SUPERVISION SHEET

PRODUCTION OF SAFE AND VALUABLE FLAVORING COMPOUNDS BY BIOCONVERSION OF ORANGE PEEL OIL

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Food Technology)

By

NASHWA FATHY SAYED MORSY

B.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 1998
M.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 2004

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. ADEL ZAKI MOHAMED AHMED BADEE
Emeritus Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SHAHINAZ AHMED HELMY
Assistant Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

PRODUCTION OF SAFE AND VALUABLE FLAVORING COMPOUNDS BY BIOCONVERSION OF ORANGE PEEL OIL

By

NASHWA FATHY SAYED MORSY

B.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 1998
M.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 2004

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences

(Food Technology)

Department of Food Technology
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2010

APPROVAL SHEET

PRODUCTION OF SAFE AND VALUABLE FLAVORING COMPOUNDS BY BIOCONVERSION OF ORANGE PEEL OIL

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Food Technology)

By

NASHWA FATHY SAYED MORSY

B.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 1998
M.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., 2004

Approval Committee

Dr. MAMDOUH HELMY OSMAN EL-KALYOUBI.....
Emeritus Professor of Food Science, Fac. Agric., Ain Shams University

Dr. NAGWA MOHAMED AHMED EL-SHIMI.....
Emeritus Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SHAHINAZ AHMED HELMY .....
Assistant Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ADEL ZAKI MOHAMED AHMED BADEE.....
Emeritus Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Date: / /

إنتاج مركبات نكهة آمنه وعالية القيمة بواسطة التحويل الحيوى لزيت قشر البرتقال

رسالة مقدمة من

نشوى فتحى سيد مرسى

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (علوم أغذية)-كلية الزراعة-جامعة القاهرة، ١٩٩٨

ماجستير فى العلوم الزراعية (علوم أغذية)- كلية الزراعة-جامعة القاهرة، ٢٠٠٤

للحصول على درجة

دكتوراه الفلسفة

فى

العلوم الزراعية

(صناعات غذائية)

قسم الصناعات الغذائية

كليـة الزراعة

جامعة القاهرة

مصر

٢٠١٠

إنتاج مركبات نكهة آمنه وعالية القيمة بواسطة التحويل الحيوى لزيت قشر البرتقال

رسالة دكتوراه الفلسفة
فى العلوم الزراعية
(صناعات غذائية)

مقدمة من

نشوى فتحى سيد مرسى

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (علوم الأغذية)-كلية الزراعة-جامعة القاهرة، ١٩٩٨

ماجستير فى العلوم الزراعية (علوم الأغذية)- كلية الزراعة-جامعة القاهرة، ٢٠٠٤

لجنة الحكم

دكتور/ ممدوح حلمى عثمان القليوبى .....

أستاذ الصناعات الغذائية المتفرغ - كلية الزراعة- جامعة عين شمس

دكتور/ نجوى محمد أحمد الشيمى .....

أستاذ الصناعات الغذائية المتفرغ - كلية الزراعة- جامعة القاهرة

دكتور / شاهيناز أحمد حلمى .....

أستاذ مساعد الصناعات الغذائية-كلية الزراعة-جامعة القاهرة

دكتور/ عادل زكى محمد أحمد بديع .....

أستاذ الصناعات الغذائية المتفرغ - كلية الزراعة- جامعة القاهرة

التاريخ / /

إنتاج مركبات نكهة آمنه وعالية القيمة بواسطة التحويل الحيوى لزيت قشر البرتقال

رسالة دكتوراه الفلسفة

فى العلوم الزراعية

(صناعات غذائية)

مقدمة من

نشوى فتحى سيد مرسى

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (علوم الأغذية)-كلية الزراعة-جامعة القاهرة، ١٩٩٨

ماجستير فى العلوم الزراعية (علوم الأغذية)- كلية الزراعة-جامعة القاهرة، ٢٠٠٤

لجنة الاشراف

دكتور / عادل زكى محمد أحمد بديع

أستاذ الصناعات الغذائية المتفرغ -كلية الزراعة-جامعة القاهرة

دكتور / شاهيناز أحمد حلمى

أستاذ مساعد الصناعات الغذائية-كلية الزراعة-جامعة القاهرة

Name of Candidate: Nashwa Fathy Sayed Morsy **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis: Production of safe and valuable flavoring compounds by bioconversion of orange peel oil
Supervisors: Dr. Adel Zaki M. A. Badee
Dr. Shahinaz Ahmed Helmy
Department: Food Technology
Approval: / /

ABSTRACT

Orange peel essential oil was extracted by cold pressing method. The obtained yield (%) of orange peel oil was 0.29%. The chemical constituents of the oil were identified by GC⁄MS. Limonene was the main component constituting 96.08%. The orange peel oil was used as a substrate for the bioconversion of d-limonene to α-terpineol by *Penicillium digitatum* NRRL 1202 compared with the bioconversion of pure limonene. The bioconversion assay was carried out by two different media malt yeast broth (MYB) and malt extract broth (MEB). Results indicated that d-limonene decreased sharply during the first 3 hr of bioconversion process in MYB and MEB media.The MYB medium was more efficient than MEB medium through bioconversion of d-limonene to α-terpineol. Hexanal was produced in both sample and control regardless, the time of process. Results showed that increasing the glucose content in the MYB medium to 2% or decreasing malt extract in the same medium to 1% didn't encourage the bioconversion of d-limonene. The highest concentration of α-terpineol (80.08%) was obtained in the biotransformation product extract (BCPE) by decreasing peptone content in MYB medium to 0.5% while increase of MYB medium pH to 7 had a negative effect on the yield of α-terpineol.

The ethanolic solution of α-terpineol rich extract at 2% in ethanol 95% had no antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* and *Aspergillus flavus* using well diffusion method. It had antimicrobial potency against *Candida albicans* at 1% .

The ability of the orange peel oil, BCPE and its major components (α-terpineol, d-limonene, decanal) and BHA, at 0.02% level to inhibit nonsite-specific hydroxyl radical mediated peroxidation was 81.86%, 78.14%, 83.72%, 76.74%, 81.86% and 84.18%, respectively.

LD_{50} of the investigated extract in mice was 1.7 g/Kg BW and 2.3 g/Kg BW by intraperitoneal and oral administration, respectively. Results showed significant increase in liver and kidneys weight (%) of group of mice administered with BCPE at 2 g/Kg BW. No significant differences in the spleen weight % as well as heart weight % were observed between the control group of mice and those administered with BCPE at 2 g/Kg BW. Oral administration of BCPE at the different investigated levels had no significant effect on mice serum glucose, urea and creatinine levels.

Replacing 50% of the commercial soap fragrance with the investigated extract (BCPE) did not significantly reduce toilet soap odor acceptability.Quality attributes of the infused green tea containing 20 ppm BCPE was similar to that of the infused jasmine tea. Results indicated that free radical scavenging activity of infused green tea was 69%, while it reached 72%, 71.4% and 87.31% in infused jasmine tea, infused green tea containing 20 ppm extract and BHA at 200 ppm, respectively.

Key words: Orange peel oil, d-limonene, α-terpineol, bioconversion, toilet soap and infused tea.

ACKNOWLEDGEMENT

In the first place I would like to record my gratitude to ***Dr. Adel Zaki Mohamed Ahmed Badee*** *Emeritus Professor of Food Science, Faculty of Agriculture, Cairo University for his supervision, advice, and guidance from the very early stage of this research as well as giving me extraordinary experiences through out the work. He provided me unflinching encouragement and support in various ways. His truly scientist intuition has made him as a constant oasis of ideas and passions in science. I am indebted to him more than he knows.*

I gratefully acknowledge ***Dr. Shahinaz Ahmed Helmy*** *Assistant Professor of Food Science, Faculty of Agriculture, Cairo University for her advice, supervision, and crucial contribution, which made her backbone of this research and so to this thesis. I am much indebted to her for her tremendous help. I feel extremely fortunate to pursue my Ph.D. under her guidance.*

I wish to express my sincere thanks and appreciation to ***Dr. Fathy Shaarawy*** *General Manager of Greatco Company for providing authentic samples and support.*

DEDICATION

I dedicate this work to my father, my mother and my brother for their patience, kindness and encouragement through out the period of my post graduation.

اسم الطالب: نشوى فتحى سيد مرسى **الدرجة:** دكتوراه الفلسفة

عنوان الرسالة: إنتاج مركبات نكهة آمنه و عالية القيمة بواسطة التحويل الحيوى لزيت قشر البرتقال

المشرفون : دكتور : عادل زكى محمد أحمد بديع
دكتور : شاهيناز أحمد حلمى
قسم: الصناعات الغذائية **تاريخ منح الدرجة:** / /

المستخلص العربي

تم استخلاص الزيت العطرى لقشر ثمارالبرتقال بالضغط على البارد و قد بلغت نسبة الزيت التى تم الحصول عليها ٠,٢٩% و بتقدير مكونات الزيت باستخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى و طيف الكتلة تبين أن مركب الدى-ليمونين هو المكون الاساسى له حيث بلغت نسبته ٩٦,٠٨%. و قد تم استخدام زيت قشر البرتقال كمادة خام فى عملية التحول الحيوى لليمونين الى الفا تربينيول.باستخدام فطر *Penicillium digitatum* NRRL 1202 مقارنة بالتحول الحيوى لليمونين النقى. و قد اجريت عملية التحول الحيوى باستخدام بيئتين ميكروبتين هما مرق مولت الخميرة MYB و بيئة مرق مستخلص المولت MEB .

و قد أوضحت النتائج انخفاض واضح فى تركيز الليمونين خلال ال ٣ ساعات الاولى من عملية التحول الحيوي باستخدام اى من البيئتين. كما كانت بيئة MYB اكثر كفاءة من MEB خلال عملية التحول الحيوى لليمونين الى الفا تربينيول.بالاضافة الي تكون الهكسانال فى كل من العينات و التجربة المقارنة بغض النظر عن زمن عملية التحول الحيوى.

أشارت النتائج الى أن زيادة تركيز الجلوكوز فى بيئة MYB الى ٢% او انخفاض مستخلص المولت فى نفس البيئة الى ١% لم يشجعا عملية التحول الحيوى لليمونين. تم الحصول على اعلى نسبة من الفا تربينيول (٨٠,٠٨%) فى المستخلص الناتج من عملية التحول الحيوى بخفض تركيز البتون فى بيئة MYB الى ٠,٥ % بينما ادى تغير الرقم الهيدروجينى فى البيئة الى ٧ الى تاثير سلبى على كمية الالفاتربينيول الناتج.لم يكن للمستخلص الناتج من عملية التحول الحيوى تاثير مثبط على نشاط ميكروبات *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Aspergillus flavus* عند استخدامه بتركيز ٢% بينما كان له فاعلية كمضاد لنشاط *Candida albicans* عند استخدامه بتركيز ١%.

أظهرت النتائج أن استخدام اى من زيت قشر البرتقال، المستخلص الناتج من عملية التحول الحيوى و مكوناته الرئيسية (الفا تربينيول ، الدى ليمونين، الديكانال) و ال BHA بتركيز ٠,٠٢% كان لها تاثيرات مضادة للاكسدة بلغت ٨١,٨٦%، ٧٨,١٤%، ٨٣,٧٢%، ٧٦,٧٤%، ٨١,٨٦%، ٨٤,١٨% على التوالى. كذلك بلغت قيمة الجرعة القاتلة (LD_{50}) ل ٥٠% من فئران التجارب الصغيرة Mice ١,٧ جم /كجم من وزن الجسم ، ٢,٣ جم /كجم من وزن الجسم عند تناول الجرعة فى الغشاء البريتونى او بالفم على الترتيب. أوضحت النتائج حدوث زيادة معنوية فى % لوزن الكبد و الكلى فى الحيوانات التى تم اعطائها جرعة مقدارها ٢ جم /كجم من وزن الجسم. بينما لم يلاحظ حدوث اختلاف معنوى فى % لوزن الطحال بين فئران مجموعة المقارنة و تلك التى تناولت جرعة من المستخلص الناتج من عملية التحول الحيوى لليمونين بنفس الجرعة . لم يتاثر مستوى كل من الجلوكوز و اليوريا و الكرياتنين فى سيرم دم الفئران عند تناولها الجرعات محل الدراسة من المستخلص الناتج عن طريق الفم. كما وجد أن استبدال ٥٠% من مخلوط الرائحة المستخدمة فى صناعة صابون التواليت بالمستخلص الناتج من عملية التحول الحيوى لليمونين لم يؤثر بدرجة معنوية على قبول رائحة الصابون الناتج كما كانت صفات الجودة لمستخلص الشاى الاخضر المضاف اليه المستخلص محل الدراسة بتركيز ٢٠ جزء فى المليون مماثلة لتلك المميزة للشاى برائحة الياسمين. اوضحت النتائج أن مقدرة مستخلص الشاى الاخضر على التخلص من الشقوق الحرة بلغت ٦٩% بينما بلغت ٧٢% و٧١,٤% و ٨٧,٣ % فى مستخلص الشاى الاخضر برائحة الياسمين ومستخلص الشاى الاخضر المضاف اليه المستخلص الناتج من عملية التحول الحيوي لليمونين بتركيز ٢٠ جزء فى المليون مقارنة ب BHA بتركيز ٢٠٠ جزء فى المليون على التوالى.

الكلمات الدالة: زيت قشر البرتقال ، الدى ليمونين، الفا تربينيول، عملية التحول الحيوى، صابون تواليت و شاى برائحة الياسمين.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**5**
1. Chemical composition of orange peel	**5**
2. Physicochemical properties of orange peel oil	**6**
3. Chemical constituents of orange peel oil	**7**
4. Bioconversion of d-limonene	**14**
5. Antimicrobial activity of products containing α-terpineol	**27**
6. Antioxidant activity of materials containing α-terpineol	**34**
7. Oxidation of d-limonene by air	**42**
8. Biological evaluation of α-terpineol	**42**
9. Applications	**47**
a. The applications of bioconversion extract rich in α-terpineol	**48**
1. Utilization of bioconversion product extract as a flavoring material	**48**
2. Utilization of bioconversion product extract as a fragrance	**50**
MATERIALS AND METHODS	**53**
1. Materials	**53**
a. Orange fruits and chemicals	**53**
b. Microorganisms	**53**
c. Media	**54**
2. Methods	**56**
a. Extraction of orange peel oil	**56**
b. Chemical composition of the orange peel	**56**
c. Physicochemical properties of orange peel oil	**57**
d. Gas chromatography analysis	**57**
e. Gas chromatography -Mass Spectrometry	**58**
f. Bioconversion process	**59**
g. Antimicrobial activity of the bioconversion product extract	**62**
h. Antioxidant capacity of the bioconversion product extract	**63**
i. Air oxidation of d-limonene	**65**
j. Biological evaluation of the bioconversion product extract	**65**
k. Application of the produced extract	**77**

l. Statistical analyses 78
RESULTS AND DISCUSSION 79
1. Chemical composition of orange peel 79
2. Physico-chemical properties of orange peel volatile oil 80
3. Chemical constituents of orange peel essential oil 81
4. Effect of bioconversion media and time on the yield of α-terpineol from orange peel oil 85
a. Malt Yeast Broth (MYB) medium 85
b. Malt Extract Broth (MEB) medium 95
5. Effect of bioconversion media and time on the yield of α-terpineol from d-limonene 109
a. MYB medium 109
b. MEB medium 121
6. Effect of microbial medium composition on the bioconversion of d-limonene from orange peel oil and yield of α-terpineol 133
7. The antimicrobial effect of bioconversion product extract 144
8. Antioxidant activity of bioconversion product extract 146
a. The DPPH radical-scavenging assay 147
b. Nonsite-specific hydroxyl radical mediated 2-deoxy-D-ribose degradation assay 149
9. Oxidation of d-limonene by air 151
10. Biological evaluation of bioconversion product extract (BCPE) 154
a. Acute toxicity (LD_{50}) of the bioconversion product extract (BCPE) 154
b. The biological and physiological effects of BCPE on experimental mice 157
11. Application of BCPE in food and fragrances formulation 170
a. Consumer acceptance of toilet soap scented with BCPE 170
b. Sensory assessment of various tea samples 171
12. DPPH radical-scavenging activity (%) of green tea containing 20 ppm extract 173
SUMMARY 175
REFERENCES 183
ARABIC SUMMARY

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
1.	Area harvested and production of oranges in Egypt	2
2.	Variables and levels changed in the screening design of medium composition	62
3.	Composition of the control diet (g/100g diet).	67
4.	Salt mixture composition (g/Kg mixture)	67
5.	Composition of vitamin mixture (g/Kg starch).	68
6.	Chemical composition of orange peel (dry weight basis)	79
7.	Physico-chemical properties of orange peel oil	81
8.	Chemical constituents of orange peel oil by GC/MS	83
9.	The bioconversion of d-limonene (from orange peel oil) by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt yeast broth (MYB) medium as affected by time (after the second addition)	86
10.	The bioconversion of d-limonene (from orange peel oil) by Penicillium digitatum 1202 NRRL in malt yeast broth (MYB) medium as affected by time (after the fourth addition)	90
11.	Bioconversion (%) of limonene (from orange peel oil) and yield of α-terpineol by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt yeast broth (MYB)	95
12.	The bioconversion of d-limonene (from orange peel oil) by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt extract broth (MEB) medium as affected by time (after the second addition)	97
13.	The bioconversion of d-limonene (from orange peel oil) by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt extract broth (MEB) medium as affected by time (after the fourth addition)	102

14. Bioconversion % of limonene (from orange peel oil) and yield of α-terpineol by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt extract broth (MEB). 106
15. The bioconversion of d-limonene by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt yeast broth (MYB) as affected by time after the second addition of bioconversion. 111
16. The bioconversion of d-limonene by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt yeast broth (MYB) as affected by time after the fourth addition of bioconversion. 116
17. Bioconversion (%) of d-limonene and yield of α-terpineol by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt yeast broth (MYB). 121
18. The bioconversion of d-limonene by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt extract broth (MEB) as affected by time (after the second addition). 122
19. The bioconversion of d-limonene by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt extract broth (MEB) as affected by time (after the fourth addition). 127
20. Bioconversion (%) of d-limonene and yield of α-terpineol by *Penicillium digitatum* 1202 NRRL in malt extract broth (MEB) 132
21. Effect o MYB medium constituents and pH value on the bioconversion products of d-limonene (from orange peel oil) by *P. digitatum* after 7 h from the fourth addition..... 135
22. Bioconversion (%) of d-limonene (from orange peel oil) and yield of α-terpineol by *Penicillium digitatum* NRRL 1202 as affected by changes of MYB constituents and pH 136
23. Antimicrobial effect (inhibition zone in mm) of α-terpineol rich extract concentrations 145
24. Free radical-scavenging activities (%) of orange peel oil, its biotransformation extract and its major individual components at different concentrations (%) using DPPH assay 147