



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Sanja Dragović

**OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE I
DESTILACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA
TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND
BIOTECHNOLOGY

Sanja Dragović

**OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND
DISTILLATION PROCESS OF BIOACTIVE
COMPOUNDS FROM THE MASTIC TREE LEAF
(*Pistacia lentiscus* L.)**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski (doktorski) studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo

UDK: 547.56: 634.574: 66.048: 665.52/.54(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE I DESTILACIJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LISTA TRŠLJE (*Pistacia lentiscus* L.)

Sanja Dragović, mag. ing. bioproc.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva i Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, Službi za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju Nastavnog zavoda za javno zdravlje Dr. Andrija Štampar u Zagrebu, Laboratoriju za plinsku kromatografiju Ireks Arome d.o.o. u Jastrebarskom i u Darkol d.o.o. u Stubičkoj Slatini.

Mentor: dr. sc. Zoran Zorić, viši znanstveni suradnik

Kratki sažetak doktorskog rada

U ovom radu istraživana je utjecaj konvencionalne ekstrakcije (CE) te ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) na sastav i udio fenolnih spojeva (ukupni fenoli, flavonoidi, flavonoli i hidrokscimetne kiseline) lista tršlje sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka ubranog tijekom tri fenološke faze (cvatnja; rani plod i zreli plod) u ovisnosti o vrsti i polarnosti otapala (voda, 100% i 80% metanol i etanol) i vremenu ekstrakcije (30 - 210 minuta) kod CE, te temperature (50-70 °C), snage mikrovalova (200-500 W) i vremena (4-12 min) kod MAE. Optimalni uvjeti ekstrakcije definirani su na temelju masenih udjela fenolnih spojeva. Najbolji ekstrakcijski kapacitet kod CE i MAE postignut je upotrebom 80 %-tne vodene otopine metanola kao otapala i to kod CE tijekom 90 min, a kod MAE u vremenu od 12 min, temperaturi od 69 °C i snazi mikrovalova od 500 W. U ekstraktima lista tršlje dobivenim pri optimalnim uvjetima pomoću HPLC-DAD i LC-MS/MS provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih spojeva te se pokazalo da je najzastupljenija fenolna kiselina je 5-O-galoilkin kiselina, dok je miricetin ramnozid određen kao dominantni flavonol glikozid. Istraživana je i utjecaj tlaka na prinos eteričnih ulja dobivenih iz uzoraka lista tršlje, te njihov antimikrobni učinak prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED pomoću disk difuzijske metode. GC-MS analizom identificirano i kvantificirano 56 sastavnica od kojih su α -pinen, β -pinen i limonen određene kao dominantne. Sva eterična ulja su pokazala umjereni antimikrobni učinak prema navedenim gram-negativnim bakterijama u usporedbi sa antimikrobnim učinkom antibiotika kloramfenikol. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja tršlje pripisuje se sinergističkom djelovanju svih sastavnica.

Broj stranica: 149

Broj slika: 27

Broj tablica: 28

Broj literaturnih navoda: 271

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: tršlja, konvencionalna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, fenolni spojevi, parna destilacija, eterično ulje, antimikrobni učinak

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac
3. Prof. dr. sc. Sanda Vladimir – Knežević
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate university (doctoral) study Biotechnology and Bioprocess Engineering

Ph. D. Thesis

UDK: 547.56: 634.574: 66.048: 665.52/.54(043.3)

Scientific Area: Biotechnical sciences

Scientific Field: Biotechnology

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION AND DISTILLATION PROCESS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE MASTIC TREE LEAF (*Pistacia lentiscus* L.)

Sanja Dragović, mag. ing. bioproc.

Thesis performed at Laboratory for drying Technologies and monitoring of biologically active compounds and in Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, Laboratory for Molecular Microbiology, Institute Ruđer Bošković in Zagreb, Department of Environmental Protection and Health Ecology Andrija Štampar teaching institute of public health in Zagreb, Laboratory for gas chromatography in Ireks Aroma d.o.o. in Jastrebarsko and Darkol d.o.o. in Stubička Slatina.

Supervisors: Ph.D. Zoran Zorić, Senior research associate

Short abstract

This study researched the influence of conventional (CE) and microwave assisted extraction (MAE) on the composition and mass fractions of phenolic compounds (total phenols, flavonoids, flavonols and hydroxycinnamic acids) in mastic tree leaves harvested at locations Barbariga, Lun, Hvar and Vela Luka during three phenological stages (flowering, early and late fruiting) depending on the solvent type and polarity (100% water, 100% and 80% methanol or ethanol), extraction time (30-210 minutes) concerning CE as well as temperature (50-70°C), microwave power (200-500W) and time (4-12 min) regarding MAE. Optimal extraction conditions for CE and MAE were obtained by using 80% methanol as a solvent during 90 minutes regarding CE and 12 minutes concerning MAE at temperature of 69 °C and microwave power of 500 W. In mastic tree leaves extracts obtained by optimal extraction conditions, phenolic profile was determined using HPLC-DAD and UPLC-MS/MS methods by which the dominant phenolic acid determined was 5-*O*-galloylquinic acid, while myricetin rhamnoside was determined as a dominant flavonol glycoside. Furthermore, the influence of pressure on the mastic leaf essential oil yield was researched as well as their antimicrobial activity against gram-negative bacteria *Escherichia coli* strain AB1157 and *Erwinia amylovora* strain EaED by disc-diffusion method. Using GC-MS analysis, 56 components of the obtained essential oil were identified and quantified among which α -pinene, β -pinene and limonene were determined as dominant. All essential oil samples exhibited moderate antimicrobial activity against mentioned gram-negative bacteria, in comparison to antibiotic chloramphenicol, due to the synergistic activity of all essential oil compounds.

Number of pages: 149

Number of figures: 27

Number of tables: 28

Number of references: 271

Original in: Croatian

Key words: mastic tree, conventional extraction, microwave assisted extraction, phenolic compounds, steam distillation, essential oil, antimicrobial activity

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Ph. D. Jagoda Šušković, Full professor
2. Ph. D. Verica Dragović-Uzelac, Full professor
3. Ph. D. Sanda Vladimir – Knežević, Full professor
4. Ph. D. Blaženka Kos (substitute), Full professor

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.



Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva i Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Laboratoriju za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, Službi za zaštitu okoliša i zdravstvenu ekologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu, Laboratoriju za plinsku kromatografiju Ireks Arome d.o.o. u Jastrebarskom i u Darkol d.o.o. u Stubičkoj Slatini u okviru projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093), koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014.-2020. pod mentorstvom dr. sc. Zorana Zorića, višeg znanstvenog suradnika.



Tema rada prihvaćena je na 7. redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu god. 2018./2019. održanoj dana 24. travnja 2019. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 10. prosinca 2019. godine na 4. redovitoj sjednici u 351. akademskoj godini (2019./2020.).

SAŽETAK

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je zbog visokih udjela bioaktivnih molekula (BAM) izvrstan potencijal za preradu u proizvode kao što su mastik guma, ekstrakti i eterična ulja. Na sastav i masene udjele BAM utječu faktori poput lokacije i fenološke faze biljke, a zadržavanje BAM u ekstraktima ili eteričnim uljima ovisi o primijenjenoj metodi i uvjetima ekstrakcije.

U prvom dijelu ovog rada istraživana je utjecaj konvencionalne ekstrakcije te ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na sastav i udio fenolnih spojeva (ukupne fenolne kiseline, ukupni flavonoidi, ukupni flavonoli i ukupne hidroksicimtnne kiseline) lista tršlje sa lokacija Barbariga, Lun, Hvar i Vela Luka ubranim tijekom tri fenološke faze (faza cvjetanje (svibanj); faza ranog ploda (kolovoz); faza zrelog ploda (listopad)) u ovisnosti o vrsti i polarnosti otapala (voda, 100 % metanol i etanol, 80 % vodena otopina metanola i etanola) i vremenu ekstrakcije (30 - 210 minuta) kod konvencionalne ekstrakcije, te temperature (50 - 70 °C), snage mikrovalova (200 - 500 W) i vremena (4 - 12 min) kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Optimalni uvjeti ekstrakcije definirani su na temelju masenih udjela fenolnih spojeva. Najbolji ekstrakcijski kapacitet kod CE i MAE postignut je upotrebom 80 %-tne vodene otopine metanola kao otapala i to kod CE tijekom 90 min, a kod MAE u vremenu od 12 min, temperaturi od 69 °C i snazi mikrovalova od 500 W. U ekstraktima lista tršlje dobivenim pri optimalnim uvjetima pomoću HPLC-DAD i LC-MS/MS provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih spojeva te se pokazalo da je najzastupljenija fenolna kiselina je 5-*O*-galoilkina kiselina, dok je miricetin ramnozid određen kao dominantni flavonol glikozid. Vrijeme od 10 minuta, temperatura 43 °C i snaga 98 W su optimalni parametri kojima se postiže najveći maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, ukupnih flavonola i ukupnih hidroksicimtnnih kiselina kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristi 80 %-tni etanol.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazala se izrazito efikasnom za izolaciju ukupnih fenola iz lista tršlje zbog visokog ekstrakcijskog prinosa i kraćeg vremena ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom. Vrijeme ekstrakcije signifikantno je utjecalo na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva dok druga dva procesna parametra ne pokazuju statistički značajan utjecaj na prinos ekstrakcije.

U drugom dijelu rada, istraživana je utjecaj tlaka na izolaciju eteričnih ulja iz uzoraka lista tršlje, -sastav eteričnih ulja te antimikrobni učinak prema gram-negativnim bakterijama *Escherichia coli* soj AB1157 i *Erwinia amylovora* soj EaED pomoću disk difuzijske metode. Procesom parne destilacije najveći prinosi eteričnih ulja određeni su pri tlaku od 1 bara, a GC-MS analizom identificirano je i kvantificirano 56 sastavnica koje predstavljaju 99,19 – 100 % ukupnog sastava eteričnog ulja lista tršlje od kojih su α -pinen,

β -pinen i limonen određene kao dominantne. Rezultati statističke analize, pokazali su da pojedinačno lokacija i fenološka faza, ali i njihovo kombinirano djelovanje imaju značajan utjecaj na udjele sastavnica i eteričnih ulja lista tršlje.

Sva eterična ulja su pokazala umjereni antimikrobni učinak prema navedenim gram-negativnim bakterijama u usporedbi sa antimikrobnim učinkom antibiotika kloramfenikol, a koji je posljedica sinergističkog djelovanja svih sastavnica eteričnog ulja.

S obzirom na sastav i masene udjele fenolnih spojeva te sastavnice eteričnih ulja, list tršlje predstavlja značajan izvor bioaktivnih molekula, a definirani optimalni uvjeti predstavljaju bazu za proizvodnju ekstrakata i eteričnih ulja visoke biološke vrijednosti.

Ključne riječi: tršlja, konvencionalna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, fenolni spojevi, parna destilacija, eterično ulje, antimikrobni učinak

SUMMARY

Mastic tree (*Pistacia lentiscus* L.) due to the high fractions of bioactive molecules (BAM) has the potential for being processed into diverse products such as mastic gum, extracts and essential oils. Content and mass fractions of BAM are influenced by factors such as location and harvesting time while BAM retention in extracts or essential oils is dependant on the applied extraction method and its conditions.

In the first part of this research, the influence of conventional (CE) and microwave assisted extraction (MAE) was researched on the composition and mass fractions of phenolics (total phenols, flavonoids, flavonols and hydroxycinnamic acids) in mastic tree leaves harvested at locations Barbariga, Lun, Hvar and Vela Luka during three phenological stages (flowering, early and late fruiting) depending on the solvent type and polarity (100 % water, 100 % and 80 % methanol or ethanol), extraction time (30 - 210 minutes) concerning CE as well as temperature (50 - 70°C), microwave power (200 - 500W) and time (4 - 12 min) regarding MAE. Optimal extraction conditions were determined based on the phenolics mass fractions. Optimal extraction capacity using CE was achieved by using 80 % methanol aqueous solution during 90 min, and regarding MAE after 12 minutes at temperature of 69 °C and power of 500 W.

Optimal extraction conditions for CE and MAE were obtained by using 80 % methanol as a solvent during 90 minutes regarding CE and 12 minutes concerning MAE at temperature of 69 °C and microwave power of 500 W. In mastic tree leaves extracts obtained by optimal extraction conditions, phenolic profile was determined by using HPLC-DAD and UPLC-MS/MS methods by which the dominant phenolic acid determined was 5-*O*-galloylquinic acid, while myricetin rhamnoside was determined as a dominant flavonol glycoside. Extraction time of 10 minutes, temperature of 43 °C and microwave power of 98 W were the optimal conditions for obtaining the highest mass fractions of total phenols, total flavonoids, total flavonols and total hydroxycinnamic acids when 80 % ethanol was used as a solvent.

MAE has proven to be a very efficient method for the isolation of total phenolic compounds from the mastic tree leaves due to the high extraction yield and shortened extraction time in comparison to CE. Extraction time has significantly influenced the isolation of phenolic compounds efficiency while other parameters did not show a statistically significant influence on the extraction yield.

When using 80 % methanol as a solvent, MAE optimal conditions for obtaining the highest BAM yield were at temperature of 76 °C, microwave power 602 W and extraction time 12 min. Extraction time of 10 minutes at temperature of 43 °C with microwave power of 602 W were the optimal parameters for obtaining the highest mass fractions of total phenols, flavonoids, flavonols and hydroxycinnamic acids when 80 % ethanol was used as a solvent.

In the second part of this research, the influence of pressure on the mastic leaf essential oil yield was researched as well as their antimicrobial activity against gram-negative bacteria *Escherichia coli* strain AB1157 and *Erwinia amylovora* strain EaED by disc-diffusion method. The highest yields obtained by steam distillation were at pressure of 1 bar, and using GC-MS analysis 56 components were identified which represent 99,19 – 100 % of total mastic leaf essential oil among which α -pinene, β -pinene and limonene were determined as dominant. Statistical analysis results indicated that individually location and phenological stage as well as their combined effect had a significant influence on the compound fractions and chemical groups from mastic leaf essential oil.

All essential oil samples exhibited moderate antimicrobial activity against tested gram-negative bacteria, in comparison to antibiotic chloramphenicol, due to the synergistic activity of all mastic tree leaf essential oil compounds.

Key words: mastic tree, conventional extraction, microwave assisted extraction, phenolic compounds, steam distillation, essential oil, antimicrobial activity