

# Utjecaj sadržaja vode u kolinijevom eutektnom otapalu na tijek lipazom katalizirane esterifikacije

---

Pavlovski, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

*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:159:140129>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno – biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij – Biotehnologija

**IVANA PAVLOVSKI**  
**6491/BT**

**UTJECAJ SADRŽAJA VODE U KOLINIJEVOM EUTEKTIČNOM  
OTAPALU NA TIJEK LIPAZOM KATALIZIRANE ESTERIFIKACIJE**

**Modul:** Biotransformacije

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Zagreb, 2015.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

### UTJECAJ SADRŽAJA VODE U KOLINIJEVOM EUTEKTIČNOM OTAPALU NA TIJEK LIPAZOM KATALIZIRANE ESTERIFIKACIJE

Ivana Pavlovski , 6491/BT

**Sažetak:** Esterifikacije katalizirane lipazama jedne su od industrijski najznačajnijih kemijskih reakcija. Tradicionalno se ove reakcije odvijaju u organskim otapalima od kojih je većina ekološki neprihvatljiva zbog hlapljivosti i toksičnosti. Stoga, pokušavaju se pronaći nova rješenja kako bi enzimi koji kataliziraju ove reakcije bili visoko aktivni i stabilni u drugim, ekološki prihvatljivijim medijima. Ovaj rad razmatra upotrebu eutekličnih otapala, otapala nove generacije, kao učinkovitog medija za odvijanje *Candida antarctica* lipazom B katalizirane sinteze butil-acetata, kratkolančanog estera od industrijskog značaja, u kolinijevom eutekličnom otapalu sa različitim sadržajem vode.

**Ključne riječi:** esterifikacija, lipaza, butil acetat, euteklična otapala

**Rad sadrži:** 22 stranice, 9 slika, 2 tablice, 22 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo, viši asistent

**Rad predan:** rujan 2015.

## DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

### THE IMPACT OF WATER CONTENT IN CHOLINIUM BASED EUTECTIC SOLVENT ON THE COURSE OF LIPASE-CATALYZED ESTERIFICATION

Ivana Pavlovski 6491/BT

**Abstract:** Lipase-catalyzed esterifications are one of the most important chemical reactions of industrial matter. Traditionally, these reactions are performed in organic solvents which are toxic and volatile. Thus, new approaches are being established to achieve high enzyme activity and stability in green solvents. This work examines the use of deep eutectic solvents, new generation solvents, as an efficient medium for *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of butyl-acetate, short-chained industrially important ester, in cholinium based eutectic solvent with different water content.

**Keywords:** esterification, lipase, butyl acetate, deep eutectic solvents

**Thesis contains:** 22 pages, 9 figures, 2 tables, 22 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Assoc. prof. Ivana Radojčić Redovniković

**Technical support and assistance:** Ph.D. Marina Cvjetko Bubalo, Scientific Assistant

**Thesis delivered:** September 2015.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Lipazama katalizirane reakcije esterifikacije .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Svojstva lipaza.....	2
2.1.2. Primjena lipaza u reakcijama esterifikacije .....	4
<b>2.2. Eutektična otapala .....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Svojstva i priprema eutektičnih otapala .....	5
2.2.2. Primjena eutektičnih otapala .....	7
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>10</b>
3.1.1. Kemikalije .....	10
3.1.2. Oprema i uređaji.....	10
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>10</b>
3.2.1. Sinteza eutektičnih otapala .....	10
3.2.2. Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata.....	11
3.2.2.1. Određivanje koncentracije butil-acetata .....	11
3.2.2.2. Sinteza butil-acetata .....	13
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>15</b>
4.1. Priprema eutektičnog otapala .....	15
4.2. Lipazom katalizirana sinteza butil acetata .....	15
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>20</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>21</b>

## **1. UVOD**

Zbog velikog industrijskog napretka posljednja dva desetljeća dolazi do nagomilavanja otpada koji ima negativan utjecaj na Zemlju i čitavu njenu populaciju. Štetne supstancije zagađuju zrak i tlo te su uzrok različitih oboljenja. Stoga se posljednjih nekoliko desetaka godina počela razvijati svijest o nužnosti zaštite i očuvanja okoliša na svim razinama. *Zelena kemija* je relativno novi program koji se zasniva na primjeni kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno eliminiraju upotrebu ili proizvodnju supstancija koje su opasne po ljudsko zdravlje i okoliš. Budući da kemijska i biotehnološka industrija koriste organska otapala tijekom provođenja različitih reakcija sinteze i biokatalize, a koja su vrlo škodljiva zbog svoje visoke hlapljivosti i toksičnosti, u sklopu *zelene kemije* veliko zanimanje znanstvene zajednice privukla su otapala nove generacije koja se nameću kao alternativa tradicionalnim toksičnim organskim otapalima te su u službi održivog razvoja. Riječ je o ionskim kapljevinama i eutektnim otapalima, a u ovom radu naglasak je na eutektnim otapalima. Ova se otapala odlikuju izuzetnom stabilnošću, nisu hlapljiva, jednostavna su za pripravu, jeftina i što je jako važno, ekološki su prihvatljiva. Moguće ih je reciklirati i opetovano koristiti. Njihovom primjenom mogla bi se uvelike reducirati potreba za organskim otapalima. Budući da se ova otapala mogu kroititi s točno određenim svojstvima za određenu primjenu, smatra se da će njihov razvoj otvoriti brojne mogućnosti. Predviđa se da će eutektna otapala, zbog niskih ukupnih troškova te biorazgradivosti i biokompatibilnosti, biti široko zastupljena kao otapala za biokatalitičke reakcije, posebice u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

U ovom radu ispitan je utjecaj sadržaja vode u kolinijevom eutektnom otapalu na lipazom kataliziranu sintezu butil-acetata, industrijski značajnog estera, acilacijom *n*-butanola anhidridom octene kiseline.

## **2. TEORIJSKI DIO**



## 2.1. Lipazama katalizirane reakcije esterifikacije

### 2.1.1. Svojstva lipaza

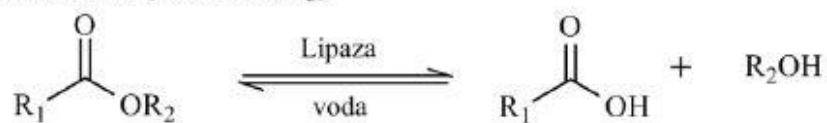
Lipaze (triacilglicerol acilhidrolaze, E.C. 3.1.1.3) su enzimi koji hidroliziraju esterske veze triglicerola masnih kiselina. Ovi enzimi pokazuju široku supstratnu specifičnost te su vrlo regio - i/ili stereoselektivni. Također, vrlo su aktivni i stabilni i pri vrlo nepovoljnim uvjetima (Jaeger i sur., 1999). Dobivaju se u zadovoljavajućim količinama iz životinjskih i biljnih organizama te iz prirodnih ili rekombinantnih mikroorganizama (Stergiou i sur., 2013). Premda lipaze iz različitih izvora mogu katalizirati iste reakcije, razlikuju se po načinu vođenja procesa pod istim reakcijskim uvjetima (Yahya i sur., 1998). Lipaze kataliziraju različite reakcije poput hidrolize, esterifikacije, transesterifikacije i interesterifikacije (slika 1), pri čemu je esterifikacija jedan od najvažnijih kemijskih i biokemijskih procesa u industriji. Lipaze kao hidrolizirajući agensi su aktivne u okolini koja sadrži barem dvije različite faze, gdje su svi reaktanti razdvojeni između tih faza, iako njihova raspodjela nije fiksna i mijenja se kako reakcija napreduje (Stergiou i sur., 2013). Ovi enzimi imaju najveću katalitičku moć upravo na granici faza. Taj se fenomen zove *aktivacija na granici faza*, a objašnjava se konformacijskim promjenama koje izlažu aktivno mjesto lipaze. Ako u reakcijskom sustavu ne postoji granica faza, lipaze će svejedno katalizirati reakciju, ali će njihova katalitička moć biti značajno smanjena (Ghanem, 2007).

U biokatalitičkim reakcijama ukupna koncentracija korištenog enzima važna je stavka, budući da utječe na trajanje reakcije i prinos produkta. Najčešće se primjenjuju imobilizirane lipaze zbog manjih gubitaka enzimske aktivnosti u odnosu na neimobilizirane. Imobilizirani su enzimi u pravilu termostabilniji od slobodnih, mogu se skladištiti dulji period, stabilniji su tijekom vođenja procesa te je olakšana regeneracija enzima što dovodi do smanjenja ukupnih troškova (Stergiou i sur., 2013).

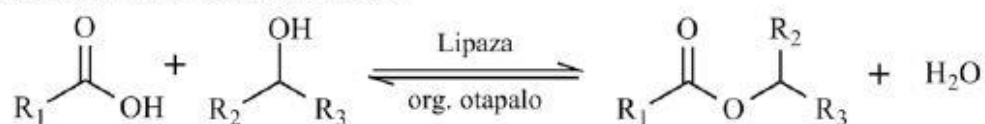
Veliku primjenu lipaze su našle u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te u različitim tehnologijama (Stergiou i sur., 2013). Zbog svojih raznolikih katalitičkih svojstava, primjenjuju se u razdvajanju masti, modifikaciji masti i ulja, kao dodatak detergentima te u različitim analitičkim procesima (Yahya i sur., 1998). Jedna od zanimljivih primjena lipaza je za dobivanje biogoriva, prirodnog izvora energije koji se odlikuje netoksičnošću i biorazgradivošću. Sintetizira se iz masti i ulja transesterifikacijom i/ili esterifikacijom, a kao supstrati koriste se trigliceridi ili masne kiseline i alkohol (npr. iz otpadnih biljnih ulja i biomase algi). Korištenjem lipaza za razgradnju biljnih ulja ne dolazi do stvaranja neželjenih

nusprodukata (poput sapuna), reakcija se odvija u jednom stupnju bez koraka koji uključuje uklanjanje intermedijera te zahtijeva znatno manje količine alkohola u odnosu na uobičajene katalizatore. Najperspektivnije lipaze za dobivanje biogoriva su one dobivene iz kvasaca, premda se koriste i bakterijske lipaze koje su također pokazale zadovoljavajuće rezultate (Stergiou i sur., 2013).

1. Hidroliza (vodeni medij)

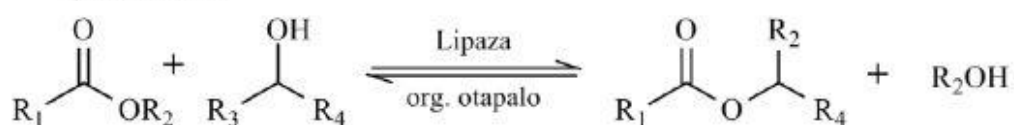


2. Esterifikacija (organski medij)

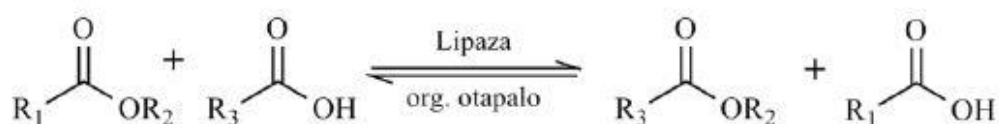


3. Transesterifikacija

a) alkoholiza



b) acidoliza



4. Interesterifikacija



**Slika 1.** Primjeri reakcija kataliziranih lipazama (Ghanem, 2007).

### 2.1.2. Primjena lipaza u reakcijama esterifikacije

Reakcije esterifikacije katalizirane lipazama su zadobile važnost tijekom prošlog desetljeća zbog povećane upotrebe organskih estera u biotehnologiji i kemijskoj industriji. Važni faktori koji utječu na prinos estera su koncentracija enzima i supstrata, njihov molarni odnos, pH vrijednost reakcijske smjese, temperatura, stupanj izmiješanosti i sadržaj vode. Katalitički aktivna trodimenzionalna struktura enzima ovisi o brojnim vodikovim vezama, hidrofobnim interakcijama, Van der Waalsovima silama te dipolnim interakcijama koje se događaju unutar same proteinske molekule te između proteina i otapala. Topljivost enzima u organskim otapalima varira te ovisi o svojstvima i samog enzima i otapala (Stergiou i sur., 2013).

Voda ima ključni utjecaj na ponašanje lipaza, bilo izravno utječući na hidrataciju enzima ili posredno, mijenjajući prirodu reakcijskog medija i/ili materijala na koji je enzim vezan. Stvaranje vode u reakcijama esterifikacije predstavlja problem jer dolazi do reverzibilne reakcije, odnosno hidrolize estera (Yahya i sur., 1998). Postoji izravna veza između sadržaja vode u reakcijskoj smjesi te aktivnosti i stabilnosti lipaze. Molekule vode koje ostaju vezane na molekule enzima doprinose očuvanju njihove aktivne strukture te povećavaju njihovu aktivnost, za razliku od vode korištenjem vodenog medija koja ima suprotan učinak (Stergiou i sur., 2013). Voda doprinosi strukturalnom integritetu, polarnosti aktivnog mjesta te stabilnosti proteina. Također, omogućuje hidrofobne interakcije s polarnim ostacima enzimske molekule koji bi inače bili u međusobnoj interakciji i tvorili nepravilnu konformacijsku strukturu. U esterifikaciji/hidrolizi sadržaj vode utječe na položaj ravnoteže reakcije kao i na raspodjelu produkata u mediju (Yahya i sur., 1998).

Potruga za novim reakcijskim sustavima s povoljnijim uvjetima za sintezu estera dovela je do katalize lipazama u nekonvencionalnim medijima poput organskih otapala, ionskih kapljevina, eutektičnih otapala ili superkritičnih tekućina. U nevodenom mediju, voda vezana na biokatalizator je jedini oblik vode prisutan u sustavu. Organska otapala mogu utjecati na reakciju izravno stupajući u interakciju s enzimima ili istiskivanjem vode s enzima. Idealno otapalo trebalo bi biti biokompatibilno i dobar ekstraktant produkta pri radnim uvjetima (Yahya i sur., 1998). Većina sustava u kojima se koriste nekonvencionalni mediji uključuju prisutnost barem dvije različite faze, ali mogu biti i jednofazni. U dvofaznim sustavima tekuća faza je obično nepolarna te služi kao rezervoar za određene nepolarne reaktante ili produkte. Kod korištenja vodeno-organskog sustava, organsko otapalo narušava mikrostrukturu enzima koja se razmatra u prisutnosti vode zbog svoje konformacijske fleksibilnosti što može

dovesti do reverzibilne ili ireverzibilne denaturacije enzima. Prednosti odvijanja reakcija kataliziranim lipazama u organskim otapalima su: povećana termostabilnost lipaza, pomicanje termodinamičke ravnoteže reakcije u smjeru esterifikacije, smanjena mogućnost inhibicije lipaza, relativno jednostavna regeneracija lipaze filtracijom (enzim u organskom otapalu nije otopljen već suspendiran) te smanjena mogućnost mikrobnih kontaminacija. Primjena jednofaznih organskih medija gdje je uklonjena slobodna voda, pri čemu je zadržana određena količina vode vezana na površini lipaza (strukturna voda), pokazala se vrlo pouzdanim i jednostavnim pristupom u reakcijama esterifikacije, pri čemu su prinosi estera viši u nepolarnim otapalima (npr. *n*-heptan) u odnosu na polarna (npr. aceton). Ipak, povećana je upotreba sustava bez prisustva otapala (*eng.* solvent-free systems) zbog njihove robusnosti, smanjenja troškova i poboljšane kontrole vođenja procesa (Stergiou i sur., 2013).

## **2.2. Eutektična otapala**

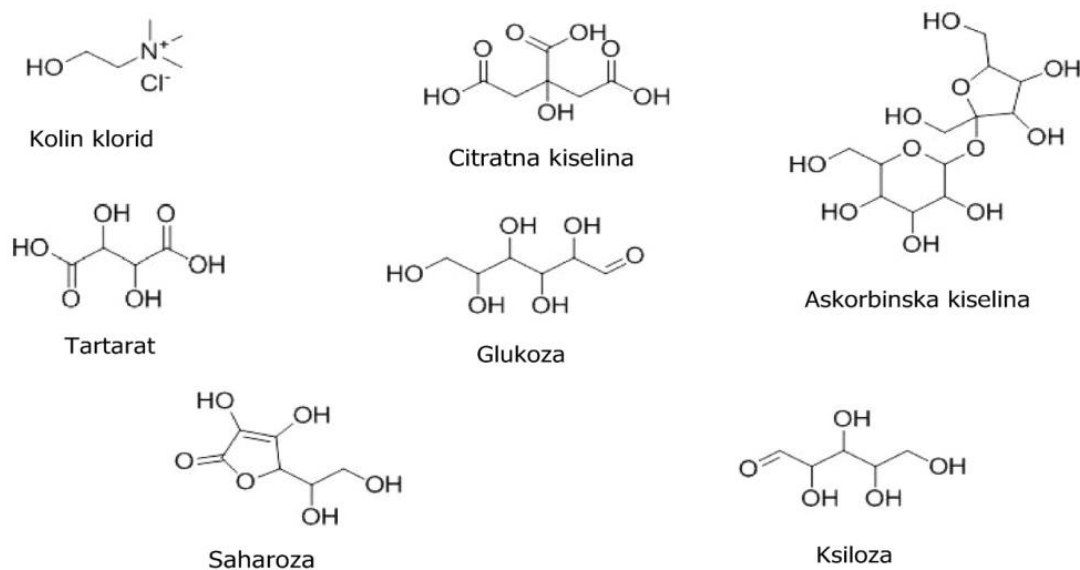
### **2.2.1. Svojstva i priprema eutektičnih otapala**

Nova ekološki prihvatljiva otapala koja bi mogla poslužiti kao zamjena za uobičajena organska otapala jedan su od najznačajnijih predmeta istraživanja u sklopu zelenih tehnologija. Tijekom posljednja dva desetljeća počele su se primjenjivati ionske kapljevine, ali zbog sumnje u njihovu ekološku prihvatljivost, prvenstveno što se tiče slabe biorazgradivosti, biokompatibilnosti i održivosti, javila se potreba za drugim alternativnim otapalima. Kao alternativa ionskim kapljevinama istaknula su se eutektična otapala (*eng.* deep eutectic solvents). To su mješavine dviju ili više komponenata (obično iz prirodnih izvora) koje mogu biti u krutom ili tekućem stanju, a koje pri određenom sastavu pri sobnoj temperaturi prelaze u tekuće stanje. U nekim slučajevima potrebno je zagrijavanje ili otapanje sastojaka u vodi nakon čega se voda mora ukloniti kondenzacijom ili otparavanjem. Kada su spojevi koji čine eutektična otapala primarni metaboliti poput aminokiselina, organskih kiselina, šećera ili derivata kolina, eutektična otapala se zovu prirodna eutektična otapala (*eng.* natural deep eutectic solvents) te u potpunosti zadovoljavaju načela zelene kemije.

Princip dobivanja eutektičnih otapala je stvaranje kompleksa između akceptora i donora vodika (stvaranje vodikove veze). Pojava delokaliziranog naboja odgovorna je za snižavanje temperature taljenja mješavine u odnosu na temperaturu pri kojoj se otapaju pojedine komponente. Prirodna eutektična otapala mogu se pripremiti iz mješavine

koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopljene jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje su grijane do unaprijed određene vrijednosti. Tijekom procesa ne dolazi do stvaranja nusprodukata pa samim time niti do stvaranja otpada (Paiva i sur., 2014).

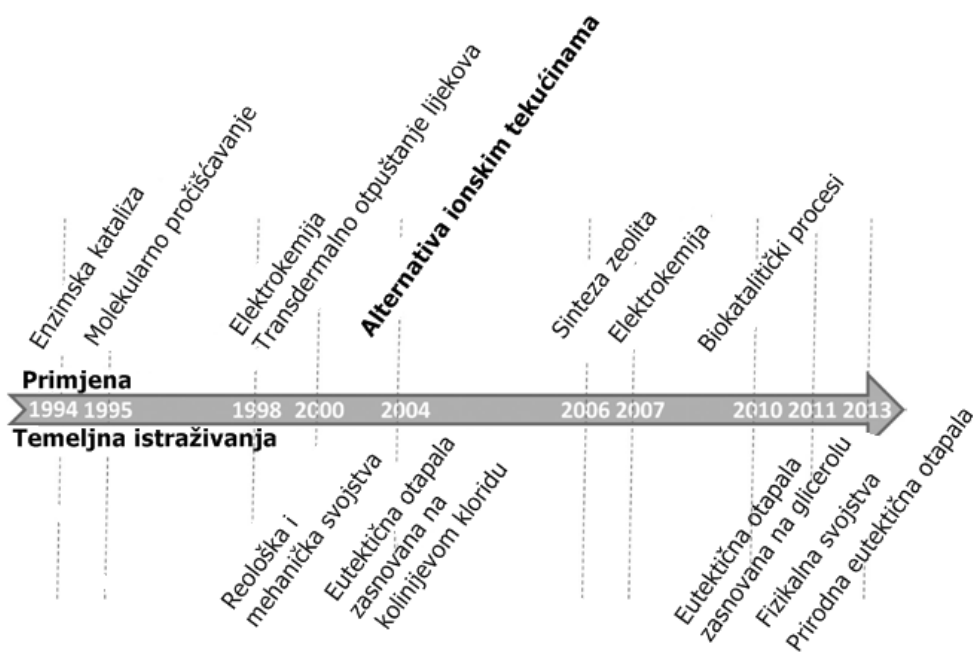
Najčešće korištena euteklična otapala baziraju se na kolin-kloridu (ChCl), karboksilnim kiselinama, šećerima, alkoholima i amidima poput urea, glukoze, citratne kiseline ili glicerola (slika 2). Euteklična otapala imaju slična svojstva kao ionske kapljevine, ali ih je jeftinije proizvesti, manje su toksična te su biorazgradiva. Kolin-klorid je upravo jedna od najčešće korištenih kvaternih soli za sintezu eutekličnih otapala zbog svoje biorazgradivosti, niske cijene i netoksičnosti. Radi se o vrlo dostupnoj sirovini koja se proizvodi u razmjerima od otprilike  $10^9$  kg, ekonomičnim procesom s vrlo reduciranom količinom otpada (Hayyan i sur., 2012).



**Slika 2.** Primjeri sirovina koje se primjenjuju u pripravi eutekličnih otapala (Paiva i sur., 2014).

## 2.2.2. Primjena eutektnih otapala

Eutektna otapala se češće počinju spominjati tek početkom 21. stoljeća kada su se počela koristiti kao supstrati za enzimске reakcije (slika 3). Enzimi mogu zadržati svoju aktivnost kada su otopljeni u eutektnim otapalima koja su se pokazala kao bolji reakcijski medij od, uobičajenih, organskih otapala.



**Slika 3.** Vremenski pravac koji prikazuje razvoj eutektnih otapala (sinteza, karakterizacija i primjena) (A. Paiva i sur., 2014).

Eutektna otapala našla su brojne primjene u biokatalizi zbog potrebe za poboljšanjem imobilizacije biokatalizatora, stabilizacije i reciklacije kako bi se smanjili procesni troškovi. Eutektna otapala koja se zasnivaju na glicerolu mogu se koristiti za dobivanje biodizela enzimskim putem, korištenjem lipaza. U reakcijama koje se odvijaju u otapalu koje se sastoji od kolin-klorida i glicerola *Candida antarctica* lipaza B (CALB) zadržala je visoku biokatalitičku aktivnost. Ovo otvara razne mogućnosti za primjenu ovakve vrste otapala.

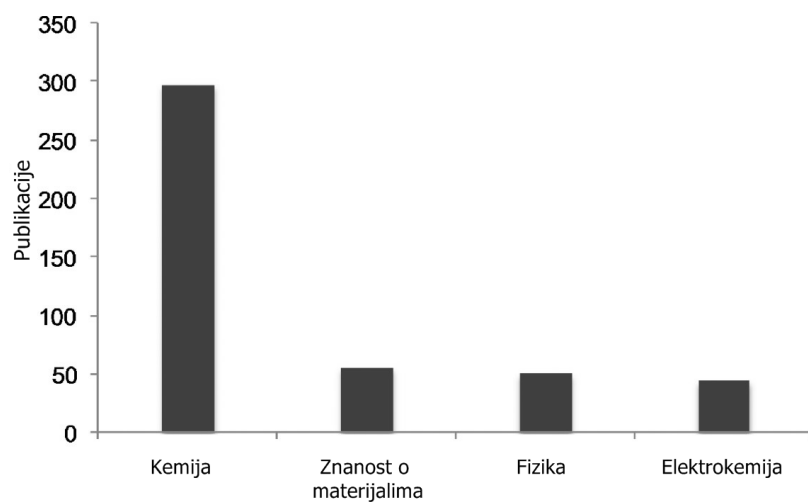
Moguća je i primjena prirodnih eutektnih otapala u farmaceutskoj industriji za ekstrakciju prirodnih produkata. Budući da se u njima mogu otapati i polarni i nepolarni metaboliti, predviđa se da će se koristiti za ekstrakciju raznih prirodnih spojeva, a ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima svakog pojedinog eutektnog otapala. Primjerice, optimiranjem svih procesnih parametara (viskoznost, polarnost, temperatura), dobiveni su visoki ekstrakcijski prinosi fenolnih spojeva korištenjem eutektnih otapala u usporedbi s uobičajenim otapalima poput vode ili etanola. Osim toga, kombiniranje eutektnih otapala s bioaktivnim molekulama poput ibuprofena ili mentola s biorazgradivim prirodnim polimerima i superkritičnim ugljikovim dioksidom, mogla bi biti učinkovita alternativa za različite biomedicinske primjene jer poboljšava otpuštanje lijekova.

Topljivost u vodi teško topljivih molekula poput benzojeve kiseline, danazola i itrokonazola je 5 do 22 puta viša u eutektnom otapalu koje se sastoji od kolin-klorida i uree ili kolin-klorida i malonatne kiseline. Ovo potvrđuje mogućnost primjene eutektnih otapala za ekstrakciju bioaktivnih molekula.

Otapanje, pohranjivanje i pretvorba CO<sub>2</sub> jedan je od glavnih predmeta istraživanja zbog sve veće emisije ovog, za okoliš, vrlo štetnog plina. Eutektna otapala pokazala su se kao izvrsni sustavi za otapanje CO<sub>2</sub>. Imaju vrlo nizak tlak para, proizvodnja je jeftina te su biokompatibilni i biorazgradivi pa je njihovo zbrinjavanje jednostavno i jeftino.

Nadalje, postoje velike mogućnosti primjene ovih otapala u kemiji i fizici (slika 4). Istraživanja eutektnih otapala zasnovanih na kolin-kloridu na polju cikličke voltometrije i kronoamperometrije proširila su upotrebu ovih otapala u elektrokemiji. To se prvenstveno odnosi na mogućnost elektrodepozicije metala. U prilog tome idu i visoka konduktivnost eutektnih otapala te otapanje metala u nevodenim otopinama.

Konvencionalna proizvodnja zeolita zahtijeva prisutnost organske vrste kako bi došlo do rasta strukture budući da organsko otapalo djeluje i kao otapalo i kao kalup. Korištenje eutektnog otapala omogućuje da se tijekom reakcije jedna komponenta eutektnog otapala pocijepa čime osigurava organski kalup potreban za reakciju. Na ovaj način se mogu pripremiti alumino, ili cink fosfatni zeoliti (Paiva i sur., 2014).



**Slika 4.** Raspodjela broja publikacija na temu eutektičnih otapala u proteklih sedam godina (Paiva i sur., 2014).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Anhidrid octene kiseline, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Butil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *n*-Butanol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen-glikol, p.a. Kemika, Zagreb, Hrvatska

#### Enzimski preparat

**Novozym 435** (lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama sa sadržajem vode 1-2 w/w %) - Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD.

U radu je kao otapalo korišten *n*-heptan analitičke čistoće.

#### 3.1.2. Oprema i uređaji:

- Homogenizator, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan

### 3.2. Metode rada

#### 3.2.1. Sinteza eutektičnih otapala

U tikvici sa okruglim dnom pomiješa se kolin-klorid (ChCl) sa donorom vodika (etilenglikol, EtGl) u određenom molarnom omjeru te doda voda u različitim molarnim odnosima (tablica 1). Reakcijska smjesa se zagrije do 80 °C pomoću vodene kupelji uz neprestano miješanje tijekom 3 sata. Dobivena eutektična otapala u obliku prozirne kapljevine ( $\eta = 100\%$ ) se prije daljnje primjene suše tijekom 8 sati pod visokim vakuumom te čuvaju u eksikatoru napunjenom silikagelom.

**Tablica 1.** Sintetizirana tecijarna smjesa kolin-klorid:etilen glikol:voda

Tercijarna smjesa	Molarni omjer komponenata	Kratica
Kolin-klorid:etilen glikol:voda	1:2:0,5	ChCl:EtGl <sub>0,5mol H2O</sub>
	1:2:1	ChCl:EtGl <sub>1mol H2O</sub>
	1:2:1,5	ChCl:EtGl <sub>1,5mol H2O</sub>
	1:2:2	ChCl:EtGl <sub>2mol H2O</sub>

### 3.2.2. Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata

#### 3.2.2.1. Određivanje koncentracije butil-acetata

Kvalitativna i kvantitativna analiza sinteze butil-acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

***Kromatografski uvjeti:***

Kromatografska kolona: Rxi\_5Si/MS: 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 mm

Pokretna faza: He

Protok: 109,6 mL min<sup>-1</sup>

Detektor: maseni spektrometar s elektrosprej ionizacijom (temperatura izvora iona 200 °C; temperatura sučelja 150 °C)

Temperatura kolone: 55 °C

Injektor i detektor: 250 °C

Vrijeme trajanja analize: 3 min

Vrijeme izlaženja butil-acetata iznosi 2,7 minute.

## ***Izrada baždarnog dijagrama***

Prirede se otopine butil-acetata u *n*-heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,0005; 0,001; 0,003; 0,005; 0,008 i 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanese se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrtaju dijagram ovisnosti množinske koncentracije butil-acetata o površini ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije butil-acetata u uzorcima.

Koncentracija butil-acetata  $c_P$  (mol L<sup>-1</sup>) tijekom sinteze u eutektičnom otapalu računa se prema jednadžbi:

$$c_P = c_{n\text{-heptan}} \cdot \left( 1 + \frac{1}{K_P} \right) \quad [1]$$

gdje je  $c_{n\text{-heptan}}$  ravnotežna koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu (mol L<sup>-1</sup>), a  $K_P$  koeficijent razdjeljenja butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala.

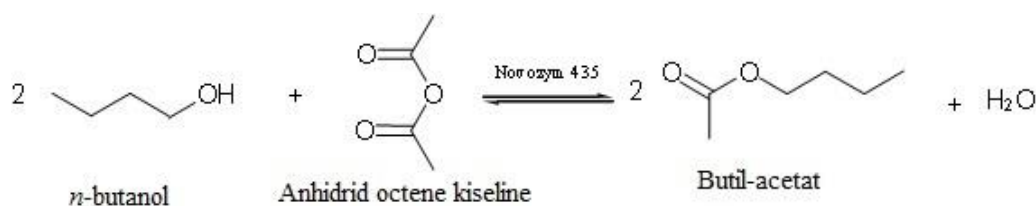
Koeficijent razdjeljenja butil-acetata ( $K_P$ ) *n*-heptan/eutektično otapalo određuje se prema sljedećem protokolu:

U staklenu kivetu doda se 1 μL eutektičnog otapala, 1 μL *n*-heptana i 6,6 μL (0,05 mmol) butil-acetata. Uzorak se miješa na vorteksu (2.000 okretaj min<sup>-1</sup>) tijekom 2 min pri temperaturi 25 °C. Koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu određuje se plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja  $K_P$  izračunava se kao omjer ravnotežne koncentracije butil-acetata u *n*-heptanu i eutektičnom otapalu prema jednadžbi:

$$K_P = \frac{c_{n\text{-heptan}}}{c_{EO}} \quad [2]$$

gdje je  $c_{n\text{-heptan}}$  koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu (mol L<sup>-1</sup>), a  $c_{EO}$  koncentracija butil-acetata u eutektičnom otapalu (mol L<sup>-1</sup>).

### 3.2.2.2. Sinteza butil-acetata



**Slika 5.** Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata aciliranjem *n*-butanola s anhidridom octene kiseline.

U epruvetu se doda 1972,26  $\mu\text{L}$  otapala (eutektično otapalo), 9,44  $\mu\text{L}$  (0,05 mol L<sup>-1</sup>) anhidrida octene kiseline i 18,3  $\mu\text{L}$  (0,1 mol L<sup>-1</sup>) *n*-butanola. Reakcija započinje dodavanjem 5 mg pripravka Novozym 435 (slika 5). U odabranim vremenskim intervalima izuzima se 50  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese iz koje se butil-acetat ekstrahira s 50  $\mu\text{L}$  *n*-heptana, uz snažno miješanje na vorteksu (2.000 okretaj min<sup>-1</sup>) kroz 2 min, a heptanski ekstrakt se analizira plinskom kromatografijom.

Kako bi se usporedila uspješnost esterifikacije u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se iskorištenje, volumetrijska produktivnost esterifikacije.

**Iskorištenje procesa esterifikacije  $\eta$  (%)** izračuna se prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{c_E}{c_T} \cdot 100 \quad [3]$$

gdje  $c_E$  predstavlja izmjerenu koncentraciju butil-acetata (mol L<sup>-1</sup>), a  $c_T$  teoretski moguću koncentraciju butil-acetata (mol L<sup>-1</sup>).

**Volumetrijska produktivnost  $V_{P\text{esterifikacija}}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )** esterifikacije računa se prema jednadžbi:

$$V_P = \frac{c_{p2} - c_{p1}}{t} \quad [4]$$

gdje  $c_{P1}$  predstavlja početnu molarnu koncentraciju butil-acetata ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $c_{P2}$  molarnu koncentraciju butil-acetata na kraju procesa ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), a  $t$  vrijeme trajanja procesa (min).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Organska otapala desetljećima se koriste u biokatalizi i organskoj sintezi. Zbog njihovih štetnih svojstava, poput visoke hlapljivosti i toksičnosti, sve se češće razmatraju otapala nove generacije, a jedna od takvih su i euteklična otapala. Riječ je o stabilnim i nehlapljivim otapalima prihvatljivim i s ekonomskog i s ekološkog aspekta. S druge strane, lipaze su enzimi od izrazitog industrijskog značaja zbog velike katalitičke moći, a posebno su značajne u biotehnologiji i kemijskoj industriji za dobivanje organskih estera. U posljednje vrijeme ispituje se mogućnost korištenja novih, ekološki prihvatljivih otapala u kojima bi ovi enzimi zadržali svoju katalitičku aktivnost.

U ovom radu ispitana je mogućnost provođenja reakcije esterifikacije, odnosno sinteze butil-acetata, pomoću lipaze u kolinijevom eutekličnom otapalu s etilen-glikolom kao donatorom vodika (molarni omjer 1:2) s različitim molarnim udjelima vode (0,5 - 2 mol). Lipaza koja se koristila za provođenje esterifikacije je lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* (komercijalni pripravak Novozym 435). Svrha rada je utvrditi koliki udio vode je najpovoljniji za provođenje ove reakcije.

#### **4.1. Priprema eutekličnog otapala**

Pripremljeno je euteklično otapalo kolin-klorid:etilen-glikol u molarnom omjeru komponenata 1:2 (ChCl:EtGl) sa određenim udjelom vode (0,5 mol, 1 mol, 1,5 mol, 2 mol vode). Kolin-klorid, etilen-glikol i voda pomiješani su u zadanom molarnom omjeru (tablica 1), a reakcija sinteze odvijala se 3 sata uz zagrijavanje. Dobivena otapala zatim su se sušila u visokom vakuumu i čuvala u eksikatoru. Iskorištenje ove reakcije je 100 %, što predstavlja jednu od prednosti primjene eutekličnih otapala.

#### **4.2. Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata**

Sinteza butil-acetata katalizirana imobiliziranom lipazom (Novozym 435) provedena je u kolinijevom eutekličnom otapalu uz različite udjele vode.

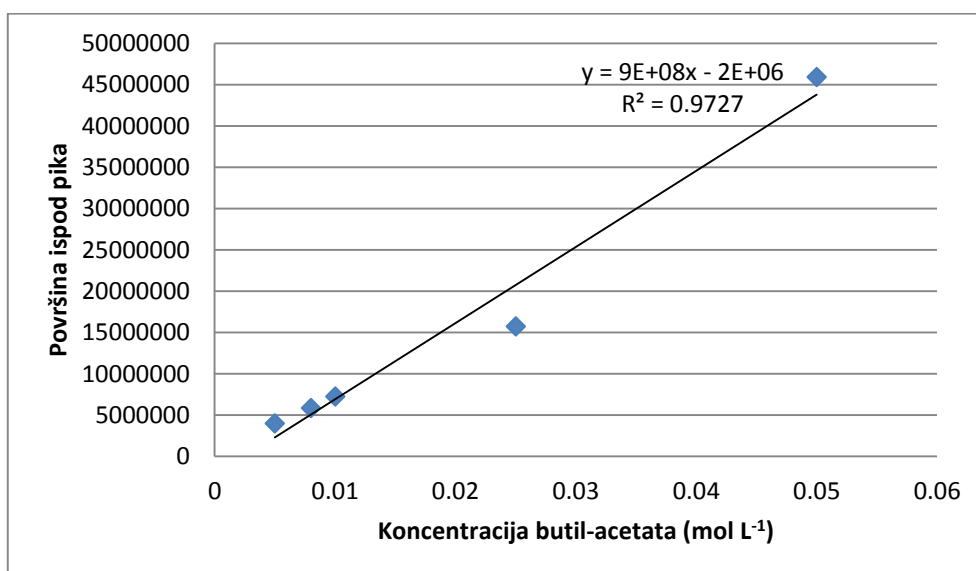
Reakcijska smjesa sastojala se od eutekličnog otapala s različitim udjelima vode (tablica 1), anhidrida octene kiseline ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) i *n*-butanola ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Reakcija je započeta dodatkom 5 mg enzimskog pripravka Novozym 435 te je reakcija provedena na homogenizatoru. Uzorkovanje se vršilo u intervalima od 5, 10, 15, 20, 40, 60 i 90 minuta, a



analiza reakcijske smjese provedena je pomoću plinskog kromatografa s masenom spektroskopijom. Budući da eutektično otapalo nije hlapljivo pa kao takvo ne može se analizirati plinskom kromatografijom, bilo je potrebno najprije provesti ekstrakciju produkta u *n*-heptanu, a heptanski ekstrakt se koristio za daljnju analizu.

Kako bi se izračunale koncentracije produkta realnih uzoraka, izrađen je baždarni dijagram prema protokolu opisanom u prethodnom poglavlju (slika 6).

Također, određen je koeficijent razdjeljenja butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala ( $K_P$ ), a vrijednosti su prikazane u tablici 2.

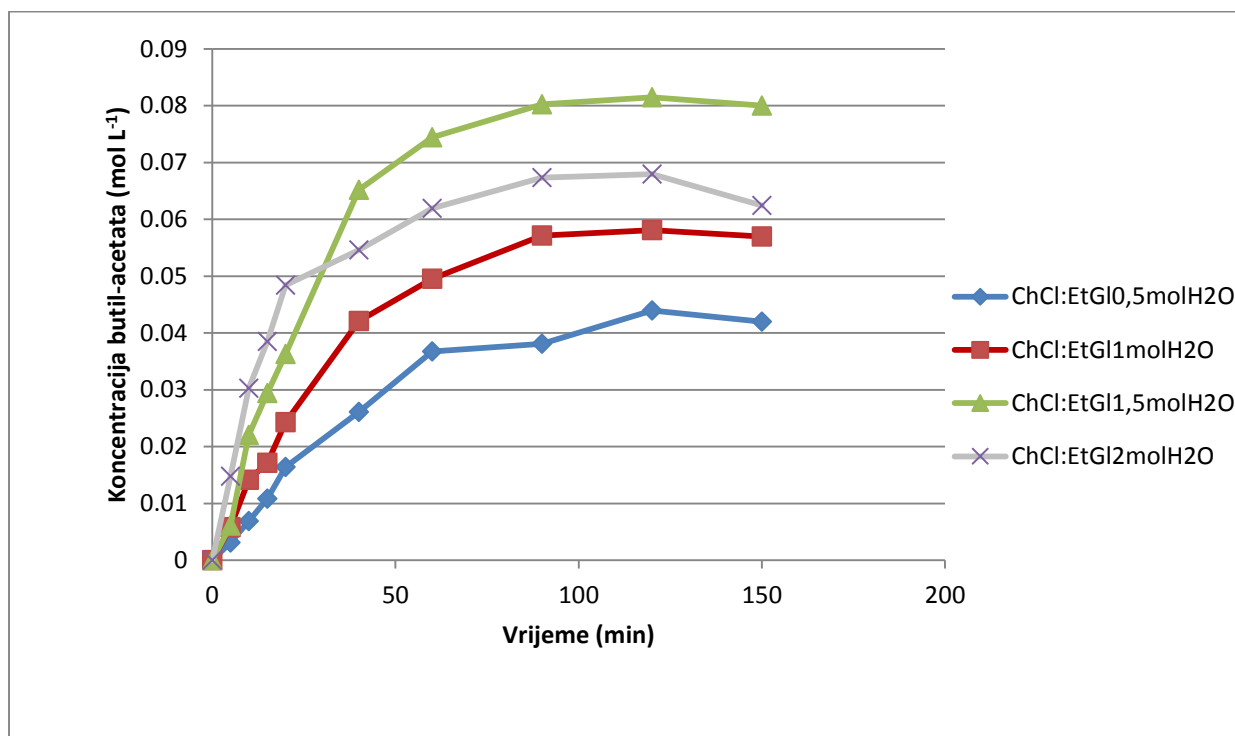


**Slika 6.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije butil acetata

**Tablica 2.** Koeficijent razdjeljenja butil-acetata ( $K_P$ ) u sustavu *n*-heptan/eutektično otapalo

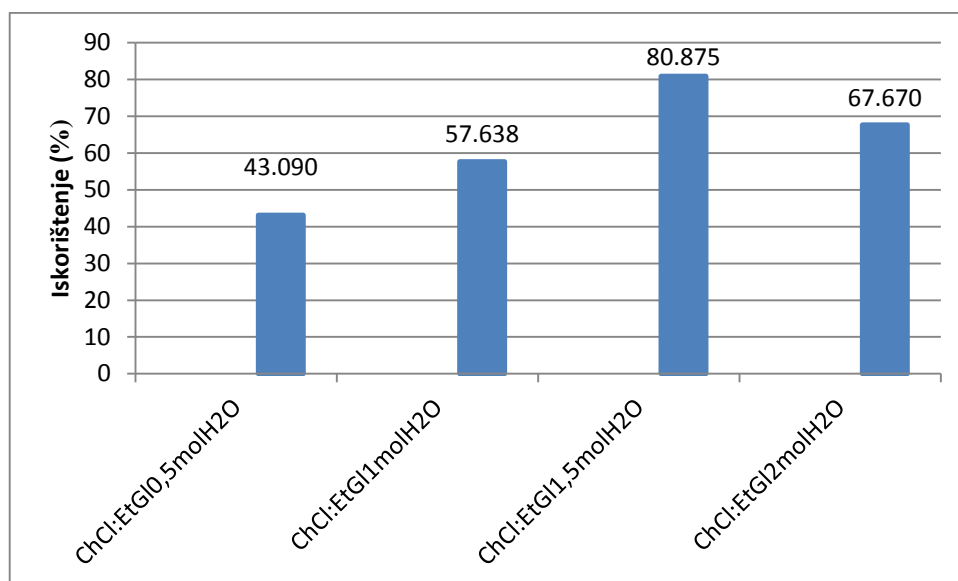
Eutektična smjesa	Kratica	$K_P$
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:0,5)	ChCl:EtGl <sub>0,5mol H2O</sub>	1,29
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:1)	ChCl:EtGl <sub>1mol H2O</sub>	1,22
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:1,5)	ChCl:EtGl <sub>1,5mol H2O</sub>	1,23
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:2)	ChCl:EtGl <sub>2mol H2O</sub>	1,2

Promjene u koncentraciji produkta butil-acetata u različitim tercijarnim eutektnim smjesama kroz vrijeme prikazane su na slici 7. Vidljivo je kako ravnotežna koncentracija butil-acetata raste s povećanjem udjela vode te je najviša kod molnog udjela vode od 1,5 mol. Nakon toga dolazi do pada koncentracije butil-acetata kod udjela vode od 2 mola.

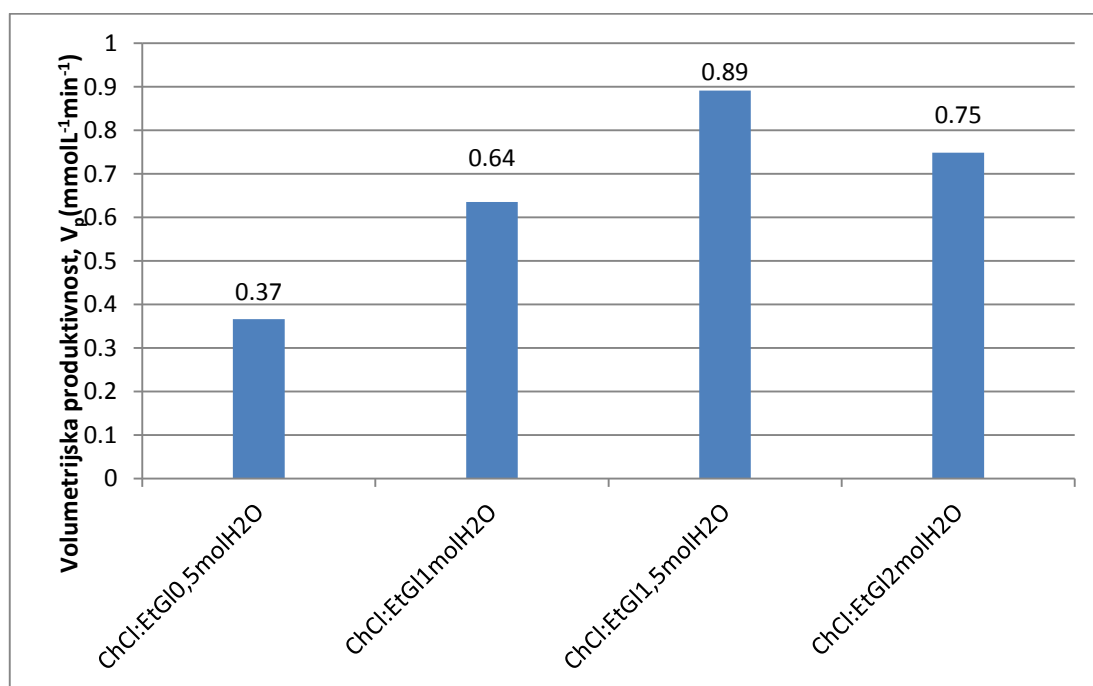


**Slika 7.** Tijek esterifikacije lipazom katalizirane sinteze butil-acetata u eutektnom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol (ChCl:EtGl=1:2) sa određenim molarnim udjelom vode (0,5 mol, 1 mol, 1,5 mol, 2 mol).

Zbog vjernijeg prikaza i interpretacije rezultata, prema prethodno navedenim jednadžbama [3] i [4] izračunata su iskorištenja i volumetrijske produktivnosti esterifikacije u pojedinom otapalu, a rezultati su prikazani na slikama 8 i 9. Pokazalo se da se najbolje vrijednosti postižu u otapalu ChCl:EtGl1,5H<sub>2</sub>O pri čemu je maksimalno iskorištenje iznosilo 80,6 %, a maksimalna volumetrijska produktivnost 0,9 mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. S druge strane, najniže iskorištenje ostvareno je u otapalu ChCl:EtGl0,5H<sub>2</sub>O i iznosilo je 43,1 %, a volumetrijska produktivnost 0,4 mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> u istom otapalu.



**Slika 8.** Iskorištenje ( $\eta$ ) esterifikacije lipazom katalizirane sinteze butil-acetata u eutektnom otapalu kolin-klorid(ChCl):etilen-glikol(EtG) uz različite molarne udjele vode. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L<sup>-1</sup> anhidrid octene kiseline; 0,1 mol L<sup>-1</sup> *n*-butanola; 5 mg Novozym 435; 25 °C.



**Slika 9.** Volumetrijska produktivnost ( $V_p$ ) esterifikacije lipazom katalizirane sinteze butil-acetata u eutektnom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol (ChCl:EtG) uz različite molarne udjele vode (0,5 mol, 1 mol, 1,5 mol, 2 mol). Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L<sup>-1</sup> anhidrid octene kiseline; 0,1 mol L<sup>-1</sup> *n*-butanola; 5 mg Novozym 435; 25 °C.

Vidljivo je kako sadržaj vode ima veliki utjecaj na katalitičku aktivnost enzima. Načelno, postizanje optimalnog sadržaja vode može se objasniti kao uspostavljanje ravnoteže između dvaju efekata koji se javljaju tijekom reakcije. Naime, kada je sadržaj vode prenizak, supstrat se veže sa eutektnim otapalom jakim vodikovim vezama i postaje jedva dostupan enzimu za odvijanje same reakcije. U slučaju kada je sadržaj vode veći od optimalnog, višak molekula vode u blizini aktivnog mjesta enzima dovodi do pojave kompetitivnih reakcija hidrolize estera što posljedično dovodi do nižih prinosa same reakcije (Huang Z i sur., 2014). Pri optimalnom sadržaju vode, supstrat se ne veže s otapalom, a hidrofilni karakter eutektnog otapala omogućuje vezanje molekula vode koje se stvaraju tijekom reakcije esterifikacije i sprječava ispoljavanje njihovog nukleofilnog karaktera u hidrolitičkim reakcijama (Durand i sur., 2014).

U ovom radu pokazano je da eutektna otapala imaju veliku perspektivu u biotehnološkoj primjeni. Zbog svoje učinkovitosti, jednostavne pripreme i ekološke prihvatljivosti ova bi se otapala mogla koristiti za sintezu butil-acetata i drugih estera od industrijskog značaja. Podešavanjem reakcijskih uvjeta i udjela vode može se otpimirati proizvodnja željenog produkta. *Candida antarctica* lipaza B pokazuje visoku aktivnost u eutektnom otapalu koje se zasniva na kolin-kloridu.

## **5. ZAKLJUČCI**

U ovom radu ispitan je utjecaj sadržaja vode na tijek reakcije esterifikacije katalizirane lipazom B (komercijalni pripravak Novozym 435) u prethodno pripremljenim kolinijevom eutektnom otapalu kolin-klorid : etilen-glikol (molarni omjer 1:2) s različitim molarnim udjelima vode (0,5 – 2 mol). Na temelju provedenog eksperimenta i interpretacije dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Za potrebe rada zagrijavanjem i miješanjem priređena su eutektna otapala kolin-klorid : etilen-glikol u omjeru 1:2 uz različite molarne udjele vode (0,5 mol, 1 mol, 1,5 mol, 2 mol).
2. Uočeno je da se povećanjem molarnog udjela vode povećava i enzimska aktivnost i postižu viši prinosi. Taj se trend nastavlja dok se ne dosegne optimalni sadržaj vode koji je u ovom slučaju bio 1,5 mol vode. Daljnjim povećanjem molarnog udjela vode došlo je do pada enzimске aktivnosti.
3. *Candida antarctica* lipaza B pokazala je visoku aktivnost u kolinijevom eutektnom otapalu uz odgovarajući udio vode što ovu kombinaciju čini zanimljivom za moguću industrijsku primjenu.
4. Moguće je pomno dizajnirati eutektna otapala i prilagoditi ih željenim tipovima reakcija i reakcijskim uvjetima u svrhu postizanja većih prinosa, što otvara brojne mogućnosti za njihovu primjenu.
5. Rezultati prikazani u ovom istraživanju doprinose su razvoju učinkovitih, ekonomičnih i održivih procesa za sintezu industrijski važnih spojeva.

## **6. LITERATURA**

- 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.
- Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 379-385.
- Durand E, Lecomte J, Baréa B, Villeneuve P. (2014) Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 16-23.
- Ghanem, A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**, 1721-1754.
- Goldberg M., Thomas, D., Legoy, M.-D. (1990) The control of lipase-catalyzed transesterification and esterification reaction rates: Effects of substrate polarity, water activity, and water molecules on enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **190**, 603-609.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013). Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193–2195.
- Halling, P. J. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: Theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 178-206.
- Huang Z, Wu BP, Wen Q, Yang TX, Yang Z. (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**, 1975–81.
- Krishna HS, Karanth NG. (2002) Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catal Rev.*, **44**, 499-591.
- Linco, Y.-Y., Lamsa, M., Huhtala, A., and Rantanen, O. (1995) Lipase biocatalysis in the production of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72**, 1293-1299.
- Macrae, A. R. And Hammond, R. C. (1985) Present and future applications in lipases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **3**, 193-214.
- Miller, C., Austin, H., Posorske, L., and Gonzles, J. (1988) Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 927-931.



- Mustranta, A., Forssell, P., and Poutanen, K. (1993) Application of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 133-139.
- Nielsen PM, Brask J, Fjerbaek L. (2008) Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 692-700.
- Paiva, A., Craveiro, R., Duarte, A. R. C, Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L. (2014) Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century. *Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Paiva, A., Vidinha, P., Angelova, M., Rebocho, S., Barreiros, S., Brunner, G. (2011) Biocatalytic separation of (R, S) - 1 - phenylethanol enantiomers and fractionation of reaction products with supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* **55**, 963-970.
- Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. (1999) Review: the realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 119-31.
- Stergiou, P-Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, G. L., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, M. E. (2013), *Biotechnology Advances* **31**, 1846-1859.
- Torres S, Castro G. R. (2004) Non-aqueous biocatalysis in homogenous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.* **42**, 271-7.
- Vermue, M. H. and Tramper, J. (1995) Biocatalysis in non-conventional media: Medium engineering aspects (technical report). *Pure Appl. Chem.* **67**, 346-373.
- Yahya, A. R. M., Anderson, A. W., Moo-Young, M. (1998) Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology* **23**, 438-450.
- Zaks A, Klibanov AM. (1988) The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* **263**, 8017-21.