

# Primjena prirodnih eutektskih otapala u ekstrakciji i biokatalizi

---

Gabrić, Ana

Undergraduate thesis / Završni 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:159:204127>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-24**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Ana Gabrić**

7392/BT

# **Primjena prirodnih eutektskih otapala u ekstrakciji i biokatalizi**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Zagreb, 2020.**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković i dr.sc. Manuli Panić na iznimnoj pomoći, savjetima i strpljenju te prijateljskom raspoloženju pri izradi ovog rada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Primjena prirodnih eutektičkih otapala u ekstrakciji i biokatalizi**

***Ana Gabrić, 0058210663***

**Sažetak:** Posljednjih godina globalna ekonomska kriza, rastuće cijene hrane i energije te povećana svijest o utjecaju čovjeka na okoliš potaknuli su razvoj koncepta zelene ekonomije. U razdoblju od 2010. do 2050. godine ključni ciljevi Europske Unije vezani su uz očuvanje okoliša. U mnogim industrijskim procesima primjenjuje se velika količina hlapljivih i zapaljivih organskih otapala koja se dobivaju iz neobnovljivih sirovina te stoga njihova primjena čini značajan dio ekoloških i ekonomskih značajki procesa. Tijekom proteklog desetljeća prirodna eutektička se otapala intenzivno istražuju kao zamjena za organska otapala. Zelena svojstva ovih otapala su neznatna hlapljivost (smanjenje onečišćenja zraka), nezapaljivost (sigurnost procesa) te velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost (mogućnost recikliranja i višestruke upotrebe). Svrha ovog rada je sumirati znanstvenu literaturu i istaknuti dosad najvažnije spoznaje o prirodnim eutektičkim otapalima i njihovoj primjeni u ekstrakciji i biokatalizi.

**Ključne riječi:** *zelena otapala, prirodna eutektička otapala, ekstrakcija, biokataliza*

**Rad sadrži:** 32 stranice, 6 slika, 2 tablice, 55 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**  
**Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000**  
**Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

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

**Datum obrane:** 10.7.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations**

**Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology**

**Application of natural deep eutectic solvents in extraction and biocatalysis**

***Ana Gabrić, 0058210663***

**Abstract:** In recent years, the global economic crisis, rising prices of food, energy and increasing awareness of human impact on the environment encouraged the development of the concept of green economy. In the period from 2010 to 2050, the key objectives of the European Union are related to environmental protection. Many industrial processes use large amounts of volatile and flammable organic solvents derived from non-renewable raw materials and therefore their application makes up a significant part of the environmental and economic characteristics of the process. Over the past decade, eutectic solvents have been intensively explored as a substitute for organic solvents. The green properties of these solvents are low volatility (reduction of air pollution), non-flammability (safety) and high thermal, chemical and electrochemical stability (recyclability and reusability). The purpose of this paper is to summarize the scientific literature and highlight the most important findings so far on natural deep eutectic solvents and their application in extraction and biocatalysis.

**Keywords:** *green solvents, natural deep eutectic solvents, extraction, biocatalysis*

**Thesis contains:** 32 pages, 6 figures, 2 tables, 55 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Technical support and assistance:** Dr.sc. Manuela Panić

**Defence date:** 10.7.2020.

# SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Zelena otapala .....	2
2.2. Eutektička otapala .....	5
2.3. Prirodna eutektička otapala .....	8
2.3.1. Priprema NADES-a.....	8
2.3.2. Svojstva NADES-a.....	10
2.4. Primjena NADES-a u ekstrakciji.....	14
2.4.1. Odabir NADES-a za ekstrakciju .....	15
2.4.2. Odabir metode ekstrakcije.....	16
2.4.3. Izolacija produkta iz ekstrakta i reciklacija NADES-a .....	17
2.4.4. Prijenos laboratorijski razvijene metode ekstrakcije primjenom NADES-a u veće mjerilo .....	18
2.5.Primjena NADES-a u biokatalizi .....	19
2.5.1. Odabir NADES-a za biokatalizu.....	21
2.5.2.Optimiranje biokatalitičkog procesa .....	23
2.5.3.Izolacija produkta, reciklacija otapala i biokatalizatora te prijenos laboratorijski razvijene metode u veće mjerilo.....	24
3. ZAKLJUČCI.....	26
4. POPIS LITERATURE .....	27

## 1. UVOD

U posljednja dva desetljeća potreba za zaštitom okoliša postala je imperativ u svakodnevnom životu zbog globalnih promjena s kojima se suočavamo. Kao odgovor na te promjene nastala je zelena kemija. Budući da otapala značajno doprinose ukupnoj količini proizvedenog otpada u većini industrijskih procesa, intenzivno se proučava upotreba modernih, nekonvencionalnih reakcijskih i skladišnih medija. Tako je jedan od glavnih ciljeva zelene kemije razvoj novih, ekološki prihvatljivih otapala. Takva otapala bi trebala biti netoksična, nehlapljiva, kemijski i fizički stabilna, višekратно uporabljiva te jednostavna za primjenu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Među otapalima koja zadovoljavaju navedene karakteristike posljednjih godina su veliki potencijal pokazala prirodna eutektička otapala. Njihov povoljan ekonomski i ekološki otisak je potaknuo mnoga znanstvena istraživanja.

Do sada su se pokazala odličnom zelenom zamjenom za organska otapala u ekstrakciji ciljanih bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora, te kao mediji za enzimске ili kemijske reakcije (Paiva i sur., 2014). Iako su pokazala odličan potencijal, ova otapala se zasada koriste tek u nekoliko industrijskih postrojenja, a broj znanstvenih istraživanja eksponencijalno raste posljednjih godina. Tako će u ovom završnom radu biti opisana najvažnija saznanja o prirodnim eutektičkim otapalima i njihovoj primjeni u ekstrakciji i biokatalizi.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Zelena otapala

Otapala su nezaobilazni faktor kemijske i biotehnološke industrije jer služe kao reakcijski medij za provođenje raznih industrijski važnih reakcija i procesa. Odabir otapala je važan jer ono bitno određuje reaktivnost i selektivnost reakcije te prinose procesa. Otapala su presudna zbog mogućnosti otapanja krutih tvari, prijenosa mase i topline te direktnog utjecaja na viskoznost te na postupke odvajanja i pročišćavanja. Zbog svoje nezamjenjive uloge u raznim industrijama, važno je da korištena otapala budu sigurna za ljude i okoliš. Naime, procijenjeno je da trenutno korištena otapala čine gotovo 60% svih industrijskih emisija i 30% emisija hlapljivih spojeva. Upravo ta činjenica je potaknula znanstvenike na razvoj zelenijih alternativa. Sukladno tome su predložene dvije strategije, a obuhvaćaju zamjenu otapala dobivenih iz nafte s onima dobivenim iz obnovljivih izvora te zamjenu opasnih otapala s onima koja pokazuju bolja svojstva prema okolišu, zdravlju i sigurnosti ljudi (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Upotreba zelenih otapala zadovoljava jedno od 12 načela zelene kemije, koncepta koji je započeo već 1991.godine. Pri provođenju određenog procesa gotovo je nemoguće je udovoljiti svim zahtjevima, ali je cilj primijeniti što više načela navedenih u tablici 1 (Anastas, 2001).

**Tablica 1.** Dvanaest načela zelene kemije (Anastas, 2001).

<b>1.</b> Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati nakon što je nastao.
<b>2.</b> Tok kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni proizvod.
<b>3.</b> Sintetske procese, ako je moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i okoliš.
<b>4.</b> Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost.
<b>5.</b> Uporabu pomoćnih kemijskih tvari (npr. otapala, sredstava za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće.
<b>6.</b> Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
<b>7.</b> Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo.
<b>8.</b> Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštićivanje funkcionalnih skupina, privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa itd.).
<b>9.</b> Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama.
<b>10.</b> Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja.
<b>11.</b> Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.



**12. U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).**

---

Voda kao otapalo je najčešće prvi izbor zbog svoje niske cijene, netoksičnosti i nezapaljivosti. Koristi se u raznim reakcijama sinteze, separacije te ekstrakcije. Međutim, njezina primjena je ograničena jer nije dobar medij za otapanje nepolarnih spojeva te zbog njezine visoke temperature vrelišta, zbog čega se javljaju veliki energetske troškovi pri njezinom uklanjanju na kraju procesa. (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Superkritični fluidi su tekućine koje zagrijane iznad svoje kritične temperature i podvrgnute visokom pritisku stvaraju jednofazne kondenzirane fluide (plin i tekućina koegzistiraju u tom području), gustoće slične tekućinama, a viskoznosti slične plinovima. Topljivost supstrata u ovakvim fluidima varira s malim promjenama temperature i tlaka u sustavu, osobito u blizini kritične točke. Iznimno su korisni u raznim primjenama, a najčešće korišteni su superkritični CO<sub>2</sub> i superkritična voda (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

CO<sub>2</sub> je molekula koja je pri sobnoj temperaturi u plinovitom agregacijskom stanju zbog čega ju je lako ukloniti i na taj način odvojiti produkt. Odlična je opcija za odabir otapala jer je sposobna otopiti nepolarne te slabo polarne spojeve. Često se koristi u postupcima ekstrakcije jer se ne stvaraju sekundarni produkti koji onečišćuju okoliš. Stoga se superkritični CO<sub>2</sub> našao kao zamjena prije korištenim toksičnim freonima i određenim organskim otapalima. Nažalost, CO<sub>2</sub> nije dobar izbor za ekstrakciju spojeva velike molekulske mase i visoke polarnosti. Drugi primjer superkritičnih fluida jest voda. Osim u superkritičnom, ona se može naći i u subkritičnom stanju. U superkritično stanje se može svrstati voda čija su temperatura i tlak viši od kritičnih vrijednosti (374,2 °C i 22,1 MPa). U subkritičnom stanju se nalazi voda kojoj je temperatura iznad temperature vrelišta (100°C), a ispod vrijednosti kritične temperature, dok joj je tlak dovoljno visok kako bi ona bila u tekućem agregacijskom stanju. Ovakva voda je manje viskozna te više difuzivna nego voda pri sobnoj temperaturi. Osim toga, u ovakvom stanju je voda nepolarno otapalo koje odlično otapa organske spojeve i plinove te taloge soli. Međutim, superkritična voda je vrlo reaktivna zbog čega može doći do oksidacije, hidrolize te na koncu raspadanja komponenti. Stoga, njezina uporaba je sigurna samo za stabilne spojeve. S druge strane, subkritična voda se pokazala mnogo sigurnijom za uporabu, pogotovo u ekstrakciji (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

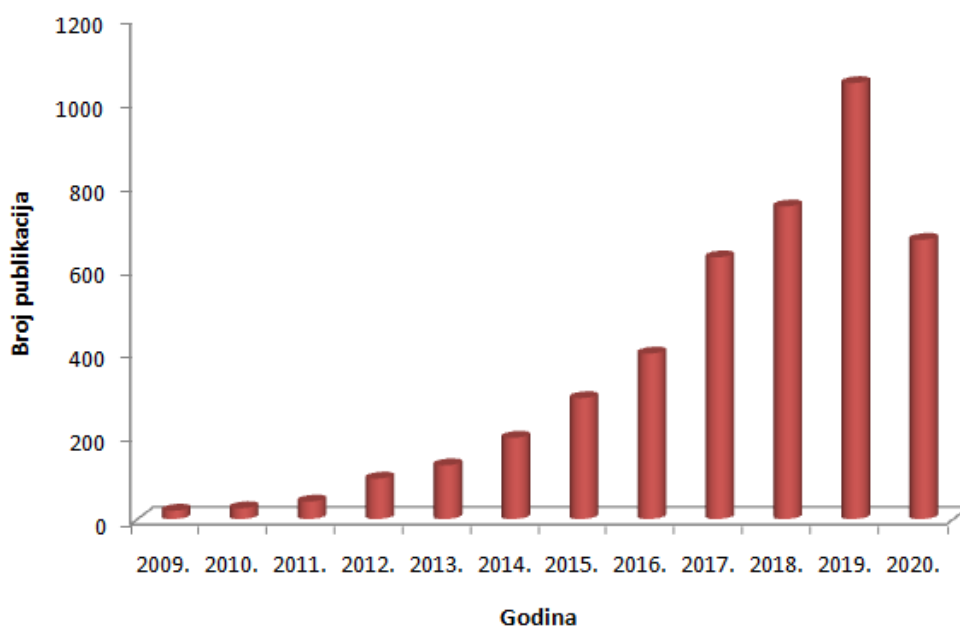
Među zelenim otapalima, otapala iz prirodnih izvora imaju važnu ulogu u zamjeni petrokemijskih otapala. Proizvode se iz sirovina kao što su drvo, škrob, biljna ulja ili voće.

Imaju visoku moć otapanja, biorazgradiva su, netoksična i nezapaljiva. Nedostaci ovih otapala su cijena, visoka viskoznost i visoko vrelište. Najčešće korišteno otapalo iz prirodnog izvora je etanol, koji se dobiva fermentacijom materijala bogatih šećerom. Često se koristi u industriji zbog njegove dostupnosti, niske cijene i biorazgradivosti. Međutim, njegove mane su hlapljivost i zapaljivost. Osim ovih otapala, pozornost privlači i voda, koja se može koristiti u ekstrakciji komponenata topljivih u vodi, kao npr. proteini, šećeri i organske kiseline, te superkrični CO<sub>2</sub>. Isto tako, razvijene su i metode ekstrakcije kod kojih se ne upotrebljavaju otapala (Chemat i sur., 2012).

Nadalje, veliku pozornost privlače i ionske kapljevine (Paiva i sur., 2014). Ionske kapljevine su organske soli s vrlo niskim talištem (ispod 100 °C) (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Veliki potencijal ovih otapala proizlazi iz njihovih posebnih karakteristika, odnosno fizikalno-kemijskih svojstava koja se mogu dizajnirati uporabom različitih aniona i kationa, zbog čega bi se ova otapala mogla upotrebljavati u različitim granama industrije za ekstrakciju različitih spojeva. Međutim, iako posjeduju neke od karakteristika zelenih otapala (nezapaljivost, nehlapljivost, mogućnost reciklacije), u posljednje vrijeme, njihov zeleni karakter je upitan zbog toksičnosti i male biorazgradivosti (Radošević i sur., 2015; Paiva i sur., 2014). Kao alternativa ionskim kapljevinama, pronađena su eutektička otapala, koja su po svojstvima slična ionskim kapljevinama, međutim mnogo prihvatljivija za okoliš. Eutektička otapala udovoljavaju gotovo svim zahtjevima zelene kemije (Paiva i sur., 2014).

## 2.2. Eutektička otapala

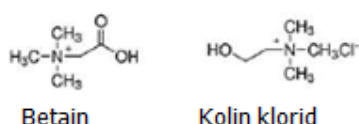
Prema definiciji, eutektičko otapalo (engl. *Deep Eutectic Solvent*, DES) jest smjesa dviju ili više tekućih ili krutih komponenata koje sadržane u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Zhang i sur. 2012). Takva otapala su biorazgradiva, stabilna, manje toksična za ljude i okolinu, nehlapljiva. Što se tiče ekonomskog aspekta, cijena im je slična organskim otapalima pa je to dodatna prednost (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Karakterizira ih nizak tlak pare, relativno širok temperaturni raspon u kojem su u tekućem stanju te nezapaljivost. Osim toga, vrlo su jednostavna za pripremu te veoma povoljna (Smith i sur., 2014). Baš zato, sve je više znanstvenika koji se bave ovim poljem i napisani su brojni znanstveni radovi na tu temu (Paiva i sur., 2014). Na slici 1 je prikazan nagli porast publikacija od 2009. godine (izvor: Web of Science).



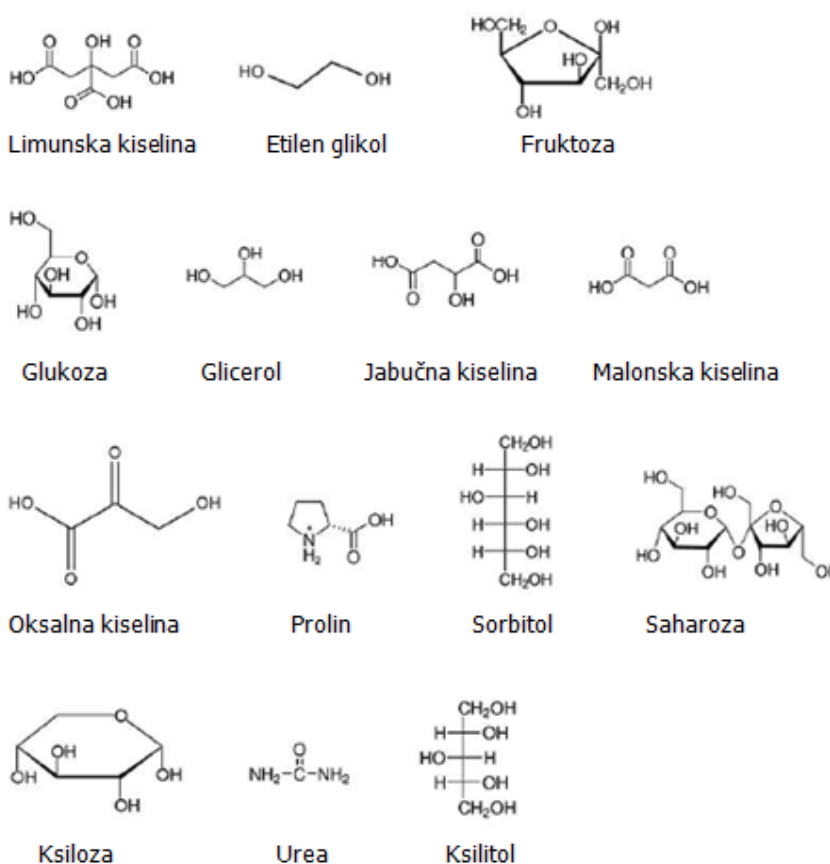
**Slika 1.** Broj objavljenih radova na temu DES-ova u određenom vremenskom periodu (Izvor: Web of Science).

Najčešće se DES-ovi pripremaju s kolin-kloridom (ChCl) i donorima vodikove veze poput uree, limunske kiseline, jantarne kiseline i glicerola, a često se dodaje i određeni udio vode (Paiva i sur., 2014). Na slici 2 su prikazane kemijske strukture akceptora vodikove veze te nekih donora vodikove veze iz kojih se pripremaju DES-ovi (Panić, 2020).

## Akceptori vodikove veze

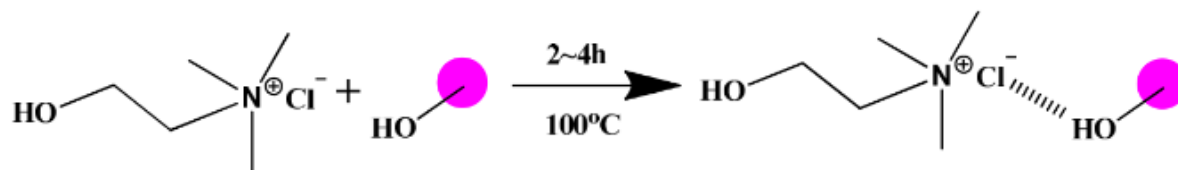


## Donori vodikove veze



**Slika2.** Donori i akceptori vodikove veze za pripremu DES-ova (Panić, 2020).

DES-ovi se po kemijskom sastavu klasificiraju u četiri skupine. Otapala skupine 1 čine metalni kloridi i kvaterne amonijeve soli. U skupinu 2 ubrajamo hidrirane metalne halide i kolin klorid. Ovakvim solima je svojstvena mala osjetljivost na zrak i vlagu što u kombinaciji s pristupačnom cijenom rezultira velikom primjenom u industriji. Skupinu tri čine kolin klorid i donori vodikove veze. Glavna karakteristika im je sposobnost otapanja klorida i oksida prijelaznih metala. Lako ih je pripremiti, uglavnom s vodom, a mnogi su biorazgradivi i jeftini. Ova kategorija DES-ova je vrlo svestrana. Obrađena je u mnogim radovima gdje je objašnjena njihova upotreba u razne svrhe (Smith i sur.,2014). Jedan primjer pripreme DES-a reakcijom kvaterne amonijeve soli i donora vodikove veze prikazana je na slici 3 (Zhao i sur., 2015).



**Slika3.** Reakcija kvaterne amonijeve soli i donora vodikove veze (Zhao i sur., 2015).

Četvrtu skupinu karakteriziraju smjese cinkovih ili aluminijevih halida i donora vodikove veze kao što su urea, acetamid, etilen-glikol i 1,6-heksandiol. Generalne formule za klasifikaciju DES-ova su prikazane u tablici 2 (Smith i sur., 2014).

**Tablica 2.** Podjela DES-ova (Smith i sur., 2014)

Skupina	Generalna formula	Objašnjenje kratica
<b>I</b>	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x$	M=Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
<b>II</b>	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x \cdot y\text{H}_2\text{O}$	M=Cr, Co, Cu, Ni, Fe
<b>III</b>	$\text{Cat}^+\text{X}^-\text{zRZ}$	Z=CONH <sub>2</sub> , COOH, OH
<b>IV</b>	$\text{MCl}_x + \text{RZ} = \text{MCl}_{x-1}^+ \cdot \text{RZ} + \text{MCl}_{x+1}$	M=Al, Zn ; Z=CONH <sub>2</sub> , OH

Abbott i sur. (2016) su istražili mogućnost formiranja DES-ova pomoću soli metala prve skupine. Pokazali su da samo limitirani broj natrijevih soli (NaBr, NaOAc, NaOAc·3H<sub>2</sub>O i Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) tvori otapala pri sobnoj temperaturi i to samo s glicerolom. Nijedna od ovih smjesa ne tvori DES, ali pokazuje neka svojstva slična onima koja imaju DES-ovi.

### **2.3. Prirodna eutektička otapala**

Kada su komponente koje sačinjavaju DES primarni metaboliti poput aminokiselina, organskih kiselina, šećera te derivata kolina, govorimo o prirodnim eutektičkim otapalima (*eng.* natural deep eutectic solvents, NADES). Ova otapala u potpunosti zadovoljavaju kriterije zelene kemije te su pokazala potencijal za primjenu u industriji, uporabu u ekstrakciji, biokatalizi i elektrokemiji (Paiva i sur., 2014).

Prvi znanstveni rad o NADES-ima objavljen je 2011.g. Choi i sur. (2011) su proučavali prisutnost određenih metabolita u stanicama sisavaca, mikroorganizama i biljaka. Primijetili su da su spojevi poput šećera, nekih aminokiselina, kolina i nekih organskih kiselina (jabučna, limunska, mliječna i jantarna kiselina) uvijek prisutni u znatnim količinama u stanicama. Budući da su ti spojevi bili zastupljeni u velikim količinama nije imalo smisla smatrati ih samo intermedijerima u metaboličkim putovima. Iz tog razloga znanstvenici su pretpostavili da ovi metaboliti tvore treći tip otapala, različit od vode i lipida. Kreirali su 30 smjesa u određenim omjerima, a ovakva otapala su nazvali prirodna eutektička otapala.

#### **2.3.1. Priprema NADES-a**

Sve potrebne komponente za pripravu ovakvih otapala su komercijalno dostupne. Postoji više načina pripreme eutektičkih smjesa, ali sve procese odlikuju jednostavnost i blagi uvjeti pripreme (sobna temperatura i atmosferski tlak), što odgovara načelima zelene kemije. Ako su odabrane komponente higroskopne, prije upotrebe ih je potrebno osušiti. Sušenje je ključan korak jer voda u sastavnicama direktno utječe na njihove odnose, a time i njihov konačan molarni omjer. Jednom kada se formira NADES, rezidualna voda više se ne može u potpunosti ukloniti jer molekule vode također sudjeluju u formiranju mreže jakih vodikovih veza s komponentama NADES-a. Prilikom sinteze sekundarnih DES-ova sačinjenih od jednog donora i jednog akceptora vodika dolazi do interakcije sastavnica, pri čemu nastale intramolekularne vodikove veze i delokalizacija naboja snižavaju točku taljenja smjese te formiraju tekuće-čvrstu fazu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Zbog tog svojstva, DES-ovi se nazivaju novom generacijom tekućih soli (Elgharbawy i sur., 2018). Pri pripremi tercijarnih NADES otopina, voda se može dodati nakon ili tijekom sinteze, uz akceptora i donora vodika. Za formiranje DES-a potreban je mehanički, termalni ili ne-termalni izvor energije. Metode pripreme NADES-a su: i) usitnjavanje komponenti pri sobnoj temperaturi u tarioniku, ii) konstantno miješanje uz zagrijavanje pri temperaturama od 50 °C do 80 °C, iii) metoda

isparavanja, iv) metoda zaleđivanja i sušenja i v) korištenje alternativnih izvora energije poput ultrazvuka i mikrovalova (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Ruesgas-Ramon i sur., 2017). Najčešće se priprema provodi blagim zagrijavanjem. Unaprijed pripremljena količina komponenata se zagrijava uz miješanje na temperaturi do 80°C, 30-240 minuta dok se ne formira bistra tekućina. Ovisno o tipu komponenata te udjelu vode u otapalu varira vrijeme potrebno za zagrijavanje te temperatura pri kojoj se proces odvija. Tako za pripravu otapala koja sadrže 50% vode treba prosječno 1-1,5 h, dok ona s 10% vode zahtijevaju nešto dužu pripravu (2-3 h) (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Kao primjer takve pripreme može se navesti priprema otapala kojeg čine kolin klorid i urea u molarnom omjeru 1:2. Navedene komponente se miješaju uz zagrijavanje u uljnoj kupelji na temperaturi od 80 °C kroz vremenski period od jednog sata nakon čega se dobiva homogena tekućina (Jablonský i sur., 2015). Prilikom sinteze NADES-a kolin klorid:organske kiselina zagrijavanjem na temperature više od 50°C je primjećen nastanak razgradnih produkata (HCl i esteri). Alternativa ovoj metodi pripreme je usitnjavanje polaznih sirovina u tarioniku s tučkom pri sobnoj temperaturi pri čemu ne dolazi do nastanka nepoželjnih estera (Florindo i sur., 2014; Qin i sur., 2020).

Već neko vrijeme u fokusu istraživanja su neke modernije metode zagrijavanja reakcijske smjese pomoću ultrazvuka ili mikrovalnog zračenja. Tim metodama je skraćeno vrijeme pripreme i pritom se štedi energija. Tako je priprema DES-a kolin klorid:glukoza zagrijavanjem u vodenoj kupelji i miješanjem magnetskom miješalicom trajala više od tri sata, dok je priprema u ultrazvučno-mikrovalnom reaktoru trajala 25 minuta, dakle sedam puta kraće (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

Još jedan način je primjena vakuum otparavanja. Sastoji se od dva koraka. Najprije se komponente otape u vodi uz zagrijavanje i miješanje na vorteksu ili uz ultrazvuk kako bi se sam proces ubrzao. U drugom koraku se voda ukloni vakuum otparivačem (centrifugalni ili rotacijski otparivač) (Liu i sur., 2018).

Osim navedenih metoda, u literaturi se spominje još liofilizacija-sušenje vodenih otopina pojedinih komponenti DES-a, pri čemu se u DES mogu uklopiti vezikule i liposomi (Gutiérrez i sur., 2009). Princip je zapravo takav da se zaleđene vodene otopine sublimacijom suše i prevode u tekućinu. Ovakva priprema je vrlo jednostavna i zadovoljavajuća s ekološke strane (Qin i sur., 2020).

Nakon pripreme otapala, bitno je provjeriti međumolekulske i unutarmolekulske interakcije komponenti koje formiraju NADES, mobilnost molekula te utjecaj suotapala poput vode na ukupno ponašanje sustava. Tome mogu poslužiti tehnike kao nuklearna magnetska

rezonanca (NMR), Furierova transformacija infracrvenog spektra (FTIR) te Raman spektroskopija (Paiva i sur., 2018).

### 2.3.2. Svojstva NADES-a

Nakon priprave NADES-ova potrebno je provesti fizikalno-kemijsku karakterizaciju (npr. odrediti električnu provodljivost, polarnost, viskoznost, gustoću, površinsku napetost, index loma, pH-vrijednost itd.) kako bi se što bolje definirala njihova svojstva, a time i mogućnost njihove primjene. Nadalje, zbog izvrsnih karakteristika ovih otapala njihova primjena u industriji je izgledna pa se prije primjene u velikom mjerilu treba ispitati njihov utjecaj na okoliš. Mnoga konvencionalna otapala su toksična, zapaljiva i korozivna. Zbog mogućnosti isparavanja i dobre topljivosti u raznim medijima doprinose onečišćavanju zraka, vode i tla. Uz to, mogu uzrokovati ozbiljne nesreće i izlagati radnike i korisnike štetnim utjecajima (Anastas i Eghbali, 2010). DES-ovi su razvijeni kako bi nadišli sve te nedostatke.

#### *Gustoća*

Gustoća je važno svojstvo koje se mora uzeti u obzir prilikom postavljanja biotehnološkog procesa obzirom da je važna za prijenos mase i uspostavljanje jednadžbe stanja i pritom za predviđanje i izračun drugih termodinamičkih parametara poput kinematičke viskoznosti i izotermne kompresije. Ona ovisi o čistoći komponenata koje tvore otapalo (donor i akceptor vodikove veze) te o njihovom omjeru i načinu priprave (Ijardar, 2020). Predviđanje gustoće ovisno o temperaturi je od iznimne važnosti za razvoj i oblikovanje postupaka primjene otapala kojeg namjeravamo koristiti. Zbog raznih mogućnosti vezanja donora i akceptora vodikove veze postoje mnoga odstupanja (Zhang i sur., 2012).

Generalno, NADES-ovi su veće gustoće od vode (Qin i sur., 2020; Zhang i sur., 2012). Florindo i sur. (2014) su opisali ponašanje gustoće DES-a. Tako otapala koje u sastavu imaju kiseline poput glutarne ili levulinske kiseline, čiji alkilni lanac sadrži pet ugljikovih atoma bilježe manju gustoću, nego, na primjer, malonska kiselina s tri ugljikova atoma. To se može objasniti smanjenjem elektrostatičkih interakcija čime se olakšava širenje i dolazi do razrjeđenja. To nam govori da gustoća ovisi o samim komponentama koje tvore otapalo. Ista



skupina znanstvenika je proučavala i utjecaj vode na gustoću ovakvih otapala te su dokazali da se dodatkom vode u NADES gustoća smanjuje.

Velika gustoća NADES-a može stvarati probleme kod rukovanja i njegove upotrebe, ali ta značajka je bitna za dobro obavljanje ekstrakcije, jer velika razlika u gustoći ekstrakcijskih faza rezultira dobrom separacijom (Mitar i sur., 2019).

### *Viskoznost*

Viskoznost je bitno svojstvo svake otopine jer utječe na fenomen prijenosa mase i na vodljivost fluida. NADES je prilično visoko viskozna pri sobnoj temperaturi, što se može pripisati širokoj mreži vodikovih veza koje utječu na mobilnost komponenti otapala. Također, veličina iona te malen volumen praznina između molekula otapala, kao i elektrostatičke i van der Waalsove interakcije rezultiraju visokom viskoznošću. Otapala manje viskoznosti više zadovoljavaju kriterije zelene kemije te su prihvatljivija opcija kod kreiranja industrijskih procesa, stoga je to bitna odrednica pri odabiru otapala. To se može postići odabirom manjih kationa te fluoriranih donora vodikove veze (Qin i sur., 2020, Zhang i sur., 2012).

### *Električna vodljivost*

Električna vodljivost je fizikalna veličina koja opisuje svojstvo materijala da prenosi električnu struju, te ovisi o raspoloživim nosiocima naboja, njihovoj pokretljivosti te valenciji iona. Na električnu vodljivost NADES-a utječe sastav, udio vode u otapalu, temperatura i viskoznost. Na vodljivost otapala mogu utjecati i njezine primarne komponente. Tako je vodljivost otapala proporcionalna promjeni molarnog omjera organska sol/donor vodikove veze pa će povećanje koncentracije udjela kolin klorida uzrokovati povećanje električne vodljivosti (Zhang i sur., 2012).

Zbog svoje relativno visoke viskoznosti, većina NADES-ova imaju nisku električnu vodljivost (niža od  $2 \text{ mScm}^{-1}$  na sobnoj temperaturi). Kako se sa povećanjem temperature smanjuje viskoznost, tako se povećava električna vodljivost NADES-a (Zhang i sur., 2012). Ovisnost električne provodljivosti i temperature, kao i kod viskoznosti, može se opisati Arrhenius-ovom jednadžbom. Također, na električnu vodljivost može se utjecati i dodatkom vode (do 50 %) čime se električna vodljivost NADES-a povećava čak i do 100 puta (Dai i sur., 2015).

### *Točka ledišta*

Prema primarnoj definiciji, glavna karakteristika ovakvih otapala je relativno niska točka ledišta. Većini NADES-ova temperatura ledišta je ispod 150 °C. Otapala kojima je ona niža od 50 °C su najpraktičnija za primjenu u industriji (Zhang i sur., 2012). Jedan primjer snižavanja točke ledišta je otapalo koje nastaje kombiniranjem dvije čvrste krutine kao što su kolin klorid i urea. Pojedinačno imaju temperature taljenja 133°C (urea) i 302°C (kolin klorid), a miješanjem u molarnom omjeru 2:1 dobiva se DES s temperaturom taljenja od 15°C (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Razlog ovakvoj velikoj razlici u temperaturi tališta je delokalizacija naboja do koje dolazi tijekom nastajanja vodikove veze između soli halogenih elemenata (kolin klorid) i donora vodikove veze (urea) (Smith i sur., 2014).

### *Biokompatibilnost, toksičnost, antimikrobno i antioksidativno djelovanje NADES-a*

Kako su NADES-ovi pripremljeni od primarnih metabolita, mogu biti metabolizirani u gotovo svim živim organizmima i baš su zato tako biokompatibilni. To što su sirovine od kojih se pripremaju proizvodi metabolizima čini ih biorazgradivima (Paiva i sur., 2014). Prema OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), smjese koje se razgrade više od 60% nakon 28 dana, smatraju se biorazgradivima. Testovi „closed bottle” i „CO<sub>2</sub> headspace” su pokazali da je biorazgradivost NADES-ova nakon 28 dana veća od 60% stoga se mogu smatrati biorazgradivima (Radošević i sur., 2015).

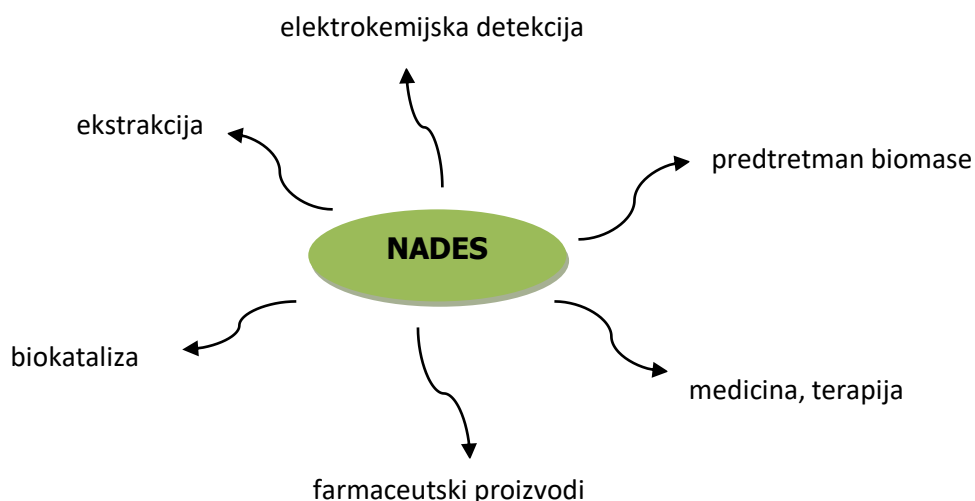
Pretpostavke da su prirodne ionske kapljevine i NADES-ovi neškodljivi temelje se na podacima o toksičnosti pojedinih komponenti koje ih sačinjavaju, a koje se dobivaju iz prirodnih izvora i farmaceutski su prihvatljive. Međutim, ova pretpostavka ne uzima u obzir mogućnost sinergističkog učinka komponenti/ionu, a što bi moglo imati značajan utjecaj na biološka svojstva ovih otapala (Radošević i sur., 2015). Radošević i sur., 2015 su izvijestili o istraživanju toksičnosti DES-ova na dvije gram pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*) te na dvije gram negativne bakterije (*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*). Istraživanja su pokazala da DES-ovi ne pokazuju nikakvu opasnost po korištene mikroorganizme. Paiva i sur. (2014) su ispitivali citotoksičnost 11 NADES-ova i dvije ionske kapljevine na L929 stanice fibroblasta. Zaključeno je da toksičnost svih pripremljenih otapala ovisi o sastavu i koncentraciji, ali da ni jedno nije pokazalo toksična svojstva. Osim toga, toksičnost je proučavana i na tri linije humanih stanica (HEK-293T, HeLa, i MCF-7) te je pokazano i da pri najvećoj koncentraciji NADES-a nije došlo do inhibicije rasta stanica. Takvi rezultati potvrđuju prethodne navode (Mitar i sur., 2019).

Neki NADES-ovi, pogotovo oni koji sadrže organske kiseline, pokazuju antimikrobna svojstva. To može biti korisno kad se ova otapala koriste, na primjer, pri antimikrobnoj fotodinamičkoj terapiji. Pritom je potrebno obratiti pažnju na toksičnost otapala s organskim kiselinama te odrediti potrebno razrjeđenje kako bi se zadovoljili svi faktori (Wikene i sur., 2017). Ispitivanja antimikrobne aktivnosti su provedena s 10 NADES-ova gdje je svako od 10 otapala bilo pripravljeno na tri načina, s različitim udjelom vode. Njihova antimikrobna aktivnost je proučena na mikroorganizmima koji su najčešći uzročnici bolesti: gram pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus aureus*), gram negativnim bakterijama (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*) i na kvascu (*Candida albicans*). Rezultati su pokazali da otapala koja sadrže kolin, betain, šećer i šećerne alkohole nemaju potencijalnu antimikrobnu aktivnost. Kao potencijalni antimikrobni agens pokazala su se otapala čija je komponenta limunska kiselina. Djelovala su inhibitorno na rast test mikroorganizama, a najveća inhibicija je zabilježena kod uporabe otapala limunska kiselina:glukoza:glicerol i limunska kiselina:fruktoza:glicerol (Radošević i sur., 2018).

Neke od komponenti koje su često korištene pri pripravi NADES-ova, kao jabučna i limunska kiselina te prolin i betain pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost. Pritom, najizraženija antioksidacijska svojstva pokazuje jabučna kiselina, a manje limunska. Međutim, otapala čije su komponente kolin klorid i alkoholi glicerol, etilen glikol, trieten glikol te urea nemaju izražena antioksidacijska svojstva kao prethodno navedeni spojevi. Po svemu sudeći, pažljivim odabirom komponenti za pripremu NADES-a, koje mogu imati različite pozitivne biološke značajke, možemo pripremiti otapalo s poželjnim karakteristikama. Tako bi se NADES mogao potencijalno primijeniti u medicinske svrhe u smislu sanacije upala, redukcije apoptoze stanica te pri liječenju kardiovaskularnih bolesti (Mitar i sur., 2019; Radošević i sur., 2018).

## 2.4. Primjena NADES-a u ekstrakciji

Budući da je broj mogućih kemijskih struktura ovih otapala iznimno velik, mogućnost njihova dizajniranja za specifične namjene čini ih vrlo zanimljivim za uporabu u različitim granama industrije te se istražuju potencijalne primjene ovih otapala u sintetskoj kemiji, elektrokemiji, izradi nanomaterijala, biokemiji, biokatalizi te izolaciji i analizi različitih spojeva što uključuje i biološki aktivne spojeve iz biljaka (slika 4).



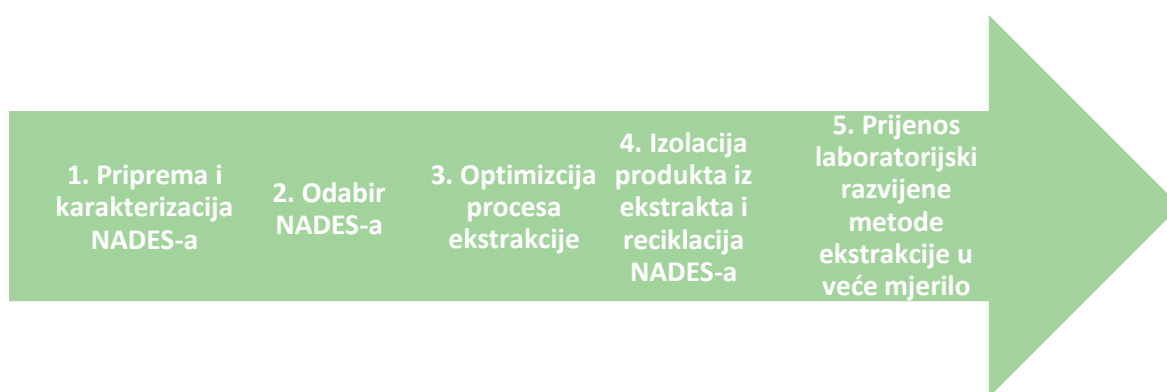
**Slika 4.** Primjena NADES-a (Vlastita slika).

Prema Chemat i sur. (2012) zelena ekstrakcija se bazira na otkrivanju i dizajniranju ekstrakcijskih procesa koji će reducirati potrošnju energije, omogućiti uporabu alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih spojeva te osigurati sigurnu i visoko kvalitetnu ekstrakciju proizvoda (ekstrakta). Ista skupina znanstvenika je ustanovila šest načela koja služe kao odrednice proizvođačima u industriji za kreaciju zelenih postupaka te u konačnici proizvoda koji zadovoljavaju sve zahtjevnije tržište. Šest principa je prikazano u nastavku:

1. Pronalazak novih izvora biljnih materijala i uporaba obnovljivih izvora biljnih materijala
2. Uporaba alternativnih otapala, uglavnom vode i otapala iz prirodnih izvora
3. Smanjenje potrošnje energije ponovnom uporabom energije i primjenom inovativnih tehnologija
4. Proizvodnja nusprodukata umjesto otpada kako bi se obuhvatila bio- i agro-industrija prerade

5. Smanjenje broja operacija i provođenje sigurnih, robusnih i kontroliranih procesa
6. Usmjerenje k proizvodnji biorazgradivog i stabilnog ekstrakta bez kontaminanata

Jedno od principa zelene ekstrakcije je i primjena zelenih otapala. Posljednjih godina, NADES se pokazao kao odlična zamjena za organska otapala u zelenoj ekstrakciji, a razlog tomu je mogućnosti dizajniranja NADES-a te djelovanja na njegova fizikalno-kemijska svojstva. Na taj način se mogu pripremiti otapala koja mogu ekstrahirati polarne i nepolarne supstance, a neki metaboliti su topljiviji u njima, nego u vodi (Choi i sur., 2011). Na slici 5 je prikazana shema razvoja procesa ekstrakcije primjenom NADES-a.



**Slika 5.** Shema razvoja procesa ekstrakcije primjenom NADES-a

#### **2.4.1. Odabir NADES-a za ekstrakciju**

Cilj svakog postupka je postići što veću produktivnost. Prvi korak prilikom primjene NADES-a u ekstrakciji je odabir odgovarajućih sirovina za sintezu otapala (Shikov i sur., 2020). Npr. otapalo pripremljeno od malonske kiseline i kolin klorida odlično ekstrahira salidrozd iz biljke *Rhodiola rosea*, dok otapalo kojeg čine kolin klorid i urea u tome uopće nije bilo uspješno (Tsvetov i sur., 2019a). S druge strane, za ekstrakciju cimeta alkohola iz iste biljke, *Rhodiola rosea*, kombinacija kolin klorida i glicerola uz razrijeđenje s vodom čini optimalnu otopinu (Tsvetov i sur., 2019b).

Fizikalno-kemijska svojstva koja utječu na učinkovitost ekstrakcije su viskoznost, polarnost, pH-vrijednost i dr. Dai i sur. (2016) bavili su se istraživanjem utjecaja viskoznosti

na uspješnost ekstrakcije. Pripremili su 6 NADES-ova i njima ekstrahirali antocijane iz biljke *Catharanthus roseus*. Prema rezultatima eksperimenta, otapala kojima je ekstrahiran najveći udio antocijana, imaju najmanju viskoznost. Osim viskoznosti, istražili su i utjecaj polarnosti i pH-vrijednosti otapala na uspješnost ekstrakcije te je dokazan utjecaj parametara na učinak ekstrakcije. Na uspješnost ekstrakcije utječe i molarni omjer komponenti od kojih se sintetizira otapalo. Stoga je pri pripremi optimalnog otapala za ekstrakciju određene komponente, osim eksperimentiranja s raznim kombinacijama komponenata koje mogu činiti otapalo, potrebno i provesti eksperimente te odrediti koji molarni udio sastavnica otapala najviše odgovara za provedbu postupka ekstrakcije (Ruesgas-Ramón i sur., 2017).

Modulacija svojstava otapala kojemu smo već odredili komponente i molarni udio tih komponenti, može se postići i dodatkom vode. Glavni razlog dodatku vode jest smanjenje visoke viskoznosti, odnosno, olakšanje prijenosa masa NADES-a koji otežava postupak ekstrakcije (Guízar González i sur., 2017; Dai i sur., 2013; Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Skupina znanstvenika, Guízar González i sur.(2017) bavila se proučavanjem ekstrahibilnosti vanilina. Razrjeđenje vodom svih pripremljenih NADES-ova do 25% uzrokovalo je povećanje ekstrahibilnosti vanilina, dok dodatak vode veći od 25% nije značajnije utjecao na kapacitet ekstrakcije, nego je čak kod jednog otapala smanjio uspješnost ekstrakcije. Također, manje polarna molekula, kartamin, koja se ekstrahira iz biljke *Catharanthus roseus*, biva bolje ekstrahirana otapalima čije razrjeđenje nije veće od 25%. Generalni zaključak je da mali dodatak vode, 10-30%, pogoduje ekstrakciji manje polarnih komponenti, dok veći dodatak vode pospješuje ekstrakciju polarnijih spojeva (Dai i sur., 2013). Osim toga, važno je pripaziti da dodatak vode ne premaši 50% jer u tom slučaju dolazi do slabljenja interakcija među molekulama otapala te otopina prestaje biti eutektička i poprima svojstva vodene otopine soli (Choi i sur., 2011; Dai i sur., 2016).

#### **2.4.2. Odabir metode ekstrakcije**

Nakon odabira otapala, odabire se i metoda ekstrakcije koja bitno utječe na kvalitetu i prinos ekstrakcije. Osim učinkovitosti ekstrakcije, odabir metode ekstrakcije mora se temeljiti na principima zelene kemije i ekstrakcije. Na taj način se minimizira štetni utjecaj na okoliš, čuva zdravlje ljudi te štedi energija (Zeng i sur., 2019). Najčešće primjenjivane metode ekstrakcije u praksi su miješanje, zagrijavanje te kombinacija miješanja i zagrijavanja. Osim navedenih, posljednjih godina sve se više koriste alternativne metode ekstrakcije primjenom ultrazvuka ili mikrovalova kojima se postiže bolje razbijanje stanične stijenke stanica iz kojih

se ekstrahira ciljani molekula. Uz to, primjenom tih netoplinskih tehnika, smanjuje se i potrošnja energije te se skraćuje vrijeme ekstrakcije (Chemat i sur., 2012).

Inovativne metode poput ekstrakcije ultrazvukom i ekstrakcije mikrovalnim zračenjem su se pokazale kao odličan izvor energije potrebne za poboljšanje uspješnosti ekstrakcije. Nekoliko studija je pokazalo da su NADES-ovi kompatibilni s ovim tehnikama te je provedena eksperimentalna optimizacija parametara. Bez obzira na odabranu metodu ekstrakcije, u oba slučaja procesni parametri o kojima ovisi učinak ekstrakcije su vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije i molarni omjer otapalo/kruta tvar. Viša temperatura pogoduje smanjenju viskoznosti NADES-a čime se olakšava prodor otapala u biljni matriks što vodi većem uništavanju međumolekulskih interakcija zbog čega se pospješuje ekstrakcija ciljanih molekula. S druge strane, važno je pripaziti na temperaturu i vrijeme ekstrakcije jer je većina bioaktivnih spojeva termoosjetljiva. Također, NADES-ovi se mogu koristiti u tehnici mikroekstrakcije za ekstrakciju hlapljivih spojeva. Osim toga, proučava se kompatibilnost NADES-a sa drugim inovativnim tehnologijama, poput superkritičnih fluida (Cvjetko Bubalo i sur., 2018.).

#### **2.4.3. Izolacija produkta iz ekstrakta i reciklacija NADES-a**

Posljednji korak ekstrakcije podrazumijeva odvajanje ekstrahirane komponente iz NADES-a. Ovaj stupanj određuje ukupnu ekološku prihvatljivost samog postupka tj. efikasnost, ekokompatibilnost i održivost procesa. Ovo je vrlo važan korak jer je kod ekstrakcije NADES-om oporavak ekstrakta izazovan zbog svojstveno niskog tlaka otapala. Inače je to dobra karakteristika jer se smanjuje onečišćenje atmosfere, ali stvara smetnju jer NADES nije moguće otpariti kao organsko otapalo i dobiti čist ekstrakt (Bosiljkov i sur., 2017; Dai i sur., 2013; Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Drugi problem odvajanja ekstrakta mogu biti otapala koja imaju visok ekstrakcijski kapacitet. Zbog jačih intermolekularnih interakcija otapala i uzorka, tj. nastajanja više vodikovih veza, kasnije odvajanje otapala od ekstrakta biva znatno otežano (Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Neki od pristupa za izolaciju produkta iz ekstrakta pripremljenog pomoću NADES-a su korištenje rekristalizacije produkta, korištenje anti-otapala, ekstrakcija tekuće-tekuće, adsorpcijska kromatografija (Ruesgas Ramon i sur., 2017.).

DES-ovi imaju sposobnost dobrog otapanja komponenti zbog stvaranja vodikovih veza između komponenti otapala i molekule koja se ekstrahira. Kako je tlak pare NADES-a približno jednak nuli, on se nakon ekstrakcije ne može otpariti i na taj način reciklirati. Jedno

od načina izolacije produkta je ekstrakcija tekuće-tekuće. Polarna otapala dobro se miješaju s DES-ovima, dok ona nepolarna (aprotična) ne te se zato mogu koristiti za razdvajanje izolirane komponente iz ekstrakta s NADES-om. NADES će biti dispergirani u aprotičnom otapalu te će se između te dvije faze odvijati izmjena ekstrakta. Što je ekstrakt manje sposoban tvoriti vodikove veze, to će izdvajanje biti lakše (Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Tako su Liu i sur. (2016) odvojili rutin, kvercetin, kaempferol i daidzein, koji su bili otopljeni u NADES-u (kolin klorid:glukoza:voda). Ekstrahirali su ih različitim organskim otapalima te su pritom iskorištenja izolacije produkta bila visoka, oko 95 %. Na ovaj način se NADES reciklira u intaktnom stanju, a organska otapala se sigurno zbrinjavaju.

Ekstrakcija kruto-tekuće se vrši pomoću smole ili molekularnih sita. Generalno se postupak može opisati na način da se otopina NADES-a propusti kroz kolonu nakon čega se željene komponente vežu na kolonu. Ta kolona se zatim ispiri nekim polarnim otapalom, najčešće vodom, kako bi se uklonio NADES, a vezani spoj s kolone se eluira određenim alkoholom (Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Dai i sur. (2013) su na taj način izdvojili fenolne komponente iz NADES-a nakon provedene ekstrakcije. Korištena je kromatografska kolona gdje je stacionarna faza bila smola HP-20. Na nju su se apsorbirale fenolne tvari, a NADES je zatim eluiran vodom. Fenolne komponente su desorbirane sa smole etanolom. Svojstva odabrane kolone, tj. smole te otapala za eluciju značajno utječu na krajnji prinos izolacije produkta i reciklacije NADES-a (Ruesgas-Ramón i sur., 2017).

Još jedna često spominjana i korištena metoda je dodatak anti-otapala. Vrlo je prihvaćena u praksi jer ne zahtijeva posebnu opremu ili neke dodatne naknade i ulaganja. Koriste se vrlo polarna otapala (voda, etanol) u kojima je NADES dobro topiv. Nakon toga se otopina anti-otapala i NADES-a otpari te ostaje sam produkt ekstrakcije (Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Ali i sur. (2019) su na taj način izdvojili flavonoide ekstrahirane NADES-om pomoću antiotapala-vode.

#### **2.4.4. Prijenos laboratorijski razvijene metode ekstrakcije primjenom NADES-a u veće mjerilo**

Posljednjih par godina upotreba NADES-a kao zelene alternative organskim otapalima neprestano raste. Dosad objavljeni znanstveni radovi odnose se na laboratorijsko mjerilo te je zabilježena samo nekolicina komercijalnih procesa zasnovanih na NADES-u, iako NADES pokazuje veliki potencijal za industrijsku primjenu zahvaljujući svojim prihvatljivim troškovima, svestranosti svojih fizikalno-kemijskih svojstava, jednostavnoj i jeftinoj pripremi



te niskoj citotoksičnosti. Visoka viskoznost NADES-a može biti ograničavajući faktor za korištenje NADES-a u industrijskom mjerilu, ne samo zbog manje učinkovitosti ekstrakcije, već i zbog energije potrebne za miješanje i pumpanje. Osim polarnosti, viskoznosti i gustoće, važno svojstvo otapala za daljnju primjenu je pH-vrijednost koja bi mogla imati negativan utjecaj na materijale u industrijskom postrojenju. Priroda donora i akceptora vodika određuje kiselost i bazičnost NADES-a. Otapala bazirana na organskim kiselinama prirodno imaju pH-vrijednost < 3. Ostala otapala su manje kisela do neutralna s pH-vrijednosti > 4 i bazična, ako im je pH-vrijednost > 7 (Paiva i sur., 2014). Također, dodatak vode utječe na promjenu pH-vrijednosti. Tako je kod otapala s iznimno niskom pH-vrijednosti zabilježen rast pH-vrijednosti dodatkom vode, dok je kod onih slabo kiselih dodatak vode uzrokovao zakiseljavanje (Mitar i sur., 2019).

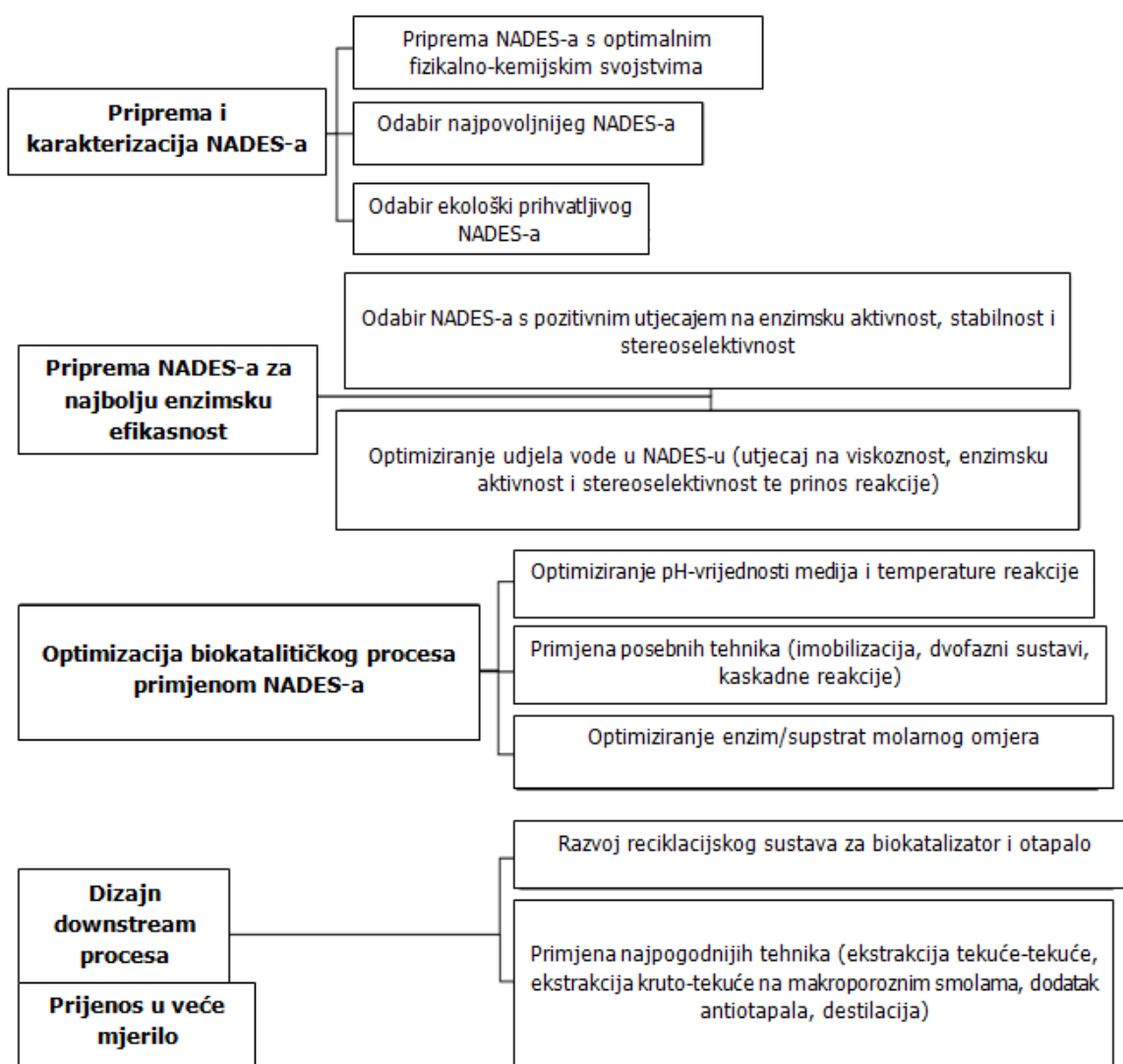
NADES pokazuje veliki potencijal za industrijsku primjenu zahvaljujući svojoj prihvatljivoj cijeni, prilagodljivosti svojih fizikalno-kemijskih svojstava, jednostavne i jeftine pripreme i niske toksičnosti. Abbott sur. (2007) su primijenili NADES u pilot postrojenju, točnije otapalo kolin klorid:glicerol u pročišćavanju biodizela. Pri prijenosu u veće mjerilo potrebno je obratiti pozornost na mnoge čimbenike, uključujući ekonomska i ekološka pitanja i metode ekstrakcije (Bosiljkov i sur., 2017). Proizvodnja NADES-ova se može klasificirati kao održivi proces, ali pri prijenosu u veće mjerilo najvažnija je cijena. Prosječna cijena NADES-a je 0,85-11,05 \$ kg<sup>-1</sup>, slično kao i kod organskih otapala. Ipak, primijećena je velika razlika u cijeni NADES-a (Bogaars, 2015). Panić i sur. (2017) su izračunali cijenu NADES-ova s obzirom na cijenu ishodnih sirovina prema web-stranici Merck (Njemačka). Prema tome izračunu, NADES-ovi koji sadrže polialkohole su dva puta skuplji od onih koji sadrže aminokiseline. Na primjer, kolin klorid:glicerol otapalo u molarnom omjeru 1:2 je vrijedilo 43,72 \$ kg<sup>-1</sup>, dok je najskuplje bilo otapalo kolin klorid:prolin:jabučna kiselina u molarnom omjeru 5:2, 252,42 \$ kg<sup>-1</sup>. Također, važno svojstvo NADES-a je nizak tlak pare. Ovo svojstvo je odlično jer smanjuje rizik onečišćenja zraka, ali istovremeno može biti velik problem pri izolaciji produkta iz ekstrakta, posebno u industrijskom mjerilu.

## **2.5. Primjena NADES-a u biokatalizi**

Biokataliza se definira kao reakcija katalizirana biokatalizatorom kao što je izolirani enzim ili cijela stanica. Svrha i opći ciljevi biotransformacija su dobivanje željenog metabolita pomoću kontroliranih mikrobnih reakcija, ali i izoliranih enzima, djelomičnom razgradnjom supstrata, dobivanje novih struktura proširenjem izvorne strukture supstrata pomoću

biosintetskih reakcija te dobivanje nove strukture supstrata preko selektivnih transformacijskih reakcija specifičnim modifikacijama (Bommarius i Riebel, 2004).

Jedan od 12 principa zelene kemije je i zamjena metalnih katalizatora biokatalizatorima (tablica 1). Prilikom dizajna biokatalitičkog procesa važno je minimizirati upotrebu pomoćnih reagensa i otapala za sve reakcije i korake pročišćavanja kako bi se proizveo minimalni otpad po jedinici sintetiziranog produkta (slika 6). Budući da se svojstva DES-ova mogu lagano modelirati izborom sastavnica, DES-ovi imaju višestruku ulogu u brojnim biotransformacijama, gdje mogu sudjelovati u različitim tipovima reakcija, poput esterifikacije, hidrolize, redukcije ili oksidacije. Mogu se koristiti kao čista otapala, kootapala u vodenim medijima i dijelovi dvofaznog sustava ili supstrati u reakcijama biokatalize (Faber, 2011).



**Slika 6.** Shema razvoja biokatalitičkog procesa primjenom NADES-ova (Vlastita slika)

Dokazana je veća učinkovitost NADES-a u lipazom kataliziranim reakcijama u odnosu na ionske kapljevine i organska otapala (Gorke i sur., 2008). Osim što mogu utjecati na tijek biokatalize, mogu utjecati i na strukturu i aktivnost biokatalizatora (Xu i sur., 2017). Tako, primjerice, povećanje molarnog omjera donora vodika u NADES-ovima na bazi kolin klorida (npr. sa 2:1 na 1:2) povećava udio  $\alpha$ -uzvojnica u peroksidazi hrena. Posljedično, tercijska struktura proteina postaje otvorenija, a enzim pokazuje bolju aktivnost i stabilnost (Wu i sur., 2014).

### **2.5.1. Odabir NADES-a za biokatalizu**

Odabir komponenti NADES-a, donora i akceptora vodikove veze bitno određuje proces biokatalize. Različite komponente ne djeluju jednako na određeni enzim pa je to uvijek potrebno ispitati. Razlog mogu biti drukčije viskoznosti otapala ili drukčija mreža vodikovih veza (Xu i sur., 2017). Sastav otapala za svaki enzim je individualan. Tako enzimu  $\beta$ -galaktozidazi više odgovaraju otapala sastavljena od kolin klorida i alkohola (glicerol, propilen glikol), nego ona koja čine kolin klorid i šećeri (glukoza, saharoza), a kao razlog se uzima visoka viskoznost šećera koja otežava postupak. Osim toga, otapala koja sadrže alkohole poželjna su i iz razloga što sadrže nekoliko hidroksilnih skupina pa zato mogu tvoriti više veza za razliku od amida uree (Xu i sur., 2018). Također, neke komponente NADES-a poput uree su vrlo denaturirajući agensi. Međutim, dodatkom druge komponente i stvaranjem vodikovih veza među njima i aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima ta svojstva postaju zanemariva, a aktivnost enzima čak povećana (Zhao i sur., 2011; Xu i sur., 2017).

Molarni omjer komponenti otapala je dosad spominjan kao bitan faktor mnogih svojstava otapala. Utječe na točku leđišta, gustoću, viskoznost, topljivost pa onda ne čudi da je značajan i u biokatalizi (Zhang i sur., 2012). Različit molarni udio komponenti mijenja formaciju vodikovih veza što vodi promjeni stereokemijske strukture enzima, što u konačnici utječe na samu reakciju (Xu i sur., 2017). Jedan od primjera je i uočena bolja enzimska aktivnost, ako je u sastavu NADES-a veći udio soli kolin klorida naprema donoru vodikove veze (2:1>1:1>1:2) (Gotor-Fernández i Paul, 2019).

Koncentracija NADES-a, koja je direktno povezana s udjelom vode u otapalu, djeluje i na aktivnost i selektivnost enzima. Kao što je već spomenuto, voda NADES-u smanjuje viskoznost, što u ovom slučaju vodi otpuštanju supstrata iz mreže vodikovih veza te olakšanom kontaktu s enzimom uz povećanje polarnosti i fleksibilnosti aktivnog mjesta čime

se pospješuje efikasnost enzima. Međutim, višak vode dovodi do agregacije enzima i time otežane difuzije supstrata do aktivnog mjesta. Također, kod reakcija esterifikacije, transesterifikacije, alkoholize i acidolize višak vode može pokrenuti neželjene reverzibilne reakcije hidrolize. Negativni utjecaj se osjeća i na samom NADES-u jer mu se narušava struktura zbog visoke kompetitivnosti vode za vodikove veze (Durand i sur., 2012; Xu i sur., 2017; Xu i sur., 2018).

Sastav NADES-a utječe i na njegovu biokatalitičku aktivnost. Otapala s organskim kiselinama kao donorom vodikove veze negativno utječu na aktivnost cijelih stanica, zbog niske pH-vrijednosti. S druge strane, kad su šećeri ili polialkoholi u sastavu NADES-a, stanice su aktivnije (Xu i sur., 2016). Kao i uvijek, i u ovom slučaju je poželjna što manja viskoznost otapala, koja također ovisi o sastavu otapala (Xu i sur., 2016)

Tip NADES-a te sadržaj vode utječu i na stereoselektivnost biokatalizatora. Tako su Gotor-Fernández i Paul (2019) proučavali sintezu (*R*)-alkohola cijelim stanicama kataliziranom redukcijom etil acetoacetata u NADES-u (*ee* =95%), dok je u vodenom mediju sintetiziran (*S*)-enantiomer.

Sirovina koja ulazi u sastav NADES-a, ponekad može biti i supstrat u biokatalitičkoj reakciji. U reakcijama kataliziranim lipazama, otapala koja su sadržavala šećere poput arabinoze, ksiloze, glukoze i manoze bila su i supstrat enzimu za stvaranje glikolipida (Panić, 2020).

Jedan od bitnih kriterija je i stabilnost enzima u NADES-u. Važan je zbog praktičnih primjena enzima, pogotovo za procese koji duže traju. Procjena skladišne stabilnosti se radi na način da se enzim inkubira u otapalu pet dana pri određenoj temperaturi. Rezultati se prikazuju kao usporedba relativne aktivnosti svakog dana i aktivnosti bez inkubacije. U istraživanju Xu i sur. (2018) enzim  $\beta$ -glukozidaza je zadržao 50% svoje aktivnosti nakon pet dana, dok je kod inkubacije u metanolu gubitak aktivnosti dosegao 79%. Durand i sur. (2012) su istražili gubitak aktivnosti enzima lipaze. Nakon samo jednog dana inkubacije u NADES-u enzim je izgubio 70% aktivnosti, ali do kraja petog dana aktivnost je ostala ista, dakle, ustabilila se nakon prvog dana. To je dovelo do zaključka da enzim treba nekoliko sati za prilagodbu u novom okruženju, nakon čega više nema promjena u aktivnosti zbog čega je enzim dugoročno prihvatljiv.

Kada govorimo o biokatalizi sa živim stanicama potrebno je obratiti pozornost na same stanice te utjecaj njihovog stanja na uspješnost reakcije. Osnova procesa je izmjena

tvori kroz membranu stanice, dakle, ulazak supstrata te kasnije izlazak produkta iz stanice. Prema tome, najbolje bi odgovaralo da stanice imaju dozu propusnosti. Drugim riječima, valjalo bi da su stanice malo oštećene kako bi se olakšao prijenos masa. Tu su se NADES-ovi još jedanput pokazali kao odličan odabir. Naime, oni djeluju na način da oštećuju staničnu membranu zbog čega supstrat ima olakšan pristup enzimima u stanici. Osim difundiranja supstrata u stanicu, zbog povećane permeabilnosti može doći i do curenja sadržaja stanice u reakcijski medij zbog čega enzim postaje dostupan supstratu izvan stanice. Nagađa se da NADES uzrokuje ekspanziju stanične membrane što također olakšava proces izmjene tvari, a ne uzrokuje eventualnu smrt stanice (Xu i sur., 2016).

### **2.5.2.Optimiranje biokatalitičkog procesa**

Odabir otapala već je veliki korak u optimizaciji biokatalitičkog procesa, jer otapalo utječe na viskoznost, polarnost i pH-vrijednost medija, a ti su parametri važni za topljivost supstrata i produkta te aktivnost enzima (Xu i sur., 2018).

Osim odabira medija, potrebno je optimirati i ostale parametre biokatalitičkog procesa kao što su vrijeme i temperatura reakcije, udio biokatalizatora i otapala te koncentracija supstrata. Podešavanje temperature je od iznimne važnosti. Osim što je temperatura ključna za modulaciju gustoće i viskoznosti otapala, kao što je ranije objašnjeno, ona je vrlo važna i za aktivnost enzima. Poznato je da enzimi imaju optimalnu temperaturu djelovanja, tako da prevelika odstupanja od dozvoljenog intervala dovode do preslabe aktivnosti ili do denaturacije enzima. Osim toga, voda koja je potrebna za pravilno provođenje reakcije često hlapi povišenjem temperature (Panić, 2020; Xu i sur., 2018; Zhang i sur., 2012). U eksperimentu kojeg su proveli Durand i sur. (2012) povišenje temperature za 30°C je uzrokovalo smanjenje viskoznosti 10 puta, dok je povišenjem temperature za 20°C došlo do povećanja specifične aktivnosti [ $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ] 1,5 puta. Tako u praksi povišenjem temperature postizemo dvojadi učinak, smanjujemo viskoznost otapala i na taj način povećavamo prijenos masa te istovremeno pojačavamo aktivnost enzima (Zhao i sur., 2011). Pretpostavka je da je termalna stabilnost enzima veća u zelenim otapalima zbog vodikovih veza koje djeluju kao štit enzimima i tako ih čuvaju od denaturacije pri visokim temperaturama (Xu i sur., 2018).

Što se tiče topljivosti supstrata, ona se mora optimirati kako ne bi došlo do inhibicije supstratom. Primjećeno je da NADES-ovi imaju sposobnost otopiti veću količinu supstrata, a

ponekad produkt nije topljiv u istom NADES-u te je na taj način omogućena i izolacija produkta (Xu i sur., 2016). Jedan primjer je otapalo kolin klorid:urea u kojem je topljivost supstrata kortizon acetata iznosila  $0,0436 \text{ mgmL}^{-1}$ , dok je u vodi i etanolu iznosila  $0,0215 \text{ mgmL}^{-1}$  i  $0,0280 \text{ mgmL}^{-1}$  (Panić, 2020).

### **2.5.3. Izolacija produkta, reciklacija otapala i biokatalizatora te prijenos laboratorijski razvijene metode u veće mjerilo**

Zadnji korak biotransformacijskog procesa (downstream proces) obuhvaća izolaciju proizvoda, izolaciju biokatalizatora te, ako je moguće, reciklaciju biokatalizatora i NADES-a (slika 6). Izolacija proizvoda i biokatalizatora iz NADES-a nije tako jednostavna. Razlog tomu je niski tlak otapala zbog čega ga nije moguće jednostavno otpariti (Dai i sur., 2013; Ruesgas-Ramón i sur., 2017). Jedan primjer postupka izolacije proizvoda jest izolacija estera mentol dodekanske kiseline. U ovom slučaju se NADES sastojao od mentola i dodekanske kiseline te je istovremeno služio kao supstrat reakcije. Budući da je mentol imao nisku temperaturu vrelišta, mogao se odvojiti vakuum destilacijom, a za njim je zaostao željeni ester. Pročišćeni mentol se zatim mogao reciklirati te ponovno koristiti kao komponenta NADES-a (Pätzold i sur., 2019). Panić i sur. (2018) su izdvojili proizvod (S)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol, dobiven redukcijom acetofenona pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Postupak su proveli ekstrakcijom tekuće-tekuće pomoću agrootapala etil acetata, koje je zatim otpareno kako bi se dobio sirovi produkt. NADES koji je zaostao nakon pročišćavanja još je dva puta uspješno iskorišten, uz neznatno smanjenje iskorištenja. Također, provedeno je razdvajanje alkohola od estera nakon biokatalitičke reakcije u NADES-u. Ester nije bio topljiv u NADES-u, a alkohol jest pa se razdvajanje provelo ekstrakcijom NADES-a. Zato se ova metoda može koristiti za izolaciju supstrata ili produkata netopivih u NADES-u (Panić, 2020).

Kako bi se ovaj ekološki prihvatljiv postupak katalize više koristio u praksi bitno je da bude ekonomski isplativ. Stoga, najbolji način je ponovna upotreba, tj. reciklacija enzima ili stanica čija je cijena previsoka za jednokratnu upotrebu. Tako su Mao i sur. (2015) ponovno iskoristili imobilizirane stanice *Arthrobacter simplex* i NADES korišten u biodehidrogenaciji steroida. Izdvajanje stanica su postigli filtracijom reakcijskog medija, a otapalo kolin klorid:urea su ekstrahirali etil acetatom s ciljem izolacije zaostalog supstrata i produkta. Ovaj postupak je izveden u pet ciklusa tijekom kojih je prinos produkta pao za samo 12% (sa 93% na 81%). Panić (2020) je izvijestila o ponovnoj uporabi imobiliziranih stanica *Lysinibacillus fusiformis* CGMCC1347 kroz čak 13 ciklusa od kojih je svaki trajao 72 h.

Tijekom svih 13 ciklusa zabilježeni su visoki prinosi. Sljedeći primjer je eksperiment Xu i sur. (2015) koji su još jednom dokazali isplativost ponovne upotrebe imobiliziranih stanica te prednost korištenja NADES-a pritom. Ponovno su iskoristili iste stanice tijekom pet ciklusa pri čemu su stanice održale 80% početne aktivnosti u NADES-u te samo 50,4% u običnom puferu.

Prijenos svakog procesa u veće mjerilo ovisi o specifičnom procesu biokatalize i trebaju ga dogovorno dizajnirati kemičari, biotehnolozi i bioproceni inženjeri (Panić, 2020). Niska cijena NADES-ova i njihova jednostavna priprema čini ih vrlo privlačnom opcijom za industrijsku primjenu. Međutim, velika viskoznost i gustoća mogu biti ograničavajući faktor zbog problema pri miješanju i pumpanju te utroška energije pritom. Kao što je već spomenuto, dodatak treće komponente, vode, može smanjiti viskoznost. Prema dosadašnjoj literaturi, ovakvi procesi se nisu provodili u volumenima većim od 500 mL. Xu i sur. (2015) su proveli biokataliziranu redukciju 3-klorpropionfenona s imobiliziranim stanicama *Acetobacter* sp. CCTCCM209061 u otapalu kolin klorid:urea u reakcijskoj smjesi volumena 500 mL. Iako je prinos (82,3%) bio manji, nego onaj u smjesi volumena 5 mL (93,3%), prinos produkta ((S)-3-klor-1-fenilpropanol) na kraju izolacije i pročišćavanja je bio vrlo visok (oko 82%), dok je ee bio iznad 99%. Panić i sur. (2018) su redukciju 1-(3,4-dimetilfenil)etanola (DMPA) pomoću kvasca *S.cerevisiae* u otapalu kolin klorid:glicerol prenijeli u mjerilo 300 mL. Proces je uključivao 3 koraka: ultrazvučni predtretman biokatalizatora u NADES-u, biokatalizu, downstream proces i reciklaciju otapala. Prinos u većem mjerilu je iznosio isto kao u mililitarskom, 89,91%.

### 3. ZAKLJUČCI

S obzirom na iznesene činjenice o primjeni prirodnih eutektičkih otapala u postupcima ekstrakcije i biokatalize izvedeni su sljedeći zaključci:

1. NADES-ovi su se pokazali dobrom zelenom alternativom za sveprisutna, štetna organska otapala u biokatalizi i ekstrakciji.
2. Sastav NADES-a utječe na fizikalno-kemijska svojstva otapala te na učinak ekstrakcije i na aktivnost enzima.
3. Glavne prednosti primjene NADES-a kao otapala za ekstrakciju prirodnih spojeva: (i) NADES-ovi su visoko selektivna otapala koja mogu otapati i polarne i nepolarne komponente te (ii) stabilnost spojeva u NADES-ovima je bolja nego u konvencionalnim otapalima
4. Glavne prednosti primjene NADES-a kao otapala u biokatalitičkim procesima: (i) poboljšana topljivost supstrata/produkata, (ii) poboljšana aktivnost, kemo-, regio- i stereoselektivnost te stabilnost biokatalizatora, (iii) poboljšani prinos reakcije te (iv) mogućnost reciklacije i ponovnog korištenja NADES-a.
5. Razvoj ekološki prihvatljivih tehnologija primjenom prirodnih eutektičkih otapala treba uključivati sljedeće korake: (i) Priprema i karakterizacija NADES-a (fizikalno-kemijska svojstva; procjena utjecaja na okoliš) (ii) odabir NADES-a (učinkovitost procesa, karakteristike NADES-a, cijena NADES-a, stabilnost procesa), (iii) optimiranje procesa (upotreba inovativnih tehnologija, reciklacija NADES-a) te (iv) prijenos laboratorijski razvijene metode u veće mjerilo.



## 4. POPIS LITERATURE

- Abbott A.P., Cullis P.M., Gibson M.J., Harris R.C., Raven E., (2007) Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid. *Green Chemistry* **9**: 868-872.
- Abbott A.P., D'Agostino C., Davis S.J., Gladden L.F., Mantle M.D. (2016) Do group 1 metal salts form deep eutectic solvents? *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**(36): 25528-25537.
- Ali M.C., Chen J., Zhang H., Li Z., Zhao L., Qiu H. (2019) Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. *Talanta* **203**: 16-22.
- Anastas P., Eghbali N. (2010) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews* **39**: 301-312.
- Bogaars R.A., n.d. Exploring Commercial Applications of Natural Deep Eutectic Solvents.
- Bommarius A. S., Riebel B. R. (2004) Biocatalysis. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. I. str. 7.
- Bosiljkov T., Dujmić F., Cvjetko Bubalo M., Hribar J., Vidrih R., Brnčić M., Zlatic E., Radojčić Redovniković I., Jokić S. (2017) Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioprocess Technology* **102**: 195-203.
- Chemat F., Vian M.A., Cravotto G. (2012) Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences* **13**(7): 8615-8627.
- Choi Y.H., van Spronsen J., Dai Y., Verberne M., Hollmann F., Arends I. W. C. E., Witkamp G.-J., Verpoorte R. (2011) Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant physiology* **156**(4): 1701-1705.
- Cvjetko Bubalo M., Panić M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. (2016) Metode priprave eutektičkih otapala. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **11** (3-4): 164-168.
- Cvjetko Bubalo M., Radošević K., Radojčić Redovniković I., Halambek J., Vorkapić-Furač J., Gaurina Srček V. (2014). Ionske kapljevine – razvoj i izazovi industrijske primjene. *Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **63** (5-6): 163–171.

Cvjetko Bubalo M., Vidović S., Radojčić Redovniković I., Jokić S. (2015) Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **90**(9): 1631-1639

Cvjetko Bubalo M., Vidović S., Radojčić Redovniković I., Jokić S. (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioprocess Processing* **109**: 52-73

Dai Y., Rozema E., Verpoorte R., Choi Y. H. (2016) Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A* **1434**: 50-56.

Dai Y., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y.H. (2013) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry* **85**(13): 6272-6278.

Dai Y., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y.H. (2015) Tailoring Properties of Natural Deep Eutectic Solvents With Water to Facilitate Their Applications. *Food Chemistry* **187**: 14-19.

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 Biochemistry* **47**(12): 2081-2089.

Elgharbawy, A.A., 2018. Shedding Light on Lipase Stability in Natural Deep Eutectic Solvents. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **32**: 359–370.

Faber K. (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. izd., Springer. str. 1 - 268.

Florindo C., Oliveira F.S., Rebelo L.P.N., Fernandes A.M., Marrucho I.M. (2014) Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2**(10): 2416-2425.

Gorke J.T., Srienc F., Kazlauskas R.J. (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chemical Communications* **10**:1235-1237.

Gotor-Fernández V., Paul C.E. (2019) Deep eutectic solvents for redox biocatalysis. *Journal of Biotechnology* **293**: 24-35.

Guízar González C., Rianika Mustafa N., Wilson E. G., Verpoorte R., Choi Y.H. (2017) Application of natural deep eutectic solvents for the "green" extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal* **33**(1): 91-96.

Gutiérrez M.C., Ferrer M.L., Reyes Mateo C., del Monte F. (2009) Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures. *Langmuir* **25**(10): 5509–5515.

Ijardar S.P. (2020) Deep eutectic solvents composed of tetrabutylammonium bromide and PEG: Density, speed of sound and viscosity as a function of temperature. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **140**: 105897.

Jablonský M., Škulcová A., Kamenská L., Vrška M., Šíma J. (2015) Deep Eutectic Solvents: Fractionation of Wheat Straw. *BioResources* **10**(4): 8039-8047.

Liu Y., Brent Friesen J., McAlpine J.B., Lankin D.C., Chen S.-N., Pauli G.F. (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products* **81**(3): 679-690.

Liu Y., Garzon J., Brent Friesen J., Zhang Y., McAlpine J.B., Lankin D.C., Chen S.-N., Pauli G.F. (2016) Countercurrent Assisted Quantitative Recovery of Metabolites From Plant-Associated Natural Deep Eutectic Solvents. *Fitoterapia* **112**: 30-37.

Mao S., Yu L., Ji S., Liu X., Lu F. (2015) Evaluation of deep eutectic solvents as co-solvent for steroids 1- $\alpha$ -dehydrogenation biotransformation by *Arthrobacter simplex*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **91**: 1099-1104

Mitar A., Panić M., Prlić Kardum J., Halambek J., Sander A., Zagajski Kučan K., Radojčić Redovniković I., Radošević K. (2019) Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **33**(1): 1-18.

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 Sustainable Chemistry and Engineering* **2**(5): 1063-1071.

Paiva A., Matias A.A., Duarte A.R.C. (2018) How do we drive deep eutectic systems towards an industrial reality? *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **11**: 81-85.

Panić M. (2020) Application of natural deep eutectic solvents in isolation of anthocyanins and biocatalysis with lipase, Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

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

Panić M., Majerić Elenkov M., Roje M., Cvjetko Bubalo M., Radojčić Redovniković I. (2017) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry* **66**: 133-139.

Pätzold M., Burek B. O., Liese A., Bloh J. Z., Holtmann D. (2019) Product recovery of an enzymatically synthesized (–)-menthol ester in a deep eutectic solvent. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **42**(8): 1385–1389.

Qin H., Hu X., Wang J., Cheng H., Chen L., Qi Z. (2020) Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications. *Green Energy & Environment* **5**(1): 8-21.

Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V., Grgas D., Landeka Dragičević T., Radojčić Redovniković I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **112**: 46-53.

Radošević K., Čanak I., Panić M., Markov K., Cvjetko Bubalo M., Frece J., Gaurina Srček V., Radojčić Redovniković I., (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research* **25**: 14188–14196.

Ruesgas-Ramón M., Figueroa-Espinoza M.C., Durand E. (2017) Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**(18): 3591-3601.

Shikov A.N., Kosman V.M., Flissyuk E.V., Smekhova I.E., Elameen A., Pozharitskaya O.N. (2020) Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Phenyletanes and Phenylpropanoids of *Rhodiola rosea* L. *Molecules* **25**(8): 1826.

Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews* **114**(21): 11060-11082.

- Tsvetov N.S., Mryasova K.P., Shavarda A.L., Nikolaev V.G. (2019a) Estimation of extraction efficiency of salidroside from *Rhodiola rosea* using deep eutectic solvents. *IOPConference Series: Earth and Environmental Science* **315**(4): 042002.
- Tsvetov N.S., Mryasova K.P., Korotkova G.V., Asming S.V., Nikolaev V.G. (2019b) Extraction of cinnamic alcohol from *Rhodiola rosea* using deep eutectic solvents. *IOPConference Series: Earth and Environmental Science* **315**(4): 042006.
- Wikene O.K., Rukke H.V., Bruzell E., Hjorth Tønnesen H. (2017) Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **171**: 27-33.
- Woodley J.M. (2008) New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology* **26**: 321–327.
- Wu B.-P., Wen Q., Xu H., Yang Z. (2014) Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **101**: 101-107.
- Xu P., Du P.-X., Zong M.-H., Li N., Lou W.-Y. (2016) Combination of deep eutectic solvent and ionic liquid to improve biocatalytic reduction of 2-oceanone with *Acetobacter pasteurianus* GIM1.158 cell. *Scientific reports* **6**: 26158.
- Xu P., Xu Y., Li X.-F., Zhao B.-Y., Zong M.-H., Lou W.-Y. (2015) Enhancing Asymmetric Reduction of 3-Chloropropiophenone with Immobilized *Acetobacter sp.* CCTCC M209061 Cells by Using Deep Eutectic Solvents as Cosolvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **3**(4): 718–724.
- Xu P., Zheng G.-W., Zong M.-H., Li N., Lou W.-Y. (2017) Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresources and Bioprocessing* **4**(1): 34.
- Xu W.-J., Huang Y.-K., Li F., Wang D.-D., Yin M.-N., Wang M., Xia Z.-N. (2018) Improving  $\beta$ -glucosidase biocatalysis with deep eutectic solvents based on choline chloride. *Biochemical Engineering Journal* **138**: 37-46.
- Zeng J., Dou Y., Yan N., Li N., Zhang H., Tan J.-N. (2019) Optimizing Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Bioactive Compounds from Chinese Wild Rice. *Molecules* **24**(15): 2718.

Zhang Q., De Oliveira Vigier K., Royer S., Jérôme F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**: 7108-7146.

Zhao B.-Y., Xu P., Yang F.-X., Wu H., Zong M.-H., Lou W.-Y. (2015) Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **3**(11): 2746-2755.

Zhao H., Baker G.A., Holmes S. (2011) Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* **72**(3-4): 163-167.

## Izjava o izvornosti

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

---

ime i prezime studenta