

# Utjecaj eutektskih otapala na enzimski kataliziranu hidrolizu (R,S)-1-feniletal-acetata

---

**Kapitanović, Josipa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:362261>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU PREHRAMBENO-  
BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Josipa Kapitanović, 1005/MB

**Utjecaj eutektskih otapala na  
enzimski kataliziranu hidrolizu  
(*R,S*)-1-feniletal-acetata**

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

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na prenesenom znanju, strpljenju i pomoći prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala mag. ing. Manueli Panić na nesebičnoj pomoći te brojnim korisnim savjetima. Neizmjereno hvala mojoj obitelji koja mi je bila najveća podrška i motivacija tijekom mog studiranja te svim mojim dragim prijateljicama.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveni polje:** Biotehnologija

### UTJECAJ EUTEKTIČKIH OTAPALA NA ENZIMSKI KATALIZIRANUHIDROLIZU (R,S)-1-FENILETIL-ACETATA

*Josipa Kapitanović, 1005/MB*

**Sažetak:** Posljednjih nekoliko godina raste broj istraživanja usmjerenih na mogućnost primjene eutektičkih otapala u različitim biotransformacijskim procesima. Glavne prednosti njihove primjene u odnosu na ostala otapala su biorazgradivost, netoksičnost, nehlapljivost te jednostavna priprema. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene imobilizirane lipaze te hidrolitičkih enzima iz narančine kore kao biokatalizatora u hidrolizi (R,S)-1-feniletil-acetata u prirodnom eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol (ChCIEG) s različitim udjelima vode. Uspoređujući postotak iskorištenja hidrolize i enantiomernog viška, utvrđeno je da je najpogodnije otapalo ChCIEG s 50 % udjela vode (w/w). Također, ispitana je skladišna stabilnost imobilizirane lipaze B te hidrolitičkih enzima narančine kore kroz vremenski period od 21 dan u eutektičkom otapalu u ChCIEG. Iz dobivenih vrijednosti rezidualne aktivnosti utvrđeno je da su hidrolitički enzimi iz narančine kore stabilniji u ChCIEG nego u puferu, dok je lipaza stabilnija u puferu nego u ChCIEG s 50 % udjela vode (w/w).

**Ključne riječi:** eutektička otapala, lipaza, narančina kora, (R,S)-1-feniletil-acetat, skladišna stabilnost

**Rad sadrži:** 44 stranice, 18 slika, 7 tablica, 45 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** Manuela Panić, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (predsjednik)
2. Doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek
3. Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo
4. Prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac (zamjena)

**Datum obrane:** 20. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for cell technology, application and biotransformations**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **THE EFFECT OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS ON LIPASE CATALYZED HYDROLYSIS OF (R,S)-1-PHENYLETHYLACETATE**

*Josipa Kapitanović, 1005/MB*

**Abstract:** In the last few years, there has been an increasing number of studies focused on the possibilities of using eutectic solvents in various biotransformation processes. The main advantages of their application over other solvents are biodegradability, non-toxicity, non-volatility and easy synthesis. This work examines the possibility of using immobilized lipase and hydrolytic enzymes from orange peel as biocatalysts in the hydrolysis of (R,S)-1-phenylethyl acetate in a natural deep eutectic solvent choline chloride:ethylene glycol with different water contents. Comparing the percentage of utilization of hydrolysis and enantiomeric excess, it was found that the most suitable solvent is ChCl:EG with 50% water content (w/w). Also, the storage thermal stability of immobilized lipase and hydrolytic enzymes from orange peel over a period of 21 days was examined. From the obtained residual activity values, it was found that the hydrolytic enzymes from the orange peel were more stable in ChCl:EG than in buffer, while lipase was more stable in buffer than in ChCl:EG with 50% water content (w/w).

**Keywords:** natural deep eutectic solvents, lipase, orange peel, (R,S)-1-phenylethyl-acetate, storage thermal stability

**Thesis contains:** 44 pages, 18 figures, 7 tables, 45 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Manuela Panić, mag. ing.

#### **Reviewers:**

1. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
2. PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor
3. PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor
4. PhD. Vlatka Petravić Tominac, Full professor

**Thesis defended:** September 20<sup>th</sup>, 2019.

## Sadržaj stranica

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1 Biotransformacije</b> .....	2
2.1.1 Biokatalizatori u biotransformacijama .....	5
<b>2.2 Zelena otapala</b> .....	9
2.2.1 Eutektička otapala .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
<b>3.1 Materijali</b> .....	16
3.1.1 Biljni materijal.....	16
3.1.2 Enzimski preparat.....	16
3.1.3 Kemikalije .....	16
3.1.4 Oprema i uređaji.....	16
<b>3.2 Metode</b> .....	17
3.2.1 Priprava eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol.....	17
3.2.2 Enantioselektivna hidroliza ( <i>R,S</i> )-1-feniletil acetata u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol .....	18
<b>3.3 Određivanje stabilnosti hidrolitičkih enzima u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol</b> .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	23
<b>4.1 Sinteza prirodnih eutektičkih otapala</b> .....	23
<b>4.2 Enantioselektivna hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol</b> .....	24
4.2.1 Hidroliza ( <i>R,S</i> )-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima narančine kore .....	24
4.2.2 Hidroliza ( <i>R,S</i> )-1-feniletil acetata primjenom lipaze.....	33
<b>4.3 Određivanje stabilnosti hidrolitičkih enzima u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol (ChCIEG)</b> .....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	39
<b>6. LITERATURA</b> .....	41



# 1. UVOD

Suvremena se industrija neprestano suočava sa izazovima u razvoju novih i boljih produkata i procesa. Pri tom znanstvenici nailaze na brojne prepreke kako bi u konačnici razvili procese koji će biti ekonomični, visokoproduktivni, ali istovremeno i održivi te ekološki prihvatljivi. U svrhu očuvanja okoliša i smanjenja onečišćenja, u SAD-u 1990. godine utemeljena je zelena kemija. Po definiciji Američke agencije za zaštitu okoliša definirana je kao kemija koja osmišljava kemijske produkte i procese koji nisu štetni za okoliš i na taj način sprečava nastajanje onečišćenja. Jedan od važnih smjerova zelene kemije jesu biotransformacije (primjena enzima u pripravi različitih organskih spojeva) koja pripadaju zelenim tehnologijama i predstavljaju kvalitetnu alternativu kemijskim postupcima sinteze. Prednost je to što su ovi postupci ekonomski učinkoviti zbog blagih uvjeta rada i visoke čistoće proizvoda, ali i ekološki prihvatljivi, stoga su našli široku primjenu za dobivanje raznih visokovrijednih proizvoda. U posljednjih dvadesetak godina došlo je do značajnog porasta znanstvenog interesa za biotransformacijskim procesima u akademskim krugovima zbog otkrića novih enzima te povećane potrebe za enantiomerno čistim spojevima u farmaceutskoj industriji i poljoprivredi.

Osim toga, nedostaci sveprisutnih organskih otapala kao što su toksičnost, zapaljivost, hlapivost i onečišćavanje okoliša, potaknuli su znanstvenike na istraživanje alternativnih otapala koja će biti sigurnija za ljude i okoliš. Prema načelima zelene kemije idealno otapalo je netoksično, kemijski i fizički stabilno, ima nisku hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe te je jednostavno za rukovanje. Razvijena su tzv. zelena otapala, a to su: ionske kapljevine, superkritični CO<sub>2</sub> te eutektička otapala. Najširu primjenu u biotransformacijama imaju eutektička otapala zbog toga što su biorazgradiva, stabilna, nisu hlapljiva, manje su toksična prema okolišu i ljudima, jeftinija su i lakše se sintetiziraju.

Stoga, cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata u (*R,S*)-1-feniletanol primjenom imobilizirane lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antartica* i hidrolitičkih enzima iz kore naranče te istražiti stabilnost ovih enzima u eutektičkom otapalu kroz vremenski period od 21 dana.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Biotransformacije

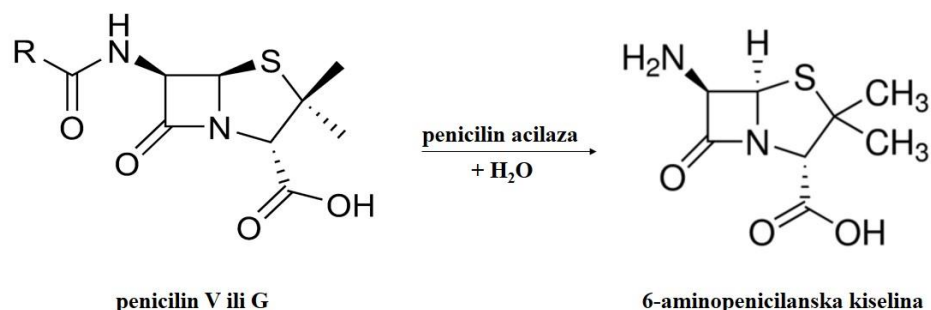
Biotransformacije podrazumijevaju enzimске modifikacije definiranih čistih spojeva (prirodnih ili dobivenih kemijskom sintezom) u definirane konačne proizvode, najčešće pretvorbom u jednom koraku, odnosno to je proces u kojem dolazi do enzimске konverzije supstrata u produkt (Bommarius i Riebel, 2004). Osim biotransformacija, za proizvodnju kemikalija, lijekova ili različitih materijala u velikom mjerilu, mogu se koristiti još i čisti kemijski procesi te kombinacija kemijskih i biokatalitičkih procesa. Pri tome se biokatalitički procesi koriste za glavne reakcije koje zahtijevaju visoku selektivnost, specifičnost ili kao zamjena za ekološki nepovoljne reakcijske korake (Ghisalba i sur., 2010).

Do razvoja biotransformacija kao znanstvene discipline došlo je zbog neizbježne potrebe suvremene industrije za razvojem inovativnih procesa i produkata, koji osim ekonomske računice zadovoljavaju i kriterije održivog razvoja. Održivi razvoj je razvoj koji zadovoljava potrebe sadašnjice, ne dovodeći u pitanje sposobnost budućih generacija da zadovolje vlastite potrebe, a kriteriji održivog razvoja su smanjenje utroška sirovina, smanjenje nastajanja otpada i onečišćenja okoliša, primjena procesa koji omogućavaju regeneraciju i/ili reciklaciju otpada te primjena obnovljivih izvora sirovina. Tako je u dvadesetom stoljeću došlo do značajnog razvoja biotransformacija kao nove discipline koja je zadovoljila visoke kriterije i načela zelene kemije.

Biotransformacijski postupci u početku su bili važan alat u proizvodnji spojeva poput šećera, aminokiselina i antibiotika u velikim količinama. Tek posljednjih dvadeset godina prepoznat je veliki potencijal biotransformacija u proizvodnji vrijednih produkata te brojne prednosti u odnosu na uobičajenu kemijsku sintezu. Tri glavne prednosti biokatalize nad kemijskom sintezom su: (i) visoka enantioselektivnost biokatalizatora, što je od izuzetnog značaja u sintezi enantiomerno čistih spojeva (od velike važnosti u farmaceutskoj industriji), (ii) ekološka prihvatljivost zbog blagih uvjeta reakcije te (iii) mogućnost modifikacije enzima za željenu primjenu metodama genetičkog, proteinskog inženjerstva i molekularne biologije (Grogan, 2009). Kod svakog biotransformacijskog procesa, ključno je odabrati prikladno otapalo i biokatalizator koji će omogućiti visoku produktivnost, ekonomsku isplativost i ekološku prihvatljivost postupka. Biokatalizator može biti čista kultura mikroorganizama, kulture biljnih i životinjskih stanica te izolirani i umjetni enzimi (abzimi) (Grogan, 2009).

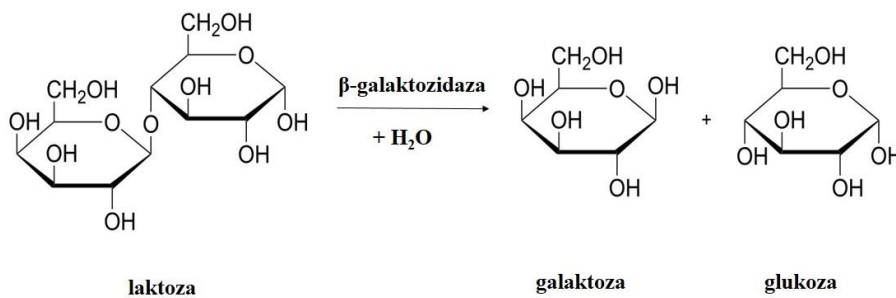
Biokatalizatori su manje štetni za okoliš u odnosu na kemijske katalizatore i njihova primjena je u skladu s načelima zelene kemije. Kao otapala u biotransformacijama tradicionalno se koriste puferi i organska otapala, ali zbog nepovoljnih utjecaja organskih otapala na okoliš, sve više se istražuje mogućnost njihove zamjene zelenim otapalima. U zelena se otapala ubrajaju superkritične tekućine, ionske kapljevine i eutektička otapala, ali osim toga postoje i reakcijski sustavi bez prisustva otapala. Zelena otapala su kvalitetna alternativa hlapljivim organskim otapalima zbog toga što se njihovom primjenom minimaliziraju štetni utjecaji na okoliš poput promjene klime na globalnoj razini, zagađenja zraka te narušavanja ozonskog omotača (Kerton i Marriott, 2013). Upravo zbog primjene biokatalizatora i zelenih otapala, biotransformacijski procesi omogućavaju proizvodnju organskih spojeva koja je značajno manje štetna za okoliš u odnosu na uobičajenu kemijsku sintezu, a istovremeno je jednako, a u nekim slučajevima i više ekonomski isplativa. Biotransformacijski procesi imaju najveću primjenu u farmaceutskoj industriji, a osobito zbog značajnog porasta prodaje enantiomerno čistih lijekova u zadnjih nekoliko godina.

Jedan od najznačajnijih biotransformacijskih postupaka u farmaceutskoj industriji je postupak dobivanja 6-aminopenicilanske kiseline iz prirodnog penicilina primjenom enzima penicilin-acilaze, a reakcija koja se odvija je enantioselektivna hidroliza te je prikazana na slici 1. Prednosti u odnosu na uobičajenu kemijsku sintezu su skraćivanje kemijski kataliziranog procesa sa tri stupnja na samo jedan, regiospecifičnost enzima, blagi reakcijski uvjeti, olakšana izolacija željenog produkta zbog toga što ne nastaju nusprodukti te samim time ekonomičnija proizvodnja (Lancaster, 2002).



Slika 1. Sinteza 6-aminopenicilanske kiseline iz penicilina V ili G, katalizirana enzimom penicilin-acilaza (Lancaster, 2002).

Osim u farmaceutskoj industriji, značajna je i primjena biotransformacija u prehrambenoj industriji. Obzirom da u suvremenom društvu dolazi do sve većeg broja ljudi koji pokazuju intoleranciju na laktozu, važan primjerbiokatalize u prehrambenoj industriji je proizvodnja mlijeka i mliječnih proizvoda koji nesadrže laktozu. Postupak podrazumijeva hidrolizu laktoze na sastavne monomere glukozu i galaktozu, a reakciju katalizira enzim  $\beta$ -galaktozidaza (slika 2) (Saqib i sur., 2017).



Slika 2. Hidroliza laktoze na sastavne monomere glukozu i galaktozu, katalizirana enzimom  $\beta$ -galaktozidaza (Bhattacharjee i Sarker, 2017).

Također, biokataliza se primjenjuje i u kozmetičkoj i tekstilnoj industriji, u proizvodnji polimera, agrokemikalija i stočne hrane te u obradi otpadnih voda. Produkti koji se sintetiziraju u velikom mjerilu su vitamini, aminokiseline, smole, farmaceutici, razni prehrambeni proizvodi i fine kemikalije (Bommarius i Riebel, 2004; Ghisalba i sur., 2010), a nekoliko primjera produkata dobivenih primjenom biotransformacija te enzima koji se pri tome koriste prikazano je u tablici 1 (Jegannathan i Nielsen, 2013).

Tablica 1. Primjeri primjene biotransformacijskih procesa u različitim industrijskim granama (Jegannathan i Nielsen, 2013).

<b>Industrija</b>	<b>Primjena biotransformacijskih procesa</b>	<b>Primjenjeni enzim</b>
<b>Farmaceutska</b>	proizvodnja L-3,4-dihidroksifenilalanina	Tirozin fenol-liaza
<b>Kemijska</b>	Proizvodnja finih kemikalija	Lipaza
<b>Kozmetička</b>	Proizvodnja oleokemikalija	Lipaza
<b>Prehrambena</b>	Proizvodnja voćnih sokova	Pektinaza
<b>Tekstilna</b>	Izbjeljivanje	Katalaza

### 2.1.1 Biokatalizatori u biotransformacijama

Primjena biokatalizatora ključna je zbog toga što osigurava odvijanje procesa koji bi se veoma teško odvijali bez njihovog prisustva, smanjuje broj reakcijskih stupnjeva te često osigurava nastajanje željenog produkta u samo jednom koraku. Također, osigurava povećanje prinosa proizvoda i vođenje procesa u blagim uvjetima čime se smanjuje utrošak energije, zamjenu toksičnih reagensa ekološki pogodnijima i smanjenje količine otpada. Iz svega navedenog može se zaključiti kako je biokataliza u skladu sa zahtjevima zelene kemije. Poželjne karakteristike biokatalizatora su visoka supstratna specifičnost (molekularna/kiralna), visoka aktivnost pri različitim uvjetima kao što su povišena ili snižena temperatura odnosno pH i visoka koncentracija supstrata i/ili produkta te skladišna i operativna stabilnost. Enzimi su su vrlo djelotvorni katalizatori, biorazgradivi su te djeluju u blagim reakcijskim uvjetima. Međutim, njihova primjena ima i neke nedostatke. Enzimi imaju najveću katalitičku aktivnost u vodi koja je najmanje pogodno otapalo za većinu organskih reakcija, broj komercijalno dostupnih enzima suviše je mali, stoga cijene enzima mogu biti visoke, podložni su inhibiciji supstratom ili produktom te im je potrebno prilagoditi procesne parametre poput temperature i pH-vrijednosti (Bommarius i Riebel, 2004).

### *2.1.1.1 Odabir biokatalizatora*

Enzimi se mogu koristiti kao izolati (sirovi ili pročišćeni) ili u svom prirodnom okruženju tj. stanici. U biotransformacijskim procesima je isplativije koristiti cijele stanice u odnosu na izolirane enzime zbog toga što je sam postupak ekstrakcije i pročišćavanja unutarstaničnih enzima skup te zato što su enzimi nestabilni izvan stanice koja je njihovo prirodno okruženje te im osigurava sve potrebno za njihovu aktivnost. Na primjer, enzimi često za svoju katalitičku aktivnost trebaju kofaktore koji su im u stanici prirodno dostupni. Prednosti primjene cijelih stanica kao biokatalizatora su visoka stereoselektivnost i regioselektivnost, regeneracija kofaktora i odvijanje višestupanjskih reakcija koje se odvijaju u uvjetima koji nisu štetni za ljude i okoliš. Međutim, upotreba biokatalizatora kao cijelih stanica ima i nedostatke kao što su difuzija supstrata i produkta kroz staničnu membranu, niža produktivnost zbog neotpornosti na veće koncentracije supstrata, teža kontrola procesa i odvijanje neželjenih sporednih reakcija zbog prisutnosti drugih enzima. Također, procesi s cijelim stanicama često su kompleksni zbog toga što uključuju dvije faze procesa, uzgoj biomase i konverzija produkta (Faber, 2011). Biokatalizatori u obliku cijelih stanica mogu biti mikrobnog, biljnog ili životinjskog podrijetla.

Mikrobni biokatalizatori su najviše primjenjivan oblik biokatalizatora kao cijelih stanica, a koriste se isključivo kao čiste kulture zbog toga što je na taj način omogućena kontrola reakcija koje se odvijaju. Također, smanjena je mogućnost odvijanja neželjenih reakcija i nepovoljnih učinaka jedne kulture na drugu, koja bi se mogla dogoditi u slučaju korištenja mješovitih kultura mikroorganizama (Bommarius i Riebel, 2004). Prednosti i nedostaci primjene cijelih stanica i izoliranih enzima kao biokatalizatora date su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Prednosti primjene cijelih stanica i izoliranih enzima kao biokatalizatora (Bommarius i Riebel, 2004).

<b>Cijele stanice kao biokatalizatori</b>	<b>Izolirani enzimi kao biokatalizatori</b>
Biomasa je jeftina (fermentacija nije skup proces)	Jednostavnija aparatura
Nije potreban dodatak koenzima (stanice regeneriraju koenzime vlastitim mehanizmima)	Jednostavnije izdvajanje produkta
Budući da se enzimi u stanici nalaze u prirodnom okruženju i zaštićeni su od vanjskog okruženja i općenito su dugoročno stabilniji od izoliranih enzima	Bolja produktivnost zbog otpornosti enzima na veće koncentracije supstrata (u odnosu na cijele stanice)

Tablica 3. Nedostaci primjene cijelih stanica i izoliranih enzima kao biokatalizatora (Bommarius i Riebel, 2004).

<b>Cijele stanice kao biokatalizatori</b>	<b>Izolirani enzimi kao biokatalizatori</b>
Kompleksniji postupci pročišćavanja produkta iz reakcijske smjese	Priravci enzima mogu biti vrlo skupi
Prisustvo nusprodukata vrlo je često (stanice posjeduju niz različitih enzima koji mogu transformirati supstrat)	Potreban dodatak koenzima (uvođenje još jedne reakcije u sustav)
Ako se enzim ne ispušta ekstracelularno potrebno je određenim metodama permeabilizirati staničnu stijenku ili provesti lizu stanica	Enzimi izvan svojega prirodnog okruženja su često manje stabilni

U biotransformacijskim postupcima mogu se koristiti mikrobnne kulture u fazi rasta, kulture u fazi mirovanja, kulture u obliku spora ili kao imobilizirane kulture, a u kojem će se obliku primjenjivati ovisi o vrsti mikroorganizma zato što nisu sve mogućnosti primjenjive za sve vrste mikroorganizama. Mikrobnne stanice su našle široku primjenu u proizvodnji velikog broja važnih produkata (tablica 4) te se češće koriste kao biokatalizator u odnosu na biljne i životinjske stanice (Carvalho, 2017). Prednosti primjene mikrobnnih stanica su to što se relativno brzo i jednostavno uzgajaju u laboratorijskim uvjetima, imaju brz stanični metabolizam čime je osigurana brza konverzija supstrata u produkt te metaboliziraju širi spektar supstrata.

Tablica 4. Primjeri produkata koji se proizvode primjenom mikrobnnih stanica kao biokatalizatora (Carvalho, 2017).

<b>Produkt</b>	<b>Mikroorganizam</b>	<b>Produktivnost (tona/godina)</b>
<b>L-lizin</b>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1,9 milijuna
<b>L-glutamat</b>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	2,9 milijuna
<b>Nikotinamid</b>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	6000
<b>Vitamin B12</b>	<i>Paracoccus denitrificans</i> <i>Propionibacterium shermanii</i>	35

Najvećim nedostatkom primjene biljnih stanica i tkiva u biotransformacijskim procesima smatra se spori rast. Međutim, biljne stanice i tkiva su našle primjenu u biokatalizi, zbog toga što imaju sposobnost proizvodnje sekundarnih metabolita kao što su alkaloidi, terpeni, steroidi, glikozidi i esencijalna ulja. Navedeni sekundarni metaboliti su od izuzetne važnosti u farmaceutskoj industriji.



Na temelju više eksperimenata pokazano je da se primjenom imobiliziranih biljnih stanica postiže veća produktivnost u odnosu na stanice u suspenziji pri istim uvjetima konverzije, a poznati primjer primjene biljnih stanica kao biokatalizatora je konverzija digitoksinogena u digitoksin koja se odvija u biljnoj vrsti *Digitalis lanata* (Dave i sur., 2014).

## **2.2 Zelena otapala**

Obzirom da je prilikom razvoja novih industrijskih procesa i postupaka, uz ekonomsku učinkovitost, nužno zadovoljiti kriterij ekološke prihvatljivosti te sigurnosti za ljude i okoliš, potrebno je koristiti otapala koja će biti u skladu s tim načelima. Naime, otapala imaju veliki utjecaj na okoliš i ljude zbog toga što se koriste u velikim količinama te izazivaju značajne promjene u okolišu.

Otapalo koje se koristi u biotransformacijskim procesima mora osigurati stabilnost samog procesa odnosno stabilnost te aktivnost enzima, visoku produktivnost, mogućnost reciklacije enzima, ali i zadovoljiti kriterije zelene kemije koja teži razvoju novih i sigurnijih procesa po ljude i okoliš. Tako je sve više istraživanja usmjereno na pronalazak novih rješenja usmjerenih na upotrebu alternativnih izvora energije i zamjenu hlapljivih organskih otapala zelenim otapalima. Zelena kemija ima sve veći značaj za održivi razvoj s ciljem smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanih tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje (Kudlak i sur., 2015).

Ekološki prihvatljivo otapalo je voda, a prednosti njene primjene kao otapala su to što je jeftina, nezapaljiva i netoksična te enzimi u njoj imaju najveću katalitičku aktivnost, ali je uklanjanje vode nakon reakcije složeno skupo zbog visoke točke vrelišta. Također, većina organskih spojeva je slabo topljiva u vodi. Nedostatak su i sporedne reakcije koje se odvijaju u vodi, a samim time i nastanak neželjenih produkata, što je nepovoljno za izolaciju i pročišćavanje željenog produkta (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). S druge strane, upotreba organskih otapala umjesto vode ima nekoliko prednosti kao što su bolja topljivost nepolarnih organskih spojeva te olakšano pročišćavanje produkta iz organskih otapala zato što imaju niže vrelište i lakše se uklanjaju u odnosu na vodu (Ghanem, 2007). Međutim, nedostaci uporabe organskih otapala su njihov citotoksičan i inhibicijski učinak na biokatalizator, hlapljivosti, zapaljivosti, eksplozivnosti te razni štetni učinci na zrak i okoliš. Obzirom na navedene nedostatke upotrebe vode i organskih otapala u biotransformacijskim procesima, nužno je bilo pronaći nove vrste otapala koja će nadići njihove negativne učinke, biti u skladu sa zahtjevima zelene kemije te osigurati sigurnost radnika, procesa, okoliša te osigurati održivost procesa.

Kako bi se osiguralo da otapalo ne bude opasno i štetno po zdravlje ljudi, ono treba biti nekancerogeno, netoksično i nemutageno. Također, ne smije biti zapaljivo ni eksplozivno kako bi se potencijalni rizike kontaminacije zraka i okoliša sveo na minimum. Kao što je prethodno navedeno, poželjne karakteristike otapala su kemijska i fizička stabilnost, nehlapljivost, jednostavnost primjene i mogućnost reciklacije. Ovi zahtjevi doveli su do razvoja ionskih kapljevina, superkritičnog CO<sub>2</sub> i eutektičkih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Prvo je došlo do razvoja ionskih kapljevina i superkritičnog CO<sub>2</sub>, a prednosti njihove primjene kao otapala u biotransformacijskim procesima prikazane su u tablici 5 (Olivier-Bourbigou i Magna, 2002; Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

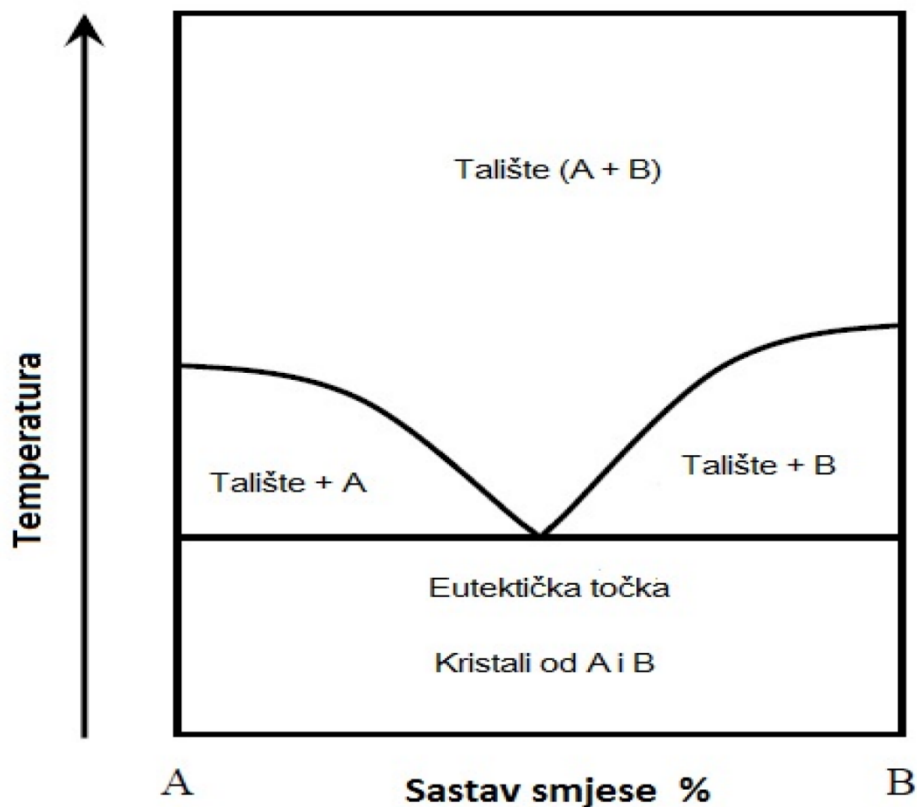
Tablica 5. Prednosti primjene ionskih kapljevina i superkritičnog CO<sub>2</sub> u biotransformacijama (Olivier-Bourbigou i Magna, 2002; Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

<b>Ionske kapljevine</b>	<b>Superkritični CO<sub>2</sub></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Toplinska stabilnost</li> <li>✓ Kemijska stabilnost</li> <li>✓ Elektrokemijska stabilnost</li> <li>✓ Nezapaljivost</li> <li>✓ Nizak tlak para</li> <li>✓ Osigurava enantioselektivnost reakcije i stabilnost enzima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Niska cijena</li> <li>✓ Lako dostupan</li> <li>✓ Nije toksičan</li> <li>✓ Mala viskoznost</li> <li>✓ Primjenjiv za sve skupine enzima</li> </ul>

Nedostaci primjene ionskih kapljevina su visoka cijena, upotreba organskih otapala prilikom pripreme zbog čega mogu biti toksične, visoka viskoznost te promjena pH-vrijednosti i inhibicija enzima zbog prisutnih nečistoća u otapalu. Primjena superkritičnog CO<sub>2</sub> također ima neke nedostatke kao što su upotreba skupe procesne opreme zbog visokih tlakova i visoki energetske troškovi zbog komprimiranja plina. Osim toga, nepogodno je otapalo za polarne spojeve i prilikom upotrebe dolazi do stvaranja ugljične kiseline, a to za posljedicu ima promjenu pH vrijednosti koja može uzrokovati denaturaciju enzima. Zbog navedenih nedostataka ionskih kapljevina i superkritičnog CO<sub>2</sub>, došlo je do razvoja još jedne vrste zelenih otapala, a to su eutektička otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

### 2.2.1 Eutektička otapala

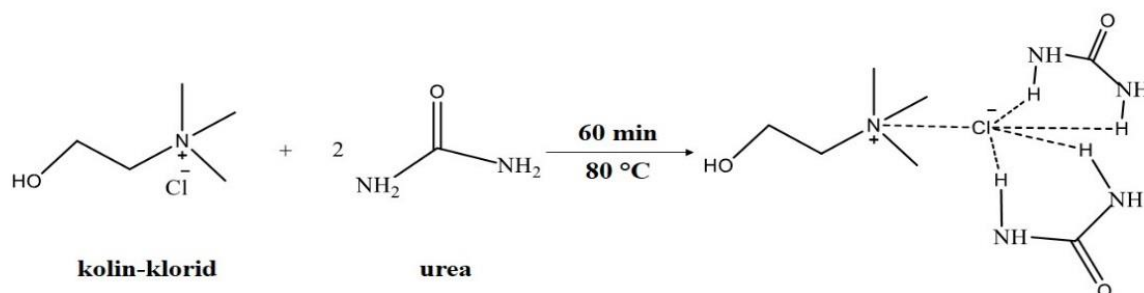
Eutektička otapala (engl. Deep Eutectic Solvents, DES) definiraju se kao smjese akceptora i donora vodikove veze koje imaju temperaturu tališta mnogo nižu od temperature tališta individualnih komponenata smjese (slika 3) (Zhang i sur., 2012).



Slika 3. Fazni dijagram binarne smjese (Zhang i sur., 2012).

Priprava eutektičkih otapala je jednostavna i 100 % učinkovita na razini atoma (engl. Atom efficiency), a sirovine koje se koriste za njihovu pripravu su lako dostupne, jeftine, sigurne i biorazgradive. Postupak priprave eutektičkih otapala podrazumijeva zagrijavanje određene mase komponenata, bez ili s dodatkom manje količine vode, pri temperaturi do 100 °C tijekom 30 do 90 minuta do nastanka bistre tekućine, a komponente su donori i akceptori vodikovih veza. Kao donori vodikovih veza koriste se karboksilne kiseline, amidi, alkoholi i ugljikohidrati, dok se kao akceptori najčešće upotrebljavaju amonijeve ili fosfatne soli. Primjer eutektičkog otapala je smjesa dvije krutine, uree čija je temperatura vrelišta 133 °C i kolin klorida čija je temperatura vrelišta 302 °C u molarnom omjeru 2:1, a temperatura vrelišta njihove smjese iznosi 15 °C (slika 4) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Kolin-klorid je kvarterni amonijeva sol koja nije opasna, jeftina je i netoksična te eutektička otapala na bazi

kolin klorida imaju dobra fizikalna i kemijska svojstva slična onima ionskih kapljevina, ali su manje toksične.



Slika 4. Sinteza eutektičkog otapala kolin-klorid:urea (Shekaari i sur., 2017).

Zbog sličnih fizikalno-kemijskih karakteristika eutektička otapala se često nazivaju ionskim kapljevina četvrte generacije, ali eutektička otapala imaju neke značajne prednosti u odnosu na ionske kapljevine koje su prikazane u tablici 6, stoga su predmet brojnih istraživanja u kojima se proučava njihova mogućnost primjene u različitim biotransformacijskim procesima.

Tablica 6. Prednosti primjene eutektičkih otapala u odnosu na ionske kapljevine.

Ionske kapljevine	Eutektička otapala
<ul style="list-style-type: none"> <li>• visoka cijena</li> <li>• priprava upotrebom organskih otapala, zbog čega nastaju ionske kapljevine koje mogu biti jednako ili više toksične</li> <li>• relativno niska biorazgradivost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Biorazgradiva</li> <li>✓ stabilna,</li> <li>✓ nisu hlapljiva</li> <li>✓ manje su toksična prema okolišu i ljudima</li> <li>✓ njihova direktna upotreba u proizvodnji moguća bez dodatnog pročišćavanja</li> <li>✓ jeftinija i lakše se sintetiziraju</li> </ul>

Značajna prednost eutektičkih otapala u odnosu na ostala otapala je i to što se zbog velikog broja različitih kemijskih struktura, koje proizlaze iz različitih mogućih kombinacija donora i akceptora vodika od kojih sastoji neko eutektičko otapalo, može dizajnirati otapalo točno određenih fizikalno-kemijskih karakteristika i biološke aktivnosti za željenu primjenu, stoga se još nazivaju i dizajnirana otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

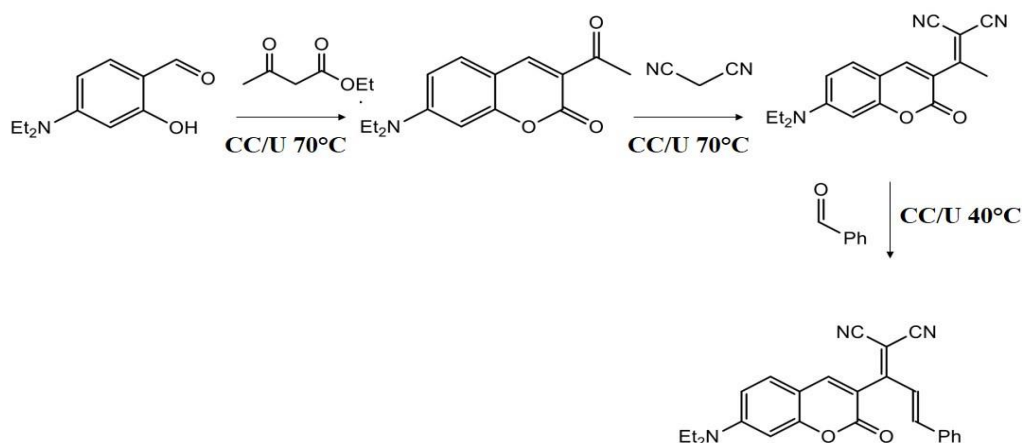
S obzirom da značajno raste ekološka svijest u svim područjima industrije, jedna od najpoželjnijih karakteristika otapala je netoksičnost. Eutektička otapala zbog svoje netoksičnosti imaju veliki potencijal da riješe problem ekološke neprihvatljivost ostalih otapala koja se koriste u industrijskim procesima (Molnar i sur., 2017). Međutim, kako bi mogla pronaći široku primjenu u raznim granama industrije, potrebno je provesti još istraživanja o njihovoj mogućoj toksičnosti. Naime, iako se eutektička otapala pripremaju od početnih sastojaka koji nisu toksični ni štetni, potrebno je uzeti u obzir sinergijski učinak do kojeg može doći tijekom miješanja sastojaka. To može dramatično promijeniti biološka svojstva otapala, zbog čega ono u konačnici može biti toksično, a to je dokazano u nekoliko istraživanja. Takav primjer naveden je u istraživanju koje su proveli Paiva i sur. (2014) kako bi ispitali toksičnost različitih prirodnih eutektičkih otapala, a na temelju dobivenih rezultata zaključili su da prisutnost vinske kiseline ima nepovoljan utjecaj na vijabilnost stanica sličnih fibroblastu. U istraživanju kojeg su proveli Hayyan i sur. (2013a, 2013b) pokazano je da eutektička otapala koja sadrže fosfonijev anion imaju slabu antibakterijsku aktivnost, a do koje je moglo doći zbog oštećenja stanične stijenke bakterija u prisustvu delokaliziranih naboja.

#### *2.2.1.1 Primjena eutektičkih otapala*

Obzirom na sve ranije navedene pozitivne karakteristike, a osobito zbog mogućnosti dizajniranja otapala za određenu svrhu, eutektička otapala našla su široku primjenu u različitim industrijskim procesima. Zbog sposobnosti otapanja različitih metalnih oksida, koriste se u elektrokemijskim procesima obnove metala i završne obrade metala koja uključuje elektropoliranje i elektronanošenje (Fischer, 2015).

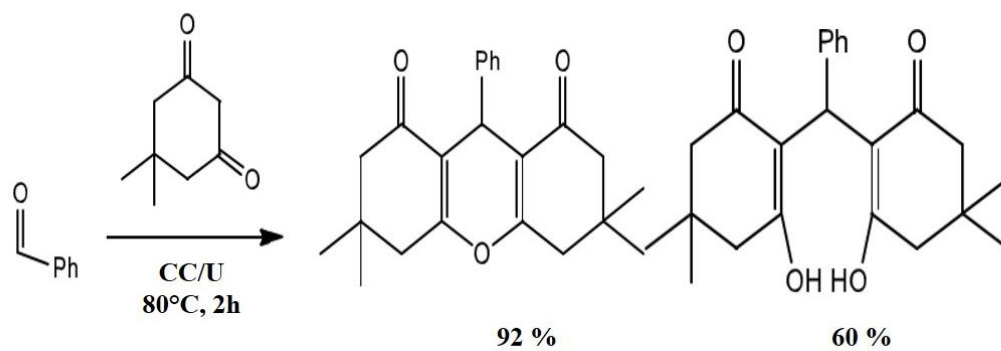
Pokazala su se i kao pogodno otapalo za širok raspon supstrata kao što su soli, proteini, lijekovi, aminokiseline, ugljikohidrati, zbog toga što imaju sposobnost doniranja ili primanja elektrona ili protona. Osim toga, koriste se u procesima pročišćavanja, katalizi i kemijskoj fiksaciji CO<sub>2</sub> te prilikom ekstrakcije glicerola iz biodizela (Durand i sur., 2013). Također, zbog jakih i stabilnih vodikovih veza između fenolnih spojeva i molekula eutektičkog otapala, koriste se pri ekstrakciji fenolnih spojeva.

Nadalje, zbog svoje netoksičnosti i ekološke prihvatljivosti, eutektička otapala su zamijenila uobičajena organska otapala u različitim reakcijama organskih sinteza kao što su elektrofilna supstitucija, kopolimerizacija, dehidracija ugljikohidrata, katalitičko stvaranju C-C veza te reakcijameredukcije (Zhang i sur., 2012; Molnar i sur., 2017). Primjer primjene eutektičkog otapala na bazi kolin-klorida i uree, za reakcije kondenzacije, prilikom sinteze boja na bazi kumarina prikazan je u radu Shankarling-a i suradnika (2013). Sinteza uključuje tri reakcije kondenzacije, aldolnu kondenzaciju i dvije Knoevenagelove kondenzacije, a primjenom eutektičkog otapala postignuto je zadovoljavajuće iskorištenje i skraćeno vrijeme sinteze u blagim reakcijskim uvjetima (slika 5).



Slika 5. Sinteza boja na bazi kumarina, koja uključuje 3 reakcije kondenzacije, u eutektičkom otapalu kolin-klorid:urea (Singh i sur., 2011).

Osim prethodno navedenih primjena, eutektička otapala se koriste pri izvođenju višesupstratnih reakcija (engl. *Multicomponent Coupling Reaction*), koje su posebno zanimljive zato što omogućuju dobivanje velikog broja novih spojeva uz minimalan broj reakcijskih koraka i upotrebom lako dostupnih reaktanata, a primjer takve reakcije je reakcija kondenzacije aldehida s dimedonom ili cikloheksan-1,3-dionom. Primjer multikomponentne reakcije prikazan je na slici 6 (Azizi i sur., 2013).



Slika 6. Primjer multikomponentne reakcije dobivanja tetraketona u eutektičkom otapalu kolina-klorid:urea (Azizi i sur., 2013).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1 Biljni materijal

Narančina kora, naranče kupljene na lokalnoj tržnici.

##### 3.1.2 Enzimski preparat

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

##### 3.1.3 Kemikalije

- Destilirana voda
- Etilen-glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Otapala *n*-heptan
- (*R,S*)-1-feniletil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

##### 3.1.4 Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator s regulacijom temperature, EppendorfThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure)
- Magnetska mješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikropipete (100  $\mu$ L, 1 mL, 5 mL )
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Sjeckalica, Moulinex, Francuska
- UV – Vis spektrofotometar, GENESYSTEM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD



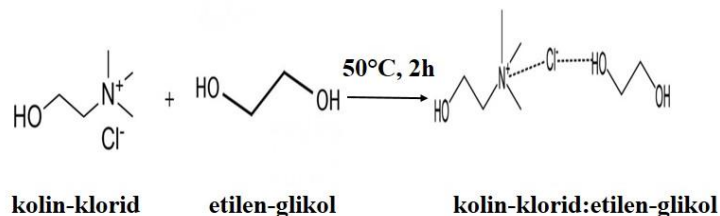
## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprava eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol

U tikvicama s okruglim dnom pomiješaju se prethodno izračunate mase kolin-klorida i etilen-glikola kao donora vodikove veze, prema zadanom molarnom omjeru 1:2 (tablica 7). Zatim se u svaku smjesu dodaje određena količina vode, kako bi se u konačnici dobila eutektička otapala sa 30 %, 50 % i 80 % udjela vode (w/w) (slika7). Nakon toga se reakcijska smjesa zagrijava na magnetskoj mješalici pri temperaturi od 50 °C tijekom 2 sata, sve dok ne nastane homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Dobivena eutektička otapala zatvore se parafilmom i skladište na tamnom mjestu prije daljnje primjene kao otapala za biokatalizu.

Tablica 7. Molarni omjeri i udjeli vode prirodnog eutektičkog otapala korištenog u ovom radu.

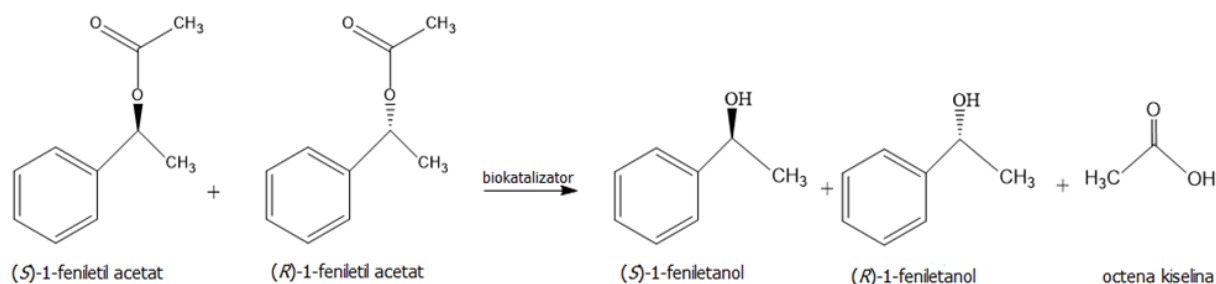
Eutektičko otapalo	Kratice eutektičkog otapala	Udio vode [%, w/w]	m (kolin-klorid) [g]	m (etilen-glikol) [g]	m (voda) [g]
Kolin-klorid:etilen-glikol sa 30 % vode	ChCIEG30%	30	7	6,22	5,67
Kolin-klorid:etilen-glikol sa 50 % vode	ChCIEG50%	50	7	6,22	13,22
Kolin-klorid:etilen-glikol sa 80 % vode	ChCIEG80%	80	7	6,22	52,90



Slika 7. Priprava prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol= 1:2 (n) (ChCIEG).

### 3.2.2 Enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol

Enantioselektivna hidroliza provedena je primjenom hidrolitičkih enzima narančine kore odnosno primjenom lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antarctica* (slika 8).



Slika 8. Enzimski katalizirana hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata

#### **Određivanje koncentracije produkta (*R,S*)-1-feniletanola**

Koncentracija dobivenog produkta (*R,S*)-1-feniletanola  $c_p$  (mol L<sup>-1</sup>) računa se prema jednadžbi 1:

$$c_p = c_{s1} - c_{s2} \quad [1]$$

gdje  $c_{s1}$  predstavlja početnu koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil acetata (mol L<sup>-1</sup>), a  $c_{s2}$  koncentraciju (*R,S*)-1-feniletil acetata izmjerenu na kraju reakcije (mol L<sup>-1</sup>).

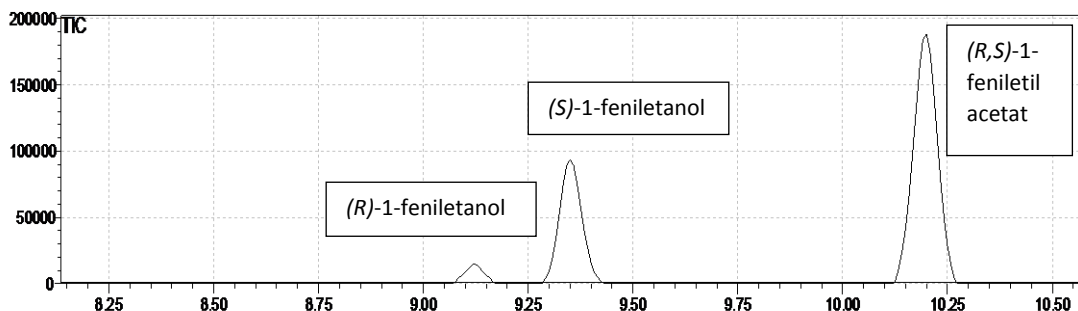
Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletil acetata odnosno (*R,S*)-1-feniletanola provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom. Koncentracija (*R,S*)-feniletil acetata  $c_{s2}$  izračuna se iz baždarnog pravca ovisnosti koncentracije istog o površini ispod kromatografskog pika analizom reakcijske smjese plinskom kromatografijom.

#### **Kromatografski uvjeti:**

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25μm)
- Pokretna faza: Helij
- Protok: 36,5 mL min<sup>-1</sup>
- Detektor: spektrometar masa
- Temperatura - kolona: gradijentno (T1=80 °C, T2=120 °C (Δt=15 °Cmin<sup>-1</sup>), T3=125 °C (Δt=2 °Cmin<sup>-1</sup>), T4=140 °C (Δt=1 °Cmin<sup>-1</sup>))
- Temperatura injektora 200 °C

- Detektor: temperatura ionskog izvora 200 °C, temperatura sučelja 200 °C
- Vrijeme trajanja analize: 26,37 min

Na slici 9 prikazan je tipičan plinski kromatogram enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletilacetata katalizirane lipazom B. Retencijsko vrijeme (*R<sub>t</sub>*) za (*R,S*)-1-feniletil acetat iznosi 10,178 min, za (*R*)-1-feniletanol iznosi 9,095 min, a za (*S*)-1-feniletanol iznosi 9,334 min.



Slika 9. Prikaz tipičnog plinskog kromatograma enzimski katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u puferu i u eutektičkim otapalima s različitim volumnim udjelima vode te pratila stabilnost izoliranog enzima i enzima u ekstraktima naranče, računa se iskorištenje procesa i enantiomerni višak prema jednadžbama 2 i 3.

**Iskorištenje procesa hidrolize  $\eta$  (%)** izračuna se prema jednadžbi 2:

$$\eta_{hidroliza} = \frac{c_P}{c_T} \cdot 100 \quad [2]$$

gdje  $c_P$  predstavlja izmjerenu koncentraciju (*R,S*)-1-feniletanola ( $\text{mol L}^{-1}$ ), a  $c_T$  teoretski moguću koncentraciju (*R,S*)-1-feniletanola ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

**Enantiomerni višak  $ee$  (%)** izračuna se prema jednadžbi 3:

$$\% ee = \frac{R_{1-feniletanol} - S_{1-feniletanol}}{R_{1-feniletanol} + S_{1-feniletanol}} \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je  $R_{1-feniletanol}$  površina ispod pika (*R*)-1-feniletanola, a  $S_{1-feniletanol}$  površina ispod pika (*S*)-1-feniletanola.

### ***Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije (R,S)-1-feniletil acetata***

Za izradu baždarnog dijagrama pripreme se otopine (R,S)-1-feniletil acetata u *n*-heptanu, tako da koncentracije redom iznose 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 i 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Zatim se 100 μL pripremljenih otopina analizira plinskom kromatografijom. Baždarni dijagram konstruira se pomoću računala, tako što se na ordinatu nanese izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija otopina. Konstruirani baždarni dijagram je dakle dijagram ovisnosti množinske koncentracije (R,S)-1-feniletil acetata o površini ispod pika, a prema dobivenoj jednadžbi pravca računaju se nepoznate koncentracije (R,S)-1-feniletil acetata u uzorcima.

#### ***3.2.2.1 Enantioselektivna hidroliza (R,S)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima narančine kore kao biokatalizatora***

Hidrolitički enzimi kore naranče primijenjeni su na dva načina: izravno u sklopu kore naranče narezane na sitne kockice te kao ekstrakti narančine kore pripremljeni pomoću ChCIEG (tj. pufera kao referentnog otapala). Za potrebe oba eksperimenta kora naranče je pripremljena na sljedeći način. Da bi se uklonile površinske nečistoće sa kore, naranča se opere pomoću detergenta, površinski se sterilizira etanolom i potom ispere demineraliziranom vodom. Zatim se naranče pažljivo oguli nožićem te se kora nareže na komadiće približne veličine 5 mm x 5 mm x 2mm.

##### ***a) Priprema ekstrakta hidrolitičkih enzima narančine kore te provođenje hidrolize (R,S)-1-feniletil-acetata***

Ekstrakti se pripremaju sljedećom metodom: izvaži se 5 g isjeckane kore naranče koja se prenese u sjeckalicu, gdje se zajedno sa 20 mL pripremljenih eutektičkih otapala odnosno kalij-fosfatnog pufera (pH=7) mehanički homogenizira. Homogenizat naranče profiltrira se vakuum filtracijom, a filtrat se centrifugira pri 3000 rpm tijekom 20 min. Hidroliza (R,S)-1-feniletil-acetata provodi se tako da se 1 mL doda 15 μL supstrata (R,S)-1-feniletil acetata te se reakcija provodi na tresilici pri sobnoj temperaturi. Uzorkovanje se vrši nakon 48, 96 i 168 sati. Uzorak za analizu se pripremi tako da se reakcijskoj smjesi doda 1 mL demineralizirane vode te se nakon vorteksiranja doda 8 mL heptana.

Zatim se provodi ekstrakcija preostalog supstrata te nastalih produkata snažnim miješanjem tijekom 3 minute. Pomoću plinske kromatografije se analizira ekstrakt (100  $\mu\text{L}$ ) iz heptanskog dijela.

*b) Hidroliza (R,S)-1-feniletil-acetata pomoću usitnjene kore naranče kao izvora hidrolitičkih enzima*

Pomoću hidrolitičkih enzima iz otpadne kore naranče u eutektskom otapalu ChCIEG s 30 %, 50 % i 80 % vode provedena je hidroliza (R,S)-1-feniletil acetata. Kao referentno otapalo koristi se kalij-fosfatni pufer. Na analitičkoj vagi se odvažuje 0,2 g isjeckane kore naranče. U Falcon epruvete se stavi po 1 mL otapala i 0,2 g isjeckane kore naranče te se reakcija započinje dodavanjem 15  $\mu\text{L}$  supstrata (R,S)-1-feniletil-acetata.

Reakcija se provodi na tresilici pri sobnoj temperaturi, a uzorkovanje se vrši nakon 48, 96 i 168 sati. Uzorak za analizu se pripremi tako da se reakcijskoj smjesi doda 1 mL demineralizirane vode te se nakon vorteksiranja doda 8 mL heptana. Zatim se provodi ekstrakcija preostalog supstrata te nastalih produkata snažnim miješanjem tijekom 3 minute. Pomoću plinske kromatografije se analizira ekstrakt (100  $\mu\text{L}$ ) iz heptanskog dijela.

*3.2.2.2 Lipazom katalizirana enantioselektivna hidroliza (R,S)-1-feniletil-acetata*

U epruvetu se doda 1 mL otapala (kalij-fosfatni pufer ili prirodno eutektsko otapalo ChEG50) i 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  (R,S)-1-feniletil acetata. Reakcija započinje dodavanjem 5 mg pripravka Novozym 435. U odabranim vremenskim intervalima izuzima se uzorak za analizu koji se pripremi tako da se reakcijskoj smjesi doda 1 mL demineralizirane vode te se nakon vorteksiranja doda 8 mL heptana. Zatim se provodi ekstrakcija preostalog supstrata te nastalih produkata snažnim miješanjem tijekom 3 minute. Pomoću plinske kromatografije se analizira ekstrakt (100  $\mu\text{L}$ ) iz heptanskog dijela.

### **3.3 Određivanje stabilnosti hidrolitičkih enzima u eutektskom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol**

Utjecaj inkubacije enzima u ekstraktima narančine kore i izolirane lipaze B u eutektskom otapalu (tzv. skladišna termička stabilnost) na aktivnost iste, praćena je u eutektskom otapalu ChCIEG.

### 3.3.1. Određivanje stabilnosti enzima u ekstraktu kore naranče pripremljenog pomoću eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol

Filtriran ekstrakt naranče, u kojem se nalaze hidrolitički enzimi iz narančine kore, inkubiran je pri +4 °C u ChCIEG i puferu. U različitim vremenskim intervalima kroz 21 dan u ekstraktima naranče provedena je reakcija enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata dodatkom 15 µL supstrata u reakcijsku smjesu prema protokolu opisanom u podpoglavlju 3.2.2.1.

### 3.3.2. Određivanje stabilnosti imobilizirane lipaze Novozym 435 u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol

Novozym 435 (5 mg) inkubiran je u 2,4 mL eutektičkog otapala ChCIEG s 50 % udjela vode, odnosno u istom volumenu pufera na sobnoj temperaturi.

U različitim vremenskim intervalima kroz 90 dana provedena je reakcija hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u *p*-nitrofeniletanol prema Čanak i sur. (2016). Ukratko, otopina supstrata pripremljena je miješanjem fosfatnog pufera, koji sadrži 1,1 mg mL<sup>-1</sup> arapske gume i 4,4 mg/mL Triton X-100, i *p*-nitrofenilpalmitata otopljenog u izopropanolu, u omjeru 9:1. Otapalo volumena 2,4 mL s dodanim enzimom inkubirano je na temperaturi 37 °C tijekom 10 minuta, a reakcija je započeta dodatkom 0,6 mL prethodno pripremljene otopine supstrata. Apsorbancija reakcijske smjese izmjerena je pri valnoj duljini od 405 nm, a mjerenje je provedeno odmah po dodatku otopine supstrata (*t*<sub>0</sub>) te nakon 2 sata homogenizacije pri temperaturi od 37 °C. Razlika između apsorbancije izmjerene nakon 2 sata provedene reakcije i apsorbancije izmjerene u *t*<sub>0</sub> korištena je za određivanje enzimske aktivnosti. Jedna jedinica aktivnosti lipaze definira se količinom enzima potrebnom za nastanak 1 µmol *p*-nitrofenola u 1 minuti.

Stabilnost enzimskog pripravka (ekstrakata kore naranče odnosno imobilizirane lipaze Novozym 435 u određenom otapalu izražena je kao rezidualna aktivnost enzimskog pripravka nakon inkubacije u određenom vremenskom intervalu prema jednadžbi 4.

$$\text{rezidualna aktivnost enzima} = \frac{\text{aktivnost enzima nakon inkubacije}}{\text{aktivnost enzima prije inkubacije}} (\%) \quad [4]$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U posljednjih nekoliko desetljeća došlo je do značajnog porasta u proizvodnji enantiomerno čistih spojeva na području kemijske, farmaceutske i agrokemijske industrije. Primjer takvog spoja je (*R*)-1-feniletanol, koji predstavlja kiralni građevni blok u sintezi lijekova i finih kemikalija (Suan i Sarmidi, 2004). Osim toga koristi se u medicini i kozmetičkoj industriji, dok se oba enantiomerna oblika koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerne čistoće i asimetrično otvaranje cikličnih anhidrida i epoksida (Frings i sur., 1999). Kako bi proizvodnja optički čistih spojeva bila ekološki prihvatljiva i u skladu s zahtjevima i principima zelene kemije, raste broj istraživanja koja ispituju učinkovitost primjene zelenih otapala i biokatalizatora kao alternativu štetnim organskim otapalima i reagensima. Od zelenih otapala istaknula su se eutektička otapala koja udovoljavaju kriterijima idealnog otapala u zelenim disciplinama i imaju raznoliku primjenu zbog mogućnosti dizajniranja fizikalno-kemijskih svojstava. Također, primjena biokatalizatora, izoliranih enzima ili cijelih stanica, ima prednost pred klasičnim reakcijama kemijske sinteze zbog blagih reakcijskih uvjeta i visoke enantio- i regioselektivnosti, a ima i manje štetan utjecaj na okoliš u odnosu na organometalne katalizatore, naročito ako se reakcije provode u zelenim otapalima.

U cilju pronalaska ekološki prihvatljivog postupka dobivanja enantiomerno čistog (*R*)-1-feniletanola, u ovom radu je ispitana mogućnost provođenja hidrolize (*R, S*)-1-feniletil acetata primjenom lipaze te narančine kore kao biokatalizatora, a kao otapalo korišteno je prirodno eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen glikol s 30, 50 i 80% udjela vode te pufer kao referentno otapalo. Budući da je stabilnost enzima u određenom otapalu vrlo važan parametar u utvrđivanju prihvatljivosti određenog otapala za primjenu u velikom mjerilu, u radu je također određena stabilnost biokatalizatora u prethodno navedenim otapalima.

### 4.1 Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

Priprema prirodnih eutektičkih otapala provodila se je jednostavnim postupkom u kojem se polazne komponente kolin-klorid i etilen-glikol pomiješaju u molarnom omjeru 1:2. Zatim se lagano zagrijavaju uz miješanje dok se ne dobije homogena viskozna kapljevina. Iskorištenje reakcije je 100 %, što je značajna prednost kod sinteze prirodnih eutektičkih otapala.

## 4.2 Enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol

4.2.1 Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata primjenom hidrolitičkih enzima narančine kore  
Uzgoj naranči predstavlja važnu ekonomsku stavku u SAD-u, Brazilu, Kini, Indiji, Pakistanu te većini mediteranskih država. Obzirom da u suvremenom društvu raste svijest o važnosti primjene proizvoda na bazi prirodnih sastojaka, dolazi do sve veće potražnje i potrebe za proizvodnjom prirodnih sokova i drugih proizvoda na bazi naranče kao što su slatka ulja, med i marmelade. Međutim, sa porastom uzgoja naranči i njihove primjene u industrijske svrhe, dolazi i do značajnog povećanja količine otpadne narančine kore (Wilkins i sur., 2007). Većina nastale narančine kore završi na odlagalištu otpada što predstavlja veliki problem, zbog toga što se njenom razgradnjom stvaraju velike količine metana i dolazi do onečišćenja okolnih voda, te je potrebno pronaći odgovorniji način postupanja s takvim otpadom (Lopez i sur., 2010).

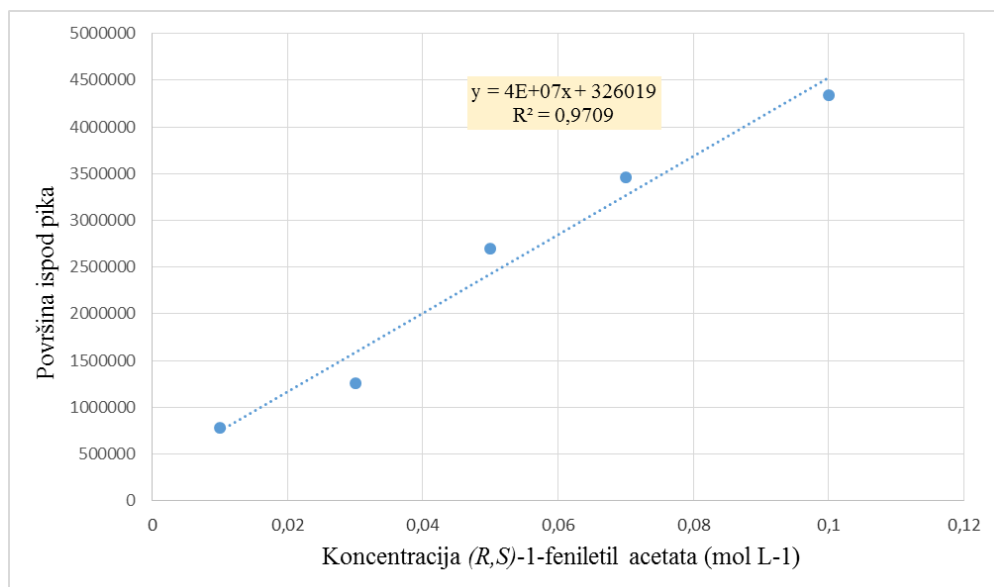
Narančina kora predstavlja izvor mnogih važnih kemijskih komponenata zato što je bogata bogata polimerima (celuloza, hemiceluloza i pektin), enzimima (npr. pektin-esteraza), flavanoidima, eteričnim uljima (većinom limonen) te pigmentima., a osim toga je jeftina, lako dostupna i biorazgradiva, stoga je nužno istražiti njene potencijalne primjene (Satari i Karimi, 2017). Za sada se koristi kao dodatak krmivima te kao organsko gnojivo, ali i u biorafinerijama koje koriste biomasu kao sirovinu za proizvodnju goriva, topline, energije i različitih kemikalija (Demirbas, 2010). Posljednjih godina raste broj znanstvenih radova koji se bave istraživanjem mogućnosti primjene prehrambenog otpada kao sirovine u biorafinerijama, u kombinaciji sa primjenom eutektičkih otapala, zbog niske cijene i jednostavnosti pripreme, biorazgradivosti te niske toksičnosti. Od prethodno navedenih kemijskih komponenata narančine kore, veliku važnost imaju hidrolitički enzimi (npr. esteraze) zbog sposobnosti stereoselektivne i enantioselektivne hidrolize, koja je ključna u sintezi enantiomerno čistih spojeva. Na industrijskoj razini počinje se razmatrati primjena voća i povrća ili dijelova voća i povrća kao katalizatora reakcija sinteze enantiomerno čistih spojeva, zbog toga što su netoksični, biorazgradivi i djeluju u blagim reakcijskim uvjetima.

U ovom radu kora naranče korištena je kao izvor hidrolitičkih enzima u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata u ekološki prihvatljivom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol (ChCIEG) i to na dva načina: izravno u sklopu kore naranče narezane na sitne kockice te kao ekstrakti narančine kore pripremljeni pomoću ChCIEG (tj. pufera kao referentnog otapala).



Ova reakcija važna je zbog dobivanja enantiomerno čistog alkohola (*R*) odnosno (*S*)-1-feniletanola, ali i kao modelna reakcija za istraživanje kinetičke rezolucije estera u eutektičkim otapalima. Naime, u enzimski kataliziranoj kinetičkoj rezoluciji racemičnog supstrata jedan enantiomer brže stupa u reakciju. Kada je katalizator potpuno stereoselektivan, 50 % enantiomerno čistog supstrata će ostati neizreagirano na kraju reakcije. Niža enantioselektivnost biokatalizatora će se odraziti na iskorištenju reakcije koje tada iznosi više od 50 % (Vandenberghes i sur., 2013).

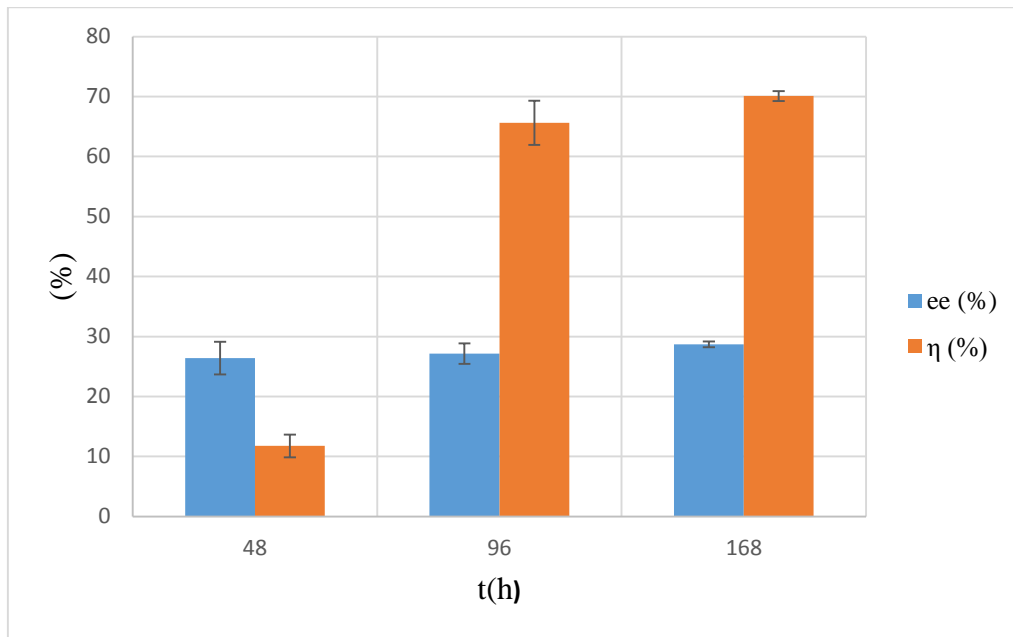
Reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata pomoću usitnjene kore naranče kao izvora hidrolitičkih enzima provedena je u eutektičkom otapalu ChCIEG sa 30 %, 50 % i 80 % vode i u puferu kao referentnom otapalu, prema prethodno navedenoj proceduri u podpoglavlju 3.2.2.1. Uzorkovanje je provedeno nakon 48, 96 i 168 sati reakcije, a uzorci su analizirani pomoću plinske kromatografije. Prvo je konstruiran baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata, koji je prikazan na slici 10.



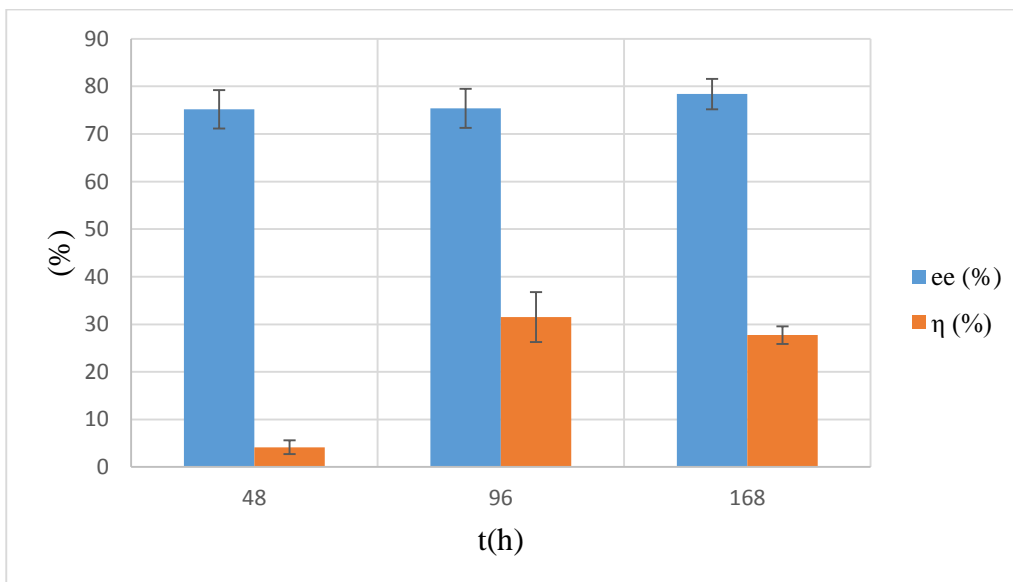
Slika 10. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R,S*)-1-feniletil acetata.

Nakon provedene analize pomoću plinske kromatografije, iz dobivenih rezultata izračunati su iskorištenje procesa hidrolize ( $\eta$ ) te enantiomerni višak ( $ee$ ), zbog usporedbe uspješnosti hidrolize u puferu te u eutektičkom otapalu s 30 %, 50 % i 80 % vode. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 11 a-d, a zbirna tablica prikazana je na slici 12.

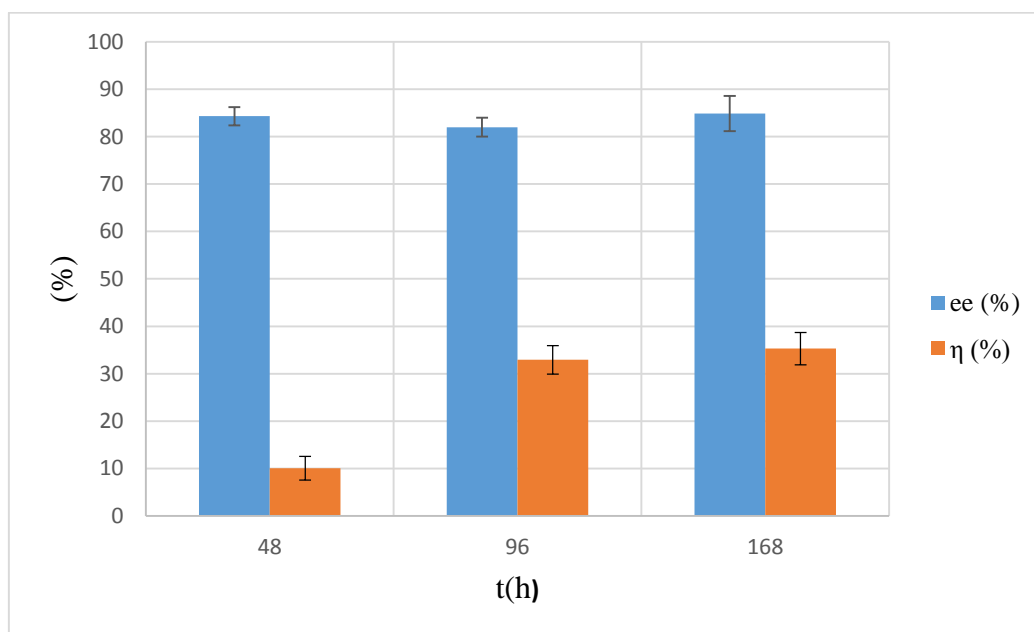
a)



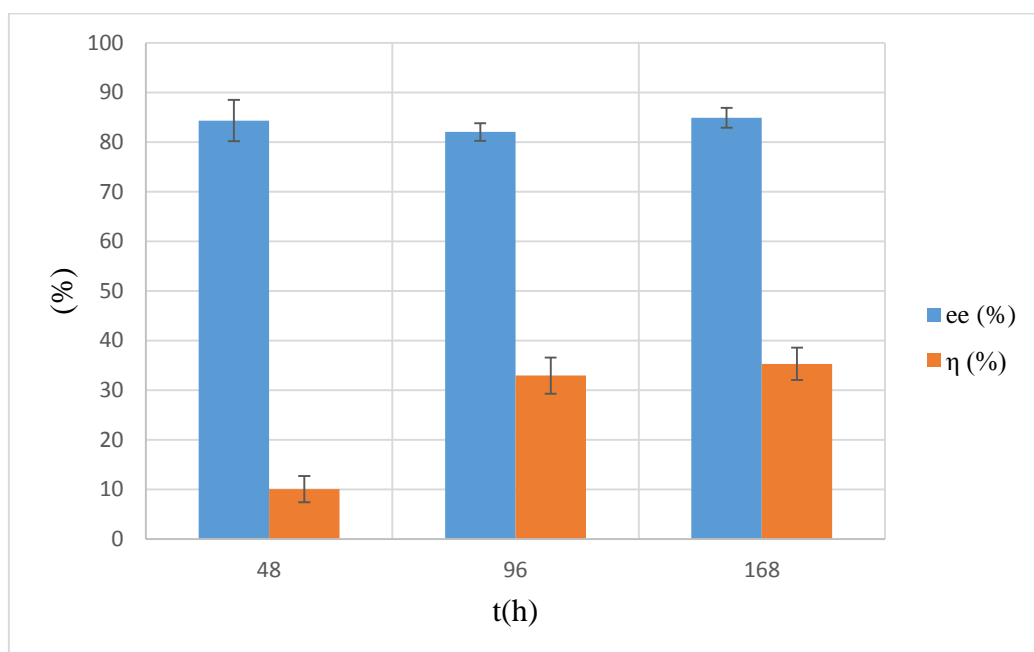
b)



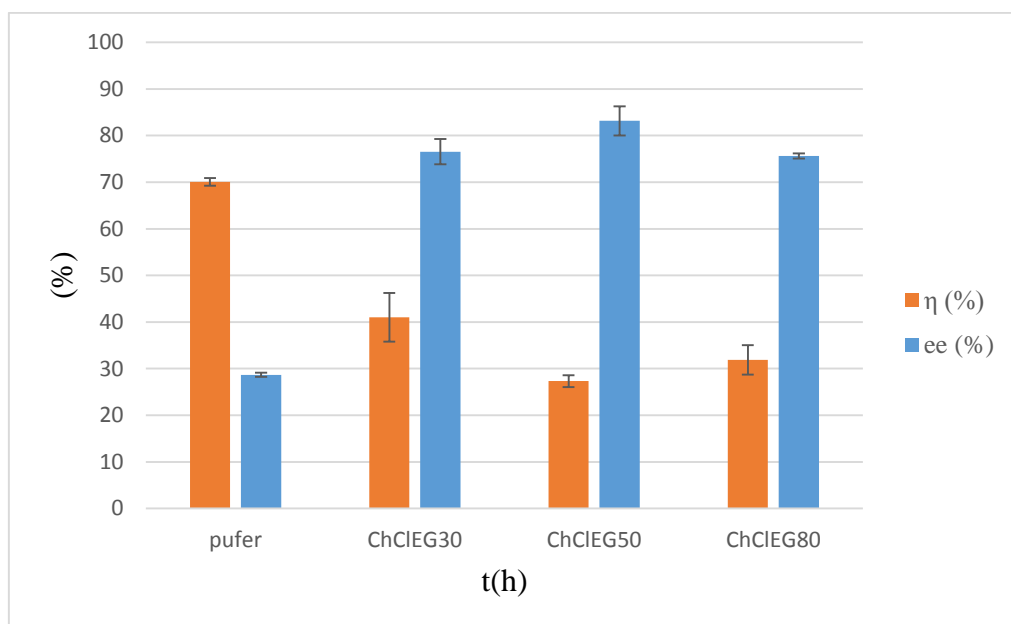
c)



d)



Slika 11. Enantiomerni višak (*ee*) te iskorištenje hidrolize ( $\eta$ ) (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane enzimima otpadne narančine kore nakon 48, 96 i 168 sati u a) puferu, b) eutektičkom otapalu ChClEG s 30% vode, c) eutektičkom otapalu ChClEG s 50% vode i d) eutektičkom otapalu ChClEG s 80% vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L-1 (*R,S*)-1-feniletil acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n= 3).



Slika 12. Enantiomerni višak (*ee*) te iskorištenje hidrolize ( $\eta$ ) (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane enzimima otpadne kore naranče u puferu te eutektičkom otapalu ChCIEG s 30, 50 i 80 % vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L<sup>-1</sup>(*R,S*)-1-feniletil acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C; 168 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3).

Iz slika 11 i 12 je vidljivo da su hidrolitički enzimi iz narančine kore aktivni i u puferu te u svim eutektičkim otapalima, međutim, dobivene su različite vrijednosti enantiomernog viška što se može objasniti prisutnošću nekoliko različitih hidrolitičkih enzima u narančinoj kori koji pretvaraju ili (*R*) ili (*S*) ester s različitom enantioselektivnošću u odgovarajući alkohol. Također, aktivnost hidrolitičkih enzima ovisi o karakteristikama korištenog otapala. Maugeri i Domínguez de María (2014) su uočili različitu enantioselektivnost enzima u ovisnosti o količini vode u eutektičkom otapalu, koja se javlja kao posljedica inhibicije pojedinih enzima u eutektičkim otapalima sa različitim udjelima vode, dok drugi enzimi ostaju aktivni.

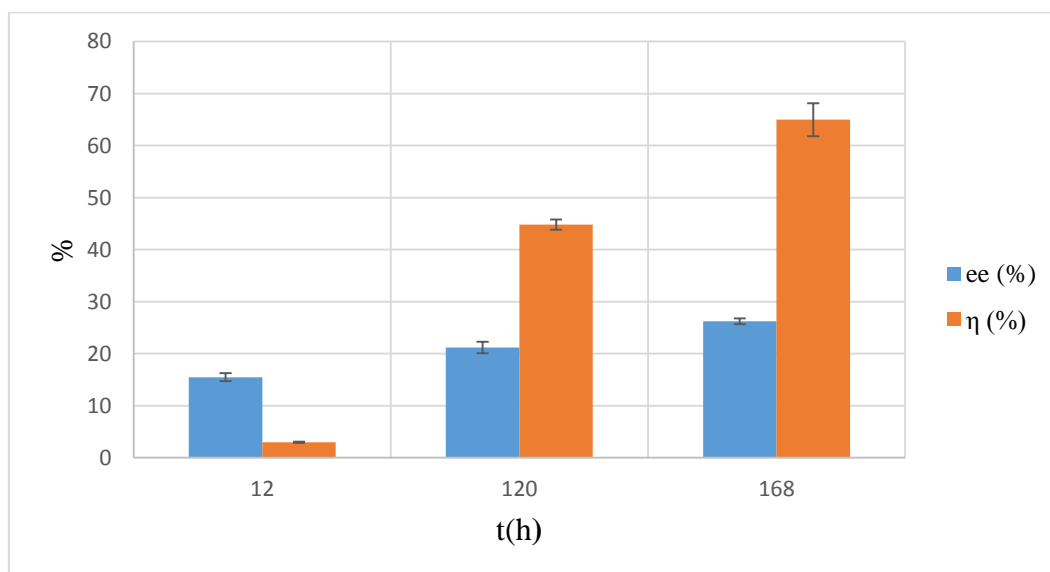
Uspoređujući enantiomerni višak hidrolize u eutektičkom otapalu ChCIEG i puferu (slika 10), vidljivo je da se otapalo ChCIEG pokazalo učinkovitijim za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata. Dok je enantiomerni višak iznosio tek 28,69 % nakon 168 sati reakcije u puferu, enantiomerni višak za reakcije hidrolize provedene u eutektičkom otapalu ChCIEG je značajno viši (>75 %). Iskorištenje reakcije hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata provedene u puferu iznosilo je 70,08 %, dok je enantiomerni višak iznosio tek 28,69 % nakon 168 sati reakcije. Iskorištenje hidrolize veće od 50 % ukazuje na to da enzimi iz kore naranče, u puferu kao otapalu, provode hidrolizu i (*R*)- i (*S*)-1-feniletil acetata u pripadajuće alkohole. Iskorištenje hidrolize za reakcije provedene u eutektičkom otapalu ne prelazi 50 %.

Najboljim se pokazalo otapalo ChClEG sa 50 % vode gdje je enantiomerni višak nakon 168 sati reakcije iznosio 84,89 %, dok je iskorištenje hidrolize iznosilo 35,3 %.

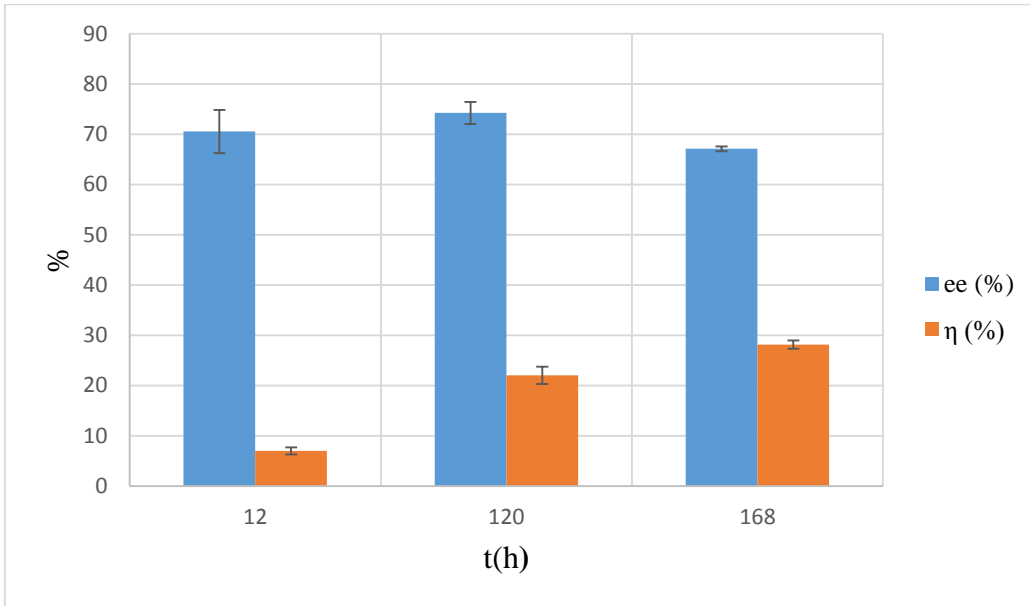
Također, reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata provedena je u eutektičkom otapalu ChClEG sa 30 %, 50 % i 80 % vode i u puferu kao referentnom otapalu, a reakcija je katalizirana hidrolitičkim enzimima iz ekstrakta narančine kore, prema prethodno navedenoj proceduri u podpoglavlju 3.2.2.1. Uzorkovanje je provedeno nakon 0,5, 5 i 7 dana reakcije, a uzorci su analizirani pomoću plinske kromatografije. Prvo je konstruiran baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata, koji je prikazan na slici 10.

Nakon provedene analize pomoću plinske kromatografije, iz dobivenih rezultata izračunati su iskorištenje procesa hidrolize te enantiomerni višak, zbog usporedbe uspješnosti hidrolize u puferu te u eutektičkom otapalu s 30 %, 50 % i 80 % vode. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 13 a-d i 14.

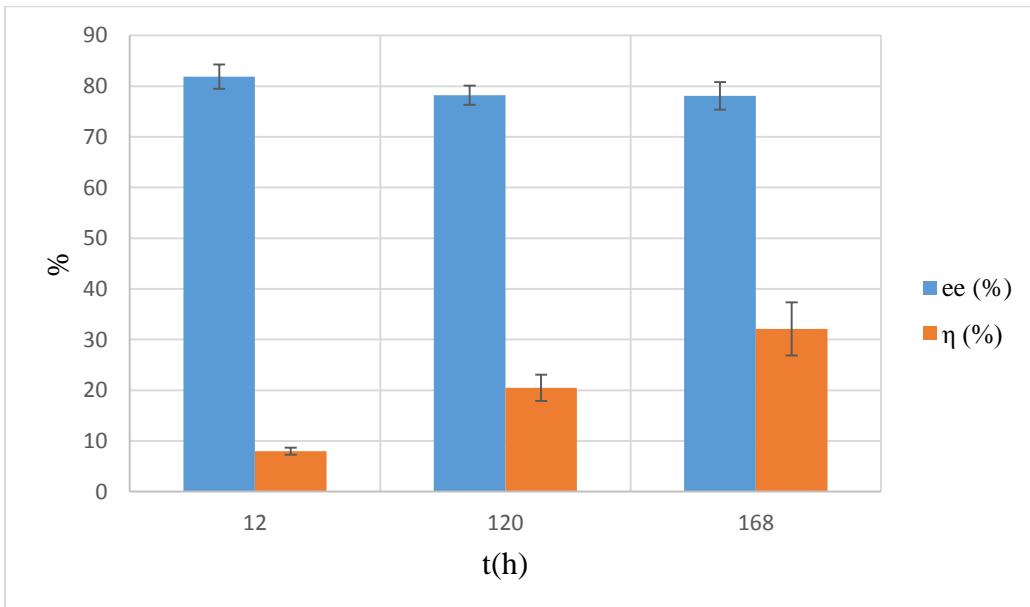
a)



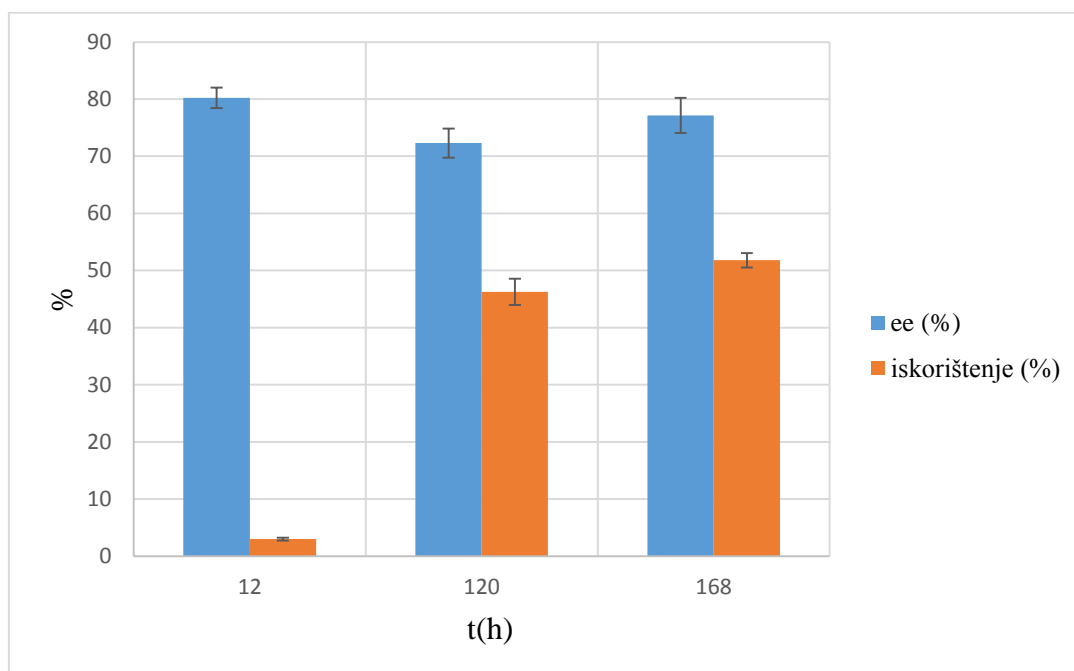
b)



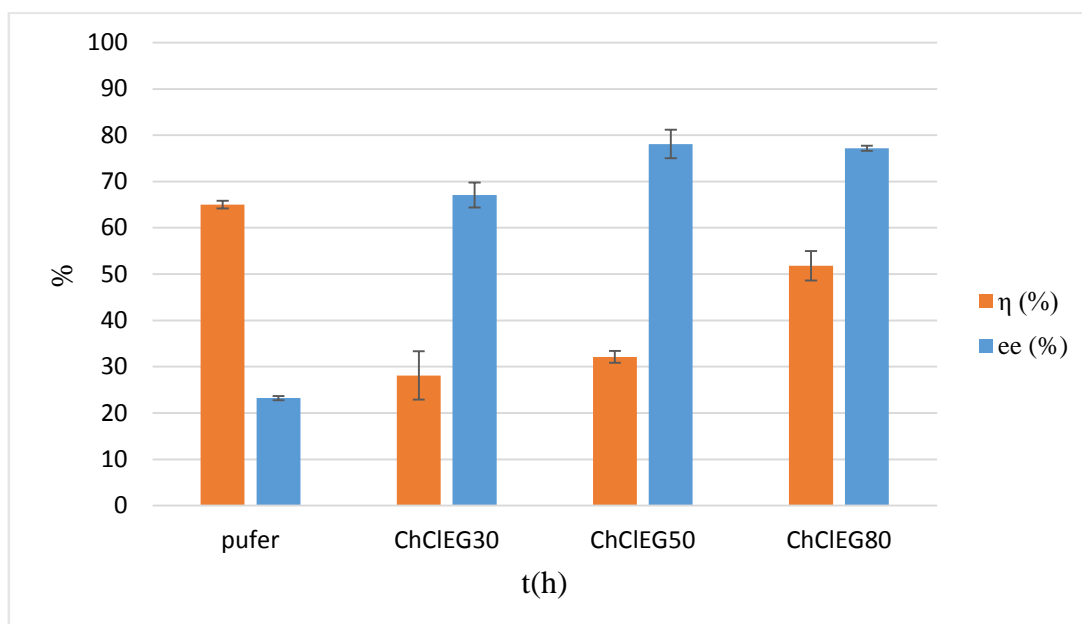
c)



d)



Slika 13. Enantiomerni višak ( $ee$ ) te iskorištenje hidrolize ( $\eta$ ) ( $R,S$ )-1-feniletil acetata katalizirane ekstraktom enzimima otpadne narančine kore nakon 0,5, 5 i 7 dana u a) puferu, b) eutektičkom otapalu ChClEG s 30% vode, c) eutektičkom otapalu ChClEG s 50% vode i d) eutektičkom otapalu ChClEG s 80% vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L<sup>-1</sup> ( $R,S$ )-1-feniletil acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n= 3).



Slika 14. Enantiomerni višak (*ee*) te iskorištenje hidrolize ( $\eta$ ) (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima otpadne kore naranče u puferu te eutektičkom otapalu ChCIEG s 30, 50 i 80 % vode. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil acetata; 0,2 g narančine kore; 25 °C; 168 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n= 3)

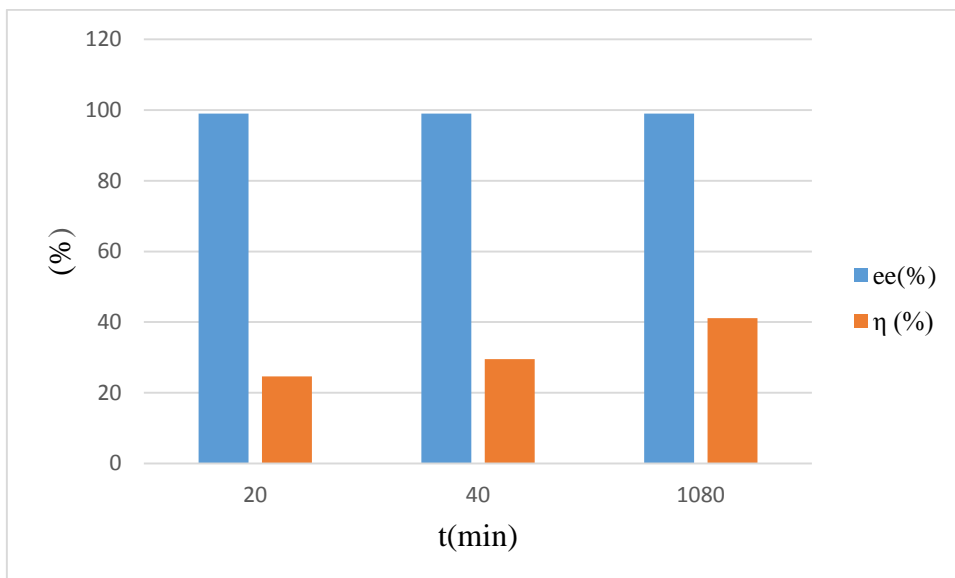
Iz dobivenih rezultata prikazanim na slikama 13 a-d i 14, može se zaključiti da hidrolitički enzimi iz ekstrakata narančine kore pokazuju aktivnost u puferu te u eutektičkom otapalu ChCIEG sa različitim udjelima vode. U puferu je vrijednost enantiomernog viška iznosila 26,22 % nakon provedene reakcije hidrolize u trajanju od 7 dana, što je niže u odnosu na vrijednost dobivenu sa komadima narančine kore. Vrijednost iskorištenja reakcije hidrolize također je niža u odnosu na vrijednost postignutu s komadima narančine kore, a iznosila je 64,98 %. Enantiomerni višak za reakcije hidrolize provedene u eutektičkom otapalu ChCIEG s različitim udjelima vode značajno je viši u odnosu na vrijednosti dobivene u puferu (>67 %), ali je nešto niži u odnosu na vrijednosti dobivene sa komadima narančine kore. Iskorištenje hidrolize niže je od 50% u otapalima ChCIEG s 30% i 50% udjela vode, a u otapalu ChCIEG80% vrijednost iskorištenja hidrolize nakon 7 dana reakcije iznosi 51,8%, što je više u odnosu na vrijednost dobivenu sa komadima narančine kore. Najboljim se pokazalo otapalo ChCIEG sa 50 % vode gdje je enantiomerni višak nakon 168 sati reakcije iznosio 78,1 %, dok je iskorištenje iznosilo 32,12 %.



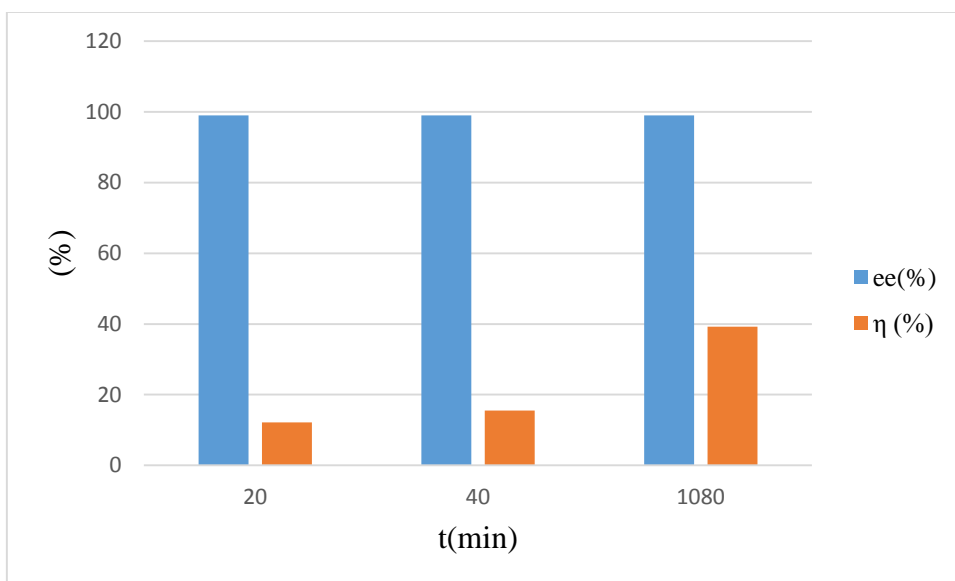
#### 4.2.2 Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata primjenom lipaze

Lipaze su enzimi koji spadaju u hidrolaze i kataliziraju različite reakcije kao što su hidroliza triglicerida, esterifikacija, transesterifikacija, aminoliza, ozonoliza i druge. Zbog mogućnosti primjene na široki spektar supstrata te visoke regio- i stereoselektivnosti, smatraju se jednim od najznačajnijih biokatalizatora. Prisutne su u svim živim organizmima, ali najveći biotehnološki značaj imaju lipaze izolirane iz bakterija i gljiva, budući da se relativno lako i jednostavno uzgajaju na različitim hranjivim podlogama pri blagim uvjetima temperature i pH-vrijednosti (Ognjanović i sur., 2010). Većina lipaza izoliranih iz bakterija pripada porodicama *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus* i *Chromobacterium*, dok lipaze izolirane iz gljiva većinom pripadaju porodicama *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* i *Aspergillus* (Müller i sur., 2004). Zbog velikog potencijala lipaza kao biokatalizatora u pripravi enantiomerno čistih spojeva, raste broj istraživanja učinkovitosti i stabilnosti lipaza u različitim zelenim otapalima. U provedenim istraživanjima, dokazana je veća ili jednaka učinkovitost NADES-a u lipazom kataliziranim reakcijama u odnosu na ionske kapljevine i organska otapala. Primjer je istraživanje koje je proveo Gorke (2008 i 2010) u kojem su se eutektička otapala kolin-klorid:urea i kolin-klorid:glicerol pokazala jednako dobrim kao i toluen u lipazom kataliziranoj reakciji transesterifikacije etil valerata s butanolom. U drugom istraživanju kojeg su proveli Durand i sur. (2012), ustanovljen je veliki potencijal DES-ova kolin-klorid:urea (ChU) i kolin-klorid:glicerol (ChGly) kao medija u lipazom kataliziranoj reakciji alkoholize vinil-laurata sa 1-butanolom.

S obzirom da se otapalo kolin-klorid:etilen glikol s 50% udjela vode pokazalo kao najbolje otapalo prilikom primjene narančine kore i ekstrakata narančine kore kao biokatalizatora, također je ispitana mogućnost njegove primjene u lipazom B kataliziranoj reakciji enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata. Nakon provedene analize pomoću plinske kromatografije nakon 20, 40 i 1080 minuta reakcije, iz dobivenih rezultata izračunati su iskorištenje procesa hidrolize te enantiomerni višak, zbog usporedbe uspješnosti hidrolize u puferu te u prirodnom eutektičkom otapalu ChCIEG s 50 % vode. Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 15 i 16.



Slika 15. Enantiomerni višak te iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimom lipazom B nakon 20, 40 i 1080 minuta u puferu. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil acetata, 5 mg pripravka Novozym 435. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3)



Slika 16. Enantiomerni višak te iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimom lipazom B nakon 20, 40 i 1080 minuta u ChClEG50%. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil acetata, 5 mg pripravka Novozym 435. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3)

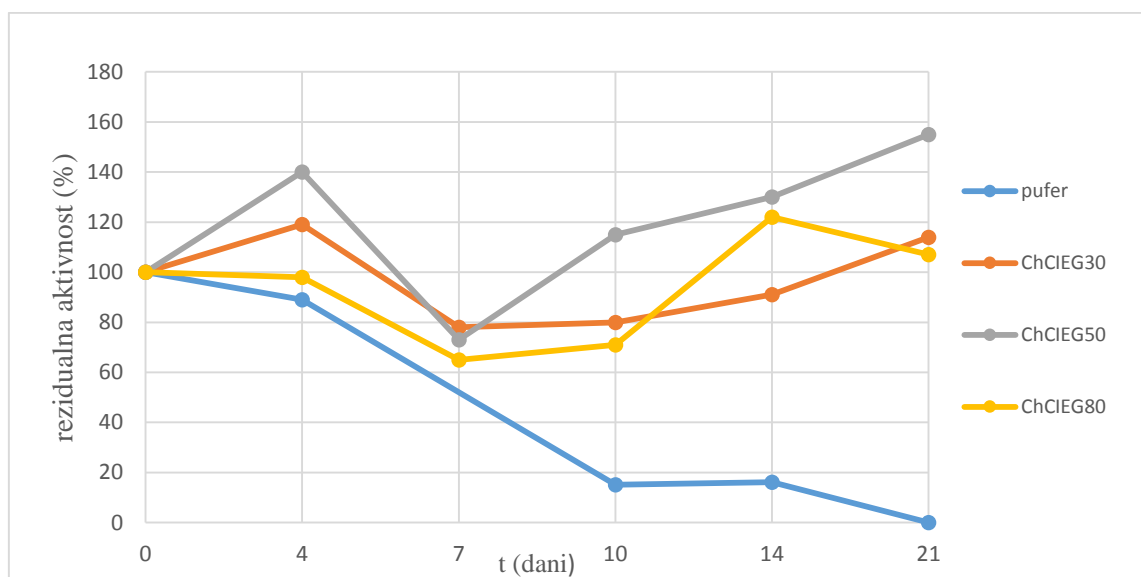
Iz dobivenih rezultata prikazanih na slikama 15 i 16, vidljivo je da enzimski pripravak Novozym 435 pokazuje aktivnost u puferu te prirodnom eutektičkom otapalu ChClEG50%.

U oba ispitana otapala dobivena je gotovo maksimalna vrijednost enantiomernog viška i iznosila je 99%, zbog toga što je došlo do enantioselektivne hidrolize samo *R*-1-feniletil acetata. Nakon provedene reakcije enantioselektivne hidrolize u trajanju od 18 sati, dobivena je veća vrijednost iskorištenja hidrolize u puferu nego u ChCIEG50%, i iznosi 41,1439 %. Također, vidljivo je da se s primjenom lipaze B kao biokatalizatora postiže veća enantioselektivnost u odnosu na narančinu koru i ekstrakte narančine kore. Na temelju svih dobivenih vrijednosti postotaka enantiomernog viška i iskorištenja hidrolize, uočljivo je da prirodno eutektičko otapalo ChCIEG50% ima veliki potencijal za primjenu u procesima u kojima se kao biokatalizator koristi lipaza B, ali i narančina kora te ekstrakti narančine kore.

#### **4.3 Određivanje stabilnosti hidrolitičkih enzima u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol (ChCIEG)**

Postoji značajan broj istraživanja koja se bave određivanjem i uspoređivanjem enzimske stabilnosti u različitim otapalima, obzirom da su aktivnost i stabilnost jedne od najvažnijih karakteristika enzima kada se primjenjuju u različitim industrijskim procesima kao biokatalizatori. Općenito, enzimi se čuvaju pri niskim temperaturama, a za lipaze je utvrđeno da prilikom skladištenja pri 4 °C očuvaju svoju punu aktivnost (Basri i sur., 1994). Posljednjih nekoliko godina raste broj radova koji su usmjereni na proučavanje stabilnosti lipaza u prirodnim eutektičkim otapalima, kako bi se što kvalitetnije ispitaio njihov potencijal da zamijene ili bar smanje upotrebu organskih otapala u industrijskim procesima. Eutektička otapala mogu značajno poboljšati aktivnost, termičku stabilnost, pH-stabilnost i skladišnu stabilnost lipaze kada se koriste kao kootapala u vodenim otopinama (Kim i sur., 2016).

U ovom radu ispitan je utjecaj prirodnog eutektičkog otapala ChCIEG s različitim udjelima vode na skladišnu termičku stabilnost hidrolitičkih enzima iz ekstrakata narančine kore te lipaze, ali i u puferu kao referentnom otapalu. Termička stabilnost navedenih enzima određena je na temelju rezidualne aktivnosti nakon inkubacije u navedenim otapalima kroz određen vremenski period. Određivanje skladišne termičke stabilnosti enzima iz ekstrakata narančine kore provedeno je u otapalu ChCIEG30%, ChCIEG50% te ChCIEG80%, ali i u puferu, a rezidualna aktivnost određena je nakon 0, 4,7, 10,14 i 21 dana. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 17.

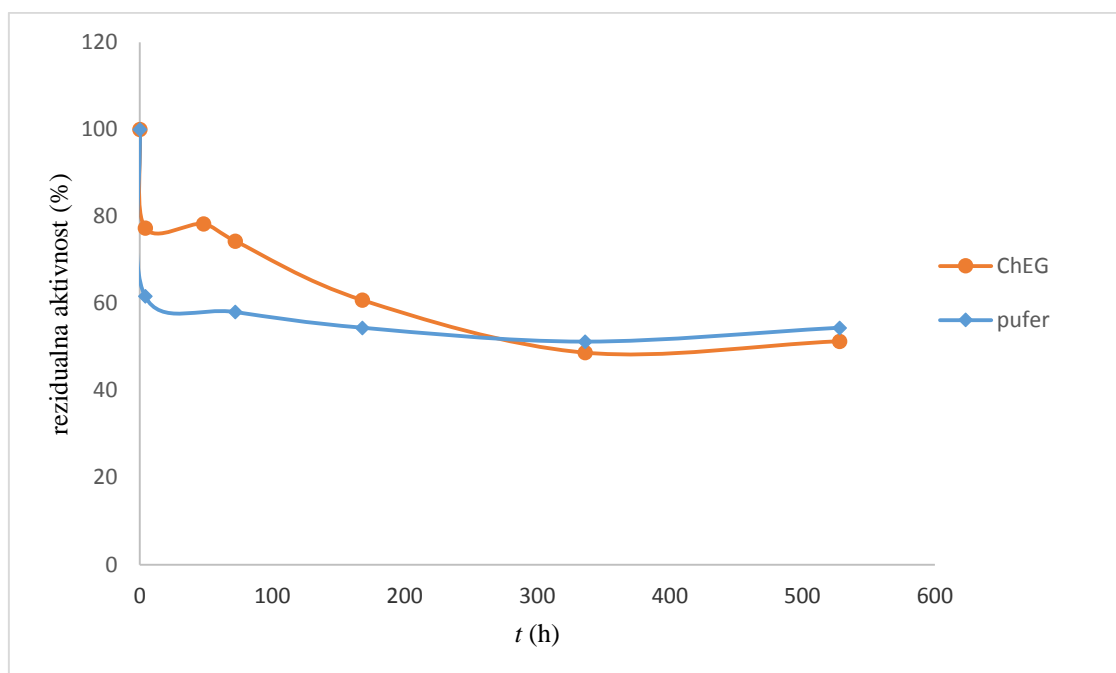


Slika 17. Rezidualna aktivnost ekstrakata narančine kore eutektičkom otapalu ChClEG sa 30, 50 i 80 %-tnim udjelom vode te puferu u ovisnosti o vremenu. Reakcijski uvjeti: 0,015 mol L<sup>-1</sup> (R,S)-1-feniletil acetata, 0,2 g narančine kore. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± S.D (n= 3).

Iz slike 17 vidljivo je smanjenje rezidualne aktivnosti enzima iz ekstrakata narančine kore, nakon inkubacije u trajanju od 4 sata, u puferu u kojem iznosi 88,96% te u ChClEG80% u kojem iznosi 98 %. U ostala dva otapala došlo je do porasta rezidualne aktivnosti, a ona iznosi 119 % u ChClEG30% te 140 % u ChClEG80%.

Nakon inkubacije u trajanju od 7, 10 i 14 dana uočeno je smanjenje rezidualne aktivnosti u puferu, ChClEG30% te ChClEG50%, dok je u ChClEG80% došlo do porasta rezidualne aktivnosti nakon 14 dana te ona iznosi 122%. Posljednja analiza provedena je nakon 21 dana te je uočeno povećanje rezidualne aktivnosti enzima iz ekstrakata narančine kore u svim ispitanim prirodnim eutektičkim otapalima, a najboljim se pokazao ChClEG50% u kojem je dobivena najviša vrijednost rezidualne aktivnosti koja iznosi 155%. Nasuprot tome, u puferu je vidljiv potpun gubitak aktivnosti enzima iz ekstrakata narančine kore te rezidualna aktivnost nakon 21 dana iznosi 0 %.

Za lipazu B termička stabilnosti određena je u otapalu ChClEG50% te u puferu kao referentnom otapalu. Rezidualna aktivnost određena je nakon 0, 4, 72, 168, 336 i 528 sati, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 18.



Slika 18. Rezidualna aktivnost lipaze B u eutektičkom otapalu ChCIEG s 50 %-tnim udjelom vode te puferu u ovisnosti o vremenu. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L-1 (R,S)-1-feniletil acetata, 5 mg pripravka Novozym 435. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  S.D (n= 3).

Za određivanje stabilnosti lipaze B korišteno je prirodno eutektičko otapalo ChCIEG50% zbog toga što se pokazalo kao najprikladnije otapalo za očuvanje stabilnosti enzima iz ekstrakata narančine kore, a pufer je korišten kao referentno otapalo.

Iz slike 18 vidljivo je smanjenje rezidualne aktivnosti lipaze B nakon 4 sata inkubacije u puferu, u kojem iznosi 61,66 % i ChCIEG50%, u kojem iznosi 77,38%. Nakon 72, 168 i 336 sati inkubacije također je uočeno smanjenje rezidualne aktivnosti u oba ispitana otapala.

Posljednja analiza provedena je nakon 528 sati inkubacije te je uočena veća rezidualna aktivnost lipaze B u puferu u kojem iznosi 54,44%, dok u ChCIEG50% iznosi 51,34 %.

Stabilnost enzima u DES-ovima pratile su i druge istraživačke grupe. U istraživanju koje su proveli Kim i sur. (2016), ispitan je utjecaj nekoliko DES-ova na aktivnost i termičku stabilnost lipaze izolirane iz kvasca *Candida rugosa*. Pri tome su se DES-ovi na bazi glicerola pokazali kao vrlo uspješni u očuvanju aktivnosti i termičke stabilnosti lipaze, za razliku od DES-ova koji sadrže formamid. Osim toga, u DES-ovima je uočena značajno viša rezidualna aktivnost, u odnosu na pufer kao referentno otapalo. Također, u istraživanju koje su proveli Huang i sur. (2014), DES-ovi na bazi glicerola i etilen-glikola pozitivno su djelovali na termičku stabilnost lipaze, za razliku od DES-ova na bazi formamida i tiouree. Na stabilnost

lipaze u DES-ovima značajan utjecaj ima i udio vode, a uočeno je da povećanjem udjela vode do 60 % (v/v) raste i enzimska aktivnost (Elgharbawy i sur., 2018).

Na temelju svih dobivenih rezultata te usporedbom vrijednosti enantiomernog viška te iskorištenja hidrolize, uočeno je kako se primjenom eutektičkog otapala ChCIEG s različitim udjelima vode postiže bolja učinkovitost reakcije enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u odnosu na pufer. Također, ChCIEG se pokazao kao pogodno otapalo za skladištenje i očuvanje stabilnosti lipaze i hidrolitičkih enzima narančine kore. Iz svega navedenog, može se uočiti kako ChCIEG ima veliki potencijal za primjenu u biotransformacijskim procesima kataliziranim lipazom te hidrolitičkim enzimima narančine kore te može biti kvalitetna alternativa štetnim organskim otapalima.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu istražena je mogućnost primjene eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol s 30 %, 50 % i 80 % volumnog udjela vode u reakciji enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata, a kao biokatalizatori su korišteni lipaza B, narančina kora te ekstrakti narančine kore. Također, istražen je njegov utjecaj na skladišnu termičku stabilnost hidrolitičkih enzima iz ekstrakata narančine kore i lipazu.

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

1. Eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen-glikol se pokazalo učinkovitijim u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil acetata kataliziranoj enzimima iz narančine kore u odnosu na pufer. Pri tome enantiomerni višak za reakciju hidrolize koja je provedena u puferu iznosi 28,69 %, dok je za reakcije provedene u eutektičkom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol veći od 75%. Kao najbolje otapalo za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata pokazalo se eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen-glikol sa 50 % vode. Dodatak određene količine vode u eutektička otapala utječe pozitivno na iskorištenje enantioselektivne hidrolize.
2. Eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen-glikol se pokazalo učinkovitijim u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil acetata kataliziranoj enzimima iz ekstrakata narančine kore u odnosu na pufer. Enantiomerni višak za reakcije hidrolize provedene u eutektičkom otapalu ChCIEG s različitim udjelima vode značajno je viši u odnosu na vrijednosti dobivene u puferu (>67 %), ali je nešto niži u odnosu na vrijednosti dobivene sa komadima narančine kore. Najboljim se pokazalo otapalo ChCIEG sa 50 % vode gdje je enantiomerni višak nakon 168 sati reakcije iznosio 78,1 %, dok je iskorištenje iznosilo 32,12 %.
3. Kod lipazom B katalizirane reakcije enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata, dobivena je gotovo maksimalna vrijednost enantiomernog viška u ChCIEG50% i puferu te je iznosila 99 %, što znači da je došlo do enantioselektivne hidrolize samo *R*-1-feniletil acetata. Nakon provedene reakcije enantioselektivne hidrolize u trajanju od 18 sati, dobivena je veća vrijednost iskorištenja hidrolize u puferu nego u ChCIEG50%, i iznosi 41,14 %.

4. Praćenjem skladišne termičke stabilnosti enzima iz ekstrakata narančine kore u DES-u ChCIEG s različitim udjelima vode i puferu, s obzirom na rezidualnu aktivnost enzima u ovisnosti o vremenu, ustanovljeno je da enzimi pokazuju veću aktivnost u eutektičkim otapalima, nego u puferu. Na skladišnu termičku stabilnost utječe i udio vode u eutektičkom otapalu, a najboljim se pokazao ChCIEG50% u kojem je dobivena najveća vrijednost rezidualne aktivnosti koja iznosi 155%. Nasuprot tome, u puferu je došlo do potpunog gubitka aktivnosti enzima iz ekstrakata narančine kore nakon 21 dana.
5. Istraživanje stabilnosti lipaze B provedeno je u prirodnom eutektičkom otapalu ChCIEG50% te u puferu kao referentom otapalu. U oba istražena otapala došlo je do značajnog opadanja stabilnosti lipaze B nakon 4, 72, 168, 336 i 568 sati. Nakon 528 sati inkubacije uočena je veća rezidualna aktivnost lipaze B u puferu u kojem iznosi 54, 44%, dok u ChCIEG50% iznosi 51, 34 %.



## 6. LITERATURA

- Azizi, N., Dezfolli, S., Hashemi, M. M. (2013) Chemoselective synthesis of xanthenes and tetraketones in a choline chloride-based deep eutectic solvents. *Cr. Chim.* **16**, 997- 1001.
- Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z., Razak, C. N. A., Salleh, A. B. (1994) Immobilization of hydrophobic lipase derivatives on to organic polymer beads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **59**, 37–44.
- Bommarius, A. S., Riebel, B. R. (2004) Biocatalysis. WILEY-WCH Verlag GmbH & Co. KGaA. I. str. 19-40.
- Bhattacharjee, S., Sarker, D. (2017) Kinetic study of enzymatic hydrolysis of lactose in whey. *Int. J. Chem. Eng. Res.* **9**, 223 – 228
- Carvalho, C. C. C. R. (2017) Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry. *Microb. Biotechnol.* **10**, 205 – 263.
- Cvjetko, Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić, Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 1631–1639.
- Čanak, I., Berkics, A., Bajcsi, N., Kovacs, M., Belak, A., Teparić, R., Maraz, A., Mrša, V. (2016) Purification and characterization of a novel cold-active lipase from the yeast *Candida zeylanoides*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 403 – 411.
- Dave, V., Khirwadkar, P., Dashora, K. (2014) A review on biotransformation. *Indian. J. Res. Pharm. Biotechnol.* **2**, 1136 –1140.
- Demirbas, A. (2010) Biorefinery Technologies for biomass upgrading. *Energ. Source. Part A* **32**, 1547-1558.
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., Villeneuve, P. (2012) Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem.* **47**, 2081–2089.
- Durand, E., Villeneuve, P., Lecomte, J. (2013) Deep eutectic solvents: synthesis, application and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 379–385.
- Elgharbawy, A. A., Hayyan, A., Hayyan, M., Rashid, S. N., Nor, M. R. M., Zulkifli, M. Y., Alias, Y., Mirghania, M. E. S. (2018) Shedding light on lipase stability in natural deep eutectic solvents. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32**, 359 – 370.

- Faber, K. (2011) Biotransformations in organic chemistry, 6. Izd., Springer. str. 1–268.
- Fischer, V. (2015) Properties and applications of deep eutectic solvents and low-melting mixtures. *Doktorski rad*. Fakultet za kemiju i farmaciju, Regensburg.
- Frings, K., Koch, M., Hartmeier, W. (1999) Kinetic resolution of 1-phenylethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 303
- Ghanem A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**, 1721-1754.
- Ghisalba, O., Meyer, H.P., Wohlgemuth, R. (2010) Industrial biotransformation. U: Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology, Flickinger M.C., John Wiley & Sons, str. 1-18.
- Gorke, J.T., Srienc F., Kazlauskas R.J. (2010) Deep eutectic solvents for *Candida antarctica* lipase B-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1038**, 169-180.
- Gorke, J.T., Srienc, F., Kazlauskas, R.J. (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.* **10**, 1235-1237.
- Grogan, G. (2009) Practical biotransformations: A beginner's guide, John Wiley & Sons., str. 1-8, 147-151.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193–2195.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E. S. (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere.* **93**, 455–459.
- Huang, Z., Wu, B. P., Wen, Q., Yang, T. X., Yang, Z. (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**, 1975–1981.
- Jegannathan, K. R., Nielsen, P. H. (2013) Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *J. Clean. Prod.* **42**, 228 – 240.

Kerton, F.M., Marriott, R. (2013) Alternative solvents for green chemistry, 2. izd., Royal Society of Chemistry, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 1 – 4.

Kim, S. H., Park, S., Yu, H., Kim, J. H., Kim, H. J., Yang, Y-H., Kim, K. J., Kan, E., Lee, S. H. (2016) Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **128**, 65–72.

Kudlak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environ. Sci. Pollut. R.* **22**, 11975-11992.

Lancaster, M. (2002) Principles of sustainable and green chemistry. U: handbook of green chemistry and technology, Clark J., Macquarrie D., Blackwell Science Ltd., str. 10-26.

Liang, J., Zhang, Y., Sun, A., Deng, D., Hu, Y. (2015) Enantioselective resolution of (±)-1-phenylethanol and (±)-1-phenylethyl acetate by a novel esterase from *Bacillus sp.* SCSIO 15121. *Appl. Biochem. Biotech.* **178**, 559 - 575.

López, J.Á.S., Li Q., Thompson, I.A. (2010) Biorefinery of waste orange peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 63 – 69.

Maugeri, Z., Domínguez de María (2014) Whole cell biocatalysis in deep-eutectic-solvents/aqueous mixtures. *Chem. Cat. Chem.* **6**, 1535 – 1537.

Molnar, M., Klenkar, J., Tarnai, T. (2017) Eco- friendly rapid synthesis of 3-substitued-2-thioxo-2,3- dihydroquinazolin-4(1H)-ones in choline chloride based deep eutectic solvent. *J. Syn. Commun.* **7**, 1040-1045.

Müller, G., Petry, S. (2004) Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology, Wiley VCH

Olivier-Bourbigou, H., Magna, L. (2002) Ionic liquids: perspectives for organic and catalytic reactions. *J. Mol. Catal. A - Chem.* **182 - 183**, 419 – 437.

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

Satari, B., Karimi, K. (2017) Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resour. Conserv. Recy.* **129**,153 – 167.

Saqib, S., Akram, A., Halim, S. A., Tassaduq, R. (2017) Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech.* **7**, 1 – 88

Shekaari, H., Zafrani-Moattar, M. T., Mokhtarpour, M. (2017) Solubility, volumetric and compressibility properties of acetaminophen in some aqueous solutions of choline based deep eutectic solvents at T = (288.15 to 318.15) K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **109**, 121 – 130.

Singh, B., Lobo, H., Shankarling, G. (2011) Selective N-alkylation of aromatic primary amines catalyzed by bio-catalyst or deep eutectic solvent. *Catalysis Letters* **141**, 178-182.

Suan, C.L., Sarmidi, M.R. (2004) Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *J. Mol. Catal. B- Enzym.* **28**, 111

Vandenberghe, A., Markó, I. E., Lucaccioni, F., Lutts, S. (2013) Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Ind. Crop. Prod.* **42**, 380 – 385.

Wilkins, M.R., Suryawati, L., Maness, N.O., Chrz, D. (2007) Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1161 – 1168.

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