

Razvoj lipazom katalizirane sinteze (R)-feniletanola u prirodnom eutektičkom otapalu

Maros, Izabela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:475934>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2020.

Izabela Maros

1021/MB

**Razvoj lipazom katalizirane sinteze
(*R*)-1-feniletanola u prirodnom
eutektičkom otapalu**

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Razvoj lipazom katalizirane sinteze (*R*)-feniletanola u prirodnom eutektičkom otapalu

Izabela Maros, 1021/MB

Sažetak: Mnogi industrijski procesi koriste velike količine hlapivih, zapaljivih i toksičnih organskih otapala što rezultira onečišćenjem prirode i narušavanjem ekološke ravnoteže. Prirodna eutektička otapala pripadaju novoj generaciji nehalapljivih i stabilnih otapala te su se pokazala su se kao dobra zamjena za tradicionalna organska otapala u kemijskoj i biotehnološkoj industriji. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene nekoliko prirodnih eutektičkih otapala u enantioselektivnoj hidrolizi (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata uz lipazu B kao biokatalizator za pripremu komercijalno zanimljivog kiralnog alkohola (*R*)-feniletanola. Prirodna eutektička otapala pokazala su se povoljnim otapalima za ispitivanu hidrolizu obzirom na ispitane parametre, pri čemu se otapalo kolin-klorid:etilen glikol pokazalo najpovoljnijim. Optimiranjem reakcijskih uvjeta pronađeni su optimalni uvjeti za hidrolizu, a koji se odnose na omjer enzima i supstrata, temperaturu i udio vode. Osim toga provedena je reciklacija enzima i otapala čime se pokazala mogućnost njihove ponovne upotrebe. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako je primjena biokatalize i prirodnih eutektičkih otapala vrlo učinkovita, ekološki i ekonomski prihvatljiva metoda za proizvodnju (*R*)-1-feniletanola.

Cljučne riječi: biokataliza, lipaza, prirodna eutektička otapala, (*R*)-1-feniletanol, zelena kemija

Rad sadrži: 42 stranice, 10 slika, 8 tablica, 33 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*
2. Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo*
3. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*
4. Izv.prof.dr.sc. *Senka Djaković (zamjena)*

Datum obrane: 09. lipnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Development of lipase-catalyzed synthesis of (*R*)-phenylethanol in a natural deep eutectic solvent

Izabela Maros, 1021/MB

Abstract: Many industrial processes use large quantities of volatile, flammable and toxic organic solvents resulting in pollution of nature and disturbance of ecological balance. Natural deep eutectic solvents belong to the new generation of non-volatile and stable solvents, and are intensively studied as a replacement for organic solvents in chemical and biotechnological industry. This study examines the possibility of using several natural deep eutectic solvents for enantioselective hydrolysis of (*R, S*)-1-phenylethyl acetate with lipase B as biocatalyst for the preparation of a commercially interesting chiral alcohol (*R*)-phenylethanol. All enantioselective reactions in natural deep eutectic solvents were successfully conducted according to all tested parameters, where solvent choline chloride:ethylene glycol was found to be the best choice for reaction tested. The reaction conditions were optimized according to ratio of enzyme and substrate, temperature and water content. In addition, the recycling of enzymes and solvents was carried out, demonstrating the possibility of their reuse. Based on the results obtained, it can be concluded that the application of biocatalysis and natural deep eutectic solvents could be very efficient, environmentally and economically acceptable method for the production of (*R*)-1-phenylethanol.

Keywords: biocatalysis, lipase, natural deep eutectic solvents, (*R*)-1-phenylethanol, green chemistry

Thesis contains: 42 pages, 10 figures, 8 tables, 33 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

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

Technical support and assistance: *Manuela Panić, PhD.*

Reviewers:

1. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
2. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
3. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
4. PhD. *Senka Djaković*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 09 June 2020

Sadržaj	
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Zelena kemija	2
2.1.1. Principi zelene kemije	3
2.1.2. Parametri zelene kemije i održivosti	4
2.1.3. Smjerovi zelene kemije	6
2.2. Biokataliza	7
2.2.1. Značaj biokatalize u zelenoj kemiji	7
2.2.2. Biokatalizatori u biokatalitičkim procesima	8
2.3. Mikrobne lipaze: svojstva i industrijska primjena	9
2.3.1. Svojstva i struktura lipaza	9
2.3.2. Klasifikacija lipaza	10
2.3.3. Primjena lipaza	11
2.4. Prirodna eutektička otapala kao medij za biokatalizu	12
2.4.1. Priprava eutektičkih otapala	12
2.4.2. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Enzimski preparat	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Oprema i uređaji	15
3.2. Metode	16
3.2.1. Priprema i karakterizacija prirodnih eutektičkih otapala	16
3.2.2. Hidroliza (<i>R, S</i>)-1-feniletil-acetata katalizirana lipazom	18
3.2.3. Određivanje koncentracije (<i>R</i>)-1-feniletanola	20
3.2.4. Optimiranje hidrolize (<i>R, S</i>)-1-feniletil-acetata u ChEG	22
3.2.5. Plan pokusa za optimiranje hidrolize (<i>R, S</i>)-1-feniletil-acetata i obrada podataka	22
3.2.6. Reciklacija i ponovna uporaba enzima	24
3.2.7. Izolacija (<i>R</i>)-1-feniletanola iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala	24
3.2.8. Hidroliza (<i>R, S</i>)-1-feniletil-aceta u ChEG _{50%} na preparativnoj skali	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Priprava i probir otapala	28
4.2. Optimizacija procesa u laboratorijskom mjerilu	31
4.3. Izdvajanje i reciklacija enzima	34
4.4. Izolacija produkta i reciklacija otapala	35
4.5. Prijenos reakcije u veće mjerilo	36
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Razvoj industrijske proizvodnje, s jedne strane donosi gospodarski razvitak koji se očituje u značajnom povećanju životnog standarda, no s druge strane uzrokuje onečišćenje prirode i narušavanje ekološke ravnoteže. Suočeni s problemom onečišćenja okoliša, znanstvenici su tijekom posljednjih nekoliko desetljeća krenuli intenzivnije razmišljati o načinima njegovog očuvanja. Unutar grane kemije, koja se naziva zelena kemija, istražuju se novi, sigurniji i energetski učinkovitiji procesi proizvodnje i primjene kemikalija koji se zasnivaju na kompromisu između ekonomskih, socijalnih i ekoloških zahtjeva. Jedno od ključnih pitanja su ekološki prihvatljiva zelena otapala koja bi zamijenila opasna organska otapala čija je upotreba široko rasprostranjena. Prema smjernicama zelene kemije idealno otapalo trebalo bi biti jednostavno za upotrebu, kemijski i fizički stabilno, niske hlapljivosti te jednostavno za recikliranje uz mogućnost ponovne uporabe. Pored korištenja zelenih otapala, cilj zelene kemije je i provođenje biološke pretvorbe organskih spojeva primjenom enzima ili cijelih stanica. Pri tome je jako važna proizvodnja enantiomerno čistih spojeva budući da su lijekovi s jednom vrstom enantiomera postali standardna potreba u farmaceutskim kompanijama. Naime, enantiomeri pojedinog kiralnog lijeka mogu se značajno razlikovati u biološkom učinku, kao i po njihovoj bioraspoloživosti, brzini metabolizma, izlučivanju, toksičnosti te selektivnosti za receptore/enzime/transportne proteine. Stoga kemijska i biotehnološka industrija nastoje razviti različite metode za proizvodnju biološki aktivnih kiralnih spojeva visoke enantiomerne čistoće.

Upotreba niskotoksičnih, zelenih otapala u pripravi komercijalno zanimljivih kiralnih spojeva primjenom enzima korisna je dakle s ekološkog i ekonomskog stajališta te zbog toga predstavlja temu rastućeg zanimanja u istraživačkom i kemijskom području.

Cilj ovoga rada je ispitati mogućnosti korištenja prirodnih eutektičkih otapala u enantioselektivnoj hidrolizi (*R, S*)-1-feniletil-acetata uz primjenu lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antarctica* kao biokatalizatora te ispitati utjecaj procesnih parametara na ishod reakcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA KEMIJA

Početak osamdesetih znanstvenici su se počeli baviti problemom nastanka velikih količina otpada u farmaceutskoj industriji i industriji finih kemikalija. Naime, istraživanja su pokazala da se u procesu proizvodnje finih kemikalija, farmaceutskih intermedijera i pojedinih kemikalija koje se proizvode u velikom mjerilu (eng. *bulk chemicals*) proizvede desetine kilograma otpada po kilogramu produkta. Krajem osamdesetih, kao rezultat povećanja svijesti o važnosti zaštite okoliša naglasak se postupno prebacio na sprječavanje nastajanja otpada umjesto zbrinjavanje otpada i nadzora onečišćenja otopinama. Američki zakon o sprječavanju onečišćenja iz 1990. godine usredotočio je pažnju na potrebu smanjenja zagađenja okoliša i prepoznao da sprječavanje nastajanja otpada ne samo da eliminira troškove njegove obrade nego jača ekonomsku konkurentnost učinkovitijim korištenjem sirovina. To je dovelo do temeljnog pomaka u planu Američke agencije za zaštitu okoliša (U.S. Environmental Protection Agency – EPA) sa tretiranja otpada na sprječavanja njegovog nastajanja što je dovelo do uvođenja pojma zelene kemije 1990-ih (Sheldon, 2017).

Prema definiciji Američke agencije za zaštitu okoliša (EPA-e) zelena kemija je program za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili eliminiraju uporabu, odnosno proizvodnju tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš. Izraz je službeno priznat objavom dvanaest principa zelene kemije koje su napisali Anastas i Warner 1988. godine. Ukratko, zelena kemija učinkovito koristi (po mogućnosti) obnovljive sirovine, uklanja otpad i izbjegava upotrebu toksičnih i/ili opasnih reagensa i otapala u proizvodnji i primjeni kemijskih proizvoda. U posljednjih 25 godina taj koncept ima veliki utjecaj na industriju te poprima sve veću važnost u industrijskim i akademskim krugovima (Sheldon, 2017).

Danas se zelena kemija smatra alatom za uvođenje održivih koncepata na temeljnoj razini i stoga je usmjerena na stvaranje novih procesa, produkata i pravaca umjesto poboljšavanje postojećih (Clarke i sur., 2018).

2.1.1. Principi zelene kemije

Principi zelene kemije temelje se dakle na 12 načela kojima je cilj smanjiti ili eliminirati upotrebu ili nastanak štetnih spojeva te povećati iskoristivost procesa. Usmjereni su na upotrebu alternativnih sintetskih i reakcijskih putova te osmišljavanje ekološki prihvatljivih kemikalija a mogu se sažeti kao što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Načela zelene kemije (Anastas i Warner, 1998)

1 Sprječavanje nastajanja otpada Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao.	5 Primjena sigurnijih pomoćnih sredstava Uporabu pomoćnih sredstava (npr. otapala, sredstava za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim.	9 Primjena katalitičkih reagensa Selektivni katalitički reagensi prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama.
2 Ekonomija atoma Sintetske metode moraju se osmisliti na način da se omogući maksimalna ugradnja sirovina u konačan proizvod.	6 Osmišljavanje ekonomske učinkovitosti Energetski zahtjevi trebaju se svesti na minimum (npr. provođenje reakcija na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku).	10 Osmišljavanje razgradnje produkata Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš.
3 Ekološki prihvatljiva kemijska sinteza Sintetske metode moraju se osmisliti na način da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i okoliš.	7 Primjena obnovljivih sirovina Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo.	11 Sprječavanje onečišćenja Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.
4 Ekološki prihvatljivi proizvodi Kemijski proizvodi moraju biti niske toksičnosti uz zadovoljavajuću djelotvornost.	8 Izbjegavanje nepotrebnih proširenja procesa Nepotrebna derivatizacija (npr. uvođenje zaštitnih skupina, privremena modifikacija spojeva) treba se svesti na minimum (nastajanje otpada).	12 Sprječavanje štetnih posljedica U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (npr. eksplozija, požar i štetno isparavanje).

Prilikom osmišljavanja procesa zelene kemije nemoguće je istodobno maksimalno udovoljiti zahtjevima svih 12 načela zelenog procesa, ali se tijekom pojedinih stupnjeva sinteze pokušava primijeniti što veći broj načela (Jukić i sur., 2004).

2.1.2. Parametri zelene kemije i održivosti

Poboljšanja u održivosti svih procesa, uključujući i biokatalitičke, moraju biti kvantitativno izmjerena. Ako nije moguće izmjeriti održivost procesa, nije moguće usporediti ga i definirati ciljeve za njegovo poboljšanje. Osim toga industrijska primjena zahtijeva kvantitativne mjere za ocjenu poboljšanja procesa kako bi se opravdala ulaganja. Dva najstarija zelena parametra su atomska ekonomičnost i E-faktor koji su prvi puta predloženi 1991. i 1992. godine (Sheldon i Woodley, 2018).

Faktor utjecaja na okoliš

Faktor utjecaja na okoliš ili E-faktor (eng. *Environmental factor, E-factor*), vrijednost je koja ukazuje na nastalu količinu otpada u kilogramima po jednom kilogramu nastalog produkta. Dakle, prikazuje stvarni iznos otpada proizveden u procesu. U obzir se uzima prinost proizvoda zajedno s otpadom iz svih pomoćnih operacija, na primjer gubici otapala i kemikalije korištene u obradi. Visoki E-faktor znači više otpada i prema tome negativan utjecaj na okoliš. Što je vrijednost E-faktora manja to je proces zeleniji, a idealni E-faktor je nula. Može se izračunati za određeni proizvod, proizvodno mjesto ili čak za cijelu tvrtku. Mana E-faktora je što ne ukazuje na vrstu otpada koja nastaje, stoga troškovi zbrinjavanja otpada između dva procesa sa istim vrijednostima E-faktora, mogu znatno varirati (Sheldon i Woodley, 2018).

$$E\text{-faktor} = \frac{\text{ukupna masa proizvedenog otpada}}{\text{ukupna masa proizvedenog produkta}} [1]$$

Atomska ekonomičnost

Atomska ekonomičnost (eng. *Atom efficiency, AE*) je teoretski broj koji predstavlja omjer molekulske mase produkta i molekulske mase svih tvari u stehiometrijskoj jednadžbi reakcije. Tvari koje se ne pojavljuju u stehiometrijskoj jednadžbi poput otapala i pomoćnih kemikalija koji se koriste za reciklaciju proizvoda se zanemaruju. Mana ovog parametra je što ne uzima u obzir stvarnu masu produkata i iskorištenje reakcije, stoga može doći do pogreške prilikom interpretacije rezultata (Dunn i sur., 2010). Bez obzira na to, atomska ekonomičnost je koristan parametar za početnu procjenu održivosti procesa prije izvođenja eksperimenata, upotrebe resursa i povezanog nastanka otpada u alternativnim načinima dobivanja ciljanog produkta (Sheldon i Woodley, 2018).

$$AE = \frac{\text{molekulska masa željenog produkta}}{\text{molekulska masa svih produkata}} \cdot 100 [2]$$

Reakcijska masena učinkovitost

Reakcijska masena učinkovitost (eng. *Reaction Mass Efficiency, RME*) uvedena je kako bi se poboljšao parametar atomske ekonomičnosti. U obzir se uzimaju stvarne mase svih reagensa i iskorištenje procesa (Sheldon i Woodley, 2017). Ovaj parametar je bolji jer uzima stvarne mase te je time uključeno i iskorištenje. No, problem je što pod masu reaktanata ne uzima masa otapala, kiselina i baza korištenih za neutralizaciju nusprodukata (Dunn i sur., 2010).

$$RME = \frac{\text{masa produkta}}{\text{masa svih reaktanata}} \cdot 100 \quad [3]$$

Maseni intenzitet, odnosno procesni maseni intenzitet

Maseni intenzitet (eng. *Mass Intensity, MI*) je ukupna masa (uključujući vodu) korištena u procesu podijeljena s masom produkta ($MI = E\text{-faktor} + 1$). Farmaceutski okrugli stol instituta za zelenu kemiju preimenovao ga u procesni maseni intenzitet (eng. *Process Mass Intensity, PMI*) kako bi se mjerili okolišni tragovi procesa za aktivne farmaceutske sastojke (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient, API*) i kako bi koristili te podatke za pokretanje zelenog procesa u farmaceutskoj industriji (Sheldon i Woodley, 2017). Parametar opisuje količinu materijala potrebnu za sintezu jednog kilograma produkta. U obzir uzima iskorištenje reakcije, stehiometriju, otapala i reagense, a u izračun ulaze i otapala korištena u separacijskim metodama. Fokus je stavljen na samu reakciju (materijali koji ulaze u proces, eng. *input*), a ne na nastali otpad (eng. *output*). Maseni intenzitet je stoga izuzetno koristan prilikom optimizacije procesa (Dunn i sur., 2010).

$$MI = \frac{\text{ukupna masa svih korištenih sirovina}}{\text{masa produkta}} \quad [4]$$

Idealni *PMI* je 1 i naglašava učinkovitost resursa, dok je idealni *E-faktor* 0 te naglašava količinu nastalog otpada što možda jasnije odražava krajnji cilj smanjenja otpada u industriji (Sheldon i Woodley, 2018).

Analiza životnog ciklusa

Analiza životnog ciklusa (eng. *Life Cycle Assessment, LCA*) je metoda dizajnirana za procjenu okolišnog utjecaja produkta u svim stadijima njegova života, od vađenja sirovina do prerade materijala za distribuciju, upotrebu, odlaganje ili recikliranje. U obzir uzima potrebne

materijale i energiju za proizvodnju reaktanata te posljedice i tretiranje otpada iz nastale reakcije. LCA se određuje na temelju mjerljivih pokazatelja utjecaja na okoliš poput potrošnje energije, globalnog zagrijavanja, oštećenja ozonskog omotača, zakiseljavanja, eutrofikacije, stvaranje smoga i ekotoksičnosti (Sheldon i Woodley, 2018). Ovakva detaljna analiza je izuzetno važna jer može otkriti propuste drugih metoda (npr. ako se koristi tvar koja je iz obnovljivih izvora, druge metode dati će pozitivne rezultate no procjena životnog ciklusa će uzeti u obzir da su prilikom uzgoja biljke iz koje se ta tvar dobiva upotrijebljena dodatna sredstva kao što su herbicidi i umjetna gnojiva koji imaju loš utjecaj na okoliš). Problem ove metode je upravo u njenoj opširnosti jer zahtjeva obradu velikog broja podataka iz različitih izvora te nedostatak informacija za neke početne sirovine što dodatno komplicira procjenu (Dunn i sur., 2010). Neke farmaceutske tvrtke su implementirale procjenu životnog ciklusa u odabir početnih sirovina i otapala, no i dalje su potrebni dodatni naponi kako bi se metoda potpuno razvila i kako bi se od nje napravio moćan alat za donošenje odluka koje će dovesti do što održivijeg i zelenijeg farmaceutskog procesa (Dunn i sur., 2010).

2.1.3. Smjerovi zelene kemije

Za postizanje zelenih uvjeta u kemijskim procesima koriste se različiti smjerovi pa se tako u kemijskim procesima primjenjuju katalitičke i biokatalitičke reakcije (heterogena i homogena kataliza), reakcije u zelenim alternativnim medijima (npr. voda, superkritični fluidi, ionske kapljevine i eutektička otapala) i/ili reakcije u različitim reakcijskim uvjetima (npr. reakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima, fotokatalitičke reakcije). Takvi trendovi otvaraju put ekološki i ekonomski prihvatljivom razvoju kemijskih procesa i omogućavaju ostvarenje ciljeva zelenog programa (Hernández i sur., 2010).

Značaj katalize je vrlo bitan i primjenjuje se u industrijskim procesima, proizvodnji goriva, zaštiti okoliša i dr., dok biokataliza ima obećavajuće rezultate kada se promatra kroz načela zelene kemije osobito u kombinaciji sa upotrebom niskotoksičnih, zelenih otapala. Iz toga je vidljivo da se zamjenom nekih koraka kemijske sinteze s odgovarajućim biokatalitičkim korakom povećava zeleni karakter cjelokupnog procesa (Hernández i sur., 2010).

2.2. BOKATALIZA

Biokataliza je transformacija tvari kemijskog ili biološkog podrijetla primjenom enzima ili cijelih stanica dobivenih iz živih organizama. Na temelju principa i parametara zelene kemije i održivog razvoja, biokataliza pripada i zelenoj i održivoj tehnologiji što je rezultat izvanrednog napretka u molekularnoj biologiji i biotehnologiji u zadnja dva desetljeća. Prije dvadeset i pet godina bilo je neophodno modificirati cijeli proces koji će pristajati dostupnom enzimu. Danas je izvedivo optimirati enzim koji će pristajati dizajniranom procesu. Proteinsko inženjerstvo omogućilo je optimizaciju postojećih enzima i pronalazak potpuno novih biokatalitičkih reakcija koje su do sada bile nepoznate u prirodi. Zbog toga je danas relativno jednostavno dizajniranje enzimskih transformacija koje će se uklopiti u definirane parametre rezultirajući tako procesima koji su uistinu održivi (Sheldon i Woodley, 2018).

Biokataliza se razvila u industrijski privlačnu tehnologiju i integrirana je u glavne procese organske sinteze te zbog toga ima veoma važnu ulogu u proizvodnji lijekova i drugih kemikalija. Štoviše, u budućnosti se očekuje šira primjena s obzirom na poticanje razvoja ekonomije na biološkoj osnovi (Sheldon i Woodley, 2018).

2.2.1. Značaj biokatalize u zelenoj kemiji

Široka upotreba biokatalitičkih metoda posljedica je njihovih ekonomskih i ekoloških koristi. Katalizator (enzim) proizvodi se iz dostupnih obnovljivih izvora, biorazgradiv je, neopasan i netoksičan. Primjenom biokatalize izbjegava se upotreba anorganskih reagensa u organskoj sintezi koji su glavni uzrok otpada, naročito u proizvodnji finih kemikalija i lijekova te dodatnih troškova njihovog uklanjanja od konačnih proizvoda. Uz to, zbog molekularne kompleksnosti većine lijekova njihova sinteza uključuje višestupanjsku sintezu koja proizvodi mnogo više otpada nego sinteza nekih jednostavnijih molekula (Sheldon i Woodley, 2018). Takvi procesi rezultiraju osobito visokim E-faktorom u odnosu na ostale industrijske sektore. Rješenje problema stoji u zamjeni takvih procesa sa katalitičkim alternativama. Enzimske reakcije provode se pod blagim reakcijskim uvjetima, u vodi i često bez potrebe aktivacije funkcionalnih skupina, njihove zaštite i uklanjanja zaštite. To doprinosi procesima koji su ekonomični u više koraka i proizvode manje otpada nego konvencionalna organska sinteza. Osim toga, procesi s izoliranim enzimima mogu biti provedeni u standardnim reaktorima čime se izbjegava potreba za dodatnim ulaganjima kao što je visokotlačna oprema. Budući da su enzimski procesi generalno vođeni pod približno istim procesima temperature i tlaka relativno je lako integrirati višestruke transformacije u ekonomski i ekološki prihvatljivim kaskadnim procesima.

U tablici 2 prikazane su glavne uloge biokatalize koje doprinose smanjenju E-faktora, zamjeni opasnih reagensa i organskih otapala te razvoju ekološki prihvatljivih procesa (Woodley, 2008).

Tablica 2. Značaj biokatalize u zelenoj kemiji (Woodley, 2008)

Biokataliza	Značaj
Djeluje u vodi	Zamjena organskih otapala
Ima visoko selektivnu katalizu uključujući regio i stereoselektivnost	Smanjenje E-faktora
Djeluje u blažim uvjetima izbjegavajući potrebu za zaštitom	Smanjenje E-faktora
Prevladava uporabu nekih opasnih materijala	Poboljšan LCA
Koristi obnovljive resurse	Poboljšan LCA
Svojstva biokatalizatora mogu se mijenjati kako bi se prilagodili procesu	Poboljšana jednostavnost obrade
Rijetko je egzoterman ili endoterman proces	Smanjenje energetske potrebe
Daje visoki prinos kao rezultat selektivnosti i blagih uvjeta	Bolja učinkovitost obrade

2.2.2. Biokatalizatori u biokatalitičkim procesima

Biokataliza nudi velike prednosti te se zbog toga danas veliki naglasak stavlja na biološki posredovanim kemijskim reakcijama više poznatim kao biokonverzije – reakcije katalizirane enzimima. Enzimi se u reakcijama mogu nalaziti u slobodnom ili imobiliziranom obliku te unutar žive stanice. U biokatalitičkim reakcijama djeluju kao biokatalizatori koji su po definiciji tvari koje ubrzavaju kemijsku reakciju, ali sami se pritom ne mijenjaju i nemaju utjecaj na promjenu standardne Gibbsove energije kemijske reakcije. Opseg biokonverzije je vrlo širok i razvrstava se u dva glavna tipa: biokonverzija pomoću cijelih stanica povezana s rastom (fermentacija) i biokonverzija pomoću enzima (izolirani enzimi ili imobilizirani enzimi) (Sheldon i Woodley, 2018).

Cijele stanice

Za produkciju željenog proizvoda koristi se cijeli mikroorganizam. Supstrat se koristi za proizvodnju biokatalizatora, njegovo održavanje i provođenje reakcije od interesa, a produktivnost je povezana sa stopom rasta stanice (Sheldon i Woodley, 2018). Cijele stanice koriste se kada je

neki enzim teško izolirati ili je nestabilan izvan svog prirodnog okoliša. Kataliza se odvija u stanici, a željeni proizvod se iz nje ekstrahira. Iako je prednost upotrebe cijelih stanica korištenje jeftinijih sirovina te nije potrebna regeneracija kofaktora, sa sobom nosi i niz nedostataka. U prvom redu to je skupa proizvodna oprema te dugotrajnost proizvodnog procesa čija produktivnost naposljetku može biti niska. Također, tijekom rasta stanice nastaju i drugi metabolički produkti od kojih je ponekad teško odvojiti željeni proizvod.

Izolirani enzimi

Podrazumijeva primjenu enzima izvan stanice u kojoj su proizvedeni. Ovaj pristup nastoji prevladati ograničenja difuzije supstrata u stanicu i produkta izvan stanice. U takvim slučajevima enzim se izlučuje tijekom fermentacije izvan stanice ili se stanice moraju razbiti nakon fermentacije kako bi se proizveo topljivi, iako nepročišćeni enzim čime se smanjuju troškovi pročišćavanja (Sheldon i Woodley, 2018). Budući da su cijene enzima takve da je obično neophodna njihova reciklacija, za biokatalitičke reakcije najčešće se koriste imobilizirani enzimi. Enzim je imobiliziran obično na čvrsti sferični nosač ili unutar porozne podloge kako bi se olakšalo njegovo uklanjanje od produkta jednostavnom filtracijom. Mnogi procesi odvijaju se s višestrukim reciklacijama kako bi se smanjili troškovi, a dodatna prednost imobilizacije je vezanje enzima u stabilnijem obliku (Sheldon i Woodley, 2018).

2.3. MIKROBNE LIPAZE: SVOJSTVA I INDUSTRIJSKA PRIMJENA

Lipaze su industrijski vrlo važni biokatalizatori koji imaju veliku primjenu u proizvodnji širokog asortimana proizvoda. Njihova jedinstvena svojstva kao što su stabilnost, selektivnost i specifičnost vezanja supstrata čine ih jednim od najviše korištenih industrijskih enzima. Uspješni su u kataliziranju brojnih reakcija važnih za prehrambenu, farmaceutsku, kožnu, kozmetičku industriju te industriju detergenata, mliječnih proizvoda, pića, masnih kiselina i papira. Budući da njihova primjena u različitim industrijskim procesima neprestano raste, postoji sve veća potreba za njihovom proizvodnjom (Sarmah i sur., 2018).

2.3.1. Svojstva i struktura lipaza

Lipaze ili triacilglicerolester hidrolaze (EC 3.1.1.3) su enzimi koji pripadaju skupini serin-hidrolaza, a definirane su kao karboksilesteraze koje kataliziraju hidrolizu i sintezu dugolančanih acil-glicerola koristeći trigliceride kao standardni supstrat. Budući da mogu sudjelovati u reakcijama esterifikacije i hidrolize, koriste se kao biokatalizatori u reakcijama transesterifikacije. Većinu lipaza karakterizira identična struktura, takozvana α/β hidrolaza nabor koji se sastoji od

osam paralelnih β -nabranih ploča okruženih sa različitim brojem α -uzvojnica, iako organizacija kao i broj β lanaca može varirati. Lipaze imaju izvanrednu kompetenciju kao biokatalizatori zbog prisutnosti katalitičke trijade koju čini G-X1-S-X2-G gdje je G glicin, S serin, X1 histidin i X2 glutamat ili asparat. Određivanje ove trijade u pročišćenom enzimu važan je korak za predviđanje trodimenzionalne strukture enzima što je bitno za precizan dizajn i njegovu modifikaciju (Sarmah i sur., 2018). Reakcije katalizirane lipazom odvijaju se na granici faza između netopljivog supstrata i vodene faze gdje pokretanje alfa uzvojnice koja prekriva aktivno mjesto enzima dopušta pristup supstrata katalitičkom mjestu enzima. Unutarnja strana alfa uzvojnice koja je okrenuta prema aktivnom mjestu je hidrofobna dok je vanjska strana hidrofilna (djeluje kao poklopac). U vodenom mediju „poklopac“ je zatvoren i pokriva aktivno mjesto enzima. Na granici faza lipaza mijenja konformaciju, dolazi do otkrivanja katalitičkog mjesta i enzim prelazi u aktivni oblik. Takva pojava naziva se interfacijalna aktivacija. Koncentracija supstrata, pri kojoj supstrati nisu više topljivi, a lipaze postaju aktivne, naziva se kritična micelarna koncentracija (eng. *Critical micelle concentration*, CMC). Ovo jedinstveno svojstvo lipaza da hidroliziraju netopljive estere razlikuje ih od ostalih esteraza koje mogu hidrolizirati samo estere topljive u vodi (Sarmah i sur., 2018).

2.3.2. Klasifikacija lipaza

Lipaze se mogu klasificirati na temelju njihove specifičnosti te na temelju izvora. Specifičnost je važan kriterij u industrijskoj primjeni lipaza na temelju kojeg se mogu podijeliti u tri glavne grupe: supstrat specifične, regioselektivne i enantioselektivne lipaze. Što se tiče izvora, lipaze su prisutne u biljkama, životinjama, kukcima i mikrobnim organizmima. Među raznim izvorima lipaza mikrobi su najbolji izvor zahvaljujući velikom industrijskom potencijalu, lakoći rukovanja s kulturama, dostupnosti i mogućnosti prijenosa u veće mjerilo. Mikrobne lipaze uključuju lipaze iz bakterija, kvasaca i plijesni. Prilagodljivost mikrobnih lipaza i lakoća njihove proizvodnje čini ih privlačnijim za industrijsku primjenu. Većina mikrobnih lipaza je ekstracelularna što olakšava i smanjuje troškove izolacije, a njihova proizvodnja je uvelike pod utjecajem sastava medija te fizikalno kemijskih faktora kao što su pH, temperatura i otopljeni kisik. Osim toga, nedavno je otkriveno da se mikrobne lipaze mogu dobiti fermentacijom na poljoprivrednom i mliječnom otpadu što doprinosi zaštiti okoliša i održivom razvoj (Sarmah i sur., 2018).

2.3.3. Primjena lipaza

Lipaze mogu značajno doprinijeti rastu bioprocene industrije zbog njihove svestrane primjene u katalizi širokog raspona reakcija koje su uključene u biopreradu sirovina ili sintezu organskih kemikalija. Lipaze se primjenjuju u različitim područjima industrije od proizvodnje biodizela, hrane, mliječnih proizvoda, farmaceutskih sastojaka, agrokemikalija i detergenata do oleo-kemikalija, industrije čajeva, kozmetike, kože i nekih procesa bioremedijacije (tablica 3). Mnogi čimbenici doprinose svestranoj primjeni lipaza kao što su njihova regiospecifičnost, enantioselektivnost, kemoselektivnost, sposobnost katalize reakcija u vodenom i bezvodnom mediju kao i kataliza reakcija u oba smjera. Nedavna istraživanja uključuju određivanje trodimenzionalnih struktura lipaza koje potječu iz različitih organizama što pomaže pri razumijevanju njezine aktivnosti, mehanizma reakcije i opsega industrijske održivosti (Sarmah i sur., 2018).

Tablica 3. Primjena lipaza iz različitih izvora (Sarmah i sur., 2018)

Tip reakcije	Izvor	Primjena	Supstrat
Hidroliza	<i>Rhizopus chinensis</i>	Proizvodnja mliječnih proizvoda	Mliječne masti i esteri
	<i>Candida rugosa</i>	Proizvodnja biodizela	Palmino i suncokretovo
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Obrada otpada	Otpadno sojino ulje
Esterifikacija	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Industrija hrane	Butil-butirat
	<i>Pichia burtonii</i>	Kemijska industrija	Dugolančani N-P esteri
	<i>Bacillus coagulans</i>	Obrada hrane	Oleinska kiselina i etanol
Transesterifikacija	<i>Rhizomucor miehei</i>	Industrija hrane	Heksanol
	<i>Candida antarctica</i>	Proizvodnja biodizela	Suncokretovo ulje
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Proizvodnja biodizela	Maslinovo ulje i metanol
Alkoholiza	<i>Rhizomucor miehei</i>	Industrija hrane	Palmolein
	<i>Candida antarctica</i>	Industrija hrane	Acil-glicerol
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Industrija hrane i kozmetike	Trigliceridi, ulje crnog ribizla

2.4. PRIRODNA EUTEKTIČKA OTAPALA KAO MEDIJ ZA BIOKATALIZU

Kemijska industrija posljednjih 20 godina pridaje veliki značaj razvoju novih vrsta otapala koja su jeftinija i ekološki prihvatljivija od konvencionalnih otapala. Zelena otapala karakterizira netoksičnost, kemijska i fizička stabilnost, niska hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe te su jednostavna za rukovanje. Prva takva dostupna otapala bile su ionske kapljevine (eng. *Ionic Liquids*, ILs) koje su definirane kao organske soli s temperaturom tališta nižom od 100 °C (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Međutim, njihovo korištenje uzrokuje niz problema budući da je većina klasičnih ionskih kapljevina (npr. imidazolijeve i piridinijeve ionske kapljevine) otrovna i nije biorazgradiva. Dodatno, proces njihove sinteze je vrlo kompleksan i skup, a uz to je teško postići visoku čistoću otapala (Dai i sur., 2013). Zbog navedenog ionske kapljevine nemaju široku primjenu industriji što je dovelo do razvoja nove generacije zelenih otapala koje nazivamo eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES), odnosno prirodna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES).

Etimološki riječ eutektik dolazi od grčkih riječi εὔ (eu) i τήσις (teksis) što znači lako topljenje i definira se kao homogena smjesa dviju ili više čvrstih komponenata koje u jedinstvenom molarnom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese. U toj točki sustav djeluje kao cjelina i kruti sustavi postaju tekući (Paiva i sur., 2018). DES-ove je lako sintetizirati jednostavnim miješanjem dviju komponenti, stabilni su, nisu hlapljivi te su često izrađeni od prirodnih biokompatibilnih supstrata i prema tome, netoksični i biorazgradivi. Osim toga izvori su lako dostupni i jeftini što ih čini zanimljivim sa ekonomskog aspekta (Sheldon, 2017).

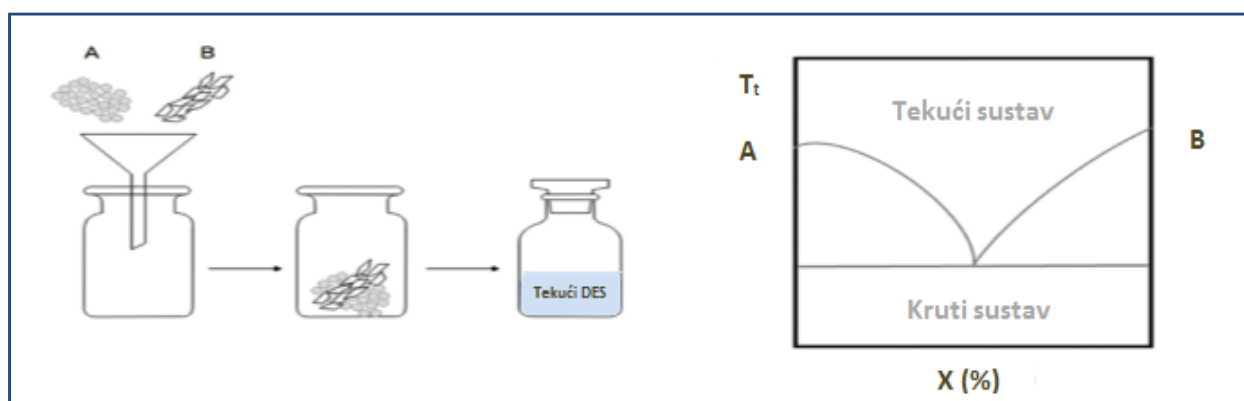
DES-ovi su definirani kao zelenija verzija ionskih kapljevina te se u posljednje vrijeme primjenjuju u sintetskim reakcijama, biotransformacijama, ekstrakciji bioaktivnih spojeva, ekstrakciji i razdvajanju ciljanih analita, apsorpciji CO₂, obradi metala, proizvodnji nanomaterijala te pročišćavanju i proizvodnji biodizela (Paiva i sur., 2018). Doprinosu dizajniranju ekološki prihvatljivih procesa zbog mogućnosti, selektivnog i jednostavnog izdvajanja produkta reakcije, prilagodbe pH, otapanja organskih i anorganskih soli kao i tranzicije metal-kompleksa i nanočestica, a jedna od najperspektivnijih prednosti je njihova reciklacija nakon upotrebe zbog zanemarive hlapljivosti (Zhang i sur., 2012).

2.4.1. Priprava eutektičkih otapala

DES-ovi se proizvode miješanjem nabijenog akceptora vodika (amonijeve ili fosfonijeve soli) i nenabijenog donora vodika (alkohol, poliol, karboksilna kiselina ili amid) laganim

zagrijavanjem pri čemu dolazi do povezivanja komponenti i formira se bezbojna tekućina (obično 2 sata pri 60 °C). Donor vodikove veze djeluje u interakciji sa anionom soli i povećava njegovu efektivnu veličinu i uzrokuje tako smanjenje tališta. Smanjenje temperature taljenja smjese u odnosu na pojedine komponente pripisuje se uglavnom stvaranju vodikovih veza između komponenti. Na primjer, miješanjem kolin-klorida ($t_t = 302$ °C) sa ureom ($t_t = 132$ °C) u omjeru 1 : 2 nastaje DES s točkom tališta od 12 °C što je značajno niže u odnosu na točke tališta pojedinih komponenata (Sheldon, 2017). Do sada je sintetiziran velik broj DES-ova, a jedna od najpopularnijih kvaternih soli koja se koristi za njihovu sintezu je kolin-klorid (ChCl) jer je jeftina, biorazgradiva i netoksična sol koja je opće prihvaćena za upotrebu u svim vrstama proizvoda. Sama sol (kolin-klorid) proizvodi se vrlo ekonomičnim procesom u kojem gotovo nema otpada (Durand i sur., 2012). Upravo zbog niže točke tališta (niže od čistih sastojaka) pri sobnoj temperaturi je otapalo. Do danas, većina pripremljenih DES-ova su tekućine ispod 70 °C.

DES-ovi se također pripremaju miješanjem ChCl s ugljikohidratima, takozvana prirodna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Izvedena iz metabolita poput šećera, amino kiselina, kolina i prirodnih organskih kiselina mogu zapravo funkcionirati kao reakcijski medij za *in vivo* sintezu slabo topivih spojeva u vodi poput flavonoida i steroida. S obzirom na njihovu raznolikost i veliki potencijal u primjeni, NADES-e nazivaju otapalima 21 stoljeća (Sheldon, 2017). Na slici 1 prikazana je općenita shema pripreme DES-a i odnos tališta dviju komponenti koje tvore sustav (Paiva i sur., 2018).



Slika 1. Shematski prikaz pripreme DES-a i odnos tališta komponenti (Paiva i sur., 2018)

2.4.2. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala

Budući da postoji velik broj amonijevih soli i donora vodikovih veza koji se mogu međusobno kombinirati, svojstva DES-ova mogu se vrlo lako podešavati. Na ovaj način postižu se

željena kiselost, polarnost, topljivost otapala, točka ledišta, viskoznost i vodljivost (Zhang i sur., 2012).

Točka ledišta

Svi sintetizirani DES-ovi imaju točku ledišta nižu od 150 °C, a najzanimljivija su ona kod kojih je točka ledišta ispod 50 °C, s obzirom da se mogu koristiti kao jeftina i sigurna otapala u mnogim područjima. Općenito, broj DES-ova koji se nalaze u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi je ograničen. Takvo otapalo može se dobiti kombinacijom kolin-klorida i uree ili glicerola vjerojatno zbog većeg afiniteta navedenih komponenti za stvaranje vodikovih veza s kolin-kloridom. Dakle, za postizanje niže temperature smrzavanja, ključan je odabir donora vodikovih veza koji će se kombinirati s kolin-kloridom u DES-u (Zhang i sur., 2012).

Gustoća

Gustoća većine DES-ova veća je od gustoće vode, a razlike su vjerojatno posljedica drugačije organizacije molekula ili nastajanja otapala. Gustoća ovisi o strukturi i često se smanjuje s povećanjem temperature kao i s povećanjem količine vode koju sadrži. Osim toga na gustoću otapala osobit utjecaj ima molarni omjer organske soli i donora vodikove veze (Zhang i sur., 2012).

Viskoznost

Viskoznost opisuje unutarnje trenje gibajućeg fluida ili drugim riječima, otpor tvari tečenju. Većina poznatih DES-ova pokazuje visoke vrijednosti viskoznosti, često veće od 100 cP što je (za usporedbu, viskoznost vode iznosi 0,89 cP na sobnoj temperaturi). Glavni razlog za ove visoke vrijednosti može biti povezan s jakom vodikovom vezom formiranom među komponentama DES-a, koja neizbježno smanjuje pokretljivost molekularnih spojeva. S obzirom na veliki potencijal ovih otapala kao održivih medija, dizajn i razvoj nisko viskoznih DES-ova je poželjan zbog smanjenja operativnih troškova za nekoliko procesnih operacija (npr. miješanje i crpljenje). Viskoznost DES-a je pod utjecajem kemijske prirode komponenata, sadržaja vode i temperature. Obzirom na to, viskoznost otapala se može podešavati ovisno o željenim karakteristikama otapala (Maugeri, 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Enzimski preparat

Novozym 435 (lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama sa sadržajem vode 1 – 2 (w/w %) – Novozyme (Bagsvard, Danska).

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda
- Etilen glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Fruktaza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol
- Glukoza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Heptan, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Limunska kiselina, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R, S*)-1-feniletil-acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Saharaza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sorboza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Urea, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Plinski kromatograf sa Varian CHIRASIL-DEX CB kiralnom kolonom (25m×0.25 mm×0.25 μm) i MS-detektorom, Shimadzu, Japan
- Stakleno i plastično posuđe

3.2. METODE

3.2.1. Priprema i karakterizacija prirodnih eutektičkih otapala

U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se preračunate količine komponenata prema molarnim omjerima prikazanim u tablici 4 uz dodatak 50 % (v/v) vode. Reakcijska smjesa zagrijava se na magnetnoj miješalici do 50 °C tijekom dva sata dok ne nastane homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Tako pripremljeni NADES-i zatvore se parafilmom i čuvaju na tamnom mjestu. pH vrijednost izmjerena je pomoću multimetra pH/ion metar S220, Mettler Toledo pri temperaturi od 25 °C. Polarnost svakog pripremljenog NADES-a određena je pomoću Nile crvene solvatokromne probe prema opisu u Jeong i sur. (2017) i Ogihara i sur. (2004). Ukratko, pripremljena je crvena stock otopina koncentracije 1,0 g L⁻¹ etanolu te je pohranjena na 4 °C. Stock otopina je 100 puta razrijeđena u etanolu i zatim dodana u NADES, nakon čega se uzorak stavlja u kvarcnu kivetu volumena 1 cm³. ApSORPCIJSKI spektri različitih boja snimljeni su pomoću GENESYS 10S UV-Vis spektrofotometra, Thermo Fisher Scientific, USA. Gustoća NADES-a određena je pomoću piknometra – staklene posude koja se sastoji od bočice poznatog volumena ($V = 2$ mL) i čepa s cjevčicom u sredini kroz koju izlazi višak tekućine da bi u njemu ostao točno poznati volumen mjerene tekućine. Masa praznog i čistog piknometra odredila se vaganjem na analitičkoj vagi nakon čega je napunjena NADES-om i ponovo izvagana.

Gustoća prirodnih eutektičkih otapala ρ_{NADES} (kg m⁻³) računa se zatim prema jednadžbi:

$$\rho_{NADES} = \frac{m_{pik+NADES} - m_{pik}}{V_{pik}} \left[\frac{kg}{m^3} \right] \quad [5]$$

Gdje m_{pik} predstavlja masu praznog piknometra (kg), $m_{pik+NADES}$ predstavlja masu piknometra s NADES-om (kg), a V_{pik} predstavlja volumen piknometra (m³).

Viskoznost NADES-a određena je Ostwaldovim (kapilarnim) viskozimetrom. Metoda se temelji na mjerenju vremena potrebnog da određeni volumen ispitivane tekućine protekne kroz kapilaru pod utjecajem gravitacijske sile. Viskozimetar je napunjen tekućinom te je štopericom mjereno vrijeme za koje je razina tekućine stigla od točke A do točke B. Najprije je provedeno mjerenje za NADES, a potom i za destiliranu vodu.

Viskoznost prirodnog eutektičkog otapala η_{DES} (Pas) računa se prema jednadžbi:

$$\eta_{NADES} = \eta_{H_2O} \frac{t_{NADES} \cdot \rho_{NADES}}{t_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}} [Pas] [6]$$

Gdje η_{H_2O} predstavlja viskoznost vode (Pas), ρ_{NADES} predstavlja gustoću NADES-a, ρ_{H_2O} gustoću vode, t_{NADES} predstavlja vrijeme protjecanja NADES-a (s), a t_{H_2O} predstavlja vrijeme protjecanja vode (s).

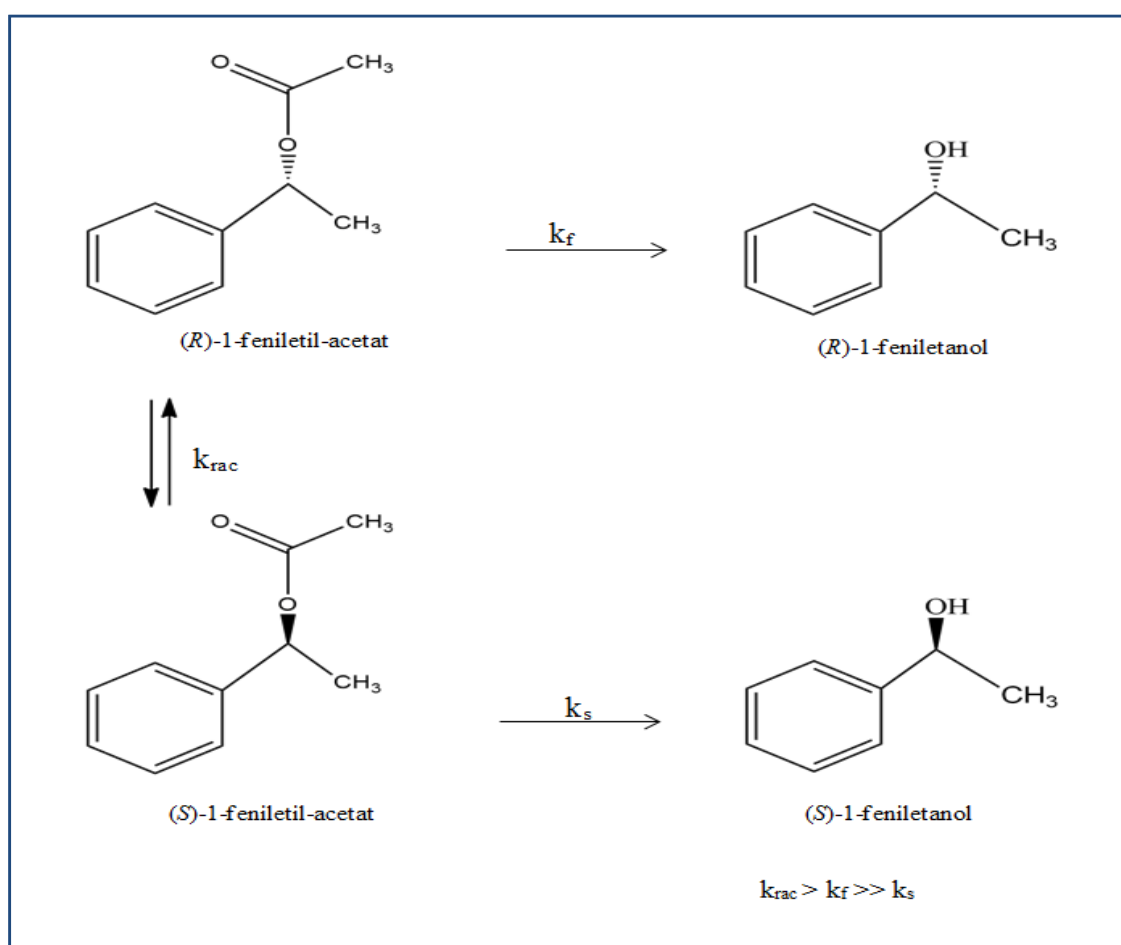
Sva mjerenja su provedena pri sobnim uvjetima. Vrijednosti gustoće, viskoznosti površinske napetosti vode pri $T = 25$ °C su preuzeti iz literature (Crittenden i sur., 2012).

Tablica 4. Korišteni NADES-i (50 % v/v) i njihova fizikalno-kemijska svojstva

NADES	Kratica	Omjer	Polarnost	Viskoznost	pH	ρ (gcm ⁻³)
Kolin-klorid : glukoza	ChGlc _{50%}	1 : 2	50,0	0,0051	4,03	1,123
Kolin-klorid : glicerol	ChGly _{50%}	1 : 2	50,10	0,0037	3,35	1,099
Kolin-klorid : etilen glikol	ChEG _{50%}	1 : 2	50,28	0,0034	5,93	1,066
Glukoza : glicerol	GlcGly _{50%}	1 : 2	50,37	0,0017	6,25	1,044
Glukoza : etilen glikol	GlcEG _{50%}	1 : 2	50,37	0,0012	5,21	1,081
Sorboza : etilen glikol	SorEG _{50%}	1 : 2	50,37	0,0015	4,80	1,061
Etilen glikol : glukoza : fruktoza	EGGlcFru _{50%}	2 : 1 : 1	50,19	0,0046	4,41	1,045

3.2.2. Hidroliza (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata katalizirana lipazom

Reakcija hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata katalizirana lipazom provedena je na način da se u epruvetu doda 992 μL otapala (sintetizirani NADES-i), 8 μL supstrata (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata i 5 mg imobiliziranog enzima lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antarctica* (pripravak Novozym 435) čime i započinje reakcija (slika 2). Reakcija se provodi pri temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$ i 650 min^{-1} tijekom 23 sata. Pri provođenju reakcije u NADES-ima u odabranim vremenskim intervalima reakcija se zaustavi i u sadržaj reakcijske smjese doda se 1 mL vode, a zatim se (*R*, *S*)-1-feniletil-acetat ekstrahira s 2 mL *n*-heptana, uz snažno miješanje na homogenizatoru (650 min^{-1}) kroz 3 minute te se izuzima 50 μL heptanskog sloja i analizira plinskom kromatografijom.



Slika 2. Hidroliza (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata

Za usporedbu učinkovitosti predložene biokatalitičke reakcije u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu praćene su: konverzija (x), volumetrijska produktivnost (Vp), enantiomerni višak (ee) i početna brzina reakcije (k_0) što je opisano u jednadžbama 7 – 10.

Konverzija X (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$(X)(\%) = \frac{c_A}{c_{AT}} \cdot 100 \quad [7]$$

gdje C_A predstavlja izmjerenu koncentraciju (*R*)-1-feniletanola (mol L^{-1}), a C_{AT} teoretski moguću koncentraciju (*R*)-1-feniletanola (mol L^{-1}).

Volumetrijska produktivnost V_p ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) računa se prema jednadžbi:

$$V_p = \frac{C_{p2} - C_{p1}}{t} \quad [8]$$

gdje C_{p1} predstavlja molarnu koncentraciju (*R*)-1-feniletanola ($\mu\text{mol L}^{-1}$) na početku reakcije (0h), C_{p2} molarnu koncentraciju (*R*)-1-feniletanola na kraju reakcije ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a t vrijeme trajanja reakcije (min).

Enantiomerni višak (eng. *enantiomeric excess* – *ee*) (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(R1 - \text{feniletanol} - S1 - \text{feniletanol})}{(R1 - \text{feniletanol} + S1 - \text{feniletanol})} \cdot 100 \quad [9]$$

gdje *R-I*-feniletanol predstavlja površinu ispod pika (*R*)-1-feniletanola, a *S-I*-feniletanol površinu ispod pika (*S*)-1-feniletanola.

Početna brzina reakcije k_0 ($\text{mmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) izračunata je iz linearnih dijelova pravca grafa prosječne koncentracije proizvoda u odnosu na vrijeme reakcije:

$$k_0 = \frac{a_p}{t} \quad [10]$$

gdje a_p predstavlja nagib pravca, a t je vrijeme trajanja reakcije (min).

Sva mjerenja su provedena u paralelama, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (u 95 %-tnom intervalu pouzdanosti nemaju statističku značajnu razliku).

3.2.3. Određivanje koncentracije (*R*)-1-feniletanola

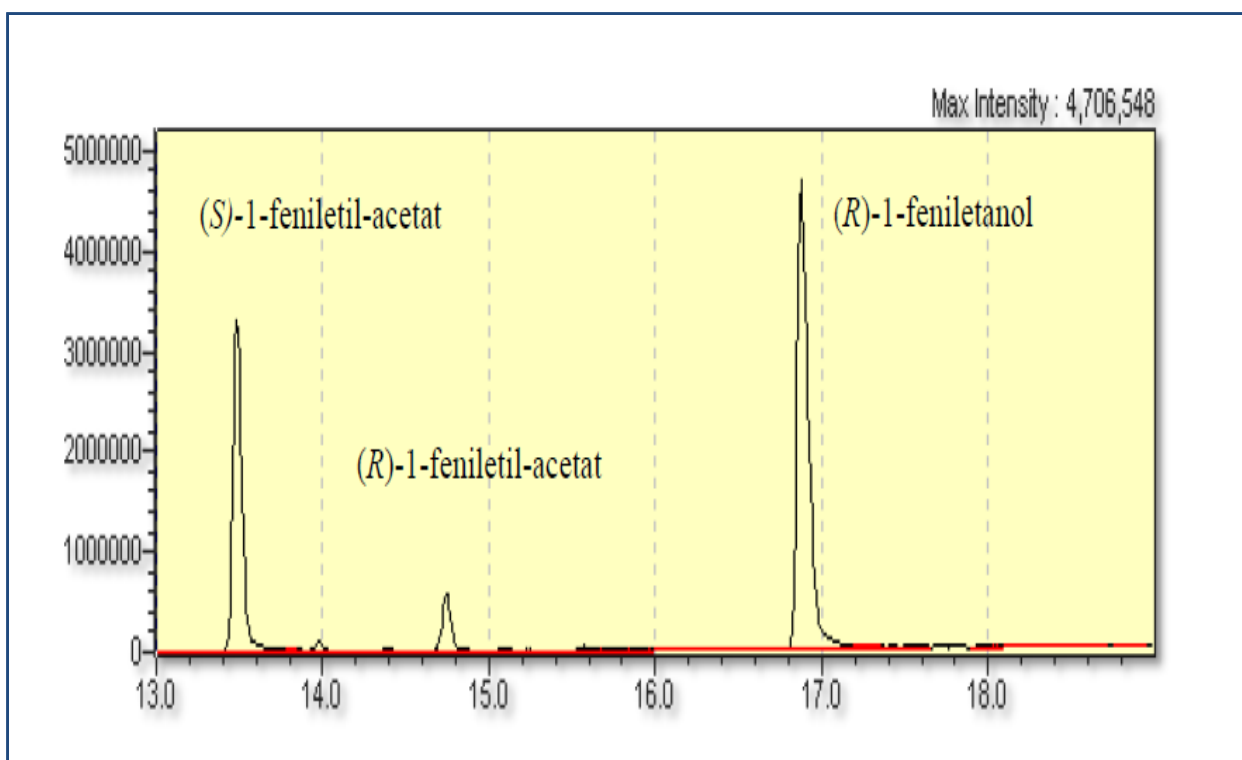
Kvalitativna i kvantitativna analiza provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom (GC-MS, slika 3). Za analizu korišteni su sljedeći kromatografski uvjeti:

- Kromatografska kolona: Varian CHIRASIL-DEX CB (25m × 0.25 mm × 0.25 μm)
- Temperatura kolone: $T_1 = 80\text{ °C}$ (2 min), $T_2\ 80\text{ °C} - 140\text{ °C}$ ($\Delta t = 5\text{ °C min}^{-1}$)
- Pokretna faza: helij (He)
- Protok: $96,9\text{ mL min}^{-1}$
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Vrijeme trajanja analize: 21 min



Slika 3. Plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan.

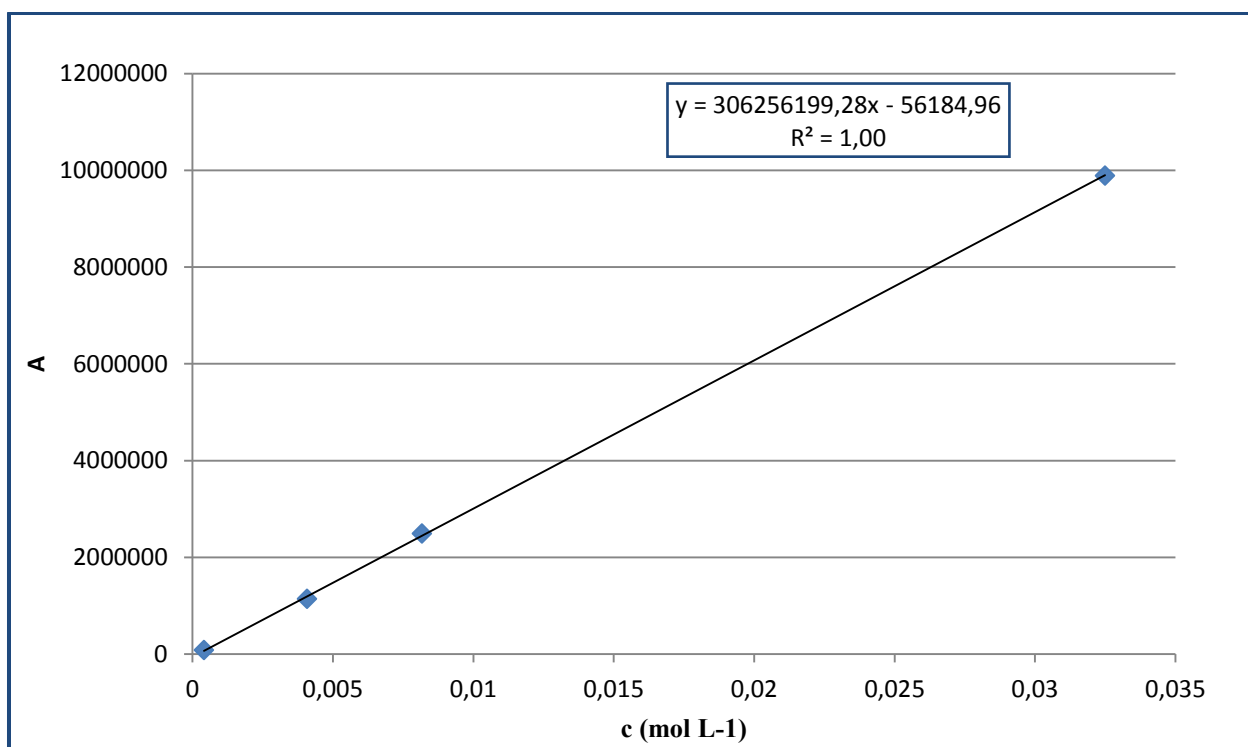
Identifikacija supstrata i produkta provedena je na temelju retencijskih vremena, tj. vremena izlaženja razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi s kiralne kromatografske kolone te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka s onima dobivenima analizom. Molarna koncentracija produkta reakcije (*R*)-1-feniletanola računa se izravno iz jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama (*R*)-1-feniletanola ($0,000409 - 0,035 \text{ mol L}^{-1}$). Tipičan plinski kromatogram reakcijske smjese nalazi se na slici 4.



Slika 4. Tipičan plinski kromatogram nakon analize reakcijske smjese za lipazom kataliziranu hidrolizu (*R, S*)-1-feniletil-acetata

Izrada baždarnog dijagrama

Baždarni dijagram za određivanje molarne koncentracije (*R*)-1-feniletanola izrađuje se tako što se pripreme otopine poznatih koncentracija (*R*)-1-feniletanola u *n*-heptanu ($0,000409 - 0,035 \text{ mol L}^{-1}$) te analiziraju na plinskom kromatografu spregnutom sa masenim spektrofotometrom. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika prikažu se na ordinati, a na apscisi se prikažu pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala konstruira se dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R*)-1-feniletanola o površini ispod pika (slika 5) te se prema dobivenoj jednadžbi pravca mogu izračunati nepoznate molarne koncentracije (*R*)-1-feniletanola u ostalim uzorcima.



Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R*)-feniletanola; A = površina ispod pika; c = koncentracija (mol L⁻¹)

3.2.4. Optimiranje hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u ChEG

Optimiranje kinetičke rezolucije (*R, S*)-1-feniletil-acetata u ChEG provedeno je prema planu pokusa dobivenog matematičkim modelom u programu Design Expert 7.0.0. (Suite 480, Minneapolis, MN 55413). Praćen je utjecaj temperature (X_1 , 20 – 60 °C), masenog udjela vode u ChEG (X_2 , 10 – 50 % v/v) i omjera E/S (X_3 , 0,1 – 1) na konverziju reakcije (X %). Svaki od eksperimenata proveden je u sustavu sa 5 mg enzima Novozym 435, 1 mL otapala ChEG i 0,05 mol L⁻¹ (*R, S*)-1-feniletil-acetata.

3.2.5. Plan pokusa za optimiranje hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata i obrada podataka

Kako bi se odredio utjecaj procesnih parametara na iskorištenje procesa hidrolize i njihovo međudjelovanje, korišten je Box-Behnkenov plan pokusa. Glavni cilj je pronalaženje optimalnih vrijednosti procesnih parametara, kako bi se omogućilo povećanje efikasnosti procesa. Ispitivane varijable (temperatura, udio vode, omjer E/S; tablica 5) prevedene su u kodirane varijable prema izrazu:

$$X = \frac{x - \frac{(x_{max} + x_{min})}{2}}{\frac{(x_{max} - x_{min})}{2}} \quad [10]$$

Tablica 5. Ispitivane varijable i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine

Faktor	Simbol	Donja razina	Centralna razina	Gornja razina
Kodirane varijable		-1	0	1
Temperatura	X1	20	40	60
Udio vode	X2	10	30	50
Omjer E/S	X3	0,1	0,55	1

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 15 eksperimenata hidrolize sa tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja. Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani sa matematičkim modelom odzivnih površina tj. polinomom drugog reda u obliku:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad [11]$$

gdje je Y modelom predviđena odzivna funkcija, β_0 konstanta jednadžbe odzivnog polinoma, β_i koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma ($i = 1, 2, \dots, k$), β_{ii} koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma ($i = 1, 2, \dots, k$), β_{ij} koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma ($i = 1, 2, \dots, k$), X_{ij} ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti) ($i = 1, 2, \dots, k$), a k je broj varijabli. Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatran proces. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina. Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara, provedena je primjenom softverskog paketa Design Expert (Verzija 7.0.0., Suite 480, Minneapolis, MN 55413). Kroz svih 15 eksperimenata, u određenim vremenskim intervalima, reakcija je zaustavljena i analizirana na

GCMS-u kao što je prethodno opisano. Kako bi se validirao predloženi model odgovora, provedeni su odvojeni eksperimenti u optimalnim uvjetima.

3.2.6. Reciklacija i ponovna uporaba enzima

Kako bi se enzim odvojio od reakcijskog medija u svrhu njegove ponovne upotrebe, nakon provođenja kinetičke rezolucije (*R, S*)-1-feniletil-acetata u optimalnim uvjetima (40 °C, 50 % vode u ChEG i omjer E/S 0,55), reakcijski medij sa enzimom (Novozym 435) filtriran je vakuum filtracijom. Reciklirani enzim ispran je s vodom (5 x 10 mL) i etil-acetatom (5 x 10 mL) i osušen u sušilici na 40 °C preko noći te pohranjen u hladnjaku do sljedećeg postupka. Izvagano je 5 mg recikliranog enzima i ponovno upotrijebljeno za reakciju hidrolize u svježem ChEG sa 50 % vode. Reakcija je praćena i analizirana kako je prethodno opisano. Reciklacija i ponovna upotreba enzima ponovljena je još 5 puta.

Reciklacija enzima ($\eta_{relativno}$ (%)) izračunata je prema jednadžbi:

$$\eta_{relativno} (\%) = \frac{\eta_{ciklusa (1+n)}}{\eta_{ciklusa (1)}} \cdot 100, n = 0,1,2,3 \dots [12]$$

gdje je $\eta_{ciklusa(1)}$ konverzija reakcije sa svježim, nerecikliranim enzimom, a $\eta_{ciklusa (1+n)}$ konverzija reakcije sa recikliranim enzimom (jednom, dva puta itd.).

3.2.7. Izolacija (*R*)-1-feniletanola iz ekstrakta dobivenog pomoću NADES-a i reciklacija otapala

Reciklacija NADES-a provedena je kao zasebni eksperiment. Kinetička rezolucija (*R, S*)-1-feniletil-acetata pri optimalnim uvjetima (40 °C, 50 % vode u ChEG i omjer E/S 0,55) zaustavljena je nakon 24h, enzim je filtriran i odvojen od reakcijskog medija, a reakcijski medij je prebačen u lijevak za odjeljivanje i ekstrahiran sa etil-acetatom (6 x 10 mL) što je prikazano na slici 6. Prikupljena organska faza je uparena pod sniženim tlakom, dajući tako sirove produkte. Tako reciklirani NADES analiziran je u drugom krugu hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata, a testiran je u četiri kruga hidrolize.

Mogućnost ponovne upotrebe NADES-a ($V_{\text{relativni}} (\%)$) izračunata je prema jednadžbi:

$$V_{\text{relativni}} (\%) = \frac{V_{\text{ciklusa}} (1+n)}{V_{\text{ciklusa}} (n)} \cdot 100, n = 1, 2 \dots [13]$$

gdje je $V_{\text{ciklusa}}(n)$ volumen NADES-a u n-ciklusu, a $V_{\text{ciklusa}} (1+n)$ volumen recikliranog NADES-a nakon n-ciklusa.

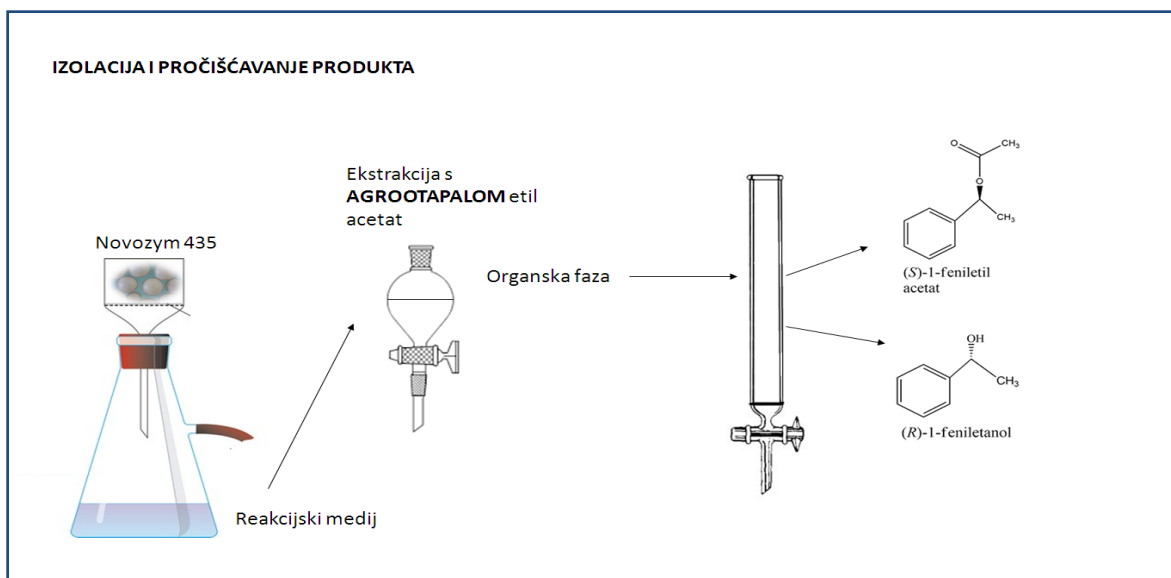
Iskorištenje reakcije u recikliranom NADES-u izračunato je prema jednadžbi 12.

(*R*)-1-feniletanol i neizreagirani (*S*)-1-feniletil-acetat iz organske faze razdvojeni su na koloni silikagela (1.2 cm x 5 cm) koristeći etil-acetat kao mobilnu fazu (slika 6).

Učinkovitost razdvajanja η (%) izračunata je prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{m_k}{m_0} [14]$$

gdje je m_k masa (*R*)-1-feniletanola nakon silikagel kolone, a m_0 teoretska masa (*R*)-1-feniletanola prije silikagel kolone.



Slika 6. Shematski prikaz izolacije i pročišćavanja produkta reakcije (*R*)-1-feniletanola

3.2.8. Hidroliza (*R*, *S*)-1-feniletil-aceta u ChEG_{50%} na preparativnoj skali

Prijenos reakcije u veće mjerilo proveden je na način da je 250 mg enzima Novozym 435 dodano u 500 mL ChEG sa udjelom vode 50 % (v/v). Reakcija je provedena u prethodno određenim optimalnim uvjetima (40 °C, 50 % vode u ChEG i omjer E/S 0,55). Nakon završetka reakcije enzim je odvojen od reakcijskog medija vakuum filtracijom. Reakcijski medij prebačen je u lijevak za odjeljivanje i ekstrahiran s etil-acetatom. Ekstrakcija je ponovljena u 5 ciklusa, a prikupljene organske faze su spojene i uparene pod sniženim tlakom, dajući tako sirove produkte. (*R*)-1-feniletanol i neizreagirani (*S*)-1-feniletil-acetat iz organske faze razdvojeni su na koloni silikagela koristeći etil-acetat kao mobilnu fazu kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Konverzija reakcije izračunata je prema jednadžbi 7 što je opisano u poglavlju 3.2.2. Prinos recikliranog NADES-a izračunat je prema jednadžbi 13, a učinkovitost razdvajanja izračunata prema jednadžbi 14 koje su opisane u prethodnom poglavlju.

Obrada podataka

Sva mjerenja su provedena u paralelama. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti uz koje su navedene i vrijednosti standardne devijacije (\pm SD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Uspostavljanje novih visokoučinkovitih i održivih procesa proizvodnje industrijski važnih kemikalija predmet je mnogih znanstvenih istraživanja u području kemijske tehnologije i biotehnologije. Stoga se NADES-i, nova generacija nehalapljivih i netoksičnih otapala, posljednjih godina intenzivno proučavaju kao zamjena za tradicionalna i škodljiva otapala u procesima organske sinteze i (bio)katalize. S druge strane, biokataliza kao jedno od najbitnijih alata zelene kemije, bezopasna je po okoliš, a zbog mogućnosti katalize složenih transformacija, može smanjiti korake kemijske sinteze te time umanjiti otpad i povećati prinos biokatalitičke reakcije (Tao i Kazlauskas, 2011). Enzimske reakcije imaju prednost pred klasičnim reakcijama kemijske sinteze zbog visoke enantio i regioselektivnosti, a naročito ako se izvode u zelenim otapalima. Posebice se primjenjuju reakcije enantioselektivne enzimske hidrolize (kinetička rezolucija) kao tipične lipazama katalizirane reakcije za dobivanje optički čistih spojeva, koji se koriste u farmaceutskoj i kemijskoj industriji (Polaina i MacCabe, 2007).

Cilj ovoga rada bio je proizvesti optički čist (*R*)-feniletanol koji je važan gradivni blok u industriji lijekova, agrokemikalija i finih kemikalija (Rios i sur., 2016). U tu svrhu ispitana je mogućnost hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata, koristeći lipazu kao katalizator uz NADES-e kao reakcijski medij. Korištena je lipaza B iz kvasca *Candida antarctica* koja je imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama (Novozym 435), budući da je taj enzimski pripravak jeftin i lako dostupan, a u brojnim se radovima pokazao učinkovit i iznimno stabilan (Cvjetko Bubalo, 2012). Prilikom planiranja i izvedbe pokusa korištene su glavne smjernice u dizajniranju biokatalitičkog procesa uključujući pripremu i karakterizaciju NADES-a, probir NADES-a za optimalno djelovanje enzima, optimizaciju biokatalitičkog procesa, izdvajanje proizvoda te reciklaciju enzima i otapala.

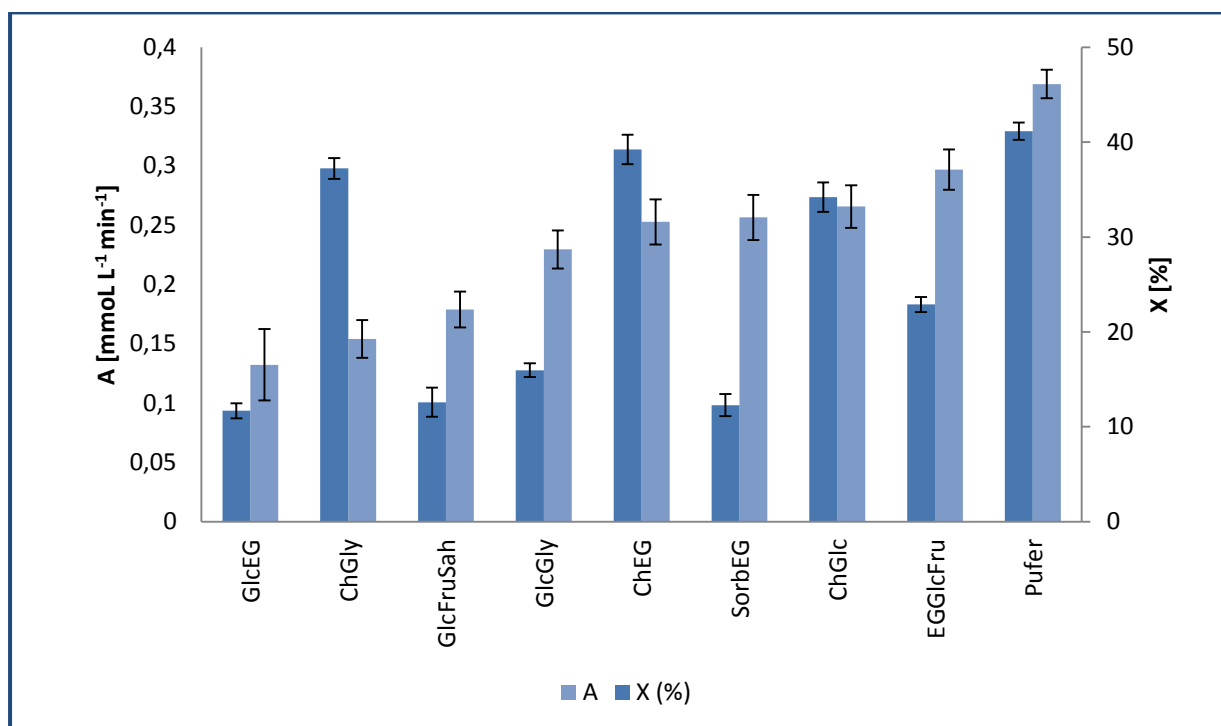
4.1. PRIPRAVA I PROBIR OTAPALA

U ovom radu provedena je enantioselektivna hidroliza (*R, S*)-1-feniletalacetata u (*R*)-1-feniletanol koristeći imobiliziranu lipazu izoliranu iz kvasca *Candida antarctica* (pripravak Novozym 435) u osam različitih NADES-a s udjelom vode 50 % (v/v) koja su pripravljena klasičnim postupkom za potrebe istraživanja (tablica 4). Budući da se NADES-i smatraju zelenim otapalima, izbor najperspektivnijih otapala za navedenu reakciju temeljio se na njihovoj toksičnosti i fizikalno-kemijskim svojstvima. Odabrana otapala bila su slabo kisela do neutralna jer je poznato da lipaza može provoditi reakciju u blagim uvjetima s izuzetnom kemo i regio-selektivnošću. Odabir pravog NADES-a za specifični biokatalitički sustav glavni je dio optimizacije biokatalitičkog procesa jer uvjetuje pH, polarnost i viskoznost medija te kao takav izravno utječe na aktivnost enzima i topljivost supstrata/proizvoda (Paiva i sur., 2014). Hidroliza je provedena i u kalij-fosfatnom puferu kao referentnom otapalu u svrhu provjere uspješnosti hidrolize, a osim toga u svim otapalima provedeni su i eksperimenti bez enzima gdje nije primijećena konverzija unutar reakcijskih uvjeta korištenih u ovim eksperimentima. Reakcija se provodila pri 25 °C na homogenizatoru, a praćena je uzimanjem uzoraka iz reakcijske smjese u određenim vremenskim intervalima, koji su analizirani plinskom kromatografijom.

Osim toga, zbog održivosti i potencijalnog prijenosa procesa u veće mjerilo (*eng. scale up*), potrebno je opravdati i upotrebu NADES-a iz ekonomskog aspekta. Procjena cijena NADES-a vrši se analizom cijena pojedinih čistih komponenti dostupnih na službenoj stranici Mercka, Njemačka. Procijenjene vrijednosti iznose: 43 \$ kg⁻¹ za ChEG, 48 \$ kg⁻¹ za ChGly i 84 \$ kg⁻¹ za ChGlc. Taj cjenovni rang odgovara ostalim organskim otapalima kao što je 99 %-tni *n*-heptan (81,53 \$ kg⁻¹), što čini NADES-e povoljnima za upotrebu u većem mjerilu.

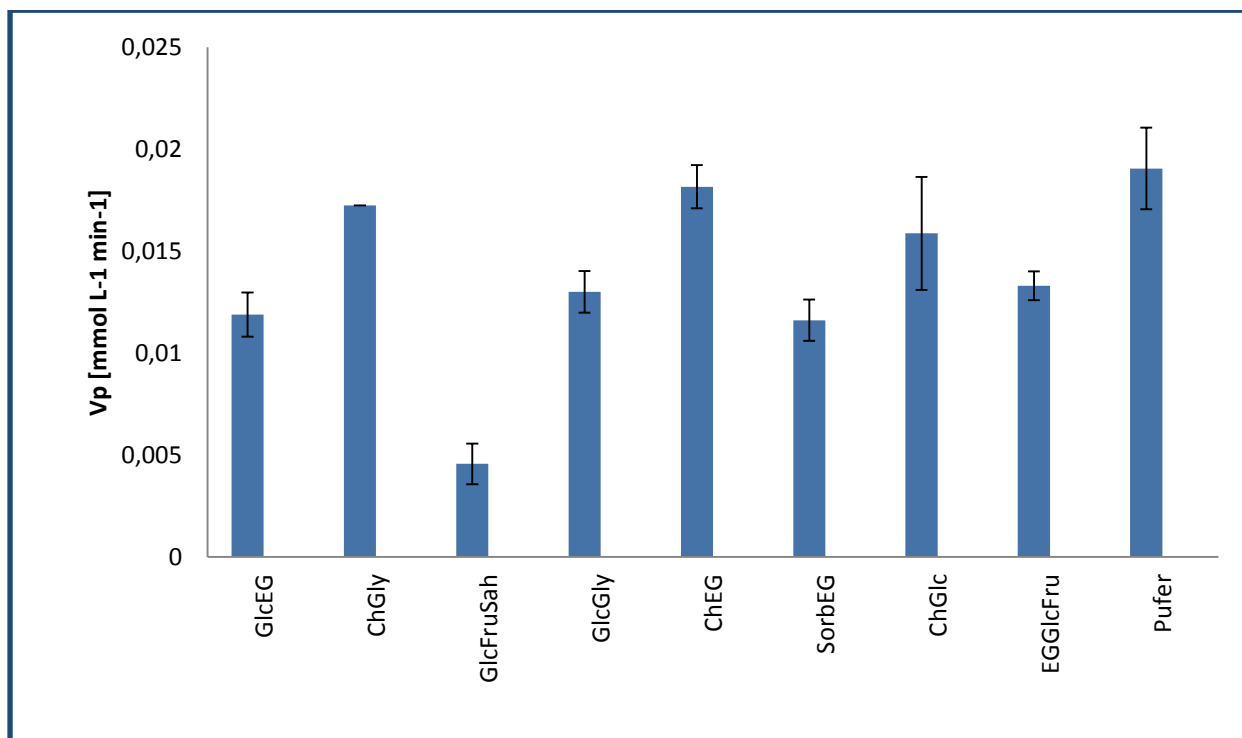
Dobiveni rezultati pokazali su da lipaza posjeduje jaku stereoselektivnost prema *R*-enantiomeru, bez obzira na korišteni NADES ($ee = 99\%$). Ta stereoselektivnost je povoljna jer omogućava izravnu proizvodnju željenog *R*-alkohola bez daljnjih kemijskih manipulacija. S druge strane pokazalo se da izmjerena početna brzina reakcije, iskorištenje i produktivnost ovise o korištenom NADES-u.

Početna brzina reakcije u različitim NADES-ima kreće se u rasponu $0,1323 - 0,2968 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok je početna brzina reakcije u puferu iznosila $0,3690 \text{ mmol L}^{-1}$ (slika 7). Najveća početna brzina reakcije primijećena je u konvencionalnom otapalu što nije iznenađujuće budući da su Durand i sur. (2012) zaključili da lipazi u NADES-u treba određeno vrijeme da postigne svoju konačnu strukturu zbog čega je prisutno smanjenje aktivnosti u prvim satima inkubacije. Konverzija (X) lipazom katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata kreće se u rasponu od $11,69 - 41,14\%$ pri čemu između NADES-a najveću vrijednost pokazuje ChEG_{50%} ($39,21\%$) te ChGly_{50%} ($37,22\%$), ali su gotovo jednaka kao u puferu ($41,14\%$) što je prikazano na slici 7.



Slika 7. Početne brzine reakcije (A) i konverzija (X) hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata u različitim NADES-ima (50 % v/v) i puferu. Reakcijski uvjeti: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (*R*, *S*)-1-fenileti-acetat; 5 mg Novozym 435; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1 mL

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti lipazom katalizirane hidrolize (V_p) u NADES-ima u rasponu su od 0,0046 – 0,0182 mmol L⁻¹ min⁻¹ (slika 8). Najviše vrijednosti volumetrijske produktivnosti postignute su u ChEG_{50%} (0,0182 mmol L⁻¹). ChGLy_{50%} također pokazuje visoke vrijednosti (0,0172 mmol L⁻¹), no postignuta je manja početna brzina te nešto niža konverzija dok su vrijednosti u puferu slične kao u NADES-u (0,0190 mmol L⁻¹). Što se tiče cijene NADES-a, na osnovi troškova sirovina procijenjena cijena varira od približno 5,57 € kg⁻¹ za GlcGly do 656,89 € kg⁻¹ za SorEG.



Slika 8. Volumetrijska produktivnost (V_p) hidrolize (*R, S*)-1-feniletetil-acetata u različitim NADES-ima (50 % v/v) i puferu. Reakcijski uvjeti: 0,05 molL⁻¹ (*R, S*)-1-feniletetil-acetat; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 1 mL

Hidroliza (*R, S*)-1-feniletetil-acetata uspješno je provedena u svim sintetiziranim NADES-ima pri čemu je, na temelju eksperimentalnih podataka o ponašanju lipaze u ispitivanim otapalima, literaturnim podacima o toksičnosti i cijeni otapala, ChEG_{50%} odabran kao najperspektivnije otapala za danu reakciju pa je korišten za daljnju optimizaciju.

4.2. OPTIMIZACIJA PROCESA U LABORATORIJSKOM MJERILU

Učinkovitost biokatalitičkog procesa ovisi o brojnim parametrima koji mogu djelovati zavisno i nezavisno. Zbog velikog broja parametara gotovo je nemoguće odrediti i kontrolirati sve istovremeno, stoga je nužno odabrati one koji imaju najveći utjecaj na promatrani proces. Pretraživanjem literature uočeno je da količina vode u NADES-u, temperatura, pH vrijednost, odnos enzima i supstrata te vrijeme trajanja reakcije znatno utječu na aktivnost enzima. Količine vode ($> 60\%$) u NADES-u mogu oštetiti jaku mrežu vodikovih veza (Cheng i Zhang, 2017; Khandelwal i sur., 2016), ali s druge strane manje količine vode ($< 30\%$) mogu negativno utjecati na hidrolizu. Osim udjela vode, za optimalnu aktivnost enzima potrebno je podesiti i odgovarajuću temperaturu te koncentraciju supstrata koja neće uzrokovati inhibiciju supstratom (Pätzold i sur., 2019). Dakle, na temelju prethodnih rezultata i literaturnih podataka, u ovom radu ispitivane su sljedeće neovisne varijable: temperatura ($20 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$), udio vode u NADES-u ($10 - 50\%$) te omjer enzima i supstrata ($0,1 - 0,5$) pri vremenu trajanja reakcije od 24h.

Kako bismo odredili optimalne uvjete hidrolize potrebno je provesti eksperiment u svim mogućim kombinacijama što zahtijeva veliki broj eksperimenata. Međutim, u današnje vrijeme moguć je pristup računalnim programima koji reduciraju broj eksperimenata, a sukladno tome i količinu utrošene energije i sredstava. Metoda odzivnih površina kao skup matematičkih i statističkih tehnika pokazala se kao praktičan alat u planiranju i reduciranju pokusa. Optimiranje navedenih uvjeta provedeno je uz pomoć programa Design Expert 7.0.0. metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa. Nakon provedenih eksperimenata i naknadne analize dobiven je odziv, odnosno konverzija procesa pri ispitivanim uvjetima.

Dobivena konverzija varirala je od $27,89 - 45,16\%$ (tablica 6). Najviša konverzija ispitivanog odgovora dobivena je korištenjem ChEG sa udjelom vode od 50% , omjerom E/S u iznosu $0,1$ i temperaturom od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tablica 6).

Nadalje, izvršena je procjena RSM modela, a za izračunavanje statističke značajnosti modela korištena je analiza varijance (ANOVA) na osnovu koje se može utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela. Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta (R^2) koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka (u idealnom slučaju iznosi 1) te vrijednosti p koja pokazuje statističku značajnost vrijednosti predviđenih modelom (tablica 7). Kada su p -vrijednosti za određene članove odzivnog polinoma manje od $0,05$ ti članovi su značajni. To znači da je vjerojatnost dobivanja tako velike F

vrijednosti manja od 5 %. Prema tome, utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih vrijednosti konverzije bioprocesa kvadratnim modelom statistički značajna, što znači da je primjena modela opravdana za ispitivano područje.

Polinomna jednadžba drugog reda za konverziju bioprocesa je sljedeća:

$$\begin{aligned} \text{Konverzija (\%)} = & \\ & = 35,81 + 6,75 \cdot X_1 + 3,44 \cdot X_2 + 11,47 \cdot X_3 + 1,92 \cdot X_1X_2 + 2,82 \cdot X_1X_3 + 1,15 \\ & \cdot X_2X_3 - 2,71 \cdot X_1^2 - 3,29 \cdot X_2^2 + 1,60 \cdot X_3^2 \end{aligned}$$

gdje je X_1 temperatura, X_2 udio vode u ChEG a X_3 omjer E/S.

Rezultati pokazuju da na vrijednost konverzije bioprocesa najveći utjecaj imaju dvije neovisne varijable tj. udio vode u ChEG (X_2 ; $p < 0,0001$) i omjer E/S (X_3 ; $p < 0,0001$), dok utjecaj temperature nije toliko značajan (X_1 ; $p = 0,7410$). Interakcija ispitivanih parametara značajna je u slučaju kombinacije temperature i udjela vode u ChEG (X_1X_2), kao i kombinacija temperature i omjera E/S (X_1X_3) dok interakcija udjela vode i omjera E/S pri konstantnoj temperaturi nije značajan parametar (X_2X_3). Osim toga vidljiv je značajan učinak kvadratnog faktora X_1 (temperatura).

ANOVA je pokazala dobru usklađenost između predviđenih modela i eksperimentalnih podataka s koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9449$. Koeficijent korelacije ukazuje na to da predloženi model može objasniti 94,49 % rezultata. Osim toga statistički parametar "nedostatak modela" (eng. *Lack of fit*) nije bio statistički značajan za $p < 0,05$ (tablica 7). Rezultati su također pokazali da je model koji je korišten za prilagodbu varijabli odgovora značajan ($p < 0,0001$) i prikladan za opis odnosa između neovisnih varijabli i odgovora.

Prema razvijenom RSM modelu optimalni uvjeti za konverziju bioprocesa su: udio vode od 50 %, temperatura u iznosu od 40 °C i omjer E/S 0,1. Uz korištenje optimalnih uvjeta model je predviđao konverziju od 44,98 %, dok je nakon izvođenja tog eksperimenta u optimalnim uvjetima konverzija bila 48 %

Tablica 6. Eksperimentalni model i vrijednosti promatranog odziva

Broj eksperimenta	X_1	X_2	X_3	Y
	T (°C)	% H ₂ O	E/S	X (%)
1	40	50	0,1	45,16
2	20	10	0,55	27,89
3	60	30	1	38,93
4	20	30	1	32,87
5	40	30	0,55	41,27
6	60	10	0,55	30,08
7	40	30	0,55	38,12
8	40	50	1	41,63
9	20	30	0,1	38,83
10	60	30	0,1	37,66
11	40	10	1	29,62
12	40	10	0,1	36,80
13	60	50	0,55	38,95
14	20	50	0,55	43,99
15	40	30	0,55	41,20

Tablica 7. Statistička analiza (ANOVA) dobivenih odgovora

Izvor varijabilnosti	Konverzija			
	SS	MS	F -vrijednost	P -vrijednost
Model	362,33	40,26	9,53	0,0115
X_1	0,52	0,52	0,12	0,7410
X_2	256,97	256,97	60,85	0,0006
X_3	29,66	29,66	7,02	0,0454
$X_1 X_2$	13,06	13,06	3,09	0,1390
$X_1 X_3$	13,08	13,08	3,10	0,1387
$X_2 X_3$	3,33	3,33	0,79	0,4155
X_1^2	35,43	35,43	8,39	0,0339
X_2^2	12,90	12,90	3,06	0,1409
X_3^2	$1,776 \cdot 10^{-3}$	$1,776 \cdot 10^{-3}$	$4,25 \cdot 10^{-4}$	0,9844
Ostatak	21,12	4,22		
Nedostatak modela	14,66	4,89	1,51	0,4213
Pogreška	6,45	3,23		
Ukupno	383,45			
R^2	0,9449			

$P < 0,01$ veoma značajno; $0,01 \leq P < 0,05$ značajno; $P \geq 0,05$ nije značajno

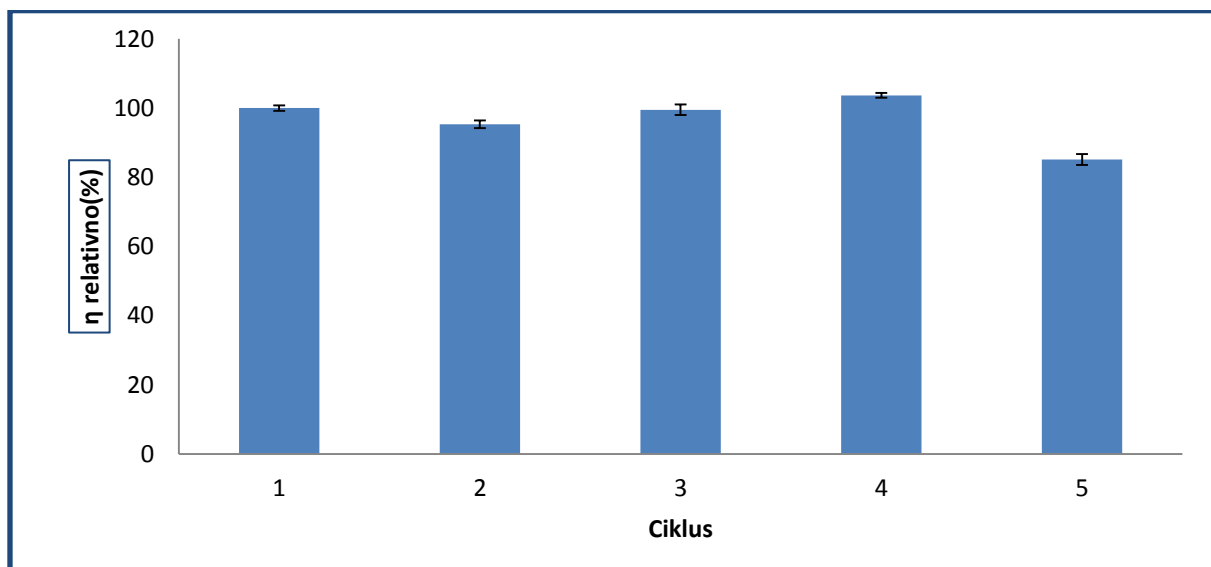
X_1 : temperatura; X_2 : udio vode u ChEG; X_3 : E/S

SS – suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; MS – varijanca

4.3. IZDVAJANJE I RECIKLACIJA ENZIMA

Budući da glavni trošak biokatalitičkog procesa predstavlja pročišćavanje (eng. *downstream proces*) (Asenjo i Andrews, 2008), posljednji korak u dizajniranju učinkovitog biokatalitičkog procesa koji uključuje primjenu NADES-a jest izolacija i pročišćavanje proizvoda, recikliranje enzima i otapala te njihova ponovna upotreba. U svrhu toga provedeno je razdvajanje (*R*)-1-feniletanola od ChEG_{50%}. Prvi korak uključuje uklanjanje biokatalizatora iz reakcijske smjese.

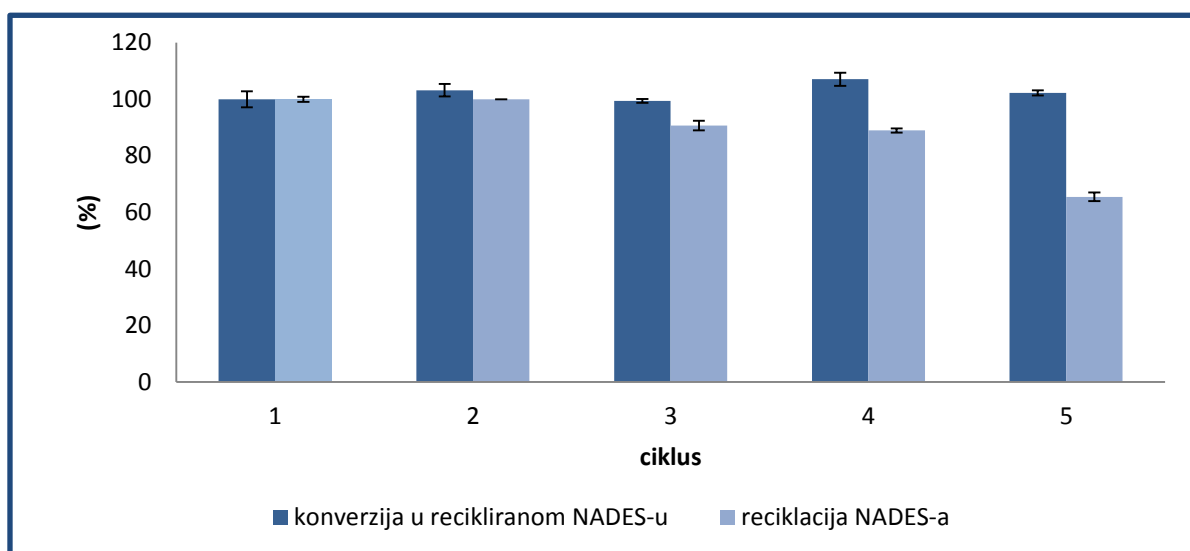
Nakon reakcije, Novozym 435 uklonjen je filtracijom iz reakcijske smjese. Enzim je ispran etil-acetatom i vodom te osušen i ponovno upotrijebljen za kinetičku rezoluciju (*R, S*)-1-feniletetil-acetata u svježem otapalu. Taj postupak ponovljen je četiri puta. Na kraju petog ciklusa, konverzija je bila 85,14 % dok se enantiomerni višak ($ee > 99\%$) nije smanjio niti u jednoj ponovljenoj seriji (slika 9). Liang i sur. (2012) također su primijetili sličan učinak proučavajući recikliranje Novozym-a 435 u mediju baziranom na puferu gdje se vrijednost enantiomernog viška nije mijenjala kroz 11 ciklusa, a relativna aktivnost bila je 70 %. Nešto veći pad aktivnosti primijetili su (Guajardo i sur., 2017) gdje je aktivnost enzima bila 47 % nakon pet ciklusa recikliranja u ChGly 92 % (v/v).



Slika 9. Učinkovitost enzima nakon reciklacije. Reakcijski uvjeti: 0,05 M (*R, S*)-1-feniletetil-acetat; 5 mg Novozym 435; 40 °C; 1 mL

4.4. IZOLACIJA PRODUKTA I RECIKLACIJA OTAPALA

Veći izazov od recikliranja imobiliziranog enzima prilikom pročišćavanja predstavlja izolacija produkta iz NADES-a. Prilikom provođenja biokatalize u organskom otapalu, otapalo se obično upari, a konačni produkt se dalje pročisti. S druge strane, nizak tlak pare NADES-a otežava uparivanje tih otapala što može predstavljati problem u industrijskoj primjeni (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Trenutno dostupna literatura predlaže nekoliko mogućnosti za izdvajanje ciljanog spoja i recikliranje NADES-a. Tu se ubrajaju ekstrakcija tekuće-tekuće korištenjem drugog otapala, ekstrakcija kruto-tekuće korištenjem makroporozne smole i dodavanje antisolventa (Ruegas-Ramon i sur., 2017). U našem slučaju, nakon kinetičke rezolucije (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata, produkt (*R*)-1-feniletanol i neizreagirani (*S*)-1-feniletil-acetat izolirani su koristeći etil-acetat kao otapalo. Zatim su (*R*)-1-feniletanol i neizreagirani (*S*)-1-feniletil-acetat iz organske faze razdvojeni na koloni silikagela koristeći etil-acetat kao mobilnu fazu. Učinkovitost razdvajanja proizvoda bila je 81,24 %. Nakon uklanjanja proizvoda i neizreagirano supstrata, recikliran je NADES. Reciklirani ChEG_{50%} ponovno je upotrijebljen za sljedeći krug proizvodnje (*R*)-1-feniletanola. Prinos NADES-a recikliranog pet puta smanjio se za 35 % u odnosu na svježe sintetizirano otapalo. Hidroliza je također provedena u recikliranom NADES-u, a konverzija i enantioselektivnost u recikliranom otapalu bile su jednake kao u svježe sintetiziranom otapalu tijekom 5 ciklusa (slika 10).



Slika 10. Uspješnost reciklacije NADES-a i konverzija reakcije hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata u recikliranom ChEG_{50%} (*X*). Reakcijski uvjeti: 0,05 molL⁻¹ (*R*, *S*)-1-feniletil-acetat; 5 mg Novozym 435; 40 °C; 1 mL

4.5. PRIJENOS REAKCIJE U VEĆE MJERILO

Nakon optimizacije procesa u laboratorijskom mjerilu, biokataliza je provedena u reakcijskoj smjesi od 500 mL u optimalnim uvjetima iz laboratorijskog mjerila (40 °C, 50 % vode u ChEG i omjer E/S 0,55). Konverzija reakcije je bila 54,7 % što je slično kao u optimalnim uvjetima u laboratorijskom mjerilu (tablica 8), dok je enantioselektivnost bila jednaka kao u laboratorijskom mjerilu. Iz pregleda literature čini se kako je uvećanje mjerila biokatalitičkih reakcija u NADES-u provedeno samo do preparativnog mjerila (do 500 mL). Xu i sur. (2015) proveli su redukciju 3-kloropropiofenona kataliziranu imobiliziranim stanicama *Acetobacter sp.* (CCTCC M209061 stanice) u otapalu kolin-klorid : urea (500 mL) pod optimalnim uvjetima iz laboratorijskog mjerila (5 mL). Prinos (82,3 %) je bio nešto niži nego što je postignuto pod optimalnim uvjetima u laboratorijskom mjerilu gdje je iznosio 93,3 %, dok je vrijednost enantiomernog viška ostala jednako visoka kao u laboratorijskom mjerilu. Panić i sur. (2018) proveli su uvećanje laboratorijskog mjerila za reakciju redukcije 1-(3,4-dimetilfenil) etanona (DMPA) koristeći *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizator. Iskorištenje redukcije u većem mjerilu (300 mL) bilo je 89,91 %, slično kao u laboratorijskom mjerilu.

Nakon završetka reakcije u većem mjerilu, provedena je izolacija i pročišćavanje proizvoda te reciklacija otapala i njegova ponovna upotreba. Prinos recikliranog ChEG_{50%} bio je 97 % dok je učinkovitost pročišćavanja feniletanola bila 49,48 % što je 30 % niže u odnosu na laboratorijsko mjerilo (tablica 8). Panić i sur. (2018) također su proveli *downstream* proces nakon preparativnog mjerila, a rezultati su bili nešto niži ili približno isti u odnosu na laboratorijsko mjerilo kao što je i u našem slučaju.

Tablica 8. Sažeti prikaz rezultata iz laboratorijskog i preparativnog mjerila

	<i>Sinteza (R)-1-feniletanola</i>	<i>Izdvajanje i pročišćavanje (R)-1-feniletanola</i>	
	<i>X</i> [%]	η_{ChEG} [%]	$\eta_{(R)-1\text{-feniletanol}}$ [%]
Laboratorijsko mjerilo (1 mL)	48	100-65,5	81,24
Preparativno mjerilo (500 mL)	54,57	97	49,48

Gdje je *X* (%) konverzija reakcije, η_{ChEG} prinos recikliranog ChEG_{50%} a $\eta_{(R)-1\text{-feniletanol}}$ učinkovitost pročišćavanja feniletanola.

U ovom radu razvijena je visoko učinkovita i ekološka metoda za proizvodnju (*R*)-1-feniletanola korištenjem lipaze u NADES-u. Prilikom probira otapala uočen je značajan utjecaj različitih otapala na uspješnost reakcije čime se može uočiti važnost racionalnog i prikladnog odabira NADES-a i njegovog utjecaja na aktivnost enzima. Obzirom da se kao najpogodnije otapalo za reakciju pokazalo ChEG_{50%}, u njemu je optimirana reakcija enantioselektivne hidrolize i dokazani su uvjeti pri kojima se postižu najveće vrijednosti iskorištenja reakcije. Nakon hidrolize, ChEG_{50%} uspješno je recikliran i ponovno upotrijebljen što dokazuje njegovu ekonomsku vrijednost. Osim toga, nakon optimizacije procesa u laboratorijskom mjerilu, proizvodnja (*R*)-1-feniletanola uspješno je provedena i u preparativnom mjerilu (500 mL) što zajedno sa ostalim rezultatima čini ovaj proces veoma zanimljivim za industrijsku primjenu.

Rad prikazuje veliku perspektivu u području upotrebe NADES-a kao zelenih otapala koja bi zamijenila postojeća organska otapala što ima prednost u ekološkom, ekonomskom i procesnom smislu. Sama upotreba zelenih otapala jedan je od ključnih koraka zelene kemije i doprinosi borbi protiv nastajanja industrijskog otpada s obzirom na to da su organska otapala jedan od najvećih onečišćivača.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Budući da se NADES-i smatraju zelenim otapalima, a odabir otapala predstavlja glavni dio optimizacije biokatalitičkog procesa, izbor najperspektivnijih otapala temelji se na njihovoj toksičnosti, fizikalno-kemijskim svojstvima te ekonomskoj isplativosti.
2. Prilikom probira otapala uočen je značajan utjecaj različitih otapala na uspješnost reakcije. Racionalnim odabirom NADES-a moguće je utjecati na aktivnost enzima.
3. Na temelju eksperimentalnih podataka o ponašanju lipaze u ispitivanim otapalima, literaturnim podacima o toksičnosti i cijeni otapala kao najperspektivnije otapalo odabran je ChEG_{50%}.
4. Optimiranjem uvjeta reakcije hidrolize katalizirane lipazom B ustanovljeno je da su uvjeti pri kojima se postižu najveće vrijednosti konverzije reakcije hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata u otapalu ChEG: udio vode od 50 %, temperatura 40 °C, omjer enzima i supstrata 0,1 pri čemu je postignuta konverzija u iznosu 48 %.
5. Lipaza je pokazala stabilnost u korištenom otapalu, visoku efikasnost nakon recikliranja i ponovne upotrebe enzima što može biti vrijedno s ekonomskog i ekološkog stajališta.
6. Izdvajanje produkta i recikliranje otapala može predstavljati problem u industrijskoj primjeni zbog otežanog uparavanja, ali trenutno postoji nekoliko mogućnosti za izdvajanje ciljanog spoja i reciklaciju NADES-a što, s obzirom na visoku vrijednost konverzije i enantioselektivnosti u recikliranom otapalu, također može imati veliku ekonomsku i ekološku korist.
7. Razvijena je vrlo učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda za proizvodnju (*R*)-1-feniletanola sa lipazom u NADES-u.

6. LITERATURA

Anastas, P. T., Warner J. C. (1998) Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, **107**, 2167.

Asenjo, J.A., Andrews, B.A. (2008) Mini-review Challenges and trends in bioseparations. *Chem. Eng.* **120**, 117 – 120.

Cheng, Q.-B., Zhang, L.-W. (2017) Highly Efficient Enzymatic Preparation of Daidzein in Deep Eutectic Solvents. *Molecules*, **22**, 186.

Clarke, C. J., Tu, W. C., Levers, O., Bröhl, A., Hallett, J. P. (2018) Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chem. Rev.* **118**, 747 – 800.

Crittenden, J.C., Trussell, R.R., Hand, D.W., Howe, K.J. and Tchobanoglous, G. (2012) Appendix C: Physical Properties of Water. In MWH's Water Treatment: Principles and Design, John Wiley and Sons, New Jersey.

Cvjetko Bubalo M. (2012) Priprava, primjena u biotransformacijama i citotoksičnost odabranih imidazolijevih ionskih tekućina (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Vorkapić-Furač, J. i Gaurina Srček, V. (2014) Ionic Liquids – Development and Challenges in Industrial Application. *Kem. Ind.* **63** (5-6), 163 – 171.

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

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

Dunn, P. J., Wells, A. S., Williams, M. T. (2010) Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry, Wiley – VCH, Weinheim, Germany.

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., Villeneuve, P. (2012) Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem.* **47**, 2081 – 2089.

Guajardo, N., Domínguez de María, H. P., Ahumada, K., Schrebler, R. A., Ramírez-Tagle, R., Crespo, F. A., Carlesi, C. (2017) Water as Cosolvent: Nonviscous Deep Eutectic Solvents for Efficient Lipase-Catalyzed Esterifications. *Chem. Cat. Chem.* **9**, 1393 – 1396.

Hernáiz, M. J., Alcántara, A. R., García, J. I., Sinisterra, J. V. (2010) Applied biotransformations in green solvents. *Chem. - A Eur. J.* **16** (31), 9422 – 9437.

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

Jukić, M., Daković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Vorkapić-Furač, J. (2004) “Zelena” kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kem. Ind.* **53**, 217 – 224.

Khandelwal, S., Tailor, Y. K., Kumar, M. (2016) Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *J. Mol. Liq.* **215**, 345 – 386.

Liang, F., Huang, J., He, J., Wang, P. (2012) Improved Enantioselective Hydrolysis of Racemic Ethyl-2, 2- dimethylcyclopropanecarboxylate Catalyzed by Modified Novozyme 435. *Biotechnol. Bioproc.* **17**, 952 – 958.

Maugeri, Z. (2014) Deep Eutectic Solvents: Properties and Biocatalytic applications (Dissertation), Fakultät für Mathematic, Informatik und Naturwissenschaften, RWTH Aachen University zur Erlangung.

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

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural deep eutectic solvents – Solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063 – 1071.

Paiva, A., Matias, A. A., Duarte, A. R. C. (2018) How do we drive deep eutectic systems towards an industrial reality? *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **11**, 81 – 85.

Panić, M., Delač, D., Marin, R., Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M. (2018) Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives : *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. *Biotechnol. Lett.* **41**, 253-262.

Pätzold, M., Weimer, A., Liese, A., Holtmann, D. (2019) Optimization of solvent-free enzymatic esterification in eutectic substrate reaction mixture. *Biotechnol. Reports.* **22**, e00333.

Polaina, J., MacCabe, A. P. (2007) *Industrial enzymes: Structure, function and applications*, Springer, Netherland.

Rios, N. S., Pinheiro, M. P., Cleiton, J., Santos, S., Fonseca, T. D. S., Lima, L. D., Mattos, M. C. De, Freire, D. M. G., Ivanildo, J., Júnior, S., Rodríguez-aguado, E., Gonc, L. R. B. (2016) Enzymatic Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R , S) - Phenylethyl acetate. *J. Mol. Catal.B.* **133**, 246 – 258.

Ruesgas-Ramon, M., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E. (2017) Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 3591 – 3601.

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., Sumana, C. (2018) Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol. Prog.* **34**, 5 – 28.

Sheldon, R. A. (2017) The E factor 25 years on: The rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem.* **19**, 18 – 43.

Sheldon, R. A., Woodley, J. M. (2018) Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **118**, 801 – 838.

Tao, J., Kazlauskas, R. (2011) *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, John Wiley and Sons, New Jersey.

Woodley, J. M. (2008) New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* **26** (6), 321 – 327.

Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41** (21), 7108 – 7146.

P. Xu, Y. Xu, X.F. Li, B.Y. Zhao, M.H. Zong, W.Y. Lou (2015) Enhancing asymmetric reduction of 3-chloropropiophenone with immobilized acetobacter sp. CCTCC M209061 cells by using deep eutectic solvents as cosolvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**, 718 – 724.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Izabela Maros