvatamine ja töötlemine maailmas

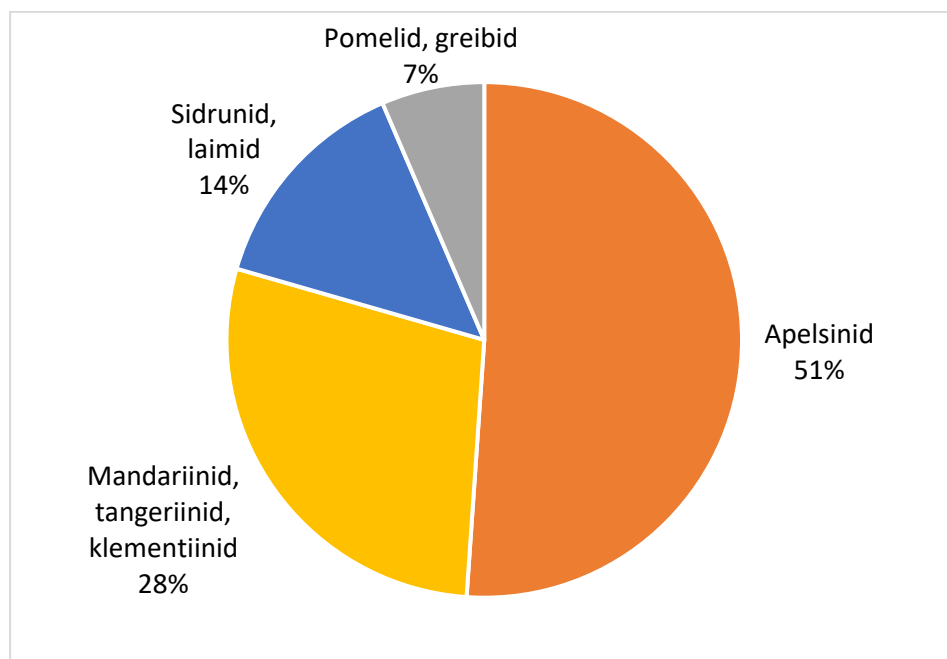
Tulenevalt oma ainulaadsetest sensorsetest omadustest ja mitmekesisest toitainete sisaldusest on tsitrusviljadest saanud ühed enim kultiveeritud, tarbitud ja töödeldud puuviljakultuure maailmas. Tsitruselised kasvavad peamiselt troopilises ja lähistroopilises kliimavöötmes ning kuuluvad ruudiliste (*Rutaceae*) sugukonda ja tsitrusse (*Citrus*) perekonda. Arvatakse, et tsitruselised pärinevat Himaalaja jalamilt: Põhja-Indiast, Põhja-Myanmarist, Kagu-Aasiast ja Lõuna-Hiinas. Tsitruseliste perekond koosneb ligikaudu 1300 põlissordist ja mõnedest populaarsematest ristamise teel saadud hübriididest. Tuntuimad tsitruselised on apelsinid, mandariinid, sidrunid, laimid, greibid ja pomelid.⁶

Tsitruseliste tootmine ja eksport on viimase kolmekümne aasta jooksul pidevalt kasvanud.^{6,7} Joonisel 2 on toodud tsitruseliste tootmise muutus summaarselt ja liigiti viimase 30 aasta jooksul, aastatel 1991-2021.⁸ Ühinenud Rahvaste Organisatsiooni Toidu- ja Põllumajandusorganisatsiooni (FAO) hinnangul kultiveeritakse tsitruselisi enam kui 140 riigis üle maailma.⁷ FAOSTAT andmetel toodeti 2021. aastal maailmas kokku ligi 148 miljonit tonni tsitrusvilju. Suurimad tsitruseliste tootjad on Hiina, kus kasvatatakse peamiselt mandariine, tangeriine ja klementiine (Eestis kõnekeeles mandariine), ning Brasiilia ja India, kus kasvatatakse peamiselt apelsine. Suurimad sidrunite ja laimide kasvatajad on India ja Mehhiko. Pomeleid ja greipe kasvatatakse enim Hiinas ning Vietnamis.⁸



Joonis 2. Tsitruseliste tootmine maailmas viimase 30 aasta jooksul, aastatel 1991-2021, summaarselt ja liigiti.

Joonisel 3 on näha kõige sagedamini kasvatatavate tsitrusviljade jaotust liigiti 2021. aastal. Kogu maailma tsitruseliste toodangust moodustavad apelsinid umbes poole, millele järgnevad mandariinid 28%, seejärel sidrunid ja laimid 14% ning pomelid ja greibid 7% maailma toodangust.⁸ Peamiselt müüakse ja tarbitakse tsitruselisi värskena ning ligikaudu 25-33% toodangust töödeldakse, mis moodustab 2021. aasta toodangust 37-49 miljonit tonni. Peamiselt toodetakse mahla ja kontsentraati, aga ka moosi, marmelaadi ja kuivatatud tooteid.^{6,7} Lisaks kasvatatakse tsitruselisi eeterliku õli ja sidrunhappe tootmiseks.⁷



Joonis 3. Kõige sagedamini kasvatatavate tsitrusviljade jaotus liigiti 2021. aastal.

1.2.1. Mandariinide kasvatamine

Apelsinid on hetkel enim kultiveeritavad tsitruselised maailmas, millele järgnevad mandariinid. Samas on mandariinid aasta-aastalt üha enam populaarsust kogumas. Kui vaadelda apelsinide ja mandariinide tootmiskoguste muutusi maailmas viimase 30 aasta jooksul, siis apelsinide tootmine on püsinud aeglases kasvutrendis, kasvades vaid 45% võrra, mis teeb 1,5% aastas. Samas kui mandariinide tootmine on selle aja jooksul enam kui kolmekordistunud, kasvades enam kui 200% võrra, mis teeb 6,8% aastas.⁸

FAO hinnangul toodeti 2021. aastal maailmas ligikaudu 42 miljonit tonni mandariine. Suurim mandariinide tootja on Hiina, hõlmates kogu turust 60%, järgnevad Hispaania (4,8%), Türgi (4,3%), Maroko (3%) ja Brasiilia (2,6%). Gruusias toodeti 2021. aastal 57200 tonni mandariine, moodustades kogu turust 0,14%.⁸ Joonisel 4 on kujutatud Gruusias olevat Satsuma mandariinide istandust.



Joonis 4. Satsuma mandariinide istandus Gruusias.⁹

1.3. Tsitrusviljade töötlemise jääde ja mõju keskkonnale

Tsitrusviljade töötlemise tööstuse kõige olulisem murekoht on tsitruseliste tahke orgaanilise jäätmekäitlemine.¹⁰ Tekkivat jääki peetakse tsitrusviljade kõrvalsaaduseks, mis moodustab kogu puuvilja massist ligikaudu 55-60%, saades 2021. aastal tervenisti 20-29 miljonit tonni tsitrusjätmeid. Tekkiv jääde koosneb koortest, viljalihast, kestadest ja seemnetest.⁶ Kuigi jääde varieerub oma koostise ja pH poolest, sõltuvalt tsitruselise sordist, korjamise ajast, kliimast, asukohast ja käitlemise protsessidest, on selle koostis laias laastus siiski suhteliselt sarnane.^{10,11}

Traditsiooniliselt on tekkinud jääde ladustatud peamiselt prügilatesse või põldudele, kasutatud loomasöödana või põletatud.^{6,10} Jäädet visatakse ka jõgedesse.¹² Paraku sellised tsitrusjätmete

vähendamise strateegiad on tänapäeval muutunud ebapiisavaks, olles keskkonnamõjude ja energiatõhususe seisukohalt problemaatilised.¹⁰

Peamiseks keskkonnaprobleemiks on tsitrusjätmete kõrgest süsivesikute ja niiskuse (80%) sisaldusest tulenev kiire riknemine.^{6,10} See aga meelitab ligi nii kärbseid kui ka hallitusseeni.⁶ Samuti tulenevalt tsitrusvilja jätmete iseäralikest omadustest, on selle otsest ladustamist keskkonda hakatud pidama ohuks, avaldades negatiivset mõju nii keskkonnale, inimeste tervisele kui ka majandusele.⁶ Näiteks eeterliku õli peamine komponent, limoneen, omab mitmete mikroorganismide kasvule inhibeerivat efekti.¹⁰

Jätmete viskamine prügilatesse või jõgedesse põhjustab keskkonna- ja veereostust, millega kaasneb lahustunud hapniku taseme vähenemine. Tsitrusjääde on kergesti kääritatav, ent tulenevalt selle rikkalikkusest, keemilisest keerukusest ja biolagunevusest nõuab see rohkelt hapnikku. Tsitrusjätmete põletamisel eraldub keskkonda suures koguses lämmastik-, süsinik- ja vääveloksiide.¹²

Tsitruste töötlemise kõrvalsaadust nimetatakse sageli jäätmeks.¹¹ Tegelikult sisaldab see aga hulgaliselt väärtuslikke komponente nagu C-vitamiini, suhkruid (glükoos, fruktoos, sahharoos) kiudaineid (tselluloos, hemitselluloos, ligniin, pektiin), valkusiid, polüfenoole ja eeterlikku õli. Seega on tsitrusvilju töötlevatel tööstustel potentsiaalselt võimalik selliste jätmete utiliseerimisega luua veel lisandväärtusega tooteid.¹¹

Tsitrusjätmete biorafineerimistehaste arendamine tööstusriikides võib anda märkimisväärset majanduslikku kasu läbi prügila kulude ja maa kokkuhoiu ning uute ettevõtete ja sellest tulenevalt töökohtade loomise. Samuti kujutab see endast keskkonnahoidu, tänu kasvuhoonegaaside heitkoguste vähenemisele ning loodusvarade nagu maa, pinnase ja põhjavee säästmisele.¹²

1.4. Mandariinide töötlemise kõrvalsaadustes sisalduvad komponendid

Mandariinide mahla eraldamisel tekkiv kõrvalsaadus moodustab ligikaudu 27% kuni 44% värske vilja massist, olles oma üldiselt koostiselt sarnane teiste tsitruseliste jäägiga.^{13,14} Tulenevalt mandariinisortide rohkusest esineb erinevusi ka nende kõrvalsaaduse koostises. Tabelis 1 on toodud Satsuma mandariinide (*Citrus unshiu*) koorte ligikaudne keemiline koostis kuivmassist, sisaldades 10% suhkruid, 1,6% rasvu, 7,5% valke, 5% flavonoide, 16% pektiini, 8,6% ligniini, 22,6% tselluloosi ja 6% hemitselluloosi.¹⁵ Lisaks sisaldub mandariinikoortes ka karotenoide, vitamiine, mineraale ja orgaanilisi happeid.¹²

Mandariinikoortes on rohkelt suhkruid.¹³ Peamiselt on esindatud glükoos, fruktoos ja sahharoos ning vähemal määral ka galaktoos, arabinoos, ksüloos ja ramnoos.^{13,16} Lisaks on tselluloosi ja hemitselluloosi, mida saab kasutada ka täiendava suhkru tekitamiseks ensümaatilisel hüdrolyüsil.¹³ Kogu suhkrute sisaldus võib moodustada 49%¹⁶ kuni koguni 70%¹³ mandariinikoorte kuivmassist.

Lisaks on mandariinikoored rikkalikud flavonoidide allikad, eriti glükoflavonoidide, millest domineerib hesperidiin, moodustades kuivmassist 6,5%¹³ kuni 7,2%¹⁷. Sisalduselt järgmine glükoflavonoid on narirutiin, mille osakaal kuivmassist on 1,2%.¹⁷

Samuti sisaldavad mandariinikoored eeterlikku õli, mille lõhn sõltub lenduvate ühendite koostisest ja sisaldusest. Eeterlike õlide koostis varieerub sõltuvalt ekstraheerimismeetodist, isegi kui

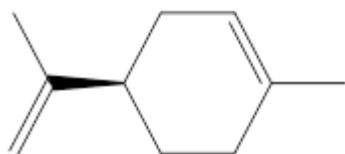
kasutatakse samu tsitrussekoori. Sellegipoolest on peamiseks eeterliku õli komponentideks limoneen, mille sisaldus on ligikaudu 84%, ja γ -terpineen sisaldusega 8%. Levinumad komponendid on veel β -mürtsseen, linalool, otsimeen, oktanaal ja sabineen.¹⁸ Dietüüleetri ekstraktsioonil saadi Satsuma mandariini koortest ligikaudu 1,3% eeterlikku õli.¹³ Superkriitilise CO₂ ekstraktsiooniga saadi hariliku mandariini (*Citrus reticulata*) koortest eeterliku õli saagiseks 1,6%.¹⁴

Tabel 1. Satsuma mandariinide koorte ligikaudne keemiline koostis.

Komponent	Sisaldus, %
Tselluloos	22,6
Hemitselluloos	6
Pektiin	16
Ligniin	8,6
Suhkrud (glükoos, fruktoos, sahharoos)	10
Valgud	7,5
Rasvad	1,6
Flavonoidid (hesperidiin, narirutiin)	5
Eeterlik õli (limoneen, γ -terpineen)	1,6
Karotenoidid	
Vitamiinid	
Mineraalid	
Orgaanilised happed	

1.4.1. Limoneen

Limoneen, molekulvalemiga C₁₀H₁₆ ja keemilise nimega (R)-4-isopropenüül-1-metüül-tsükloheksen, on tsükliiline monoterpeen.¹⁹ Selle peamine aktiivne vorm on D-limoneen,²⁰ mille struktuur on toodud joonisel 5. D-limoneeni leidub rohkelt tsitruseliste koortest ekstraheeritud eeterlikus õlis, olles selge värvitu meeldiva tsitruselise lõhnaga vedelik.¹⁹



Joonis 5. D-limoneeni molekulstruktuur.

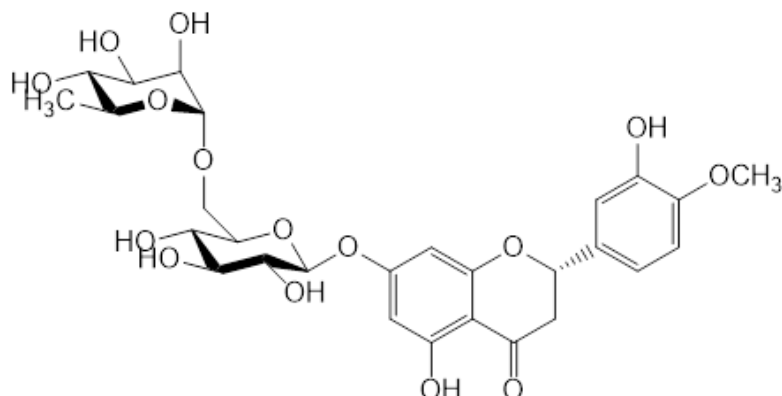
Tänu oma kvaliteetsele lõhnaomadusele on D-limoneeni kasutamine maitse- ja lõhnaandina pidevalt suurenenud, leides laialdaselt rakendust parfüümides, eeterlikes õlides, kosmeetika toodetes, seepides, toitutes ja jookides.²⁰ Lisaks kasutatakse D-limoneeni toidulisandi, lahusti ja mürgava agendina, samuti putukamürgi ning putuka- ja loomatõrjevahendite valmistamiseks.¹⁹

Tulenevalt D-limoneeni kolesterooli lahustavatest omadustest, on seda inimestel efektiivselt kasutatud kolesterooli sisaldavate sapikivide lahustamiseks. Ent kõrvaltoimena esines valu ja hellust, mis kiirgusid ülakõhust rindkere eesmisesse osasse, iiveldust, oksendamist ja kõhulahtisust. Maohapet neutraliseeriva toime ja normaalse peristaltika toetamise tõttu on seda kasutatud ka

kõrvetiste ja gastroösofagealse refluksi (maosisaldise tagasiheide söögitorru) leevendamiseks. Samuti on täheldatud vähki ennetavat toimet mõningate vähitüüpide vastu. I faasi kliiniline uuring näitas osalist ravivastust rinnavähiga patsiendil ja üle kuu kuu stabiilse haigusega kolmel kolorektaalse (käärsoole, pärasoole) vähiga patsiendil.¹⁹

1.4.2. Hesperidiin

Hesperidiin ehk hesperitin-7-rhamnoglükosiid, molekulvalemiga $C_{28}H_{34}O_{15}$, on glükoflavonoid, mis koosneb hesperetiinist ja disahhariidist, rutinoos.²¹ Hesperidiini struktuur on kujutatud joonisel 6. See on lõhnatu ja maitsetu peenkristalliline tahke aine.²²



Joonis 6. Hesperidiini molekulstruktuur.

Hesperidiini leidub laialdaselt liblikõielistes, kases, huullilledes ja tsitruselistes. Tal on vererõhku reguleeriv, allergia-, põletiku-, B-hepatiidi- ja kasvajavastane, luu mineraalset tihedust ja kolesterooli vähendav, ensüümide aktiivsust ja mikrotsirkulatsiooni parandav toime. Abiainena kasutatakse hesperidiini laialdaselt südame-veresoonkonna süsteemi raviks.²²

Hesperidiini kasutatakse põhiliselt näopuhastuslappides, näomaskides, käte- ja kehakreemides, juuksehooldustoodetes, palsamites, lauvärvides ja päikesekreemides. Kosmeetikas kasutamise eesmärgiks on peamiselt nahka puhastav ja pehmendav toime, parandamaks naha omadusi.²¹

National Library of Medicine andmebaasi järgi on viidud läbi 29 hesperidiiniga seotud kliinilist uuringut.²³

Ravimiregistri andmetel on Eestis müügil üks ravim, Hesio, mille toimeainena on pakendi infolehele märgitud mikroniseeritud flavonoidid. Ravim sisaldab 450 mg diosmiini ja 50 mg teisi flavonoide, väljendatuna hesperidiinina. Hesio on vasoprotektor, mis suurendab veenide toonust ja väikeste veresoonte vastupanuvõimet. Ravim on näidustatud jalgade kroonilise venoosse puudulikkuse raviks jalgade raskustunde, turse, valu ja öiste lihaskrampide esinemisel. Samuti hemorroididega seotud vaevuste ägenemise sümptomaatiliseks raviks.²⁴

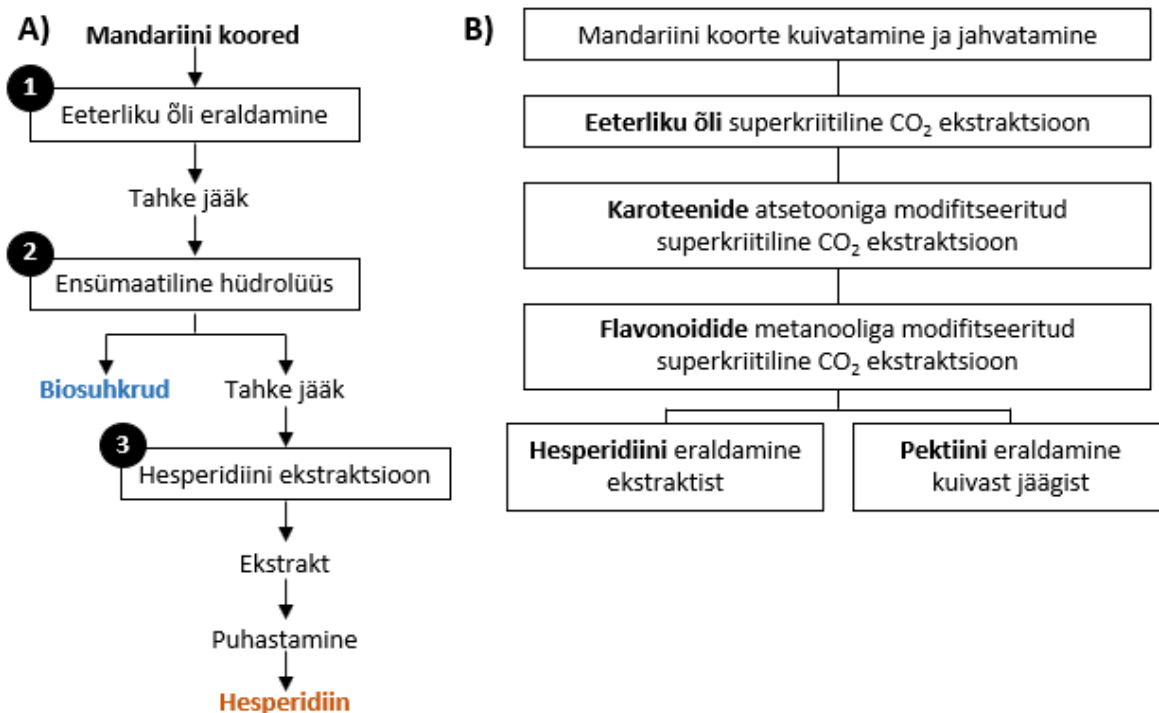
1.5. Mandariinide kõrvalsaaduse kaskaadne väärindamine

Selleks, et mandariinide töötlemise tööstuses tekkivast kõrvalsaadustest saada kätte võimalikult palju väärtuslikke ühendeid, on välja töötatud mitmeid kaskaadseid väärindamise tehnoloogiaid.

Cho koos oma kolleegidega töötas välja kolmest etapist koosneva tehnoloogia, mida on kujutatud ka joonisel 7 A. Biomassina kasutati külmuivatatud ja jahvatatud Satsuma mandariinide koori.

1. Esimese etapina eraldati 5 tunni vältel 45 °C juures dietüleetriga ekstraktsioonil mandariini eeterlik õli kasutades Soxhlet aparatuuri.
2. Teise etapina viidi läbi eelnevalt saadud osaliselt ammendunud tahke jäägi ensümaatiline hüdroolüüs tsellulaasi (3,4 mg/g jääk) ja pektinaasiga (9,2 mg/g jääk) 24-48 tunni vältel 45 °C juures, eesmärgil saada biosuhkruid.
3. Kolmanda etapina eraldati veel enam ammendunud tahkest jäägist hesperidiin. Selleks viidi metanooliga 3 tunni vältel 75 °C juures läbi tagasijooksuga ekstraktsioon.
 - a. Saadud ekstraktist eemaldati rotatsioonaurustiga metanool ja hesperidiin sadestati 5% äädikhappega. Hesperidiini toorsegu puhastati dimetüülsulfoksiidiga (DMSO) ümberkristallimisel, saades selle puhtuseks 91,2%.

Väärindamise tulemusena saadi kuivast mandariinikoore jäägist 1,29% eeterlikku õli, 6,48% hesperidiini ja 34,46% biosuhkruid.¹³



Joonis 7. A) Cho et al. väljatöötatud kolme-etapiline ja B) Tsitsagi et al. väljatöötatud nelja-etapiline kaskaadne tehnoloogia mandariinikoorte väärindamiseks (kohandatud)

Tsitsagi koos kolleegidega töötas välja neljast etapist koosneva tehnoloogia, mida on kujutatud joonisel 7 B. See põhineb peamiselt superkriitilisel CO₂ astmelisel ekstraktsioonil, tõstes superkriitilise fluidumi polaarsust, modifitseerides seda erinevate solventidega. Biomassina kasutati 14 päeva toatemperatuuril kuivatatud ja seejärel jahvatatud Satsuma mandariinide koori.²⁵

1. Esimese etapina viidi läbi 30 min vältel eeterliku õli superkriitiline CO₂ ekstraktsioon rõhul 100 atm, 35 °C juures, 15 min tasakaalustumise ajaga.

2. Teise etapina viidi läbi 1 h vältel β -karoteeni superkriitiline CO₂ ekstraktsioon, kasutades modifitseerimiseks 7% atsetooni rõhul 150 atm, 40 °C juures, 1 h tasakaalustumise ajaga, voolukiirusel 2 ml/min.
3. Kolmanda etapina viidi läbi 30 min vältel hesperidiini superkriitiline CO₂ ekstraktsioon, kasutades modifitseerimiseks 7% metanooli rõhul 250 atm, 60 °C juures, 1 tunni tasakaalustumise ajaga, voolukiirusel 2 ml/min. Ekstrakt koguti jäävette.
 - a. Hesperidiini toorsegu puhastati DMSO-ga ümberkristallimisel.
4. Neljanda etapina viidi läbi 25 min vältel pektiini ultraheli ekstraktsioon sidrunhappega pH 1,5 juures, sagedusel 20 kHz ja temperatuuril 50 °C.

Kaskaadse väärimise tulemusena saadi kuivast mandariinikoore jäägist 0,85% eeterlikku õli, 0,45-3,97 µg/g koorte kohta β -karoteeni ja 1,6-1,8% hesperidiini, pektiini saagise kohta info puudus.²⁵

1.6. Mandariini eeterliku õli saamise meetodid

Eeterlike õlide ekstraheerimiseks kasutatavad traditsioonilised meetodid on Soxhlet ekstraktsioon, hüdrodestillatsioon ja ekstraktsioon leostamisel. Ent kasutatakse ka mitte nii tavapäraseid meetodeid nagu solvendivaba mikrolainete abil ekstraktsioon, ultraheli ekstraktsioon kui ka superkriitilise fluidumiga ekstraktsioon. Tulenevalt uudsete tehnoloogiate keskkonnasõbralikkusest, tänu suuremale ekstraktsiooni saagisele, lühemale ajale ja väiksemale solvendi kulule, on hakatud neid üha enam uurima.¹⁴

Soxhlet ekstraktsioon. Ekstraktori korpuse sisemises torus asub poorsest tselluloosist sõrmkübaras tahke proov. Solvendi aurud tõusevad üles jahutisse, kus see kondenseerub ja langeb ekstraktorisse, täites proovi sisaldava sõrmkübara aeglaselt solvendiga. Kui vedeliku tase tõuseb teatud piirini, siis ekstraktor tühjeneb ja vedelik voolab tagasi destillatsioonikolbi. Iga tsükli jooksul lahustub osa huvipakkuvast komponendist.²⁶

Ekstraktsioon leostamisel ehk matsereerimisel. Tahke proov pannakse anumasse ja segatakse solvendiga, milles huvipakkuv komponent lahustub.²⁷

Solvendivaba mikrolainete abil ekstraktsioon. Taimne materjal asetatakse mikrolainereaktorisse vett või solvendi lisamata. Taimerakkudes leiduvat vett stimuleeritakse mikrolainekiirguse all pöörlema, selle tulemusena toimub järsk rõhu suurenemine taimerakkudes, mistõttu rakusein laguneb ja sihtmolekulid vabanevad. Vabanenud vesi ja lenduvad komponendid aurustuvad ja liiguvad mikrolaineahjust väljas asuvasse jahutisse, kus need kondenseeruvad. Eeterlik õli kogutakse büretti ja vesi voolab tagasi reaktorisse, tagamaks taimse materjali õige niiskustaseme.²⁸

Superkriitilise fluidumiga ekstraktsioon. Meetod, millega eraldataks üks komponent teisest, kasutades ekstraheeriva solvendina superkriitilist fluidumit, millel on nii vedeliku kui ka gaasi omadused. Enim kasutatav superkriitiline vedelik on CO₂, mida võidakse modifitseerida teiste solventide lisamisega. Ekstraktsiooni tingimused on üle kriitilise temperatuuri ja rõhu, CO₂ vastavalt üle 31 °C ja 74 atm. Selle tulemusena huvipakkuv ühend lahustub ja liigub madalamal rõhul olevasse separaatorisse, kus see sadeneb.²⁹

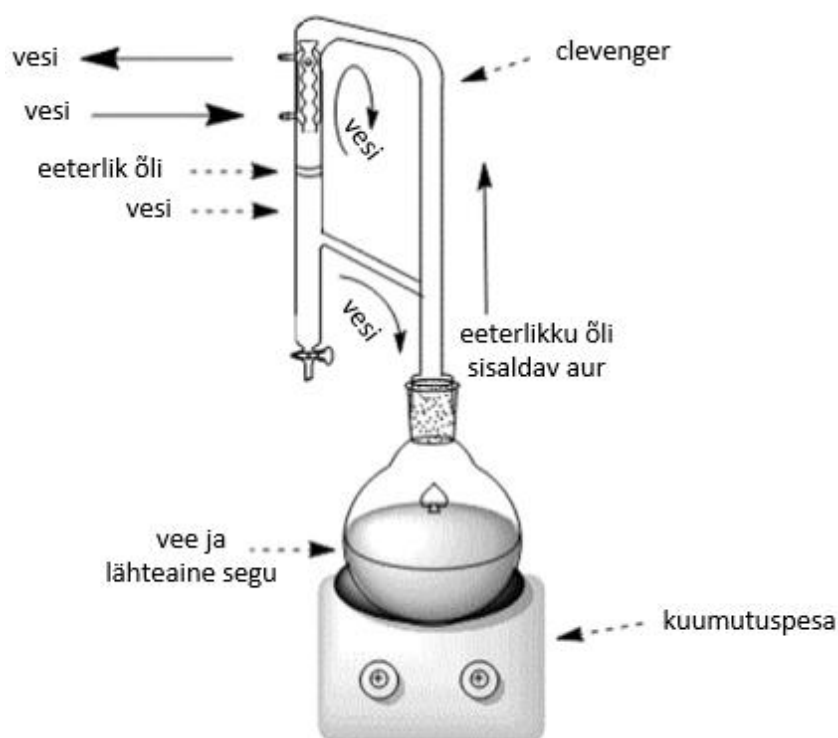
1.6.1. Hüdrodestillatsioon

Veeaurdestillatsiooni korral asetatakse lähteaine perforeeritud sõela abil keedunõus oleva vee kohale. Hüdrodestillatsioon (HD) on veeaurdestillatsiooni lihtsaim versioon, kus nii lähteaine kui ka vesi paiknevad koos keedunõus.³⁰

Veeauru- ja hüdrodestillatsiooni kasutatakse siis, kui ekstraheeritava aine keemistemperatuur on kõrgem kui vee keemistemperatuur ja lähteainet ei saa selle temperatuurini kuumutada lagunemise või muude soovimatute reaktsioonide tõttu. See on hea meetod ka siis, kui soovitud aine kogus on mittelenduvate jääkide omaga võrreldes väike.³⁰

HD on eraldusprotsess, mis seisneb vee destilleerimises koos muude lenduvate komponentidega. Keeva vee aur kannab lenduvate ainete auru jahutisse, kus need kondenseeruvad, ja mittelenduvad jäägid jäävad keeduanumasse. Lenduvad ained, mis ei segune veega, moodustavad pärast kondenseerumist spontaanselt selge faasi, mida saab eraldada dekanteerimise või jaotuslehtriga.³⁰

Laboriskaalas kasutatakse hüdrodestillatsiooni läbiviimiseks sageli Clevenger tüüpi aparatuuri, mida on kujutatud ka joonisel 8.³⁰



Joonis 8. Clevenger tüüpi hüdrodestillatsiooni aparatuur.³¹ (kohandatud)

1.7. Hesperidiini ekstraktsiooni meetodid

Flavonoidide, sealhulgas hesperidiini ekstraheerimiseks on uuritud mitmeid meetodeid, võttes arvesse ka keskkonnasõbralikkust. Ekstrakti kvaliteeti ja protseduuri tõhusust mõjutavad mitmed parameetrid, nagu lahusti tüüp, temperatuur, ekstraktsiooni aeg ning tahke aine ja vedeliku suhe. Tavaliselt kasutatakse solvendina metanooli ja etanooli või nende segu erinevates vahekordades veega, aga ka dimetüülsulfoksiidi.³²

Üha enam asendatakse leostamise ja Soxhlet ekstraheerimise meetodeid täiustatud tehnikatega, mis suurendavad tõhusust ja selektiivsust. Need on üldiselt kiiremad, keskkonnasõbralikumad ja suurema automatiseerimise võimalusega.³² Seda peamiselt tänu väiksemale solventide ja energia kasutamisele, vähendades ühtlasi ka jäätmete tekkimist.¹³

Hesperidiini eraldamiseks taimsest materjalist on kasutatud mitmeid meetodeid nagu mikrolainete abil ekstraktsioon, ultraheli ekstraktsioon, subkriitilise veega ekstraktsioon ja superkriitiline fluidum ekstraktsioon.^{13,32}

Mikrolainete abil ekstraktsioon. Võib toimuda nii atmosfääri rõhul kui ka rõhu all. Tahke proov segatakse mikrolainekiirgust neelava solvendiga. Mikrolainete toimel hakkab solvent keema, aur tõuseb jahutisse, kus see kondenseerub ja voolab tagasi anumasse. Selle tulemusena läheb huvipakkuv ühend üle proovi maatriksist solventi.²⁶

Subkriitilise veega ekstraktsioon. Tuntud ka kui ülekuumendatud veega ekstraktsioon või survestatud kuuma veega ekstraktsioon. Viiakse läbi temperatuuril 100-374 °C ja rõhul, mille juures püsib vesi veel vedelal kujul. Sellistel tingimustel suureneb vee difusioon ja väheneb selle viskoossus, muutudes vähepolaarseks. Selle tulemusena on võimalik proovi maatriksist eraldada vähepolaarseid ühendeid.³³

1.7.1. Ultraheli ekstraktsioon

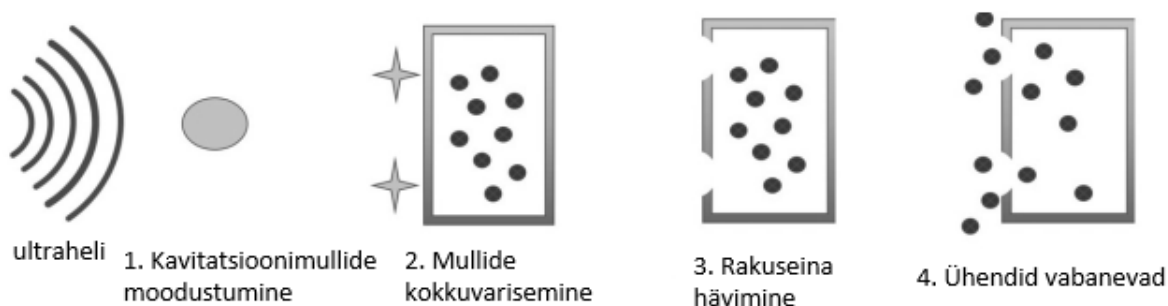
Ultraheliga assisteeritud ekstraktsioon ehk ultraheli ekstraktsioon (UAE) on mittetermiline meetod, mis kasutab taimedest erinevate metaboliitide ekstraktsiooniks ultrahelilainete energiat.³⁴ Laboriskaalas ultrahelilainete tekitamise võimalusi on kujutatud joonisel 9.



Joonis 9. Ultrahelilainete tekitamise võimalused laboriskaalas.^{35,36}

Kõrge energiaga ultrahelilained levivad läbi vedeliku, tekitades vaheldumisi kõrgrõhu ja madalrõhu tsükleid, mille tulemusena tekivad kavitatsioonimullid. Tekkinud mullid kasvavad mitme tsükli jooksul, kuni saavutavad ebastabiilse suuruse ja varisevad kokku. Kavitatsioon põhjustab lokaalselt äärmuslikke temperatuure, rõhkusid, soojenemis- ja jahtumiskiirusi ning suuri nihkejõudusid keskkonnas. Kui kavitatsioonimullid lõhkevad rakkude pinnale, tekivad keskkonnas makroturbulentsid, mikrosegamine ja mikrojoad, mis tekitavad osakestevahelisi kokkupõrkeid.

Selle tulemusena rakuseinad purunevad ja bioaktiivsed ühendid vabanevad lahustisse.^{34,36} Vastavat mehhanismi on kujutatud ka joonisel 10.



Joonis 10. Ultraheli ekstraktsiooni mehhanism.³⁴ (kohandatud)

1.8. Analüüsimeetodid

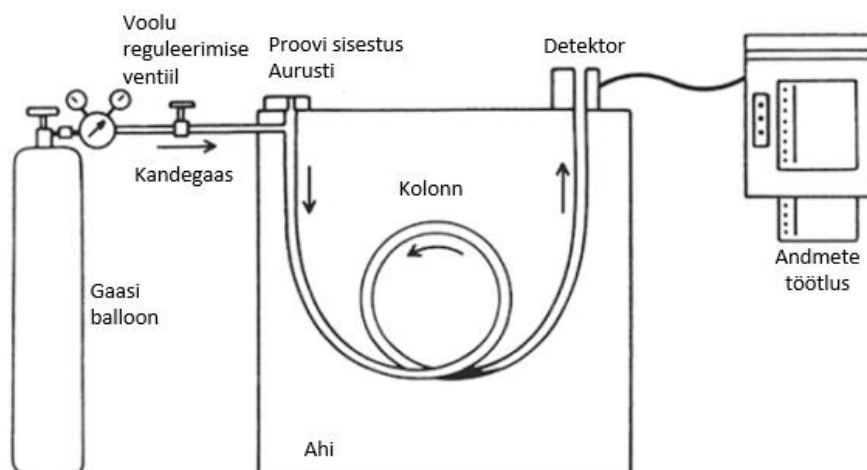
1.8.1. Gaasikromatograafia massispektromeetrilise detekteerimisega

Antud töös kasutati mandariini eeterliku õli komponentide määramiseks gaasikromatograafiat massispektromeetrilise detektoriga, mis on varustatud elektroonse ionisatsiooni allikaga ja kvadrupol massianalüsaatoriga.

Gaasikromatograafia (GC) on peamine meetod lenduvate ühendite lahutamiseks ja analüüsimiseks. Seda on kasutatud nii gaaside, vedelike kui ka tahkete termiliselt stabiilsete ainete analüüsimiseks, seejuures viimased on tavaliselt lahustatud lenduvates lahustites. Analüüsida saab orgaanilisi ühendeid molekulmassidega 2-1000 Da.³⁷

GC jaguneb kaheks alamklassiks vastavalt kapillaarkolonnis kasutatava statsionaarse faasi olekule: gaasi-adsorptsioon-kromatograafia ja gaasi-vedelik-kromatograafia (GLC). Enam levinud on GLC, kus kapillaari siseküljele on kantud viskoosne vedelik.³⁷

GC aparatuuri põhikomponendid on kandegaasiga varustaja, gaasivoolu kontroller, proovi sisestus, ahi, milles paikneb kapillaarkolonn, detektor ja andmete töötluste süsteem.³⁷ Aparatuuri üldine skeem on kujutatud joonisel 11.

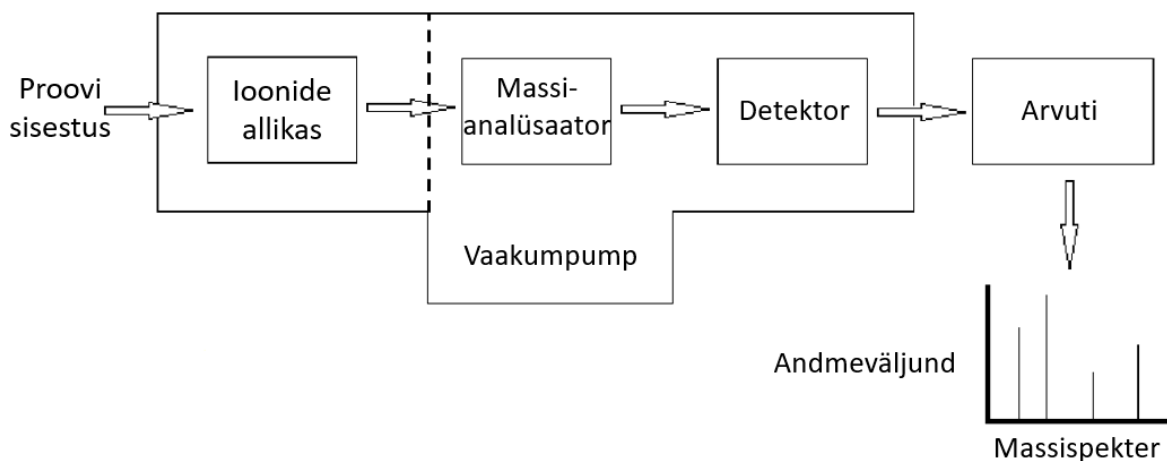


Jooni 11. Gaasikromatograafia aparatuuri üldine skeem.³⁷ (kohandatud)

Inertne kandegaas (nt heelium) voolab gaasiballoonist hoolikalt kontrollitud voolukiirusel pidevalt läbi sisselaskeava, kolonni ja detektori. Proov süstitakse sisselaskeavasse, kus see aurustatakse ja viiakse kapillaarkoloni, mis on seest kaetud õhukese kõrge keemistemperatuuriga viskoosse vedeliku kihiga – statsionaarse faasiga. Proov jaotub liikuva ja statsionaarse faasi vahel vastavalt analüütide jaotuskoefitsientidele, mis lähtub nende lahustuvusest vedelfaasis ja aururõhust. Seejärel läbivad kandegaas ja analüüdi tsoonid detektori, kus mõõdetakse teatud füüsikalise-keemilist parameetrit ja saadakse elektriline signaal. Saadud signaal läheb andmete töötlemise süsteemi, kus genereeritakse kromatogramm.³⁷

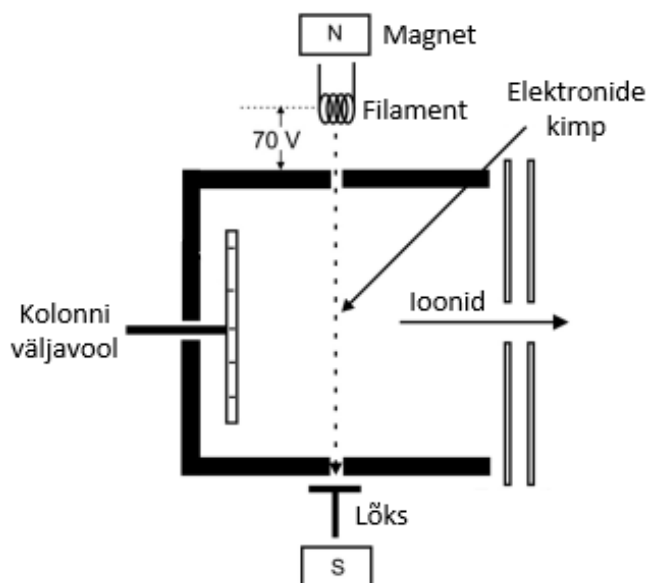
GC kombineerimisel massispektrometrilise (MS) detektoriga saadakse üks võimekamaid analüütilisi meetodeid,³⁸ millest on saanud paljude analüütiliste laborite hädavajalik osa.³⁹ MS on analüütiline meetod, mis lahutab ioniseeritud osakesi nagu aatomeid ja molekule vastavalt nende massi ja laengu (m/z) suhtele.⁴⁰

MS instrumendid koosnevad järgnevatest moodulitest: proovi sisestus; vaakumpump; ionide allikas, mis lõhestab proovimolekulid ionideks; massianalüsaator, mis sorteerib osakesi nende m/z suhte järgi; detektor, mis registreerib saabuvald laetud osakesi ja annab andmed olemasolevate ionide koguse arvutamiseks; arvuti, mis reguleerib massianalüsaatorit ja haldab detektorist saadud andmeid. Tulemusena saadakse massispekter.⁴¹ MS blokk skeemi on kujutatud joonisel 12.



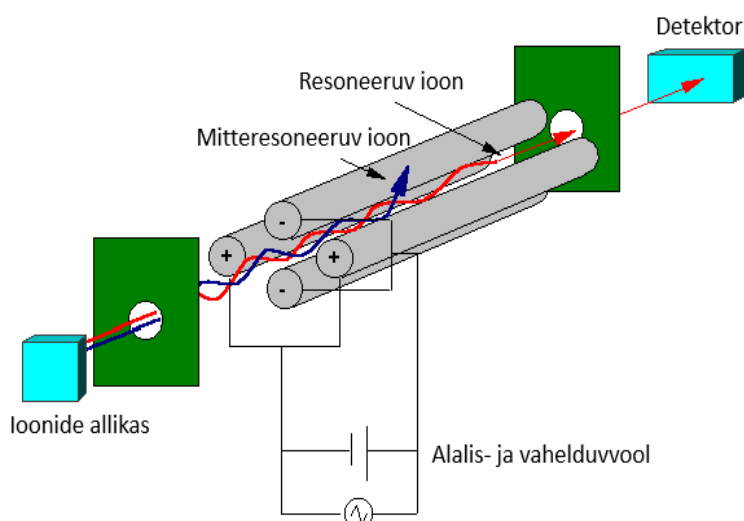
Joonis 12. Massispektrometria blokk skeem.⁴² (kohandatud)

Elektroonne ionisatsioon (joonis 13) on ionide genereerimise meetod, kus proovimolekule pommitatakse elektronidega, mis edastavad energiat, põhjustades molekulide ioniseerumise. See asub massispektrometri vaakumsüsteemis ja kujutab endast väikesest (10 mm läbimõõduga) kuumutatud kambrit, kuhu liigub kolonni väljavool. Kuumutatud filamendi genereeritud elektronide kimp liigub läbi kambri kolonni väljavooluga risti teisele elektroodile, mida nimetatakse lõksuks. Tavaliselt kasutatakse elektronide ionisatsioonienegiat 70 eV. Kokkupõrke tulemusena proovimolekulid ioniseeruvad. Ioonid väljutatakse ionide allikast ja fokuseeritakse kimbuks, mis siseneb massianalüsaatorisse.⁴³



Joonis 13. Elektroonse ionisatsiooni skeem.⁴³ (kohandatud)

Kvadrupol massianalüsaatorid (joonis 14) on tänapäeval GC-MS seadmetes kõige sagedamini esinevad massianalüsaatorite tüübid, tulenevalt nende kiirest skaneerimisvõimest ja suhtelisest lihtsusest. Lineaarne kvadrupol koosneb neljast paralleelsest vardast, mis asetsevad ionide kimbuga samas suunas. Vastastikku olevad vardad on omavahel ühendatud ja neile rakendatakse nii alalis- kui ka vahelduvvoolu. Ioonid otsileeruvad varraste vahel ja tulenevalt väljade kombinatsioonist, on etteantud m/z suhtega ionide liikumise trajektooriid stabiilsed ja ioonid pääsevad läbi. Ülejäänud ioonid pöörkuvad vastu vardaid ja neutraliseeruvad.⁴³



Joonis 14. Kvadrupol massianalüsaatori skeem.⁴⁴ (kohandatud)

1.8.2. Kõrgsurvevedelikkromatograafia UV kiirguse neelduvuse detekteerimisega

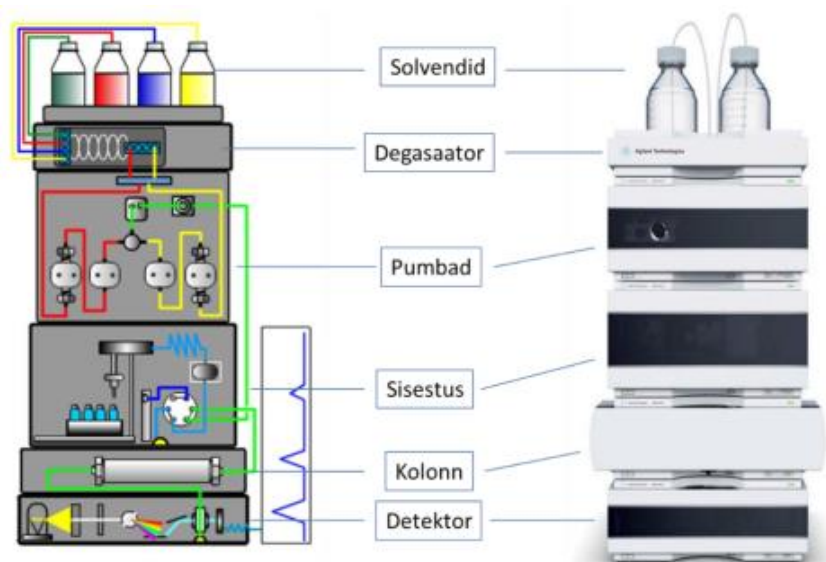
Käesolevas töös kasutati hesperidiini määramiseks pööratud faasi (RP) kõrgsurvevedelikkromatograafiat (HPLC) ultraviolet (UV) kiirguse neeldumise detekteerimisega.

HPLC on kromatograafiline meetod keemiliste segude lahutamiseks ja analüüsimeetod.⁴⁵ See on tänapäeval üks kõige kasulikum ja laialdasemalt kasutatav analüüsimeetod, mis võimaldab määrata

60-80% kõigist olemasolevatest ühenditest. Seejuures RP-HPLC on kõige populaarsem HPLC lahutusmeetod, mida kasutatakse enam kui 70% kõigist HPLC analüüsides. See on sobilik nii polaarsetele (vees lahustuvad), keskmise polaarsusega kui ka mõningatele vähepolaarsetele analüütidele. Samuti saab analüüsida iooneid analüüte, kasutades laengu mahasurumise või ioonpaari tehnikaid.⁴⁶

RP-HPLC kasutatakse mittepolaarset kolonni (nt oktaadetsüülsilaan täidisega, C18) koos polaarsete liikuva faasiga, millena kasutatakse vee ja orgaanilise lahusti segu. Analüütide lahutumine põhineb nende jaotuskoeffitsientidel, vastavalt millele analüütid jaotuvad polaarsete liikuva faasi ja mittepolaarse statsionaarse faasi vahel. Tulenevalt mittepolaarsete analüütide tugevama interaktsioonist statsionaarse faasiga, elueeruvad analüütid kolonnist üldiselt polaarsete vähenemise järjekorras.⁴⁶

HPLC aparatuur koosneb minimaalselt lahustidest, koos fritiga ülekandtorustikust, kõrgrõhkepumbast, proovi sisestuse süsteemist, kolonnist, detektorist ja andmetöötluse süsteemist. Sageli on aparatuur varustatud ka lahusti segamiskambri, degaatori ja termostaadiga.⁴⁵ HPLC aparatuuri ja üldist skeemi on kujutatud joonisel 15.



Joonis 15. HPLC aparatuur ja selle üldine skeem.⁴⁷

Liikuv faas tõmmatakse lahustidest pumba, mis kontrollib voolukiirust ja tekitab piisava rõhu, et juhtida eluent läbi kolonni. Proov sisestatakse kolonni pumba voolu peatamata, mis järel toimub kolonnis analüütide eraldumine. Detektor reageerib kolonnist elueeruva analüüdi füüsikalise-keemilise parameetri muutusele. Andmetöötluse süsteem jälgib detektori signaali muutust ajas ja kuvab tulemused nii graafiliselt kui ka tabelina.⁴⁵

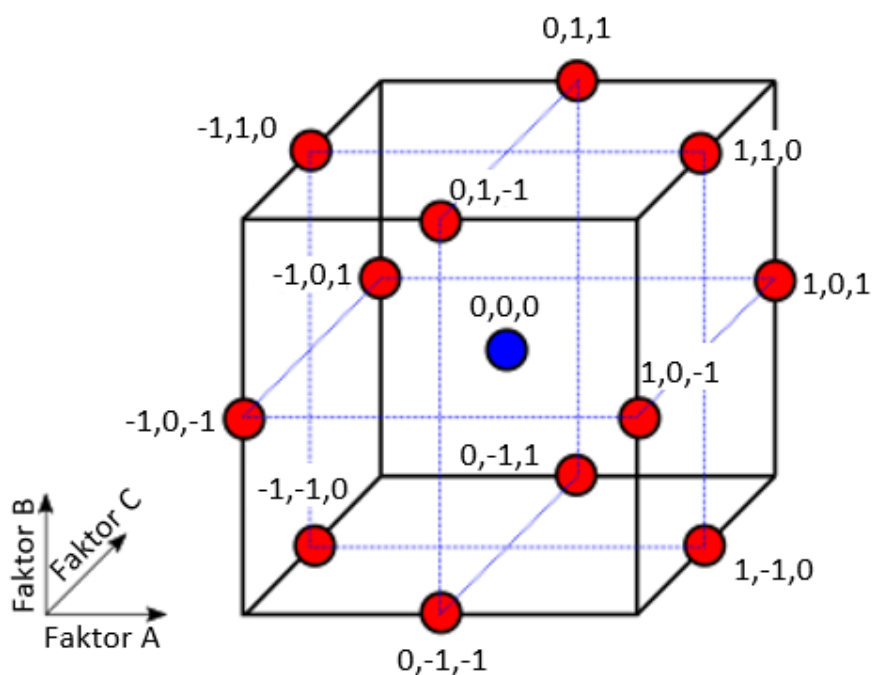
UV detektor on üks sagedamini kasutatav detektor tulenevalt oma suhteliselt heast tundlikkusest, laiast lineaarsest ulatusest, temperatuuri kõikumiste mõju puudumisest ja gradient elueerimise võimalikkusest. Sellega saab detekteerida ühendeid, mis neelavad UV või nähtavat valgust alates lainepikkusest üle 190 nm, mõõtes eluaadi absorptsiooni. UV detektoris võidakse kasutada kas deuteriumlampi, mis kiirgab pidevat UV-spektrit kuni umbes 400 nm, või halogeenlampi, mis

kiirgab vahemikus 320-2500 nm. Molekulid, mille neelduvus on suurem, tekitavad tugevama detektori signaali kui need, mille neelduvus on väiksem.⁴⁸

1.8.3. Statistilise katseplaneerimise olemus

Katseplaneerimine (DOE) on rakendusstatistika haru, mis tegeleb kontrollitud testide planeerimise, läbiviimise, analüüsimise ja tõlgendamisega, et hinnata ühe või mitme parameetri väärtust reguleerivaid faktoreid. See on võimas andmete kogumise ja analüüsimise tööriist, mida saab kasutada erinevates eksperimentaalsetes olukordades. DOE abil saab manipuleerida mitme faktoriga korruga, tänu millele saab tuvastada olulisi interaktsioone, mis võib ühe faktori kaupa katsetamisel märkamata jääda. Kui uuritakse kõiki võimalikke kombinatsioone, on tegemist täis faktoriaaliga, aga kui uuritakse ainult osa võimalikest kombinatsioonidest, on tegemist osalise faktoriaaliga. Strateegiliselt kavandatud ja läbiviidud katse võib anda palju rohkem teavet ühe või mitme faktori mõju kohta vastusele, erinevalt üks faktor korruga lähenemisviisist.⁴⁹

Box-Behnkeni mudel on statistiline katseplaneerimine vastavuspinna meetodika jaoks. See on iseseisev ruutkujundus, kus sõltumatute faktorite väärtused paiknevad kuubi servade keskpunktides ja keskel. Selline mudel sisaldab kolme taset, kus iga faktor on paigutatud ühele kolmest võrdse vahega väärtusest, mis on tavaliselt kodeeritud kui -1, 0 ja +1.⁵⁰ Kolme faktoriga Box-Behnkeni mudel on kujutatud joonisel 16.



Joonis 16. Box-Behnkeni mudel kolme faktoriga.⁵¹ (kohandatud)

2. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli mandariinimahla pressijääkide kaskaadse väärimise tehnoloogia väljaarendamine laboriskaalal väärtuslike kemikaalide, limoneeni ja hesperidiini, tootmiseks.

Eesmärgi täitmisel keskenduti järgnevatele alameesmärkidele:

1. Mandariinimahla pressijäägist mandariini eeterliku õli (peamiselt limoneeni) hüdrodestillatsioonil eraldamise meetodika optimeerimine.
 - 1.1. Saada kätte vähemalt 60% võimalikust eeterlikust õlist.
2. Eelnevalt osaliselt ammendunud biomassist hesperidiini selektiivse ultraheli ekstraktsiooni meetodika väljatöötamine ja optimeerimine.
 - 2.1 Kasutada rohelist orgaanilist solventi, etanooli.
 - 2.2 Saada kõrge puhtusastmega hesperidiin.

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Seadmed ja töövahendid

Mandariini eeterliku õli koostise analüüsi läbiviimiseks kasutati Agilent Technologies'lt (Ameerika Ühendriigid) soetatud gaasikromatograafi Agilent 7890A, varustatuna massispektromeetrilise detektoriga Agilent 5975C, mis koosneb elektroonse ionisatsiooni allikast ja kvadrupol analüsaatorist. Proovi komponentide lahutamiseks kasutati Phenomenex Zebron ZB-5MS kapillaarkoloni (sisediameeter 0,25 mm; pikkus 30 m; statsionaarse kihi paksus 0,25 µm) (Ameerika Ühendriigid).

Glükoflavonoidide määramiseks kasutati HPLC aparatuuri Agilent 1260 Infinity II, mis on soetatud Agilent Technologies'lt (Ameerika Ühendriigid). Proovi komponendid lahutati Agilent Poroshell 120 EC-C18 kolonniga (sisediameeter 4,6 mm; pikkus 150 mm; osakeste läbimõõt 2,7 µm). Analüütide detekteerimiseks kasutati Agilent Technology diodrivi detektorit 1260 DAD WR, mis on varustatud 1024 diodiga.

Hüdrodestillatsiooni läbiviimiseks kasutati kuumutuspesa Nahita blue 655 mahtuvusega 2 L ja võimsusega 450 W (Nahita, Suurbritannia) ja Clevenger tüüpi aparatuuri (Glassco, India).

Ultraheli ekstraksioonide läbiviimiseks kasutati ultrahelivanni USC 1200 THD väljund sagedusega 45 kHz ja võimsusega 180 W (Avantor VWR, Suurbritannia).

Tsentrifuugid:

- J6-HC; kuni 4000 rpm (Beckman Coulter, Ameerika Ühendriigid)
- 5804 R; kuni 4500 rcf (Eppendorf, Saksamaa)
- Microspin 12, kuni 12500 rcf (BioSan, Läti)

Kasutatud jääd saadi jäämasinaga F80C (Icematic, Itaalia).

Biomassi homogeniseerimiseks kasutati blendrit NutriBullet Magic Bullet (De'Longhi Group, Itaalia).

pH mõõtmiseks kasutati kalibreeritud pH-meetrit 744 (Metrohm, Šveits).

Niiskuse sisalduse mõõtmiseks kasutati niiskuse analüsaatorit MB90 (OHAUS, Ameerika Ühendriigid).

Lahuste tegemiseks kasutati kalibreeritud automaatpipette mahtudega 10, 20, 200, 1000, 5000 ja 10000 µl. Lisaks kasutati automaatse proovivõturi viaale, katsuteid mahtudega 0,2; 1,5; 2 ml ning tsentrifuugituube mahtudega 15 ja 50 ml.

Proovide ja lahuste valmistamiseks kasutatud destilleeritud vett (≥ 18 MΩcm) saadi laboriseselt Milli-Q veepuhastussüsteemiga (Millipore, Ameerika Ühendriigid).

3.2. Analüüsi meetodikad

3.2.1. GC-MS meetodika

Mandariini eeterliku õli koostise analüüs viidi läbi kasutades GC-MS aparatuuri laboris varasemalt väljatöötatud meetodikaga. Kandegaasina kasutati heeliumi voolukiirusega 1,3 ml/min. Proov (0,5 µl) sisestati jaotusega režiimil (*split mode*) 1:10 aurusti temperatuuril 250 °C. Kolonni kuumutamiseks kasutati gradient režiimi 35-300 °C kuumutamise kiirusega 30 °C/min. Detektori temperatuur 230 °C. MS detekteerimisel kasutati ioniseerivate elektronide energiat 70 eV ja ionide skaneerimise režiimi m/z vahemikus 30-500.

3.2.2. HPLC-UV meetodika

Glükoflavonoidide analüüs viidi läbi kasutades HPLC-UV aparatuuri. Analüüdid lahutati toatemperatuuril voolukiirusega 0,7 ml/min gradient elueerimisega ACN ja veega. Täpsem elueerimise režiim on toodud Lisas 1. Analüüdid detekteeriti lainepikkusel 283 nm.

3.3. Biomass ja kemikaalid

Töö teostamiseks kasutatud biomass:

- Kuivatatud ja jahvatatud Satsuma mandariinimahla pressijääk (Gruusia)
- Satsuma mandariinid (Rimi, Hispaania)

Töö teostamiseks kasutatud kemikaalid:

- Atsetonitriil HPLC *grade* (ACN, ≥99,8%; Fisher Chemical, Ameerika Ühendriigid)
- Etanool (EtOH, 96,6%; Estonian Spirit, Eesti)
- Heksaan HPLC *grade* (≥97,0%; Honeywell, Ameerika Ühendriigid)

- Bikalutamiid (IS, 99,9%, LGC, Saksamaa)
- Naatriumhüdrosiid (NaOH, ≥98%; Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid)
- Sidrunhape (lanch:ner, Tšehhi)
- Veevaba naatriumkarbonaat (Na₂CO₃, ≥99,5%; Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid)
- Veevaba naatriumsulfaat (Na₂SO₄, ≥99%; Fisher Chemical, Ameerika Ühendriigid)

3.4. Tarkvara

GC-MS aparatuuri seadistamiseks ja proovide jälgimiseks elueerimisprotsessi ajal ning spektrite analüüsimiseks ja piikide integreerimiseks kasutati Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 programmi ja ühendite tuvastamiseks MS andmebaasi NIST 2017.

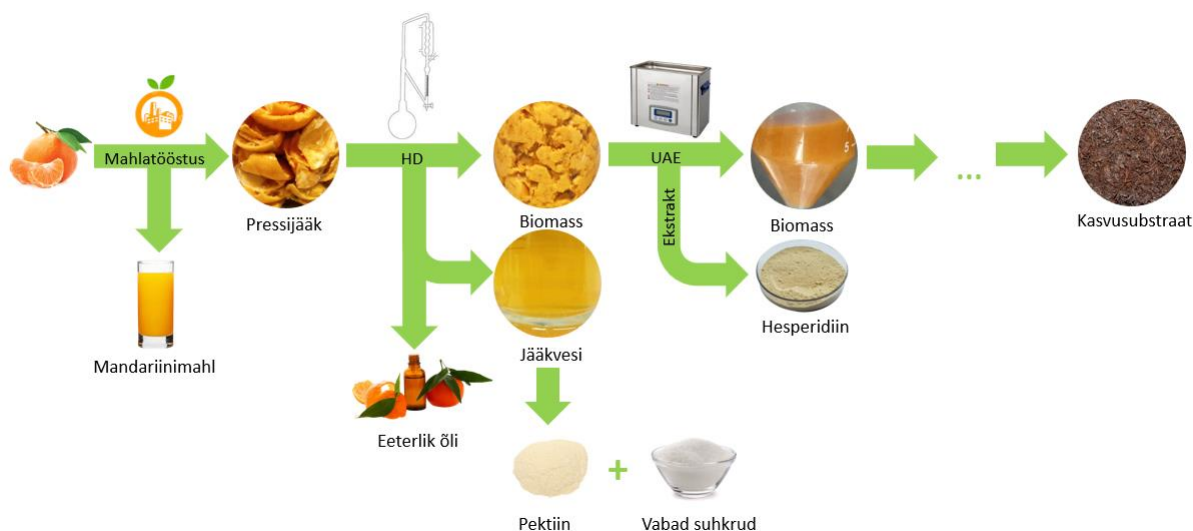
HPLC aparatuuri seadistamiseks ja proovide jälgimiseks elueerimisprotsessi ajal ning kromatogrammide analüüsimiseks ja piikide integreerimiseks kasutati OpenLab CDS ChemStation programmi.

Lisaks kasutati andmete töötlemiseks ja analüüsimiseks programme Microsoft Excel ja JMP (DOE). Molekulstruktuuride joonistamiseks kasutati programmi ChemDraw 20.1.1.

3.5. Katsete läbiviimise tingimused

3.5.1. Kaskaadse väärimise etapid

Biomassi kaskaadne väärimine seisneb sellest mitme järjestikuse etapi vältel väärtuslike ühendite eraldamises. Esimese etapina saadakse mandariinimahla tööstuses primaarse produktina mandariinimahla, millest jääb järele kõrvalsaadus ehk pressijääki. Tekkinud pressijääki suunatakse edasi HD etappi, mille käigus eraldatakse eeterlik õli ja saadakse osaliselt ammendunud mandariini biomass. Eelnevalt saadud biomassi omakorda kasutatakse UAE etapis glükoflavonoidide, peamiselt hesperidiini, eraldamiseks ning alles jääb veel enam ammendunud biomass. Sellest on omakorda võimalik eraldada näiteks tselluloosi ja hemitselluloosi, kuni lõpuks leiab biomass oma viimase otstarbe kasvusubstraadina taimedele või seentele. Lisaks on võimalik mandariini biomassist eraldada ka vabad suhkrud ja pektiin. Mandariinide kaskaadse väärimise skeem on toodud joonisel 17.

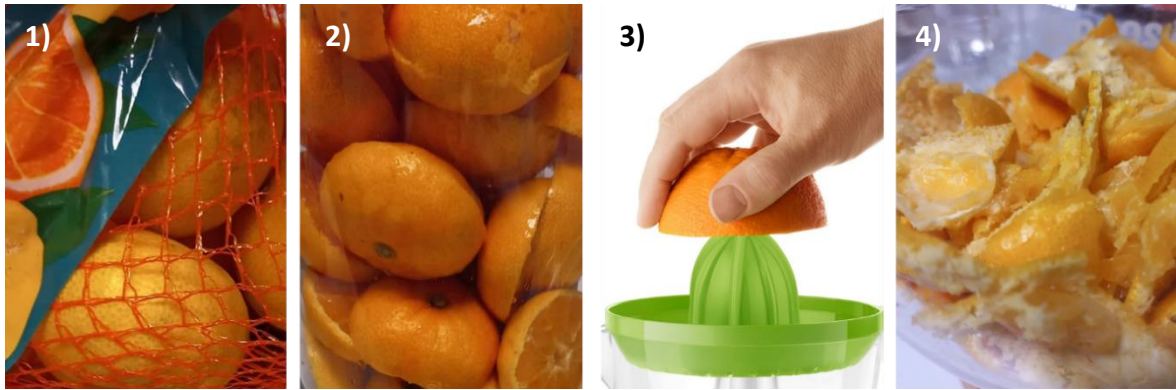


Joonis 17. Mandariinimahla pressijäägi kaskaadse väärimise skeem.

3.5.2. Mandariinimahla pressijäägi valmistamine

Hüdrodestillatsiooni teostamiseks valmistati eelnevalt mandariinimahla pressijääki. Selleks prooviti imiteerida Gruusia ettevõtet Georgian Industrial Asset Management Group tekkivat pressijääki. Tuginedes eeldusele, et kasvukeskkond ei põhjusta oluliselt väärimise optimaalsete tingimuste nihkeid, kasutati biomassina poest ostetud Satsuma (Hispaania) mandariine. Satsumad valiti sellepärast, et need kasvavad peamiselt ka Gruusias. Korraga osteti kokku suurem kogus mandariine, mida säilitati külmkapis või külmuumis 4 °C juures, eesmärgil katsed läbi viia ühe sordiga. Ennekoike oli see tingitud Satsuma mandariinide suhteliselt üürikesest hooajast (oktoober-detsember)⁵², mistõttu on need Eesti poodides müügil lühikest aega.

Pressijäägi imiteerimiseks esmalt mandariinid pesti voolava kraanivee all. Seejärel lõigati mandariinid horisontaalselt pooleks ning algselt pressiti mahl kätega välja ja jääk rebiti veel 2-4 tükiks. Hiljem kasutati mahla eraldamise etapis tsitrusemahlapressi, kuid ülejäänud protsess jäi samaks. Mandariini pressijäägi imiteerimise protsess etappidena on toodud joonisel 18.



Joonis 18. Mandariini pressijäägi imiteerimise protsess etappide kaupa. 1) Satsuma mandariinid, 2) pestud ja poolitatud mandariinid, 3) mahla eraldamine, 4) valmis pressijääk.

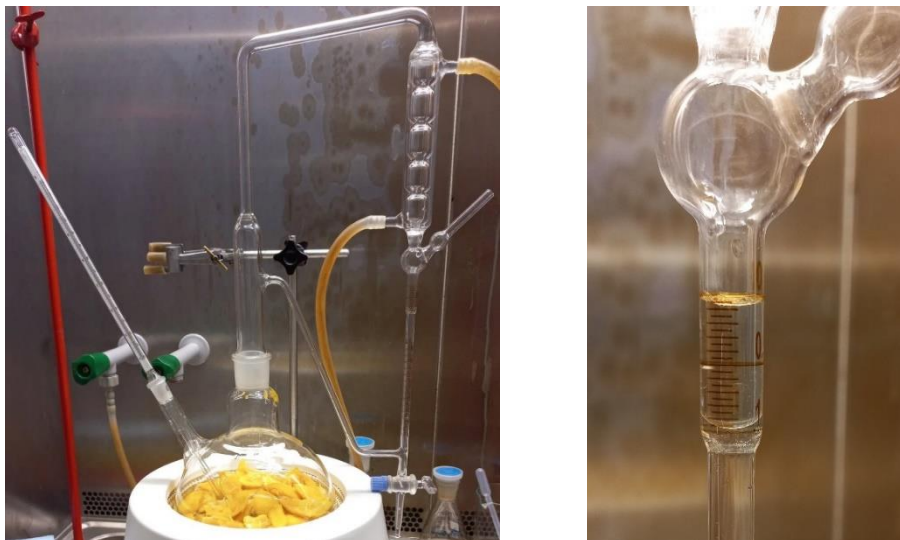
3.5.3. Eeterliku õli hüdrodestillatsioon ja proovi valmistamine

Hüdrodestillatsiooni läbiviimiseks võeti esmalt väike osa värskelt või eelmisel päeval valmistatud mandariinimahla pressijääki, homogeniseeriti uhmris ja määrati niiskusesisaldus. Seejärel kaaluti 1 kg mandariinidest valmistatud pressijääk kahe kaelaga ümarkolbi ja lisati 700 ml destilleeritud vett. HD Clevenger tüüpi aparatuur, mida on kujutatud ka joonisel 19, seati üles ja kuumutati järgides rangelt ühesugust temperatuuri seadistust (kuni 100 °C võimsus 300 W, edasi 225 W).

Temperatuuri seadistuse eesmärgiks oli suhteliselt aeglane kuumutamine, et saavutada võimalikult selge eeterliku õli fraktsioon. Temperatuuri seadistuse muutmisel muutub ka eeterliku õli eraldumise dünaamika, ent kui kuumutamine toimub liialt kiiresti, hakkab eralduma hägune eeterliku õli-vee emulsioon ja eeterliku õli koguse määramine ning eraldamine on raskendatud.

HD viidi läbi 6 tunni vältel, alustades aja mõõtmist hetkest, kui büretti hakkas kogunema eeterlik õli. Eeterliku õli kogust mõõdeti büreti skaala järgi algul 15 min intervallidega, hiljem 30 min ja 60 min tagant. HD lõppedes lülitati kuumutuspesa välja ja lasti jahtuda kuni eeterlikku õli ega vett enam ei eraldunud. Seejärel koguti mandariini eeterlik õli 2 ml katsutisse.

Eeterliku õli analüüsimiseks eemaldati katsutist pipetiga suurem osa veest, kuivatati veevaba Na_2SO_4 , tehti 10 kordne lahjendus heksaaniga ja analüüsiti GC-MS abil.



Joonis 19. Clevenger tüüpi hüdrodestillatsiooni läbiviimise aparatuur ja bürett mandariini eeterliku õliga.

3.5.4. Ultraheli ekstraktsiooni ettevalmistus, teostamine ja proovi valmistamine

Eelnevas etapis HD käigus saadud osaliselt ammendunud biomass filtreeriti läbi nutšfiltrit ja jäeti üleöö filtrile jahtuma ning nõrguma. Järgmisel päeval biomass homogeniseeriti blendriga ja filtraat tsentrifuugiti (4000 rpm) 1 liitris mahutis 5 min. Mõõdeti HD jääkvee maht ja sade segati ülejäänud biomassi hulka. Määrati filtraadis ehk HD jääkvees sisalduva hesperidiini ja narirutiini kontsentratsioonid. Selleks tsentrifuugiti (12400 rcf) HD jääkvett 2 ml katsutis veel 10 min ning lahjendati 10 korda 70% EtOH ja 20 µl IS-ga.

UAE läbiviimiseks mõõdeti biomassi niiskusesisaldus ($88\pm 1\%$, $n=4$). 50 ml koonilisse katsutisse kaaluti biomass vastavalt, et kuivainet oleks 1 g (g DW), lisati solvendid, segati ja asetati keeduklaasiga ultrahelivanni (joonisel 20) nii, et UH vanni vee nivoo oleks kõrgem kui keeduklaasis. UH vanni temperatuur, võimsus ja aeg seadistati vastavalt läbiviidavale eksperimendile. UH vanni kindla temperatuuri hoidmiseks lisati vajadusel juurde jääd. UAE lõppedes ekstraktid tsentrifuugiti (4500 rcf) samades katsutites 20 °C juures 5 min ja määrati saadud ekstrakti maht. Ekstrakti analüüsimiseks tsentrifuugiti (12400 rcf) seda 2 ml katsutis veel 10 min ja tehti vajaminev lahjendus 70% EtOH ja 20 µl IS-ga.

Matsereerimiseks lisati biomassile 1 ml vastava kontsentratsiooniga Na_2CO_3 või NaOH lahust, segati ja lasti teatud aja (vastavalt eksperimendile) laual seista. Tulenevalt asjaolust, et biomassi niiskusesisaldus varieerub ja omab 1 g kuiva biomassi kaalumisel suurt mõju (7,6-9,4 g märga biomassi), arvutati lisatavate lahuste kontsentratsioonid kuiva biomassi suhtes. Seejärel lisati puuduolev kogus EtOH ja vett ning viidi läbi UAE. Analüüsitava proovi hapustamiseks pH-ni 4-5 lisati 50% sidrunhappe lahust (pH 0,7).



Joonis 20. Ultraheli ekstraktsioon.

Ekstrahendi EtOH sisalduse ja biomassi-solvendi suhte määramisel võeti arvesse ka biomassis sisalduv vesi, lisades ekstraktsiooniks selle võrra vähem vett.

Kõik ekstraktsioonid viidi läbi kasutades poest ostetud Hispaania Satsuma mandariine ja tuletatult kirjandusest biomassi-solvendi suhtega 1:21,5 g/ml,²⁷ kui ei ole öeldud teisiti. Suhe 1:21,5 on

tingitud biomassi suurest niiskusesisaldusest, mis ei võimaldanud 1:20 suhte korral säilitada 60% EtOH sisaldust.

Täpsem eksperimentide kirjeldus on toodud peatükis 4.3. Ultraheli ekstraktsiooni optimeerimine.

Ekstraktsiooni tulemuste võrdlemiseks kasutati kahepoolset t-testi, võttes olulisuse tasemeks 5% ($\alpha=0,05$).

Ekstrakti hesperidiini osakaalu hindamisel võeti arvesse vaid hesperidiini ja narirutiini kontsentratsioone, sest need on peamised Satsuma mandariinides leiduvad glükoflavonoidid. Kuid olulist rolli omas ka asjaolu, et need ühendid on suhteliselt sarnaste füüsikalise-keemiliste omadustega, mis tõttu on nende kiirkolonnkromatograafiline eraldamine problemaatiline.

4. Tulemused ja arutelu

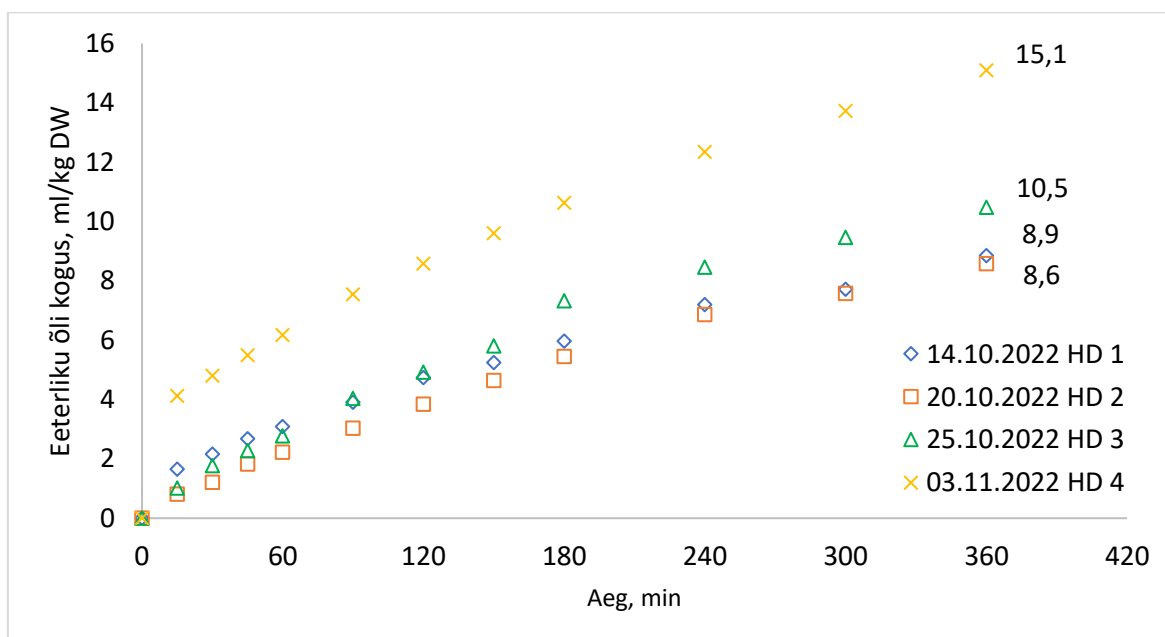
4.1. Eeterliku õli eraldumise dünaamika hüdrodestillatsioonil

Eeterliku õli eraldumise dünaamika hindamiseks viidi HD läbi 4 paralleelis 3 nädala vältel vastavalt peatükis 3.5.3. kirjeldatule. HD 1-4 eraldunud eeterliku õli saagised on toodud tabelis 2 väljendatuna kg kuiva mandariini pressijäägi kohta ja massiprotsendina.

Tabel 2. HD 1-4 mandariini eeterliku õli saagised: 1) eeterlik õli mõõdetud büreti skaala järgi, 2) kuivatatud eeterliku õli kaalutis, 3) massiprotsent.

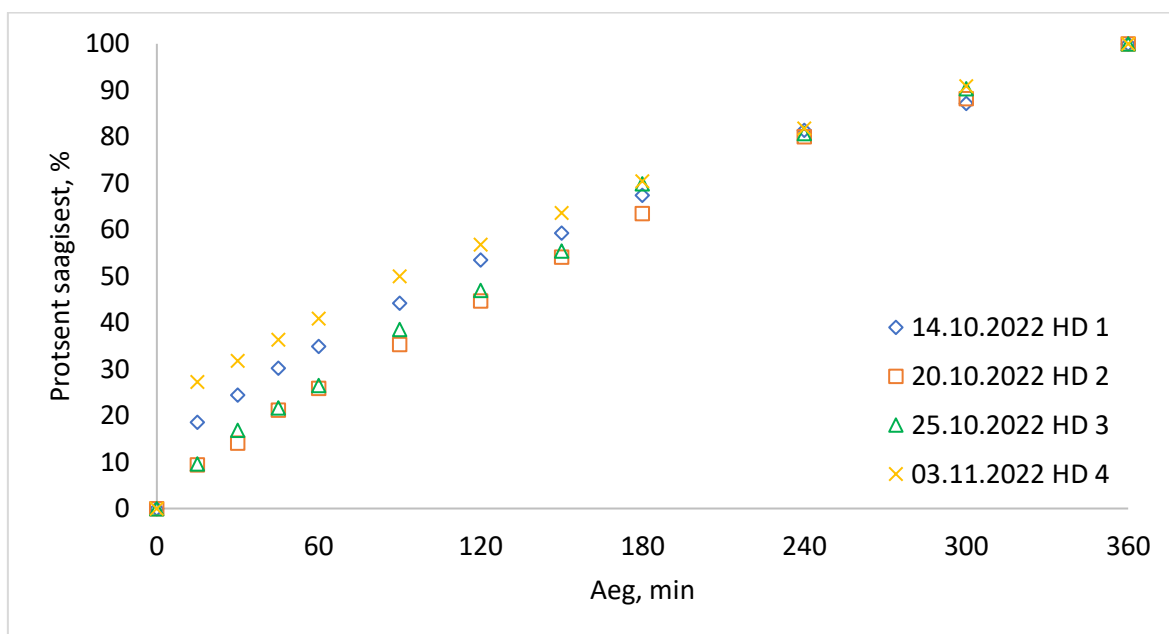
Saagis	HD 1	HD 2	HD 3	HD 4	keskmine	ssh, %
1) ml/kg DW	8,85	8,58	10,48	15,09	10,8±3,0	28
2) g/kg DW	5,97	6,66	7,34	9,19	7,3±1,4	19
3) m/m %	0,60	0,67	0,73	0,92	0,7±0,1	19

Joonisel 21 on toodud erinevatel ajahetkedel mõõdetud katsepunktid ja eeterliku õli saagis kg kuiva pressijäägi kohta, olles HD 1 kuni HD 4 vastavalt 8,9; 8,6; 10,5 ja 15,1 ml. Tulemustest on näha saagise suurt varieeruvust olles koguni 28%, keskmise saagisega 10,8±3,0 ml/kg DW, mis moodustab keskmiselt 0,7±0,1% kuivast mandariini pressijäägist. Sellegipoolest, vaatamata suurele varieeruvusele, on kõigi HD korral näha sarnast dünaamikat. Samuti võib täheldada selget ajas kasvavat trendi saagise suurenemise suunas, olles madalaim HD 1 ja HD 2 ning suurim HD 4 korral. Suur saagise varieeruvus ja nähtav trend on tõenäoliselt tingitud mandariinide seisemisest toimunud vananemisest, mille käigus muutusid mandariinikoored pehmemaks, ja eeterlik õli vabanes kergemini.



Joonis 21. HD 1-4 eeterliku õli eraldumise dünaamika väljendatuna ml/kg kuiva pressijäägi kohta.

Selleks, et siiski hinnata eeterliku õli eraldumise dünaamikat ja optimaalset HD aega, vaadeldi dünaamikat väljendatuna protsentides (joonis 22), võttes 100%-ks 6. tunni lõpuks eraldunud eeterliku õli koguse. Tabel eeterliku õli eraldumise dünaamika statistiliste näitajate ajaliste muutuste kohta on toodud Lisas 2. Tulemustest selgus, et esimese 2 tunni jooksul varieerub eraldunud eeterliku õli kogus kõige rohkem, 18-12% võrra (ssh 52-11%), saades 2. tunni lõpuks kätte ligikaudu pool eeterlikust õlist. Viimase 4 tunni jooksul varieerub dünaamika vaid 10-2% võrra (ssh 7-1%). Seega, vähendamaks mandariinikoorte küpsus- ja värskusastme mõju mandariini eeterliku õli saagisele, võiks minimaalne HD aeg olla 2 tundi. Samas optimaalse HD aja määramiseks tuleb arvesse võtta ka muid asjaolusid, ennekõike tugineda majanduslikele kaalutlustele, nõ tulud miinus kulud. Minimaalselt 60% eeterliku õli eraldamiseks peaks HD kestma 2,5-3 tundi.

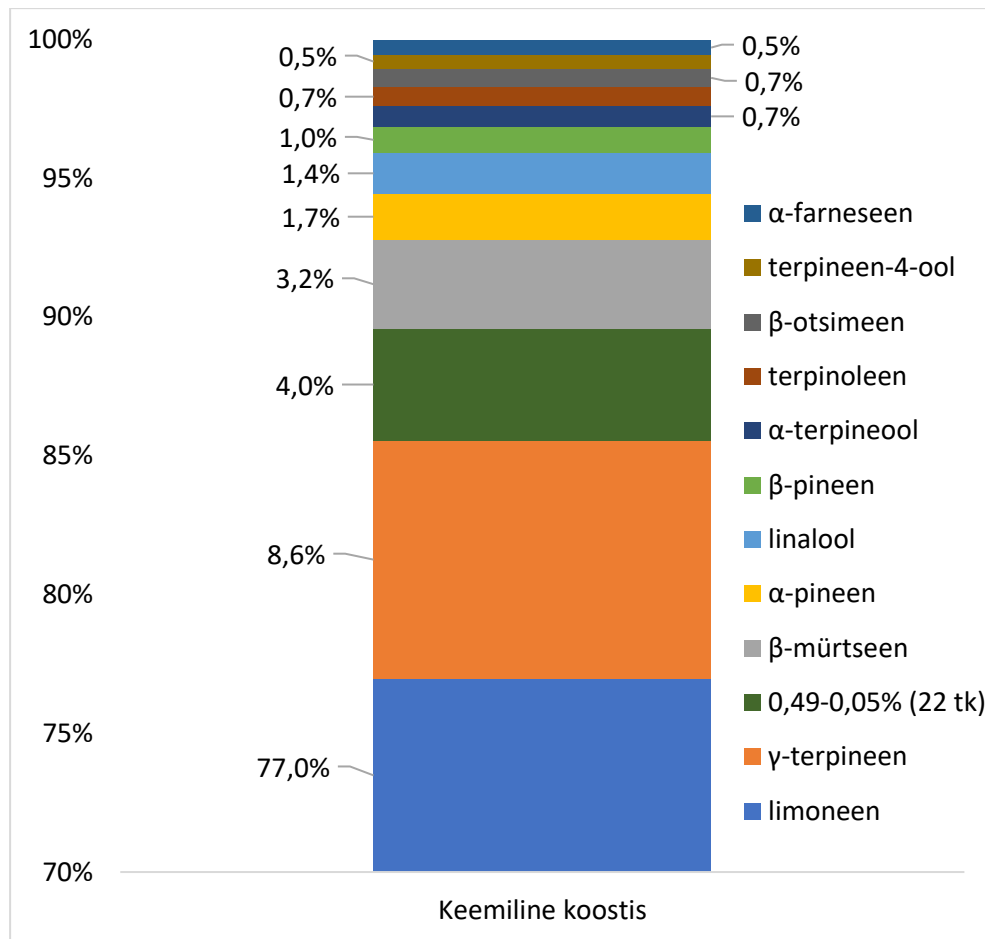


Joonis 22. HD 1-4 mandariini eeterliku õli eraldumise dünaamika väljendatuna protsentides.

4.1.1. Satsuma mandariinide eeterliku õli koostis

Satsuma mandariinide eeterliku õli koostise hindamisel vaadeldi HD 1-4 komponentide keskmist sisaldust. Kokku määrati 33 komponenti, mida leidub eeterlikus õlis vähemalt 0,05%. Eeterliku õli keemilise koostise määramisel kasutati lisaks massispektrite andmebaasile NIST ka võrdlemist kirjandusega¹⁸. Joonisel 23 on toodud 11 peamist komponenti, mida leidub vähemalt 0,5% ja summaarsena on toodud ülejäänud 22 komponenti, mida leidub 0,05% kuni 0,49%.

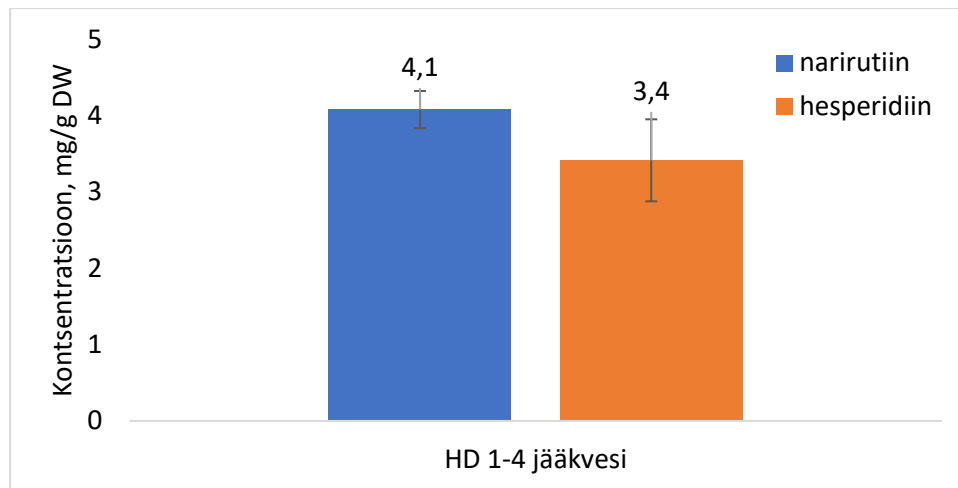
Satsuma mandariini eeterlik õli koosneb peamiselt limoneenist (D-limoneen), mis moodustab kogu eeterlikust õlist tervelt 77±1%. Väheimal määral leidub ka γ-terpineeni (8,6±0,8%), β-mürtseeni (3,2±0,1%), α-pineeni (1,7±0,2%), linalooli (1,4±0,6%) ja β-pineeni (1,0±0,1%). Ülejäänud komponente leidub alla 1%. Peamiste komponentide molekulstruktuurid ja eeterliku õli kromatogramm on toodud vastavalt Lisas 3 ja Lisas 4.



Joonis 23. Satsuma mandariinide HD 1-4 saadud eeterlike õlide keskmise koostise peamised komponendid, mida sisaldub vähemalt 0,5%. Summaarsena on toodud 22 komponenti, mida sisaldub 0,49-0,05% . Kokku 33 komponenti.

4.2. Hüdrodestillatsiooni jääkvesi

HD käigus jääb osa glükoflavonoididest jääkvette. Selleks, et hinnata, kui suur narirutiini ja hesperidiini kadu esimese etapiga kaasneb, määrati nende kontsentratsioonid ka jääkvees. HD 1-4 jääkveed sisaldasid keskmiselt narirutiini $4,1 \pm 0,2$ mg/g ja hesperidiini $3,4 \pm 0,5$ mg/g kuiva biomassi kohta, moodustades vastavalt 0,4% ja 0,3%. Seega võib öelda, et narirutiini ja hesperidiini kadu esimeses etapis on marginaalne. Jääkvee hesperidiini osakaal oli keskmiselt $45,6 \pm 3,3\%$, tingituna narirutiini suuremast vees lahustuvusest (hesperidiin 2,7 g/l, narirutiin 3,1 g/l)^{53,54}. Saadud tulemused on toodud ka joonisel 24.



Joonis 24. Hüdrodestillatsiooni 1-4 jääkvee keskmine narirutini ja hesperidiini kontsentratsioon (sh, n=4).

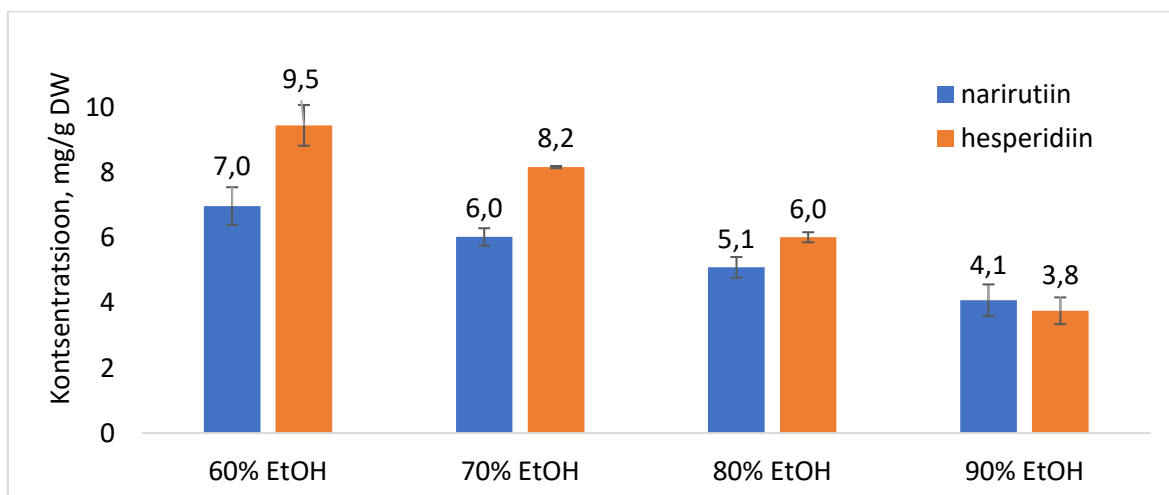
4.3. Ultraheli ekstraktsiooni optimeerimine

4.3.1. Optimaalne etanooli sisaldus ekstrahendis

UAE meetodika väljatöötamisel alustati optimaalse etanooli vesilahuse kontsentratsiooni määramisest. Selleks varieeriti 3 paralleelis EtOH sisaldust ekstrahendis vastavalt 60, 70, 80 ja 90%.

Antud eksperimendi jaoks kasutati Gruusiast saadetud kuivatatud ja jahvatatud mandariinimahla pressijääki. Biomassi ja solvendi suhe 1:20 g/ml ja UAE tingimused temperatuur 30 °C, aeg 30 min ja võimsus 180 W.

Eksperimendi tulemused on kujutatud joonisel 25, millelt on näha, et nii hesperidiini ja narirutini saagised kui ka hesperidiini osakaal vähenevad EtOH sisalduse kasvades. Seega osutus optimaalseks 60% EtOH vesilahus. Seejuures hesperidiin on muutuste suhtes tundlikum kui narirutiin, saades EtOH sisalduse kasvades 90%-ni vastavalt 60% ja 41% väiksemad saagised.



Joonis 25. Optimaalse EtOH sisalduse määramine ekstrahendis (sh, n=3). Gruusia kuivatatud ja jahvatatud mandariinimahla pressijääki, 1:20 g/ml, UAE (30 °C, 180 W, 30 min).

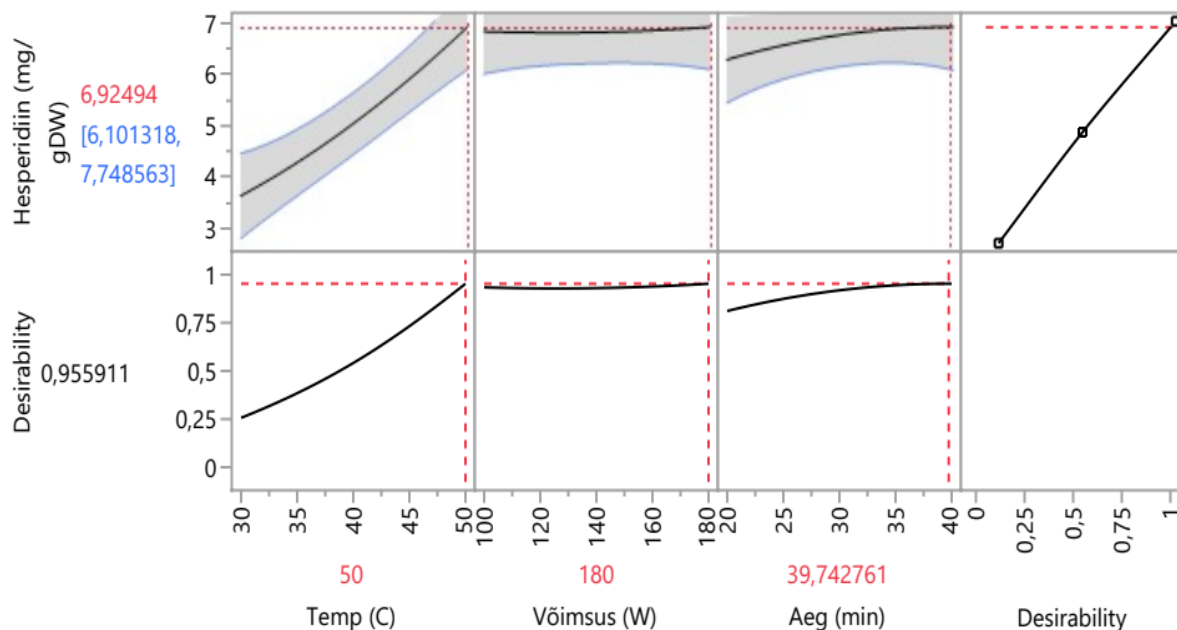
4.3.2. Optimaalsed ultraheli ekstraktsiooni tingimused

Optimaalsete UAE tingimuste leidmiseks kasutati statistilist katseplaneerimist (DOE) Box-Behnkeni mudeli näol, tuginedes vastavuspinna meetodile. Eesmärgiks seati maksimaalse hesperidiini kontsentratsiooni saavutamine. Selleks viidi läbi 15 eksperimenti, kasutades ekstrahendina 60% EtOH. Varieeriti ekstraktsiooni temperatuuri (30, 40 ja 50 °C), võimsust (100, 140 ja 180 W) ja aega (20, 30 ja 40 min). Box-Behnkeni mudel, faktorite väärtused ja tulemused on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Box-Behnkeni mudel, faktorite väärtused ja tulemused.

	Mudel			Faktorite väärtused			
	X1	X2	X3	Temp, °C	Aeg, min	Võimsus, W	Hesperidiin, mg/g DW
1	-	-	0	30	20	140	3,1
2	-	+	0	30	40	140	3,7
3	+	-	0	50	20	140	6,7
4	+	+	0	50	40	140	6,7
5	0	-	-	40	20	100	4,3
6	0	-	+	40	20	180	4,8
7	0	+	-	40	40	100	4,6
8	0	+	+	40	40	140	5,0
9	-	0	-	30	30	100	2,9
10	+	0	-	50	30	100	6,2
11	-	0	+	30	30	180	3,3
12	+	0	+	50	30	180	6,9
13	0	0	0	40	30	140	5,0
14	0	0	0	40	30	140	4,3
15	0	0	0	40	30	140	5,0

DOE tulemused on kujutatud joonisel 26. UAE optimaalseteks väärtusteks saadi temperatuur 50 °C, võimsus 180 W ja aeg 40 min, hesperidiini teoreetilise kontsentratsiooniga 6,9 mg/g DW. Lisaks on joonisel toodud ka mudeli ennustusprofiil, kus on näha, et suurim mõju hesperidiini kontsentratsioonile on temperatuuril ($p < 0,01$) ja efekti omab ka ekstraktsiooni aeg ($p = 0,04$), ent võimsus vaadeldavas vahemikus ei oma statistilist tähtsust ($p = 0,19$).



Joonis 26. Box-Behnken mudeli ennustusprofiil, optimaalsed UAE väärtused ja teoreetiline maksimaalne hesperidiini kontsentratsioon.

Mudeli kontrollimiseks viidi saadud optimaalsetel tingimustel läbi UAE. Ekstraktsiooni tulemusena kinnitati eksperimentaalselt mudeli korrektsust, saades hesperidiini kontsentratsiooniks $6,7 \pm 0,1$ mg/g kuiva biomassi kohta, erinevades teoreetilisest väärtusest kõigest 3,5%.

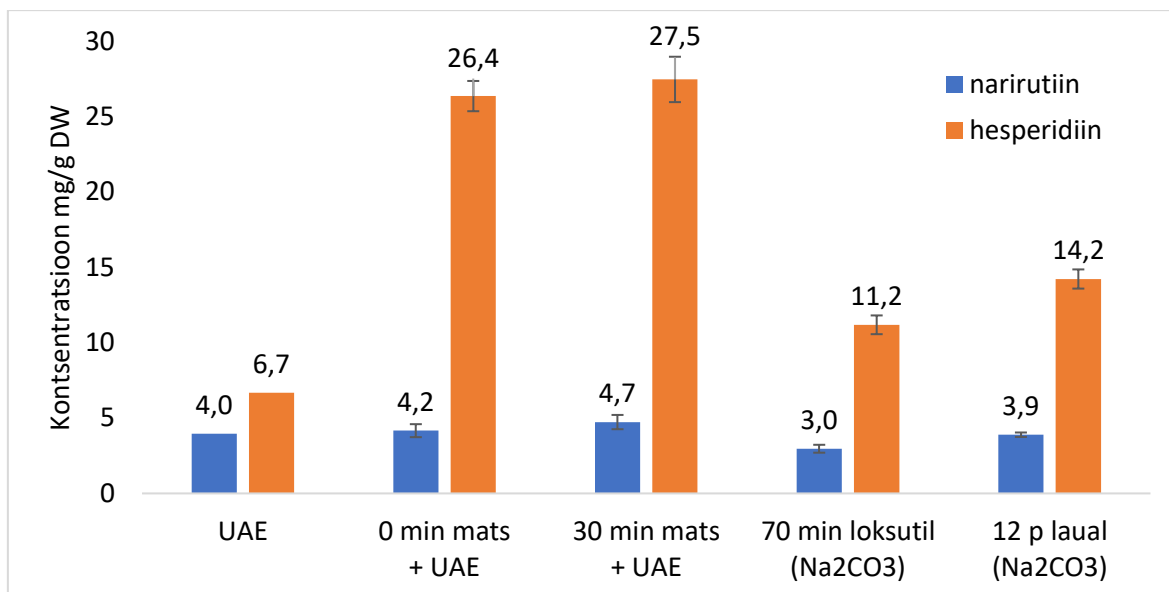
4.3.3. Matsereerimise ja ultraheli vajalikkus ekstraktsioonil

Kirjandusest oli teada, et hesperidiini lahustuvus suureneb märkimisväärselt pH tõustes üle 9.⁵⁵ Selle kontrollimiseks viidi läbi UAE 20% Na_2CO_3 lahuse (pH ~11) osalusel.

1 g kuiva biomassi kaaluti katsutisse, lisati 1 ml Na_2CO_3 lahust ja segati. Ühtedes katsutites matsereeriti biomassi 30 min ja seejärel lisati 60% EtOH, teistes biomassi ei matsereeritud, vaid lisati kohe 60% EtOH, millele järgnes koheselt UAE peatükis 4.3.2 kirjeldatud optimaalsetel tingimustel (50 °C, 180 W, 40 min).

Paralleelselt viidi ekstraktsioonid läbi ka UH vanni kasutamata. Selleks kaaluti katsutisse 1 g kuiva biomassi, lisati 1 ml Na_2CO_3 lahust, segati ja lisati 60% EtOH. Ühed katsutid pandi 70 min loksutile ja teised jäeti 12 päevaks lauale seisma.

Läbiviidud eksperimentide tulemused võrdluses eeltöötlemata biomassiga tehtud UAE-ga on kujutatud joonisel 27. Tulemustest selgus, et Na_2CO_3 omab väga suurt efekti hesperidiini kontsentratsiooni suurenemisele, saades koguni 4 korda kõrgema hesperidiini saagise. Samas on näha, et 30 min matsereerimist Na_2CO_3 lahusega ei oma olulist mõju hesperidiini kontsentratsioonile ($p=0,48$). Paraku aga ei ole võimalik elimineerida UH vanni kasutamist. Loksutil läbiviidud eksperimendil on küll hesperidiini sisaldus 1,7 korda suurem kui tavalise UAE korral, kuid sellegipoolest on see 2,4 korda väiksem kui matsereerimise ja UAE kombinatsiooni puhul. Samuti ei paranda hesperidiini kontsentratsiooni oluliselt ka 12-päevane ekstraktsioon lauall.



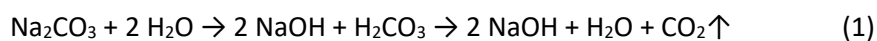
Joonis 27. 20% Na₂CO₃ matsereerimise ja UAE mõju narirutiini ja hesperidiini kontsentratsioonidele (sh, n=2). Hispaania Satsuma, 1:21,5 g/ml, 60% EtOH, UAE (50 °C, 180 W, 40 min).

Seega tehti kindlaks Na₂CO₃ ja UAE kombinatsiooni suur efekt ja olulisus hesperidiini kontsentratsiooni kasvule ekstraktis. Lisaks tagab nende kombinatsiooni kasutamine ka selektiivsema ekstraktsiooni hesperidiini suhtes, saades hesperidiini osakaaluks algse 63% asemel koguni 85-86%. Antud tulemus on eriti oluline ja märkimisväärne tulenevalt asjaolust, et ekstraktist on kiirkolonnkromatograafia abil keeruline isoleerida hesperidiini teistest lisanditest, ennekõike narirutiinist.

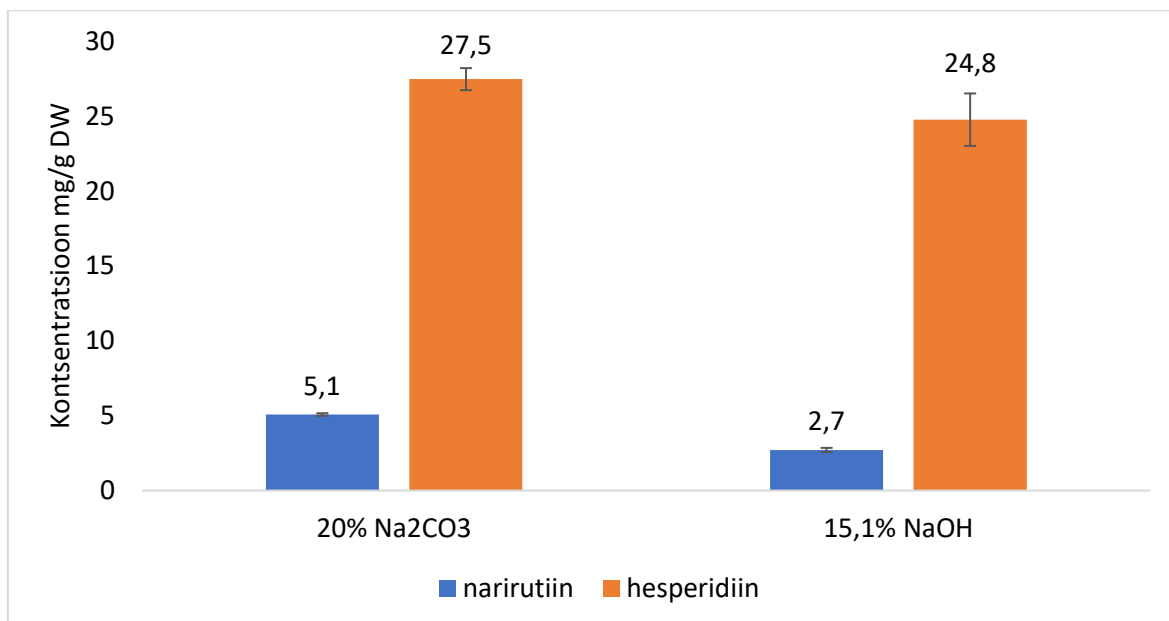
4.3.4. Aluselise keskkonna loomine – Na₂CO₃ või NaOH

Kuigi Na₂CO₃ kasutamine biomassi matsereerimisel andis väga hea tulemuse, nagu eespool näidatud, tekib paraku Na₂CO₃ lahustamisel vees süsihape (H₂CO₃), mis laguneb omakorda H₂O ja CO₂. Seetõttu sooviti aluselise keskkonna tekitamiseks leida alternatiiv, viies läbi UAE, matsereerides eelnevalt biomassi 30 min vältel hoopis NaOH lahusega.

Selleks, et Na₂CO₃ ja NaOH osalusel läbiviidavad ekstraktsioonid oleksid võrreldavad, arutati tulenevalt Na₂CO₃ hüdroolüüsi võrrandist (1) sellele vastava NaOH kogus, eeldusel, et reaktsioon kulgeb lõpuni. Saadi, et 200 mg/ml Na₂CO₃ (20%, pH ~11) vastab 151 mg/ml NaOH (15,1%, pH ~14). Seega võimaldaks NaOH kasutamine lisaks vähendada kemikaalide kasutamist koguni 25% võrra.



Biomassi matsereerimisel 20% Na₂CO₃ lahusega saadi hesperidiini sisalduseks 27,5±0,7 mg/g DW ja narirutiini sisalduseks 5,1±0,1 mg/g DW, hesperidiini osakaaluga 84,4%. Biomassi matsereerimisel 15,1% NaOH lahusega saadi aga hesperidiini sisalduseks 24,8±1,8 mg/g DW ja narirutiini sisalduseks 2,7±0,1 mg/g DW, sellest hesperidiini osakaal oli 90,1%. Tulemused on kujutatud ka joonisel 28.



Joonis 28. Na₂CO₃ ja NaOH osaluse mõju ekstraktsioonil narirutini ning hesperidiini kontsentratsioonidele (sh, n=2). Hispaania Satsuma, 1:21,5 g/ml, 60% EtOH, UAE (50 °C, 180 W, 40 min).

Kahe ekstraktsiooni tulemuste võrdlemiseks viidi läbi kahepoolne t-test, hinnates nii hesperidiini kontsentratsiooni kui ka osakaalu ekstraktis. Selgus, et Na₂CO₃ ja NaOH mõju hesperidiini kontsentratsioonile ei oma statistilist erinevust ($p=0,18$). Küll aga oli NaOH matsereerimine selektiivsem, andes suurema hesperidiini osakaalu ($p=0,005$).

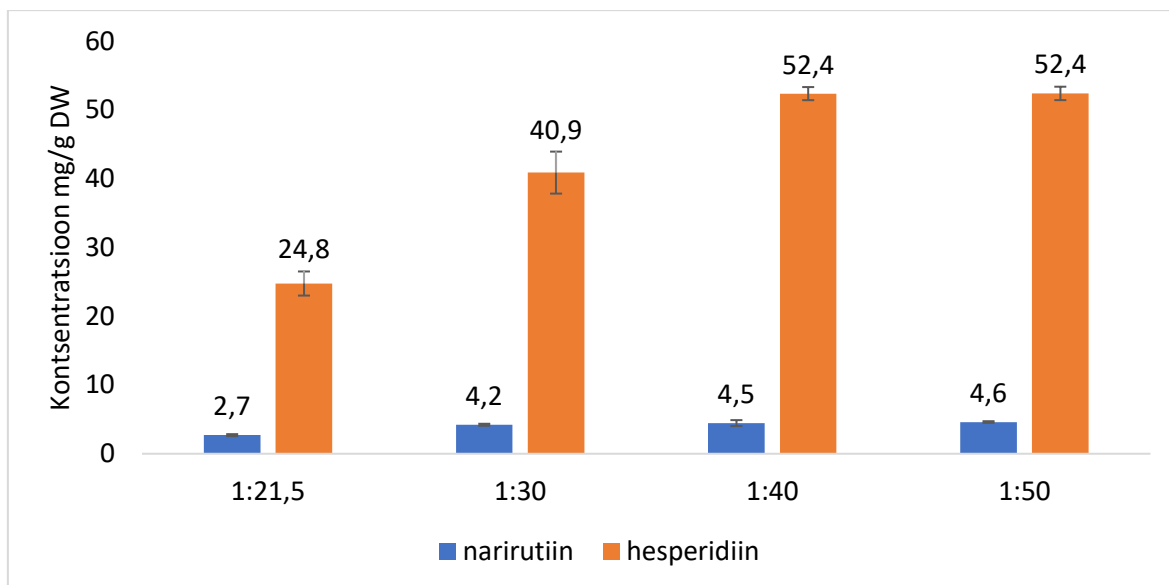
Lisaks sellele, et CO₂ tekitav reagent oli võimalik vahetada NaOH vastu, parandas see oluliselt ka UAE selektiivsust ehk hesperidiini osakaalu ekstraktis.

4.3.5. Optimaalne biomassi ja solvendi suhe

Optimaalse biomassi ja solvendi suhte hindamiseks varieeriti ekstraktsiooniks lisatava solvendi koguseid saavutamaks suhted 1:21,5; 1:30; 1:40 ja 1:50 g/ml.

Ekspriimentide läbiviimiseks matsereeriti 1 g kuiva biomassi 1 ml 15,1% NaOH lahusega 30 min vältel. Seejärel lisati 60% EtOH ja viidi läbi UAE (temperatuur 50 °C, aeg 40 min, võimsus 180 W).

Biomassi ja solvendi suhte mõju hesperidiini ja narirutini kontsentratsioonidele ekstraktis on toodud joonisel 29. Kõrgeimad hesperidiini kontsentratsioonid ($52,4 \pm 1,0$ mg/g DW) saadi biomassi-solvendi suhte korral 1:40 ja 1:50. Kuna saadud hesperidiini kontsentratsioonid olid võrdsed, valiti optimaalseks biomassi ja solvendi suhteks 1:40.



Joonis 29. Biomassi ja solvendi suhte mõju narirutini ja hesperidiini kontsentratsioonidele ekstraktis (sh, n=2). Hispaania Satsuma, 15,1% NaOH, 60% EtOH, UAE (50 °C, 180 W, 40 min).

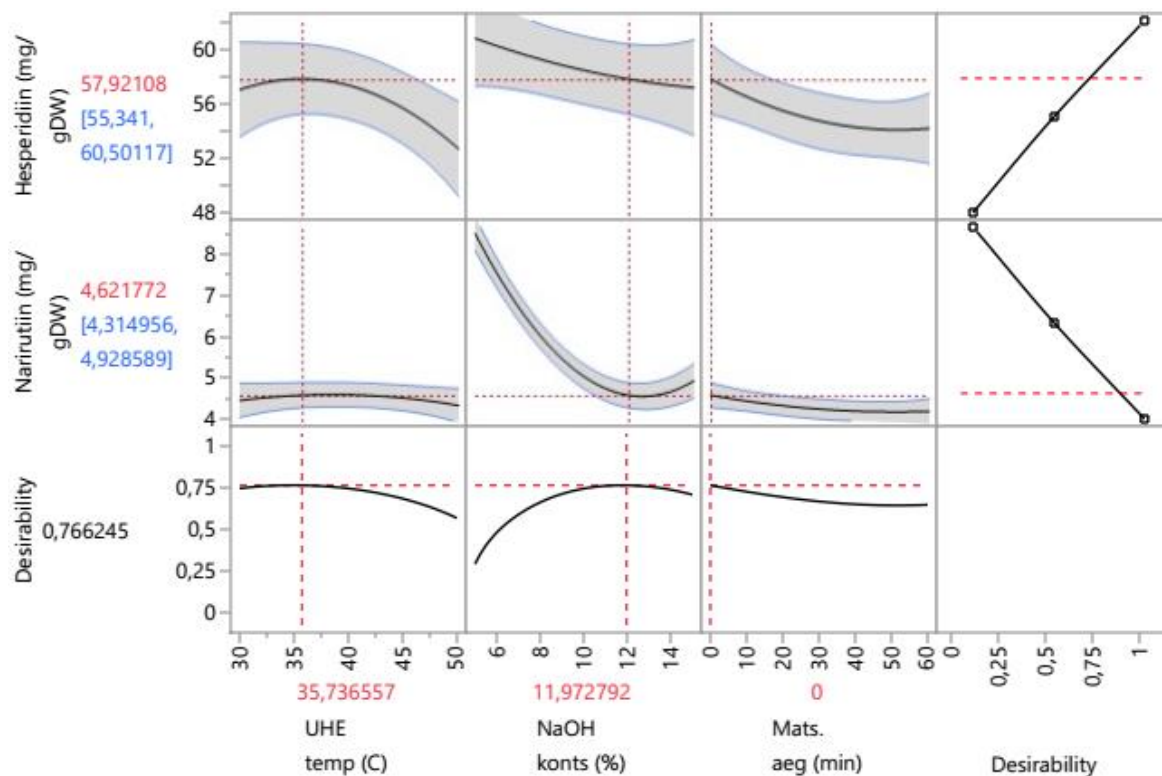
4.3.6. Optimaalsed ultraheli ekstraktsiooni ja matsereerimise tingimused

Optimaalsete tingimuste leidmiseks biomassi matsereerimisel NaOH lahusega kasutati samuti katseplaneerimist Box-Behnkeni mudeli näol, tuginedes vastavuspinna meetodile. Eesmärgiks seati nii maksimaalse hesperidiini kui ka minimaalse narirutini kontsentratsiooni saavutamine. Selleks viidi läbi 15 eksperimenti, 60% EtOH ja biomassi-solvendi suhtega 1:40. Varieeriti temperatuuri (30, 40 ja 50 °C), NaOH kontsentratsiooni matsereerimisel (5, 10 ja 15%) ning matsereerimise aega (0, 30 ja 60 min). Box-Behnkeni mudel, faktorite väärtused ja tulemused on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Box-Behnkeni mudel, faktorite väärtused ja tulemused.

	Mudel			Faktorite väärtused			Hesperidiin, mg/g DW	Narirutin, mg/g DW
	X1	X2	X3	Temp, °C	NaOH, %	Mats aeg, min		
1	-	-	0	30	5	30	51,2	7,8
2	-	+	0	30	15	30	55,4	4,5
3	+	-	0	50	5	30	51,3	7,8
4	+	+	0	50	15	30	51,6	4,6
5	0	-	-	40	5	0	61,7	8,5
6	0	-	+	40	5	60	51,2	8,0
7	0	+	-	40	15	0	55,7	4,9
8	0	+	+	40	15	60	55,8	4,8
9	-	0	-	30	10	0	58,2	5,1
10	+	0	-	50	10	0	53,6	4,8
11	-	0	+	30	10	60	51,9	4,4
12	+	0	+	50	10	60	48,7	4,3
13	0	0	0	40	10	30	55,1	4,9
14	0	0	0	40	10	30	52,5	4,5
15	0	0	0	40	10	30	55,2	4,7

Katse tulemusena saadi UAE optimaalseteks väärtusteks temperatuur 36 °C, NaOH kontsentratsioon matsereerimisel 12% ja matsereerimise aeg 0 min. Saadud tingimustel on hesperidiini teoreetiline kontsentratsioon 57,9 mg/g DW ja narirutiini kontsentratsioon 4,6 mg/g DW, milles hesperidiini osakaal on 92,6%. Tulemusi ja ennustusprofile on kujutatud ka joonisel 30, kus on näha, et suurim mõju UAE on NaOH kontsentratsioonil ($p < 0,01$), aga mõju avaldab ka matsereerimise aeg ($p = 0,004$) ja UH vanni temperatuur ($p = 0,04$).



Joonis 30. Box-Behnkeni mudeli ennustusprofiil maksimaalse hesperidiini ja minimaalse narirutiini väärtuste juures, optimaalsed UAE tingimused ja saadavad teoreetilised hesperidiini ja narirutiini kontsentratsioonid.

Mudeli kontrollimiseks viidi saadud optimaalsetel tingimustel läbi UAE. Ekstraktsiooni tulemusena saadi hesperidiini kontsentratsioon $61,0 \pm 0,1$ mg/g DW ja narirutiini kontsentratsiooniks $5,1 \pm 0,1$ mg/g DW, milles hesperidiini osakaal on $92,2 \pm 0,1\%$.

Ekspereimetaalselt saadud hesperidiini kontsentratsioon on 5,3% ja narirutiini kontsentratsioon 11,1% suurem teoreetilistest väärtustest. Samas, kui võrrelda eksperimeentalsete väärtuste hesperidiini osakaalu teoreetilisega, on see kõigest 0,4% võrra väiksem. Seega võib öelda, et mudel sai eksperimeentaltselt kinnitatud.

4.3.7. Ultraheli ekstraktsiooni optimeeritud eeskiri ja tulemus

Käesoleva magistritöö tulemusena tehti kindlaks optimaalsed UAE tingimused.

50 ml katsutisse kaaluti 1 g kuiva mandariini pressijääki, lisati 1 ml 12% NaOH lahust ja segati võimalikult ühtlaselt. Seejärel lisati katsutisse EtOH ja destilleeritud vesi nii, et koos biomassis oleva veega tuleks kokku 60% EtOH vesilahus, moodustades biomassiga suhte 40:1 ml/g DW. Viidi läbi UAE 40 min vältel, võimsusel 180 W ja temperatuuril 36 °C.

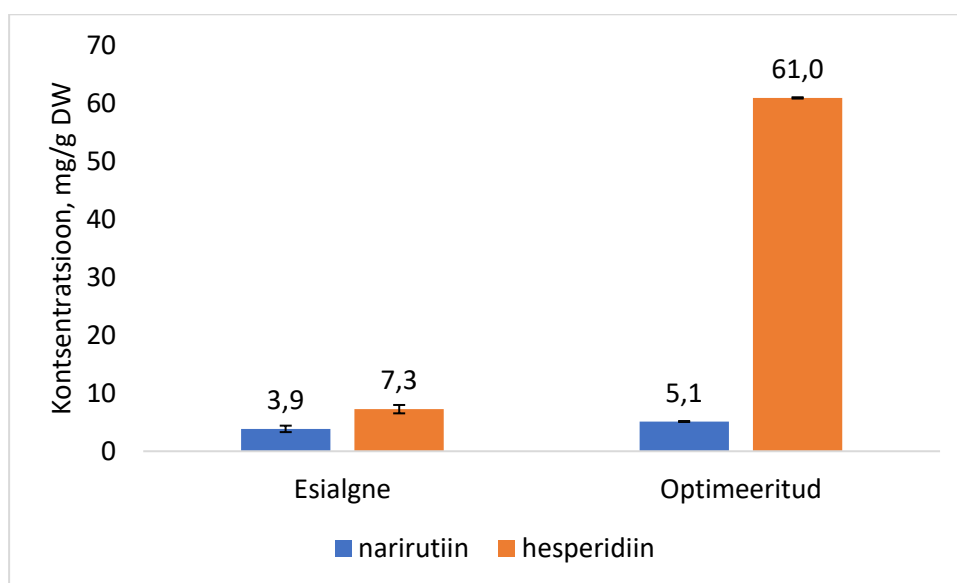
Katsutid tsentrifuugiti (4500 rcf) 20 °C juures 5 min ja möödeti ekstrakti maht. Proovi valmistamiseks HPLC-UV analüüsi jaoks tsentrifuugiti (12500 rcf) ekstrakti veel 2 ml katsutis 10 min ning proov hapustati 50% sidrunhappe lahusega.

Optimeerimise alguses saadi hesperidiini kontsentratsiooniks ekstraktis $7,3 \pm 0,7$ mg/g kuiva biomassi kohta, moodustades biomassist 0,7%, mis on kõigest 2,3 korda suurem kui HD jääkvees (0,3%). Narirutiini kontsentratsiooniks saadi $3,9 \pm 0,6$ mg/g kuiva biomassi kohta, moodustades biomassist 0,4%, olles sama nagu HD jääkvees. Esialgne hesperidiini osakaal ekstraktis oli $65,3 \pm 2,0\%$.

Optimeerimise tulemusena suurendati hesperidiini kontsentratsiooni, saades $61,0 \pm 0,1$ mg/g kuiva biomassi kohta, mis moodustab biomassist $6,10 \pm 0,01\%$. Narirutiini kontsentratsiooniks saadi $5,1 \pm 0,1$ mg/g kuiva biomassi kohta, mis moodustab biomassist $0,51 \pm 0,01\%$. Optimeeritud meetodikaga saadi hesperidiini osakaaluks ekstraktis $92,2 \pm 0,1\%$.

Seega suurendati optimeerimise tulemusena hesperidiini saagist koguni 8,7 korda, kui narirutiini saagis suurenes vaid 1,25 korda, tänu millele suurenes ka hesperidiini osakaal 26,9% võrra. Saadud esialgsed ja optimeeritud UAE tulemused on kujutatud joonisel 31.

Lisas 5 on toodud võrdlusena NaOH matsereeritud ja eeltöötlemata HPLC-UV kromatogrammid.



Joonis 31. Esialgsed ja optimeeritud UAE tulemused. (sh, esialgne n=8, optimeeritud n=2)

Kokkuvõte

Käesolev magistritöö tehti seoses KIK21023 projektiga, mille sisuks on „Mandariinimahla pressijääkide väärindamise tehnoloogiate väljaarendamine eesmärgiga leevendada Gruusia puuviljamahla tööstuste keskkonna jalajälge, kasutades ringmajanduse põhimõtteid“. Töö tulemusena arendati välja ja optimeeriti kahest etapist koosnev kaskaadne mandariinimahla pressijäägi väärindamise tehnoloogia, et toota väärtuslikke kemikaale, limoneeni ja hesperidiini.

Esimese etapina eraldati hüdrodestillatsioonil mandariinimahla pressijäägist eeterlik õli. Katsetest selgus, et mandariinide küpsus- ja värskusaste mängib olulist rolli eeterliku õli saagisele, olles suurem küpsemate mandariinide korral. Saagised varieerusid koguni 19%, jäädes vahemikku 0,6-0,9% kuivast biomassist, keskmise saagisega $0,7 \pm 0,1\%$. Samas kui vaadeldi eeterliku õli eraldumise dünaamikat protsentides 6. tunni lõpuks saadud eeterlikust õlist, varieerus dünaamika vähem, olles suurim esimese 2 tunni jooksul (ssh 52-11%), kui saadi kätte ligikaudu pool eeterlikust õlist. Edasise 4 tunni jooksul varieerus dünaamika vaid 7-1%. Selleks, et vähendada mandariinide küpsus- ja värskusastme mõju eeterliku õli saagisele, võiks minimaalne destillatsiooni aeg olla 2 tundi. Kuid minimaalselt 60% eeterliku õli eraldamiseks peaks HD kestvus olema 2,5-3 tundi. Saadud eeterlikust õlist määrati 33 komponenti, mida leidis eeterlikus õlis vähemalt 0,05%. Limoneeni sisalduseks saadi $77 \pm 1\%$. Lõpliku optimaalse destillatsiooni aja määramiseks on vaja teha tasuvusanalüüs.

Teise etapina viidi läbi eelnevalt osaliselt ammendunud biomassist ultraheli ekstraktsioonil hesperidiini eraldamine. Meetodika optimeerimiseks kasutati nii parameeter optimeerimist kui ka katseplaneerimist Box-Behnkeni mudeli abil. Parameeter optimeerimisel varieeriti ekstrahendi etanooli sisaldust (60-90%), matsereerimiseks aluselise keskkonna tekitajat (Na_2CO_3 või NaOH) ning biomassi ja solvendi suhet (1:21,5-1:50). Katseplaneerimise lähenemist kasutati kahel erineval eksperimendi plaanil, kus ühes varieeriti UH vanni temperatuuri (30-50 °C) ja võimsust (100-180 W) ning ekstraktsiooni aega (20-40 min). Teisel juhul varieeriti samuti UH vanni temperatuuri (30-50 °C), kui suurimat efekti omavat faktorit, aga lisaks ka NaOH kontsentratsiooni (5-15%) ja matsereerimise aega (0-60 min).

Optimeeritud UAE meetodika tingimusteks saadi biomassi ja solvendi suhe 1:40, kasutades solvendina 12% NaOH lahust ja 60% etanooli vesilahust, UH vanni võimsus 180 W ja temperatuur 36 °C, ekstraktsiooni ajaga 40 min. Optimeerimise tulemusena suurendati hesperidiini saagist koguni 8,7 korda, kui narirutiini saagis suurenes vaid 1,25 korda, tänu millele suurenes ka hesperidiini osakaal 26,9% võrra. Optimeeritud tingimustel saadi hesperidiini saagiseks $6,10 \pm 0,01\%$ kuivast mandariinimahla pressijäägist, osakaaluga $92,2 \pm 0,1\%$.

Sooritatud magistritöö tulemusena täideti kõik varasemalt seatud eesmärgid. Töö edasi arendamiseks tuleks väljatöötatud tehnoloogia viia üle suuremale skaalale ja teha tasuvusarvutused. Samuti võiks uurida UAE statistiliselt vähem oluliste parameetrite mõju saagisele ja sisendhinnale. Lisaks saaks väärindamise kaskaadi lisada uusi etappe näiteks vabade suhkrute, pektiini, tselluloosi ja hemitselluloosi eraldamise näol.

Abstract

Development of technology for cascade valorization of mandarin juice press residues

This master's thesis was made in connection with the KIK21023 project, on the topic "Development of technologies for valorization of mandarin juice press residues with the aim of reducing the environmental footprint of the Georgian fruit juice industries using circular economy principles". As a result of this work, a two-stage cascade valorization technology was developed and optimized to produce the valuable chemicals limonene and hesperidin from mandarin juice press residues.

As a first step, essential oil was separated from the mandarin juice press residue by hydrodistillation. The experiments revealed that the degree of ripeness and freshness of mandarins plays an important role in the yield of essential oil, being higher in the case of more ripe mandarins. Yields varied by as much as 19%, ranging from 0.6-0.9% of dry biomass, with an average yield of $0.7\pm 0.1\%$. While the dynamics of essential oil release was observed as a percentage of the essential oil obtained by the end of 6 hours, the dynamics varied less, being the largest during the first 2 hours (RSD 52-11%), when approximately half of the essential oil was obtained. During the next 4 hours, the dynamics varied by only 7-1%. To reduce the influence of the ripeness and freshness of mandarins on the essential oil yield, the minimum distillation time should be 2 hours. But to extract at least 60% of the essential oil, the duration of HD should be 2.5-3 hours. 33 components, which were found in at least 0.05% of the essential oil, were determined. The limonene content was $77\pm 1\%$. A cost-effectiveness analysis is required to determine the final optimal distillation time.

As a second step, isolation of hesperidin was performed from previously partially depleted biomass by ultrasound assisted extraction. Both parameter optimization and design of experiment using the Box-Behnken model were used to optimize the method. Parameter optimization was used to optimize the ethanol content of the extractant (60-90%), generate alkaline medium for maceration (Na_2CO_3 or NaOH) and optimize the ratio of biomass to solvent (1:21.5-1:50). The DOE approach was used on two different experimental plans, in one of which the temperature (30-50 °C) and power (100-180 W) of the ultrasound bath and the extraction time (20-40 min) were varied. In the second case, the temperature of the ultrasound bath (30-50 °C), as the most significant factor, the concentration of NaOH (5-15%) and the maceration time (0-60 min) was varied.

The optimized UAE method conditions were obtained: the ratio of biomass to solvent was 1:40 g/ml DW, 12% NaOH and 60% ethanol aqueous solution as a solvent, extraction time 40 min, ultrasound bath power 180 W and temperature 36 °C. As a result of the optimization, the hesperidin yield was increased as much as 8.7 times, while the narirutin yield increased only 1.25 times, leading to the 26.9% increase in the proportion of hesperidin. Under the optimized conditions, the yield of hesperidin was $6.10\pm 0.01\%$ from dry mandarin juice press residue, with a proportion of $92.2\pm 0.1\%$.

As a result of the master's thesis, all previously set goals were fulfilled. To further develop this technology, it should be transferred to a larger scale and profitability calculations should be made. Also, the statistically less significant factors of UAE could be investigated, to see its effect on yield and input price. In addition, new steps could be added to the valorization cascade, for example the separation of free sugars, pectin, cellulose and hemicellulose.

Tänuavaldused

Autor soovib tänada Keskkonnainvesteeringute keskust projekti finantseerimise eest ja projektijuhti Tiit Lukki antud projekti värbamise ja usalduse eest.

Samuti soovitakse tänada töö valmimisele kaasaaitamise eest oma juhendajat Maria Kuhtinskajat ja kaasjuhendajat Merike Vaherit suure toetuse ja abivalmiduse eest.

Veel soovitakse tänada Annabel Tanieli meeldiva koos töötatud aja ja arutelude eest, kes viis läbi ka katsed ekstraktsiooni optimaalse etanooli sisalduse ja UAE optimaalsete tingimuste leidmiseks ning töötas välja kiirema HPLC-UV meetoodika glükoflavonoidide analüüsimiseks.

Lisaks soovib autor edastada suured tänud ka kogu TalTechi instrumentaalanalüüsi labori sõbralikule ja toetavale kollektiivile meeldiva koos töötatud aja eest.

Eriti suured tänud soovib aga autor edastada oma perele, kelle toetuse ja abiga sai töö valmimine üldse võimalikuks.

Kasutatud kirjandus

- (1) Euroopa Komisjon; Euroopa Liit. 2019. *Euroopa roheline kokkulepe*. Consilium Europa. <https://www.consilium.europa.eu/et/policies/green-deal/#what> (accessed 2023-04-19).
- (2) Keskkonnaministeerium; Keskkonnaagentuur. *Ringmajanduse Valge Raamat*; Tallinn, 2022.
- (3) Ellen MacArthur Foundation. *The circular economy in detail*. <https://ellenmacarthurfoundation.org/the-circular-economy-in-detail-deep-dive> (accessed 2023-04-19).
- (4) Ragn-Sells. *Ringmajandus*. <https://www.ragnsells.ee/keskkond/ringmajandus/> (accessed 2023-05-01).
- (5) Keskkonnainvesteeringute keskus. 2021. *Mandariinimahla pressijääkide väärimise tehnoloogiate väljaarendamine eesmärgiga leevendada Gruusia puuviljamahla tööstuste keskkonna jalajälge kasutades ringmajanduse põhimõtteid*. <https://kik.ee/et/projektid/mandariinimahla-pressijaakide-vaarindamise-tehnoloogiate-valjaarendamine-eesmargiga> (accessed 2023-05-02).
- (6) Panwar, D.; Saini, A.; Panesar, P. S.; Chopra, H. K. Unraveling the Scientific Perspectives of Citrus By-Products Utilization: Progress towards Circular Economy. *Trends Food Sci Technol* 2021, *111*, 549–562. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.03.018>.
- (7) Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. *Citrus*. FAO. <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/citrus/en/> (accessed 2023-04-25).
- (8) Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. *FAOSTAT*. FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (accessed 2023-04-28).
- (9) Ashley Robinson. 2020. *Update on Georgia citrus production*. Citrus Industry. <https://citrusindustry.net/2020/04/30/update-on-georgia-citrus-production/> (accessed 2023-05-21).
- (10) Satari, B.; Karimi, K. Citrus Processing Wastes: Environmental Impacts, Recent Advances, and Future Perspectives in Total Valorization. *Resour Conserv Recycl* 2018, *129*, 153–167. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2017.10.032>.
- (11) Zhongli Pan; Ruihong Zhang; Steven Zicari; et al. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*; Elsevier, 2019.
- (12) Russo, C.; Maugeri, A.; Lombardo, G. E.; Musumeci, L.; Barreca, D.; Rapisarda, A.; Cirimi, S.; Navarra, M. The Second Life of Citrus Fruit Waste: A Valuable Source of Bioactive Compounds†. *Molecules* 2021, *26* (19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195991>.
- (13) Cho, E. J.; Lee, Y. G.; Chang, J.; Bae, H. J. A High-Yield Process for Production of Biosugars and Hesperidin from Mandarin Peel Wastes. *Molecules* 2020, *25* (18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184286>.
- (14) Rajput, S.; Kaur, S.; Panesar, P. S.; Thakur, A. Supercritical Fluid Extraction of Essential Oils from Citrus Reticulata Peels: Optimization and Characterization Studies. *Biomass Convers Biorefin* 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02807-4>.

- (15) Marín, F. R.; Soler-Rivas, C.; Benavente-García, O.; Castillo, J.; Pérez-Alvarez, J. A. By-Products from Different Citrus Processes as a Source of Customized Functional Fibres. *Food Chem* 2007, *100* (2), 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.040>.
- (16) Boluda-Aguilar, M.; García-Vidal, L.; González-Castañeda, F. del P.; López-Gómez, A. Mandarin Peel Wastes Pretreatment with Steam Explosion for Bioethanol Production. *Bioresour Technol* 2010, *101* (10), 3506–3513. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.063>.
- (17) Cheigh, C. I.; Chung, E. Y.; Chung, M. S. Enhanced Extraction of Flavanones Hesperidin and Narirutin from Citrus Unshiu Peel Using Subcritical Water. *J Food Eng* 2012, *110* (3), 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.019>.
- (18) Shin, S. D.; Kim, C. S.; Lee, J. H. Compositional Characteristics and Antibacterial Activity of Essential Oils in Citrus Hybrid Peels. *Food Science and Technology* 2022, *42*. <https://doi.org/10.1590/fst.95921>.
- (19) PubChem. 2023. *D-Limonene*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Limonene#section=Drug-Warnings> (accessed 2023-05-06).
- (20) Anandakumar, P.; Kamaraj, S.; Vanitha, M. K. D-Limonene: A Multifunctional Compound with Potent Therapeutic Effects. *J Food Biochem* 2021, *45* (1). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13566>.
- (21) PubChem. 2023. *Hesperidin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hesperidin> (accessed 2023-05-06).
- (22) Guan-Hua Du. *Natural Small Molecule Drugs from Plants*; Springer, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7>.
- (23) National Library of Medicine. 2023. *Hesperidin Clinical Trials*. [ClinicalTrials.gov](https://beta.clinicaltrials.gov/search?distance=50&cond=hesperidin). <https://beta.clinicaltrials.gov/search?distance=50&cond=hesperidin> (accessed 2023-05-06).
- (24) Ravimiregister. 2023. *Hesio*. <https://ravimiregister.ee/publichomepage.aspx?pv=PublicMedDetail&vid=2508f6dc-d177-40fa-93f4-fe913e794690> (accessed 2023-05-06).
- (25) Tsitsagi, M.; Ebralidze, K.; Chkhaidze, M.; Rubashvili, I.; Tsitsishvili, V. Sequential Extraction of Bioactive Compounds from Tangerine (Citrus Unshiu) Peel. *Ann Agrar Sci* 2018, *16* (2), 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.02.007>.
- (26) John R. Dean. *Extraction Techniques in Analytical Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- (27) Nipornram, S.; Tochampa, W.; Rattanatraiwong, P.; Singanusong, R. Optimization of Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (Citrus Reticulata Blanco Cv. Sainampueng) Peel. *Food Chem* 2018, *241*, 338–345. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.08.114>.
- (28) Li, Y.; Sylvie Fabiano-Tixier, A.; Vian, A.; Chemat, F. Solvent-Free Microwave Extraction of Bioactive Compounds Provides a Tool for Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 2013, *47*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.007>.
- (29) Wikipedia. 2021. *Supercritical Fluid Extraction*. https://en.wikipedia.org/wiki/Supercritical_fluid_extraction (accessed 2023-05-21).
- (30) Wikipedia. 2023. *Steam Distillation*. https://en.wikipedia.org/wiki/Steam_distillation (accessed 2023-05-07).

- (31) Samadi, M.; Abidin, Z. Z.; Yunus, R.; Awang Biak, D. R.; Yoshida, H.; Lok, E. H. Assessing the Kinetic Model of Hydro-Distillation and Chemical Composition of Aquilaria Malaccensis Leaves Essential Oil. *Chin J Chem Eng* 2017, 25 (2), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2016.09.006>.
- (32) Pyrzynska, K. Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients* 2022, 14 (12). <https://doi.org/10.3390/nu14122387>.
- (33) Haghghi, A.; Khajenoori, M. Subcritical Water Extraction. In *Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling*; InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/54993>.
- (34) Fakhru-Nisa; Tahir, T.; Ashfaq, M.; Shahzad, M. I.; Bukhari, S. T. Recent Approaches in the Extraction of Citrus Metabolites. *Curr Biotechnol* 2019, 8 (2), 85–95. <https://doi.org/10.2174/2211550108666191210101516>.
- (35) Avantor. 2023. VWR® USC, Ultrasonic Cleaning Baths | VWR. <https://uk.vwr.com/store/product/10694225/vwr-usc-ultrasonic-cleaning-baths> (accessed 2023-05-11).
- (36) hielscher Ultrasound Technology. 2022. *Ultrasonic Extraction and its Working Principle*. <https://www.hielscher.com/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm> (accessed 2023-05-08).
- (37) Harold M. McNair; James M. Miller; Nicolas H. Snow. *Basic Gas Chromatography*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2019.
- (38) Colin F. Poole. *GAS CHROMATOGRAPHY SECOND EDITION*, 2nd ed.; Elsevier, 2021.
- (39) Harold M. McNair; James M. Miller; Nicolas H. Snow. *Basic Gas Chromatography*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2019.
- (40) Murayama, C.; Kimura, Y.; Setou, M. Imaging Mass Spectrometry: Principle and Application. *Biophys Rev* 2009, 1 (3), 131–139. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0015-6>.
- (41) Murayama, C.; Kimura, Y.; Setou, M. Imaging Mass Spectrometry: Principle and Application. *Biophys Rev* 2009, 1 (3), 131–139. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0015-6>.
- (42) Saang'onoy, D. Optimization And Validation Of Direct Analysis In Real Time Mass Spectrometry (Dart-Ms) For Quantitation Of Sugars To Advance Biofuel Production, 2011. <https://encompass.eku.edu/etd/44> (accessed 2023-05-08).
- (43) Colin F. Poole. *GAS Chromatography*, 2nd ed.; Colin F. Poole, Ed.; Elsevier, 2021.
- (44) webmail.life. *Quadrupole Mass Spectrometry*. <https://webmail.life.nthu.edu.tw/~labcyjw/BioPhyChem/Mass/quadrupo.htm> (accessed 2023-05-08).
- (45) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- (46) Dong; Michael W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*; John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- (47) Maria Kuhtinskaja. Vedelikkromatograafia. *Instrumentaalanalüüsi loeng*. 2020.
- (48) Veronika R. Meyer. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

- (49) Keith M. Bower. *What Is Design of Experiments (DOE)?*. American Society for Quality. <https://asq.org/quality-resources/design-of-experiments> (accessed 2023-05-09).
- (50) Wikipedia. 2023. *Box-Behnken design*. https://en.wikipedia.org/wiki/Box%E2%80%93Behnken_design (accessed 2023-05-09).
- (51) Develve. 2022. *Box-Behnken design*. <https://develve.net/Box-Behnken%20design.html#1> (accessed 2023-05-19).
- (52) James J., F.; Peter C., A. *The Satsuma Mandarin*. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. 2019. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/CH116> (accessed 2023-03-20).
- (53) FooDB. 2019. *Narirutin*. <https://foodb.ca/compounds/FDB011868> (accessed 2023-03-26).
- (54) FooDB. 2019. *Hesperidin*. <https://foodb.ca/compounds/FDB002680> (accessed 2023-03-26).
- (55) Majumdar, S.; Srirangam, R. Solubility, Stability, Physicochemical Characteristics and in Vitro Ocular Tissue Permeability of Hesperidin: A Natural Bioflavonoid. *Pharm Res* 2009, 26 (5), 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/S11095-008-9729-6/FIGURES/9>.

Lisad

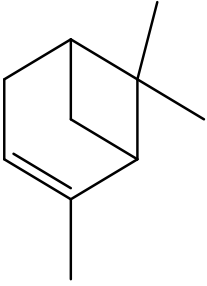
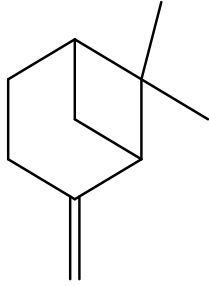
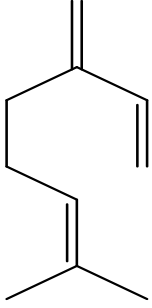
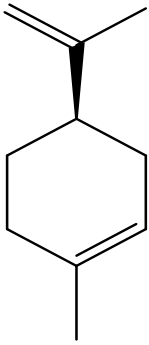
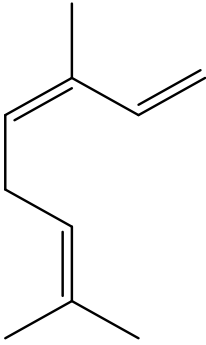
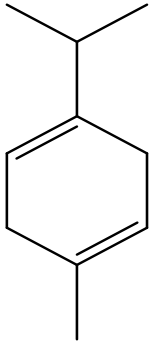
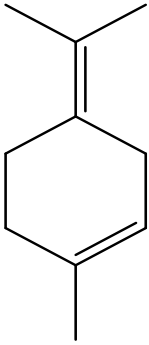
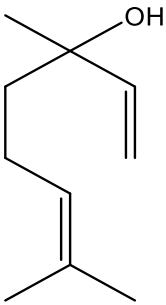
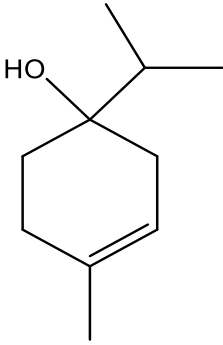
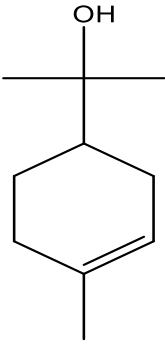
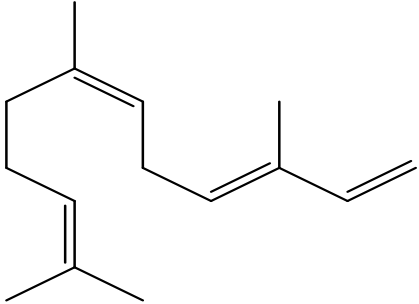
Lisa 1. HPLC-UV metoodika gradient elueerimise režiim

Aeg, min	MQ, %	ACN, %
0,00	75	25
6,00	67,5	32,5
6,01	25	75
12,00	25	75

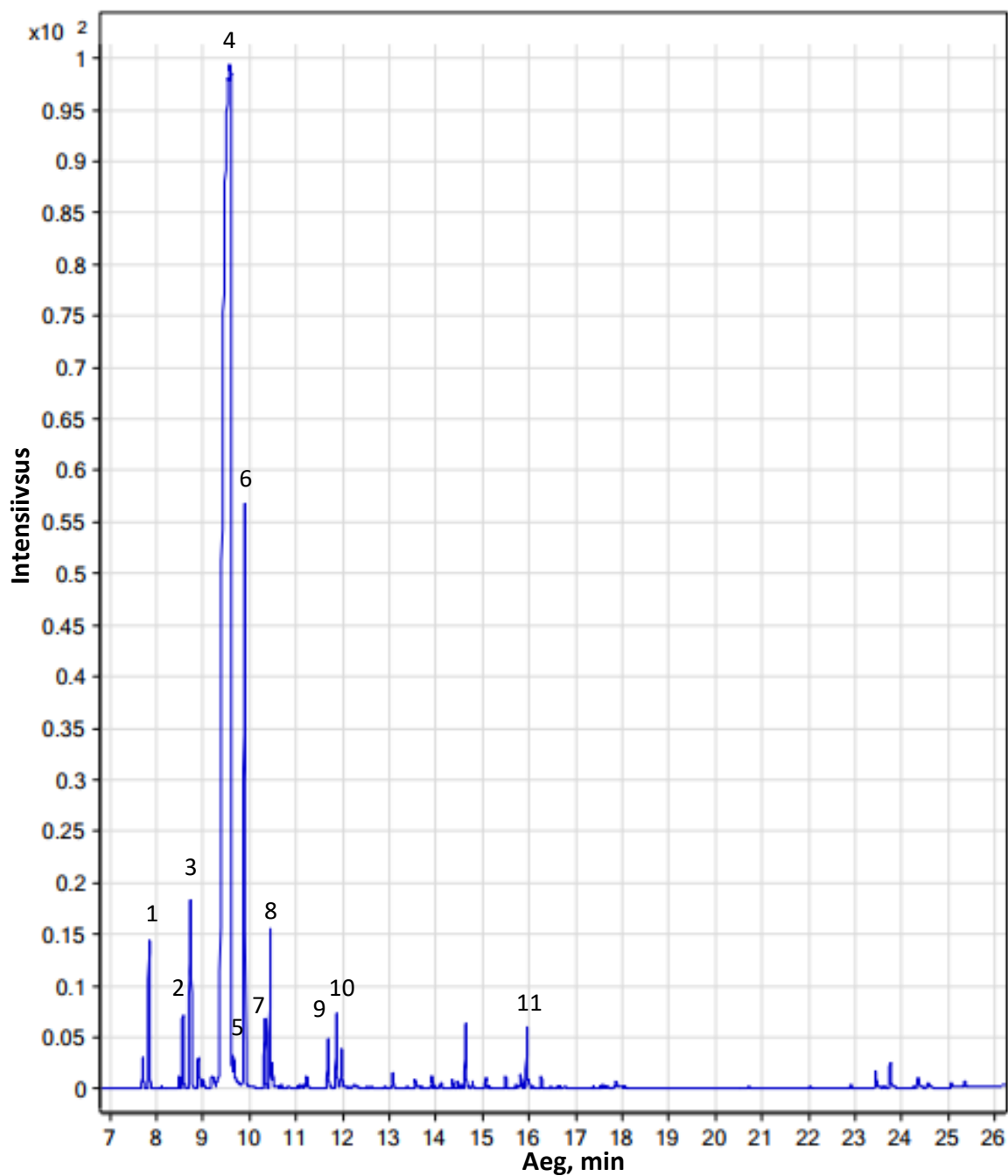
Lisa 2. HD 1-4 eeterliku õli eraldumise statistiliste näitajate muutused ajas

Aeg, min	max-min, %	keskmine, %	sh	ssh, %
0	0	0,0	0,0	0
15	18	16,2	8,5	52
30	18	21,8	8,0	37
45	15	27,4	7,3	27
60	15	32,0	7,2	22
90	15	42,0	6,5	15
120	12	50,5	5,6	11
150	10	58,1	4,3	7
180	7	67,8	3,1	5
240	2	81,0	0,8	1
300	4	89,2	1,7	2
360	0	100,0	0,0	0

Lisa 3. Satsuma mandariinide eeterliku õli peamiste komponentide struktuurid

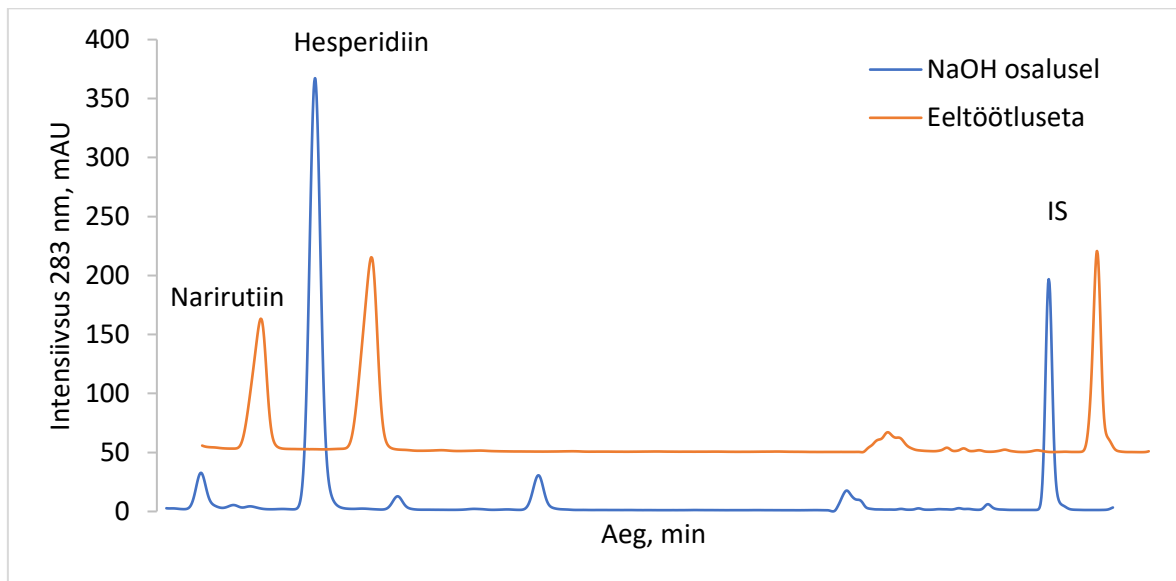
<p>α-pineen</p> 	<p>β-pineen</p> 	<p>β-mürtseen</p> 
<p>D-limoneen</p> 	<p>β-otsimeen</p> 	<p>γ-terpineen</p> 
<p>terpinoleen</p> 	<p>linalool</p> 	<p>terpineen-4-ool</p> 
<p>α-terpineool</p> 	<p>α-farneseen</p> 	

Lisa 4. Satsuma mandariinide eeterliku õli GC-MS kromatogramm



1) α -pineen, 2) β -pineen, 3) β -mürtsseen, 4) limoneen, 5) β -otsimeen, 6) γ -terpineen, 7) terpinoleen, 8) linalool, 9) terpineen-4-ool, 10) α -terpineool, 11) α -farnaseen

Lisa 5. Ultraheli ekstraktsioonil saadud ekstrakti HPLC-UV kromatogramm



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Marlen Leemet
(*autori nimi*)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Mandariinimahla pressijääkide kaskaadse väärindamise tehnoloogia väljaarendamine,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Maria Kuhtinskaja,
(*juhendaja nimi*)

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna
Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu,
sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete
kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

26.05.2023
(kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.