

Lipazom katalizirana kinetička (dinamička) rezolucija (R,S)-1-feniletanola u hidrofobnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Gregur, Paola

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:221427>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Paola Gregur

7980/BT

**Lipazom katalizirana kinetička (dinamička)
rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola u hidrofobnim
niskotemperaturnim eutektičkim otapalima**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: HRZZ-IP-04-2019 Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova

Mentor: dr.sc. Manuela Panić

Zagreb, 2022.

Zahvaljujem se mentorici dr.sc. Manueli Panić na prenesenom znanju i savjetima te strpljenju i pomoći prilikom izrade završnog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi najveća motivacija i podrška tijekom studiranja, bez vas moji studentski dani ne bi bili isti. Od srca vam zahvaljujem na strpljenju i razumijevanju koje ste mi uvijek pružali i riječima podrške kada je to trebalo.

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

Lipazom katalizirana kinetička (dinamička) rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola u hidrofobnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Paola Gregur, 7980/BT

Sažetak:

Razvojem programa zelene kemije, tendencija znanstvenika i akademske zajednice je da se načela zelene kemije primjenjuju u kemijskim i biološkim procesima. Također, jedan od ciljeva je zamijeniti organska otapala alternativnim zelenim otapalima. Niskotemperaturna eutektička otapala dosad su pokazala velik potencijal za njihovu primjenu u biotransformacijama. Jedna od primjena je reakcijski medij za proizvodnju kiralnih lijekova. Prema tome, u ovom radu ispitana je aktivnost lipaza u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (hDES) te mogućnost korištenja hDES u enantioselektivnoj redukciji (*R,S*)-1-feniletanola uz primjenu lipaza kao biokatalizatora. Praćenjem parametara (X , V_E , V_P), zaključeno je da je najaktivnija lipaza CALB u hDES-u Ty:C8. U tom sustavu je provedena kinetička (dinamička) rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola te je na temelju dobivenih rezultata zaključeno da Ty:C8 moguća zamjena za organska otapala u ispitanim reakcijskim uvjetima.

Ključne riječi: niskotemperaturna eutektička otapala, kinetička (dinamička) rezolucija sekundarnih alkohola, zelena kemija, stereoselektivne biotransformacije

Rad sadrži: 33 stranice, 9 slika, 6 tablica, 35 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr.sc. Manuela Panić

Pomoć pri izradi: mag.ing. Anja Damjanović

Datum obrane: srpanj 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Lipase-catalyzed kinetic (dynamic) resolution (*R,S*)-1-phenylethanol in hydrophobic deep eutectic solvents

Paola Gregur, 7980/BT

Abstract:

With the development of the green chemistry program, the tendency of scientists and the academic community is to apply the principles of green chemistry in chemical and biological processes. Also, one of the goals is to replace organic solvents with alternative green solvents. Deep eutectic solvents have so far shown great potential for their application in biotransformations. They can be used as a reaction medium for the production of chiral drugs. Therefore, in this work, the activity of lipases in deep eutectic solvents (hDES) and the possibility of using hDES in the enantioselective reduction of (*R,S*)-1-phenylethanol with the use of lipase as a biocatalyst were tested. By monitoring the parameters (X , V_E , V_P), it was concluded that the most active lipase is CALB in hDES Ty:C8. In this system, the kinetic (dynamic) resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol was performed, and based on the obtained results, it was concluded that Ty:C8 is a possible substitute for organic solvents in the tested reaction conditions.

Keywords: deep eutectic solvents, kinetic (dynamic) resolution secondary alcohol, green chemistry, stereoselective biotransformations

Thesis contains: 33 pages, 9 figures, 6 tables, 35 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Manuela Panić, PhD

Technical support and assistance: Anja Damjanović, mag.ing.

Thesis defended: July, 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Što su biotransformacije?	2
2.1.1. Biokatalizatori u biotransformacijama	2
2.2. Zelena otapala	4
2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala.....	7
2.2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biotransformacijama	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali i metode.....	11
3.1.1. Materijali.....	11
3.1.1.1. Kemikalije.....	11
3.1.1.2. Enzimi	11
3.1.1.3. Oprema i uređaji.....	12
3.1.2. Metode rada.....	12
3.1.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala.....	12
3.1.2.2. Određivanje aktivnosti lipaza.....	12
3.1.2.3. Određivanje aktivnosti lipaza u niskotemperaturnim eutektičkim hidrofobnim otapalima	13
3.1.2.4. Lipazom katalizirana kinetička i dinamička kinetička rezolucija (<i>R,S</i>)-1-feniletanola.....	15
3.1.2.5. Analiza rezultata.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
4.1. Sinteza niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	20
4.2. Aktivnost lipaza.....	20
4.3. Probir niskotemperaturnih eutektičkih hidrofobnih otapala za esterifikaciju (<i>R,S</i>)-1-feniletanola i vinil acetata.....	22
4.4. Lipazom katalizirana kinetička i dinamička kinetička rezolucija (<i>R,S</i>)-1-feniletanola.....	25
6. POPIS LITERATURE.....	30

1. UVOD

U posljednjih dvadesetak godina pobuđuje se ljudska svijest o važnosti očuvanja okoliša i održivom razvoju. Isto tako, razvojem programa zelene kemije, tendencija znanstvenika je da se načela zelene kemije primjenjuju u kemijskim i biološkim znanostima. Jedan od ciljeva današnjih znanstvenika jest zamijeniti organska otapala alternativnim zelenim otapalima. Karakteristike koje bi trebalo imati idealno otapalo prema načelima zelene kemije su: netoksičnost, neškodljivost prema okolišu i ljudima, kemijska i fizička stabilnost, niska hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe. Jedno od zelenih otapala koja pokazuju velik potencijal za široku primjenu su niskotemperaturna eutektička otapala, tzv. DES-ovi. Zbog svojih karakteristika kao što su nehlapljivost, biorazgradivost, mala toksičnost i nezapaljivost, pronalaze svoju primjenu u kemijskoj sintezi, elektrokemiji, (bio)katalizi, proizvodnji nanometarijala te biomedicini.

Osim primjene zelenih otapala, jedan od ciljeva zelene kemije je primjena mikrobnih stanica ili enzima, odnosno bioloških katalizatora, u kemijskoj sintezi. Pri tome je jako važna proizvodnja enantiomerno čistih spojeva budući da su lijekovi s jednom vrstom enantiomera postali standardna potreba farmaceutske industrije. Naime, enantiomeri pojedinog kiralnog lijeka mogu se značajno razlikovati u biološkom učinku, kao i po njihovoj bioraspoloživosti, brzini metabolizma, izlučivanju, toksičnosti te selektivnosti za receptore/enzime/transportne proteine. Stoga, kemijska i biotehnološka industrija nastoje razviti različite metode za proizvodnju biološki aktivnih kiralnih spojeva visoke enantiomerne čistoće.

Cilj ovog rada je ispitati aktivnost lipaza u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (hDES), mogućnosti korištenja hDES u enantioselektivnoj redukciji (*R,S*)-1-feniletiletanola uz primjenu lipaza kao biokatalizatora (lipaza B izolirana iz *Candida antarctica*, (CALB), lipaza G „Amano“ izolirana iz *Penicillium camembertii* (G), Lipaza AS „Amano“ izolirana iz *Aspergillus niger* (AS), lipaza AYS „Amano“ izolirana iz *Candida cylindracea* (AYS) i lipaza AH „Amano“ izolirana iz *Pseudomonas cepacia* (AH)) te proizvesti enantiomerni čisti (*R*)-1-feniletetil-acetat.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Što su biotransformacije?

Biotransformacije su transformacije supstrata u konačni produkt pomoću mikrobnih stanica ili enzima (Grogan, 2009).

Za razliku od tradicionalnih tehnoloških postupaka za proizvodnju biosintetskih proizvoda, biotransformacije se smatraju selektivnim enzimskim modifikacijama definiranih čistih spojeva u definirane konačne proizvode. Prvi postupci koji se mogu smatrati biotransformacijama korišteni su u 19. stoljeću, kao što je primjerice oksidacija alkohola u octenu kiselinu s *Bacterium xylinum*. No, svoje sadašnje značenje dobivaju otkrićem mikrobnih transformacija steroidnih hormona kao što su redukcija androstendiona u testosteron sa *Saccharomyces cerevisiae* i 11 α -hidroksilacija progesterona s *Rhizopus arrhizus*.

Prema IUPAC-u (1990) glavne prednosti biotransformacija su: kemoselektivnost, regioselektivnost, stereospecifičnost te velika brzina reakcije u blagim reakcijskim uvjetima. Također navode da je primjena biotransformacija riješila neke probleme u sintetskoj kemiji kao što su uvođenje kiralnih centara u molekule, odvajanje racemata i pretvorbu nestabilnih molekula u blagim reakcijskim uvjetima. Biotransformacije pronalaze sve veću primjenu u proizvodnji farmaceutika, finih kemikalija, biogoriva te u kozmetičkoj industriji. Budući da su enzimi kiralni katalizatori, biotransformacije imaju velik potencijal u sintezi enantiomera kiralnih lijekova. Isto tako, primjena enzima i mikrobnih stanica kao prirodnih biokatalizatora zadovoljava kriterije zelene kemije. Nadalje, razvojem genetičkog i proteinskog inženjerstva te molekularne biologije, manipulacija enzimima i mikrobnim stanicama postaje uobičajena i prihvaćena metoda u laboratorijima diljem svijeta (Grogan, 2009).

2.1.1. Biokatalizatori u biotransformacijama

Biokatalizatori koji se primjenjuju u biotransformacijama su enzimi, biljne i životinjske stanice i tkiva, čiste kulture mikroorganizma te umjetni enzimi (Grogan, 2009). Brojne kemijske reakcije su katalizirane biokatalizatorima: hidroliza, esterifikacija, izomerizacija, adicija, eliminacija, alkilacija, dealkilacija, halogenacija, dehalogenacija, oksidacija i redukcija (Adam i sur., 1999).

Svaki katalizator i biokatalizator je okarakteriziran s tri osnovne dimenzije: aktivnost, selektivnost i stabilnost. Aktivnost pojedinih enzima je uglavnom dobro istražena budući da se može izravno mjeriti u reakciji i neophodna je za izvođenje osnovnih eksperimentalnih protokola. Većina enzima je aktivna i stabilna u uskom rasponu temperature i pH. Prilikom mjerenja aktivnosti enzima potrebno je jasno definirati uvjete provođenja reakcija kako bi aktivnost bila valjani parametar. Aktivnost enzima može se izraziti na tri različita načina:

- ukupna enzimaska aktivnost se izražava u internacionalnim jedinicama
 $ukupna\ aktivnost \equiv 1\ I.J. = 1\ \mu mol\ min^{-1}$
- specifična aktivnost enzima se svodi na masu enzima
 $specifična\ aktivnost \equiv 1\ I.J.\ (mg\ enzima)^{-1} = 1\ \mu mol\ (min\ mg\ protein)^{-1}$
- volumetrijska aktivnost koja se temelji na aktivnosti enzima po jedinici volumena
 $volumetrijska\ aktivnost \equiv 1\ I.J.\ mL^{-1} = 1\ \mu mol\ (min\ mL)^{-1}$

Selektivnost biokatalizatora je znatno veća od nebioloških katalizatora bilo da se radi o stereo-, enantio- ili regioselektivnosti. U kontekstu biotransformacija najbitnija je enantioselektivnost radi postizanja enantiomerne čistoće produkta.

Stabilnost enzima se definira kao toplinska stabilnost, tj. temperatura iznad koje enzim gubi stabilnost. Budući da stabilnost na određenoj temperaturi prvenstveno ovisi o vremenu izlaganja, takva konstatacija stabilnosti je često nepotpuna. U kontekstu biokatalitičkih procesa važnija je stabilnost rada pojedinog enzima koja se definira kao dugotrajna stabilnost u određenim uvjetima (Bommarius i Riebel, 2004).

Enzimi su prirodni biokatalizatori koji postaju sve popularniji alati u sintetskoj organskoj kemiji. Ti enzimi se lako primjenjuju, robusni su i jeftini (Allen i sur., 1998). Kao što je već spomenuto, zahtijevaju blage uvjete temperature (15-50 °C) i neutralan pH (pH 5-9) za provođenje reakcije. Najveća prednost njihove primjene je povećanje selektivnosti ili regioselektivnosti reakcije te razdvajanje enantiomernih spojeva kod kojih je razlika slobodne Gibbsove entalpije između R- i S-enantiomera tek 1-3 kJ mol⁻¹. Dakle, enzimi su prihvaćeni kao prirodni katalizatori i primjenjuju se posebice u reakcijama koje zahtijevaju kinetičku rezoluciju produkta (Bommarius i Riebel, 2004).

Lipaze pripadaju skupini hidrolitičkih enzima koje karakterizira visoka stabilnost, aktivnost i jednostavnost primjene, stoga se smatraju jednim od najboljih i često korištenih enzimskih katalizatora. Primjenjuju se u reakcijama hidrolize esterskih veza u triacilglicerolima te

reverzne hidrolize, acilacije alkohola i amina koje se provode u organskim otapalima. Također, smatraju se dobrim biokatalizatorima zbog njihove enantioselektivnosti i kiralnosti aktivnog mjesta. Naime, trodimenzijska struktura lipaze se sastoji od alfa-heliksa te tvori tzv. „poklopac“ koji sprječava supstratu pristup aktivnom mjestu (Grogan, 2009).

Prednosti i nedostaci primjene biokatalizatora i enzima prema Bommariusu i Riebelu (2004) navedene su u Tablici 1. Prednosti biokatalizatora su: netoksičnost, visoki prinosi, kraće trajanje reakcije te blagi uvjeti reakcije (pH i temperature) (Bommarius i Riebel, 2004), prirodnog su podrijetla i biorazgradivi (Grogan, 2009).

Tablica 1. Prednosti i nedostaci biokatalizatora i enzima (Bommarius i Riebel, 2004)

Prednosti	Nedostaci
Visoka enantioselektivnost	Često niska specifična aktivnost
Visoka regioselektivnost	Nestabilni pri ekstremnim uvjetim temperature i pH
Transformacija u blagim uvjetima	Prikladni samo za određene reakcije
Voda je reakcijski medij	Dugo vrijeme razvoja za nove enzime

2.2. Zelena otapala

Otapala se upotrebljavaju u kemijsko-tehnološkim operacijama kao što su ekstrakcija, pročišćavanje, sušenje produkta, kao medij za odvijanje sintetskih reakcija te u analitičkim metodama. Njihova primjena je neizbježna u kemijskoj i biotehnološkoj industriji. Nedostaci hlapljivih organskih otapala su toksičnost, zapaljivost i korozivnost, a za regeneraciju i ponovnu uporabu istih potrebna je energetski zahtjevna destilacija uz velike gubitke i onečišćenja. Zbog činjenice da organska otapala obuhvaćaju gotovo 60% svih industrijskih emisija i 30 % emisija hlapljivih spojeva te njihovih brojnih štetnih učinaka na okoliš i ljude, javila se potreba za zamjenom istih te istraživanjem i razvojem novih alternativnih otapala. Razvoj alternativnih odnosno zelenih otapala je u skladu s načelima zelene kemije, koju je 1991. razvio kemičar P.T. Anastas (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Prilikom osmišljavanja procesa koji odgovara načelima zelene kemije nastoji se istovremeno pridržavati čim većeg broja od svih 12 načela koja se nalaze u Tablici 2. (Jukić i sur., 2004).

Tablica 2. Načela zelene kemije (Jukić i sur., 2004)

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

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

Dakle, u skladu s načelima zelene kemije, tendencija akademske zajednice i industrije je da se otapala dobivena iz nafte zamijene s otapalima iz obnovljivih izvora koja su prihvatljivija za okoliš ili s otapalima s manje štetnim utjecajem na okoliš i na ljude. Također, otapala moraju osiguravati sigurnost procesa u kojima se koriste, odnosno moraju imati povoljan tzv. EHS faktor (engl. *Environment, Health and Safety factor*). Vrlo važan faktor prilikom izbora otapala je i njegova cijena.

Uzevši u obzir sve prije spomenute faktore izbora zelenog otapala, voda se zbog svoje dostupnosti, netoksičnosti, prihvatljive cijene i nezapaljivosti smatra dobrim izborom otapala. Unatoč tome, slaba topljivost mnogih organskih i organometalnih spojeva u vodi, visoko talište i visoka molarna entalpija isparavanja su ograničavajući faktori primjene vode kao otapala. Unatrag 20 godina znanstvenici rade na istraživanju i razvoju drugih ekološki prihvatljivih i neškodljivih otapala, među kojima se ističu ionske kapljevine, superkritični i subkritični fluidi, fluorirana otapala te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora kao što su primjerice niskotemperaturna eutektička otapala (Radović i sur., 2021).

Ionske kapljevine sastavljene su od organskih kationa s kompatibilnim anionom. U usporedbi s organskim otapalima, ionske kapljevine imaju niski tlak pare te imaju širok raspon toplinske stabilnosti u tekućem stanju te se koriste za formiranje dvofaznog sustava s mnogim otapalima (Kragl, 2002). Osim toga, karakterizira ih nezapaljivost i neznatna hlapljivost što ih čini dobrim alternativnim otapalima u organskoj i organometalnoj sintezi (Olivier-Bobrigou i Magna, 2002). Budući da posjeduju sposobnost otapanja velikog broja različitih spojeva kao što su soli, lipidi, proteini, aminokiseline, površinski aktivne tvari, šećera, polisaharida i organskih otapala primjenjuju se u ekstrakciji i separaciji biološki važnih komponenata (Cvjetko, 2012).

Jedan od najčešće korištenih superkritičnih fluida je CO₂ zbog svoje lake dostupnosti, nezapaljivosti, netoksičnosti i neškodljivosti za okoliš, a uz to se i lako odvaja od produkata reakcije. Također, pozitivne karakteristike superkritičnog CO₂ su niska površinska napetost, niska viskoznost i visoki koeficijent difuzije. Superkritični CO₂ se miješa sa svim plinovima što je idealno za reakcije s plinovitim reaktantima. Isto tako, primjena CO₂ kao otapala povećava brzinu kemijske reakcije, produžuje djelovanje katalizatora te omogućuje

podešavanje selektivnosti produkta. Unatoč svim dobrim karakteristikama CO₂ kao otapala, glavni nedostatak primjene su visoka kapitalna ulaganja u skupu opremu za provođenje reakcija (Tanchoux i Leitner, 2002).

2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

Kao što je prije navedeno niskotemperaturna eutektička otapala spadaju u skupinu zelenih otapala. Prema Paivi i sur. (2014), eutektičko otapalo (engl. *Deep Eutectic Solvent*, DES) jest homogena smjesa dviju ili više krutih komponenata koje u određenom molarnom omjeru postižu niže talište nego pojedinačne komponente smjese. Uzrok sniženja tališta (Tt) je delokalizacija naboja uslijed formiranja intermolekulskih interakcija poput vodikovih, ionskih te van der Waalsovih veza te pritom kruta homogena smjesa postaje kapljevina. Kod niskotemperaturnih eutektičkih otapala dolazi do znatnog sniženja temperature talište pri čemu su takva otapala kapljevine pri sobnoj temperaturi.

Opća formula niskotemperaturnih eutektičkih otapala je Cat^+X^-zY . Cat^+ se odnosi na amonijev, sulfonijev ili fosfonijev kation, a X^- je Lewisova baza. Cat^+X^- zajedno tvore akceptor vodikove veze (engl. *hydrogen bond acceptor*, HBA). Lewisova ili Brønstedova kiselina (Y) je donor vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor*, HBD) koja tvori "kompleks" s X^- . U općoj formuli z se odnosi na broj molekula koje stupaju u interakciju. Niskotemperaturna eutektička otapala su prema strukturi podijeljena u 4 različita tipa :

- tip I (kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe)
- tip II (kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Cr, Co, Fe)
- tip III (kvaterna sol Cat^+X^- i donor vodikove veze poput amida, kiseline i alkohola)
- tip IV (halogenid metala i donor vodikove veze poput amida i alkohola) (Smith i sur., 2014).

Eutektička otapala najčešće se pripremaju miješanjem akceptora i donora vodikove veze koji su u krutom stanju u određenom molarnom omjeru pri temperaturi od 50 do 60 °C uz neprestano miješanje do trenutka nastanka kapljevite homogene smjese (Aroso i sur., 2015)

Što se tiče fizikalno-kemijskih svojstava tih otapala poput temperature tališta, viskoznosti, gustoće, ona ponajprije ovise o strukturi komponenata koje tvore pojedino otapalo, ali i njihovom molarnom odnosu. Otapala koja se najčešće koriste imaju talište ispod 50 °C pa se mogu upotrebljavati pri sobnoj temperaturi. (Paiva i sur., 2014). Gustoća niskotemperaturnih eutektičkih otapala je uglavnom veća od vode i organskih otapala. Većina otapala ima gustoću

u rasponu $\rho = 1,1 - 1,4 \text{ g cm}^{-3}$. Isto tako, većina otapala pokazuje prilično visoke vrijednosti viskoznosti u rasponu $\eta = 0,02 - 0,5 \text{ Pas}$ pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Struktura sirovina iz kojih se pripremaju otapala, njihov molarni omjer i temperatura imaju utjecaj na spomenute fizikalno-kemijske karakteristike. Primjerice, otapala koji se pripremaju na bazi kolin klorida sa šećerom kao donatorom vodikove veze su najviskozija, za razliku od onih na bazi poliola, koja su najmanje gusta i viskozna (Cvjetko Bubalo i sur., 2016 i Toledo i sur., 2019). Važno svojstvo niskotemperaturnih eutektičkih otapala jest njihova polarnost koja također ovisi o strukturi sirovina iz kojih je pripremljeno otapalo. Najviše se upotrebljavaju polarna otapala pri čemu su otapala na bazi organskih kiselina najpolarnija, dok su ona na bazi šećera i poliola najmanje polarna. Bitno je napomenuti da su u dosadašnjoj literaturi najviše istražena polarna otapala, no u posljednje vrijeme istražuju se i otapala hidrofobnog karaktera (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Niskotemperaturna eutektička otapala smatraju se tzv. dizajniranim otapalima budući da se izborom njihovih komponenata i njihovih molarnih omjera mogu mijenjati karakteristike otapala i poboljšati uspješnost primjene (Radović i sur., 2021).

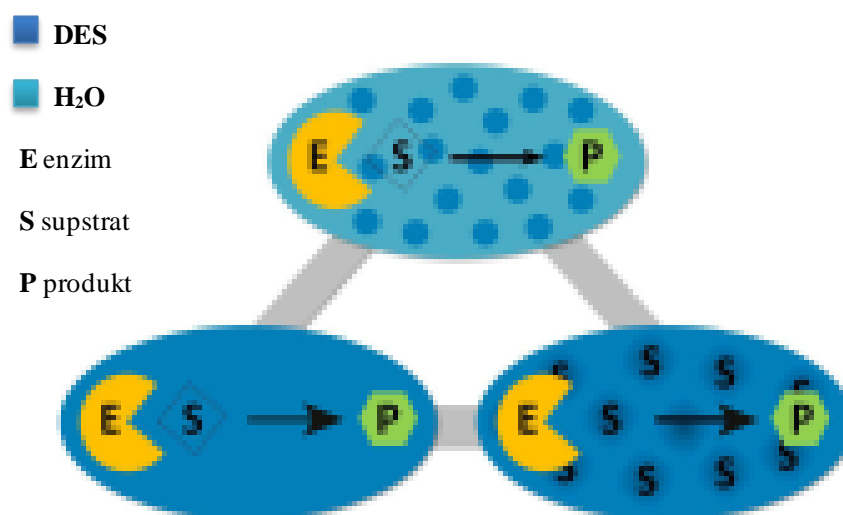
Potencijal za industrijsku primjenu hidrofobnih DES-ova postoji, no potrebna su određena poboljšanja. Prvo poboljšanje odnosi se na korištenje prirodnijih komponenata za pripremu hidrofobnih DES-ova (Osch i sur., 2019). Prema istraživanju van Oscha i suradnika iz 2019., jedan od načina je korištenje prirodnih komponenata kao što su terpeni. Isto tako, ističu da su potrebna detaljnija istraživanja toksičnosti istih. Kao drugi problem navode održivost hidrofobnih DES-ova. Ukoliko je hidrofobno otapalo previše viskozno ili je razlika između gustoće DES-a i vode premala, teško ih je odvojiti čime dolazi do velikog utroška energije. Dakle, potrebno je da viskoznost DES-ova bude što manja, a razlika između gustoće DES-a i vode što veća kako bi se olakšala njihova separacija odnosno odvajanje.

Neznatna hlapljivost, nezapaljivost, biorazgradivost i niska toksičnost su svojstva koja niskotemperaturna eutektička otapala čine učinkovitim u mnogim područjima primjene (Martins i sur., 2019). Također, priprematih otapala odvija se jednostavno i pri blagim uvjetima bez korištenja dodatnih otapala, pomoćnih tvari ili katalizatora. Tijekom pripreme ne dolazi do nastajanja nusproizvoda i otpada što je u skladu sa smjernicama zelene kemije (Zhao i sur., 2015). Cijena tih otapala je usporediva s organskim otapalima, relativno su jeftina, a trošak pripreme istih je u rasponu od 10 do 140 €/L (Sheldon, 2015). Činjenica da su eutektička otapala jeftina, jednostavna za pripremu te niske razine toksičnosti, dovodi do pretpostavke da bi se ista mogla koristiti u različitim industrijama poput farmaceutske, kozmetičke i agrokemijske (Panić, 2020). Sva prethodno navedena svojstva čine niskotemperaturna eutektička otapala dobrom

zamjenom za organska otapala te se mogu smatrati zelenim otapalima budući da odgovaraju smjernicama zelene kemije.

2.2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biotransformacijama

Poznato je da neki enzimi mogu biti aktivni i stabilni u nevodenom mediju te se zbog toga kao medij u biokatalitičkim reakcijama mogu primjenjivati hidrofobna otapala, superkritični fluidi i ionske kapljevine (Panić i sur., 2020). Također, u posljednjih desetak godina sve intenzivnije se istražuju DES-ovi kao medij za biokatalitičke reakcije. Komponente DES-ova su uglavnom primarni metaboliti, organske kiseline, aminokiseline i derivati kolina koji osiguravaju enzimima njihovo prirodno okruženje (Choi i sur., 2011). Martins i suradnici (2019) ističu da se niskotemperaturna eutektička otapala zbog svojih svojstva sve više primjenjuju različitim područjima poput kemijske sinteze, elektrokemije, (bio)katalize, izrade nanometarijala, biomedicini i dr. Kao što je već spomenuto, DES-ovi su netoksične, nezapaljive i biorazgradive tekućine. Velik broj enzima i mikrobnih stanica može se primjenjivati u biotransformacijama u DES-ovima. Najviše se koriste lipazom katalizirane reakcije u sintezi estera ili transesterifikacije u kojima je DES otapalo, ko-otapalo ili čak otapalo i supstrat u jednom (Slika 1). Osim u spomenutim reakcijama, DES-ovi se mogu primjenjivati u reakcijama dehalogenacije, hidrolize epoksidnih veza, sinteze peptida, oksidacije, peroksidacije i formiranja C-C veza (Pätzold i sur., 2019).



Slika 1. Različiti principi primjene DES-ova u biotransformacijama (Pätzold i sur., 2019)

Prilikom provođenja lipazom kataliziranih reakcija u eutektičkom otapalu kao reakcijskom mediju, važno je razumjeti interakcije koje se odvijaju u tom mediju kako bi efikasnost reakcije

bila što veća. Izbor odgovarajućeg eutektičkog otapala za pojedinu reakciju nije jednostavan proces. Potrebno je uzeti u obzir nuspojave s komponentama otapala te zbog toga izbjegavati komponente otapala koja su kemijski slična supstratu. Isto tako, enzimska aktivnost i stabilnost nije predvidljiva, a eksperimenti pokušaja i pogrešaka su neizbježni u izboru odgovarajućeg otapala. Unatoč tome što se za pojedino eutektičko otapalo može suziti opseg supstrata i različitih enzima koji se mogu koristiti za provođenje reakcije, eutektička otapala pokazuju prednosti u brojnim primjenama. Primjerice, eutektička otapala su kompatibilni reakcijski medij u proizvodnji biodizela zbog svoje niske cijene te blagih reakcijskih uvjeta (Pätzold i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Materijali

3.1.1.1. Kemikalije

- Arapska guma
- Destilirana voda
- Heptan, CARLO ERBA Reagents S.A.S., Val de Reuil, Italija
- Izopropanol, Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka
- Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH=7), pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije
- Laurinska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Oktanska kiselina, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
- *p*-nitrofenilpalmitat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- 1-hidroksitetrafenilciklopentadienil-(tetrafenil-2,4-ciklopentadien-1-on)- μ -hidrotetrakarbonildirutenij(II), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD, u nastavku rada se naziva shvo katalizator
- Timol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Triton X, AppliChem, Darmstadt, Njemačka
- (*R,S*)-1-feniletil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R,S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Vinil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.1.2. Enzimi

- Novozym 435 (lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama sa sadržajem vode 1-2 w/w %), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD, u nastavku rada se koristi kratica CALB
- Lipaza AYS „Amano“ (izolirana iz *Candida cylindracea*), Amano Pharmaceutical Co., Nagoya, Japan, u nastavku rada se koristi kratica AYS
- Lipaza AS „Amano“ (izolirana iz *Aspergillus niger*), Amano Pharmaceutical Co., Nagoya, Japan, u nastavku rada se koristi kratica AS

- Lipaza G „Amano“ (izolirana iz *Penicillium camembertii*), Amano Pharmaceutical Co., Nagoya, Japan, u nastavku rada se koristi kratica G
- Lipaza AH „Amano“ (izolirana iz *Pseudomonas cepacia*), Amano Pharmaceutical Co., Nagoya, Japan, u nastavku rada se koristi kratica AH

3.1.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator-IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica Železniki, Slovenija
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s UV-Diode Array detektorom, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD

3.1.2. Metode rada

3.1.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

Prirodna eutektička otapala sintetizirana su dodatkom izračunate količine komponenata prema molarnim omjerima (Tablica 3.) u epruveti. Epruveta je stavljena na miješalicu pri temperaturi od 50 °C tijekom pola sata dok nije nastala homogena i viskozna tekućina. Otapala su zatim skladištena na sobnoj temperaturi do provođenja biokatalitičkih reakcija.

Tablica 3. Pripravljena prirodna eutektička otapala

Prirodno eutektičko otapalo	Kratica	Molarni omjer
Timol:oktanska kiselina	Ty:C8	1:3
Oktanska kiselina:laurinska kiselina	C8:C12	1:1

3.1.2.2. Određivanje aktivnosti lipaza

Za određivanje aktivnosti različitih lipaza provedena je reakcija hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u *p*-nitrofeniletanol prema radu Čanak i sur. iz 2016. Priređena je otopina supstrata koja se

sastoji od 9 mL kalij-fosfatnog pufera, 1 mL otopine *p*-nitrofenilpalmitata u izopropanolu (10 mg mL⁻¹), 11 mg arapske gume i 44 mg Triton X. Za pojedinu reakciju koristi se jedna od sljedećih pet lipaza: lipaza B izolirana iz *Candida antarctica*, (CALB), lipaza G „Amano“ izolirana iz *Penicillium camembertii* (G), Lipaza AS „Amano“ izolirana iz *Aspergillus niger* (AS), lipaza AYS „Amano“ izolirana iz *Candida cylindracea* (AYS) i lipaza AH „Amano“ izolirana iz *Pseudomonas cepacia* (AH). U Eppendorf epruvete stavi se 0,4 mL otopine pojedinog enzima u puferu i 0,1 mL kalij-fosfatnog pufera. Reakcija započinje dodatkom 0,5 mL supstrata te se reakcija provodi 30 minuta pri 30 °C i 1000 o min⁻¹ na Eppendorf mješaču. Uzorkuje se svakih 10 minuta tako da se u plastične kivete stavlja 800 µL reakcijske smjese iz Eppendorf epruveta. Određivanje aktivnosti 10 različitih lipaza izoliranih iz mikroorganizama provodi se na UV-VIS spektrofotometru mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 410 nm svakih 10 minuta kroz vremenski period od 30 minuta.

Izrada baždarnog dijagrama

Prirede se otopine *p*-nitrofenola u acetonitrilu tako da koncentracije redom iznose 7,2; 5,8;3,6;1,8 mmol L⁻¹. Izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 410 nm nanesu se na ordinatu, a na apscisu se nanesu pripadajuće vrijednosti koncentracija *p*-nitrofenola. Pomoću računala se izradi dijagram ovisnosti molarne koncentracije *p*-nitrofenola o apsorbanciji pri 410 nm te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunaju nepoznate molarne koncentracije *p*-nitrofeniletanola u uzorcima.

3.1.2.3. Određivanje aktivnosti lipaza u niskotemperaturnim eutektičkim hidrofobnim otapalima

Enantioselektivna kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola s vinil acetatom koju kataliziraju pojedine lipaze odabrane na temelju rezultata iz poglavlja 3.1.2.2. Reakcija lipazom katalizirane enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola provedena je prema radu Stradomska i sur. iz 2021. U reakcijsku smjesu dodaje se 1000 µL otapala (heptan ili prirodno eutektičko otapalo Ty:C8 ili C12:C8), 6 µL supstrata (*R,S*)-1-feniletanola, 13,91 µL supstrata vinil acetata, 1 mg pojedine lipaze i 10 µL vode. Za pojedinu reakciju koristi se jedna od sljedećih pet lipaza: lipaza B izolirana iz *Candida antarctica*, (CALB), lipaza G „Amano“ izolirana iz *Penicillium camembertii* (G), Lipaza AS „Amano“ izolirana iz *Aspergillus niger* (AS), lipaza AYS „Amano“ izolirana iz *Candida cylindracea* (AYS) i lipaza AH „Amano“ izolirana iz *Pseudomonas cepacia* (AH). Reakcija se provodi 30 minuta pri 25 °C na Eppendorf mješaču pri 1000 o min⁻¹.

Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletil-acetata provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-Diode Array detektorom.

Priprema otopine standarda

Priređena su razrjeđenja (*R,S*)-1-feniletil-acetata (6,1;3,0;1,5;0,8;0,08 mmol L⁻¹) u mobilnoj fazi A. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskih pikova nanesu se na ordinatu, a na apscisu pripadajuće vrijednosti molarnih koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata. Iz ovisnosti površine kromatografskih pikova o molarnoj koncentraciji standarda izrađen je baždami dijagram i izračunata pripadajuća jednadžba pravca. Identifikacija i kvantifikacija provedena je metodom baždarnog dijagrama.

Kromatografski uvjeti

Kolona: Phenomenex Lux Cellulose-3, LC Column, 250 × 4,6 mm, 5 μm

Pokretna faza: A – 80 % (v/v) heksan

B - izopropanol

Injektirani volumen: 5 μL

Temperatura injektiranja: 4 °C

Protok: 1 mL min⁻¹

Temperatura kolone: 25 °C

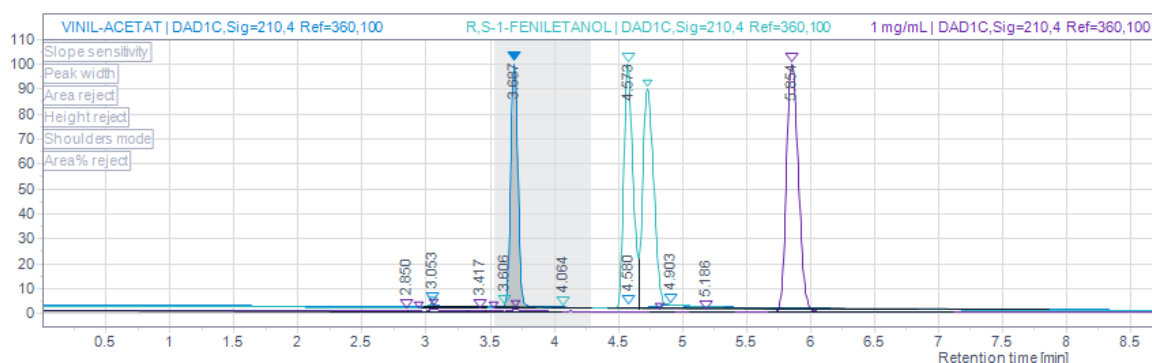
Vrijeme analize: 15 min

Detektor: UV – Diode Array (λ = 210 nm)

Identifikacija i kvantifikacija

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (*R_t*) s vremenima zadržavanja standarda te usporedbom UV-spektara.

Retencijsko vrijeme (*R_t*) za vinil-acetat iznosi 3,687, (*R_t*) za (*R*)-1-feniletanol iznosi 4,573 (*R_t*) za (*S*)-1-feniletanol iznosi 4,7 min, (*R_t*) za (*R,S*)-1-feniletil-acetat iznosi 5,854 min (Slika 2).

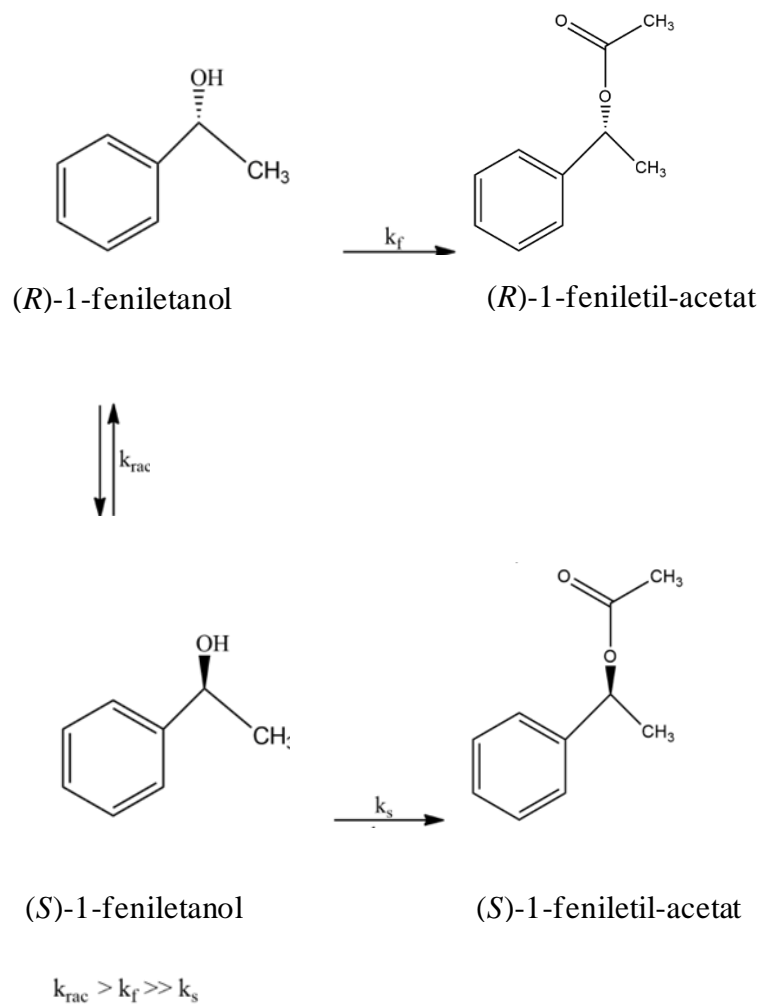


Slika 2. Prikaz tipičnog tekućinskog kromatograma enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola katalizirane lipazom

3.1.2.4. Lipazom katalizirana kinetička i dinamička kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola

Enantioselektivna kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola s vinil acetatom koju katalizira imobilizirana lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* provodi se u heptanu kao referentnom otapalu. Reakcija enantioselektivne, lipazom katalizirane esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola provedena je prema radu Stradomska i sur. (2021). U tikvicu s okruglim dnom stavlja se 30 μL (*R,S*)-1-feniletanola, 69,5 μL vinil acetata, 5 mg lipaze CALB i 5 mL otapala (heptan ili Ty:C8). Reakcija se provodi pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje, tijekom reakcije praćen je kroz vrijeme. Uzorkovanje je provedeno nakon 24 h. Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletanola provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-Diode Array detektorom uz iste kromatografske uvjete opisane u poglavlju 3.1.2.3.

Dinamička kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola s vinil acetatom koja je katalizirana imobiliziranim lipazom B koja je izolirana iz kvasca *Candida antarctica* provodi se u heptanu kao referentnom otapalu (Slika 3). Reakcija enantioselektivne, lipazom katalizirane esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola provedena je prema radu Stradomska i sur. (2021.). U tikvicu s okruglim dnom kako je prikazano na slici 4. stavlja se 30 μL (*R,S*)-1-feniletanola, 69,5 μL vinil acetata, 5 mg lipaze CALB, 5 mL otapala (heptan ili Ty:C8) te 5 mg shvo katalizatora. Reakcija se provodi pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje te je reakcija praćena kroz vrijeme. Uzorkovanje je provedeno nakon 24 h. Alikvot iz reakcijske smjese analiziran je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-Diode Array detektorom uz iste kromatografske uvjete opisane u poglavlju 3.1.2.3.



Slika 3. Lipazom katalizirana dinamička kinetička rezolucija (R , S)-1-feniletanola



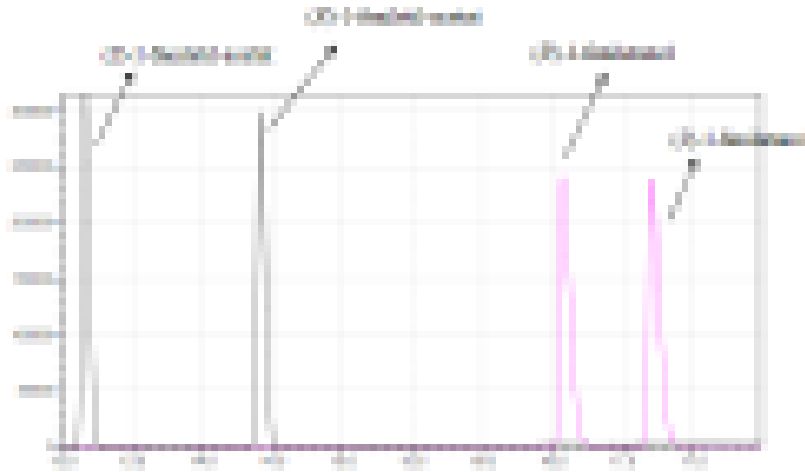
Slika 4. Aparatura za provođenje reakcije dinamičke kinetičke rezolucije i kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola (vlastita fotografija)

Uzorkovanje je provedeno nakon 15, 30 i 60 minuta te nakon 19 i 22 h. Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletil-acetata u heptanu provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom (GC-MS).

Kromatografski uvjeti:

- Kromatografska kolona: Varian CHIRASIL-DEX CB(25 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
- Pokretna faza: He
- Protok: 56,3 mL min⁻¹
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone: $T_1=80\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), $T_2=140\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta t=5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$)
- Vrijeme trajanja analize: 21 min

Retencijsko vrijeme (R_t) za (*S*)-1-feniletil-acetat iznosi 13,2 min, (R_t) za (*R*)-1-feniletil-acetat iznosi 14,4 min, (R_t) za (*R*)-1-feniletanol iznosi 16,7 min, (R_t) za (*S*)-1-feniletanol iznosi 17,3 min (Slika 5).



Slika 5. Prikaz tipičnog plinskog kromatograma enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola katalizirane lipazom

3.1.2.5. Analiza rezultata

Kako bi se međusobno usporedila aktivnost različitih lipaza prema metodologiji u poglavlju 3.1.2.2. računa se početna brzina reakcije (A).

Početna brzina reakcije A ($\text{mmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) računa se prema jednadžbi:

$$A = \frac{ap}{t} \quad [1]$$

ap - nagib (mmol L^{-1})

t -vrijeme trajanja procesa (min).

Kako bi se usporedila aktivnost pojedinih lipaza u ispitivanim hDES-ovima u poglavlju 3.1.2.3. i 3.1.2.4., izračuna se konverzija procesa esterifikacije (X), enantiomerni višak (ee) prema jednadžbama [2] i [3], volumetrijska produktivnost esterifikacije (V_p) i specifična produktivnost enzima (V_E) prema jednadžbama [4] i [5]. Kako bi se međusobno usporedila uspješnost esterifikacije bez i s dodatkom shvo katalizatora u poglavlju 3.1.2.4., za pojedinu reakciju se također izračuna konverzija procesa esterifikacije, enantiomerni višak te volumetrijska i specifična produktivnost esterifikacije prema danim jednadžbama.

Konverzija procesa esterifikacije X (%) računa se prema jednadžbi:

$$X = \frac{c_A}{c_{AT}} * 100 \quad [2]$$

c_A - izmjerena koncentraciju estera (mol L^{-1})

c_{AT} -teoretski moguća koncentracija estera (mol L^{-1}).

Enantiomerni višak ee (%) računa se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(R_{1\text{-feniletil-acetat}} - S_{1\text{-feniletil-acetat}})}{R_{1\text{-feniletil-acetat}} + S_{1\text{-feniletil-acetat}}} * 100 \quad [3]$$

$R_{1\text{-feniletil-acetat}}$ - površina ispod pika (R)-1-feniletil-acetata

$S_{1\text{-feniletil-acetat}}$ - površina ispod pika (S)-1-feniletil-acetata.

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

$$V_P = \frac{c_A - c_{A1}}{t} \quad [4]$$

c_A -molarna koncentracija estera (mol L^{-1}) na kraju procesa

c_{A1} -početna molarna koncentracija estera (mol L^{-1})

t -vrijeme trajanja procesa (min).

Specifična produktivnost enzima V_E ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) računa se prema jednadžbi:

$$V_E = \frac{n_{p2} - n_{p1}}{m_E * t} \quad [5]$$

n_{p1} -početna množina estera (μmol)

n_{p2} -množina estera na kraju procesa (μmol)

m_E -masa pripravka enzima (mg)

t -vrijeme trajanja procesa (min).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Biotransformacije su transformacije supstrata u konačni produkt pomoću mikrobnih stanica ili enzima (Groganu, 2009). Jedna od primjena biotransformacija u sintetskoj kemiji je proizvodnja čistih enantiomera. Primjena enzima kao katalizatora, za razliku od organometalnih katalizatora, pokazuje veću enantioselektivnost i bolju stereoselektivnost te ekološku prihvatljivost (Cheng i sur., 1996). Primjena enzima ima prednost pred klasičnim reakcijama u sintetskoj kemiji. Biokatalitičke reakcije se nastoje provoditi u vodenim medijima, ali takav reakcijski medij ima brojne nedostatke. Upotreba organskih otapala kao reakcijskih medija ima znatne prednosti: bolje iskorištenje reakcija, lakše uklanjanje otapala zbog niže točke vrelišta, deaktivacija i/ili inhibicija supstrata/produkta je manja, nusreakcije poput hidrolize su suprimirane te manja mogućnost denaturacije enzima. Cilj zelene kemije je zamjeniti štetna organska otapala i doprinijeti redukciji CO₂ emisije. Jedno od potencijalnih otapala za zamjenu organskih otapala, koja su pokazala izraziti potencijal s ekološkog i ekonomskog pogleda, su niskotemperaturna eutektička otapala.

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala za esterifikaciju kiralnog alkohola (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata, kojom je dobiven enantiomer (*R*)-1-feniletil-acetat. Najprije je ispitana aktivnost lipaza (CALB, AYS, AS, G, AH) u niskotemperaturnim hidrofobnim eutektičkim otapalima (hDES), te mogućnost korištenja hDES u enantioselektivnoj esterifikaciji (*R,S*)-1-feniletanola uz primjenu lipaze CALB kao biokatalizatora. Na kraju provedena je i dinamička kinetička rezolucija kako bi se povećalo iskorištenje reakcije esterifikacije.

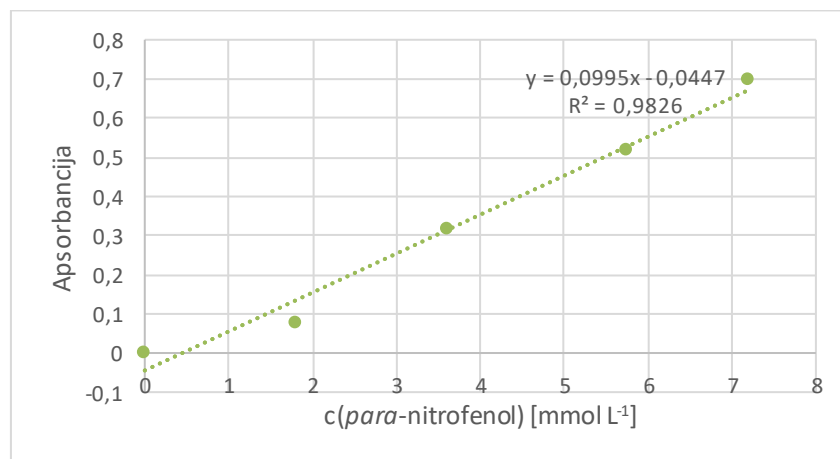
4.1. Sinteza niskotemperaturnih eutektičkih otapala

U svrhu rada pripremljena su odgovarajuća hidrofobna eutektička otapala klasičnim postupcima kemijske sinteze. Priprava eutektičkih otapala provodi se jednostavnim postupkom u kojem se odgovarajuće polazne sirovine pomiješaju u određenim molarnim omjerima (Tablica 3.) te se kontinuirano zagrijavaju na tresilici dok se ne dobije homogena viskozna tekućina. Iskorištenje sinteze je 100% što je važna pozitivna karakteristika sinteze hidrofobnih eutektičkih otapala.

4.2. Aktivnost lipaza

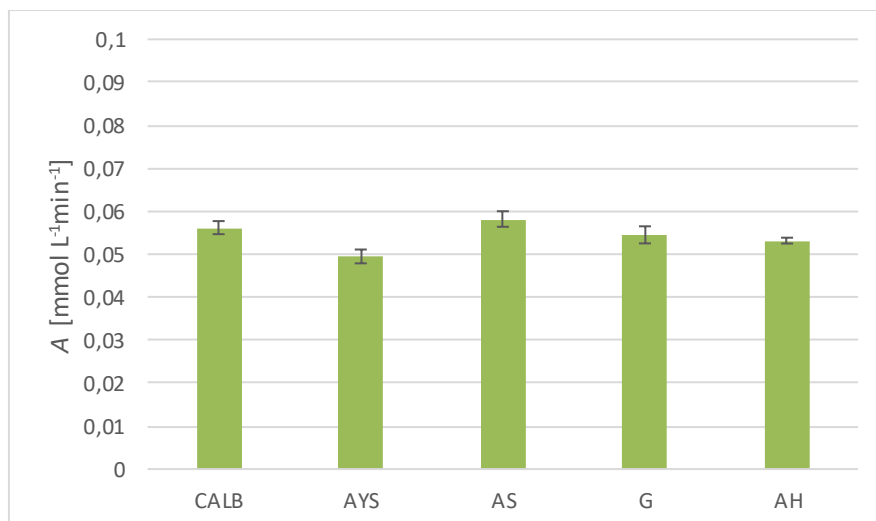
Lipaze su skupina enzima koja se široko primjenjuju u biotehnološkoj proizvodnji hrane, kemikalija, farmaceutika i u drugim industrijama (Jaeger and Eggert, 2002; Treichel i sur.,

2010). Primjenjuju se u različitim biotehnoškim procesima budući da kataliziraju reakciju transesterifikacije, sintezu estera i hidrolizu esterske veze između glicerola i masnih kiselina u gliceridima. Također, većinu lipaza karakterizira visoka specifičnost za supstrat te stereoselektivnost. Lipaze mogu biti izolirane iz velikog broja bakterija, plijesni ili kvasaca, nastanjuju različita područja te preferiraju uvjete rasta mikroorganizma producenta (Čanak i sur., 2016). U ovom radu ispitana je aktivnost lipaza iz različitih mikroorganizama (CALB, AYS, AS, G, AH) u reakciji hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u kalij-fosfatnom puferu.



Slika 6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije *p*-nitrofeniletanola

Prethodno je izrađen baždarni dijagram (Slika 6) *p*-nitrofeniletanola prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u *p*-nitrofeniletanol. Kako bi se međusobno usporedila aktivnost različitih lipaza, izračunata je inicijalna brzina reakcije hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata.



Slika 7. Inicijalna brzina reakcije hidrolize *para*-nitrofenilpalmitata katalizirane različitim lipazama u kalij-fosfatnom puferu. Reakcijski uvjeti: 10 mg mL⁻¹ *para*-nitrofenilpalmitata; 1 mg lipaze; 30 °C; 30 min.

Vrijednosti inicijalnih brzina hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata prikazane su na slici 7. pri čemu je vidljivo da su inicijalne brzine reakcija u rasponu $A = 0,05\text{--}0,06$ mmol L⁻¹ min⁻¹. Lipaze s najvećom inicijalnom brzinom reakcije su AS ($A = 0,06$ mmol L⁻¹ min⁻¹) i CALB ($A = 0,06$ mmol L⁻¹ min⁻¹).

Prema vrijednostima inicijalne brzine reakcije sve lipaze (CALB, AYS, AS, G i AH) su aktivne te su korištene dalje u radu za provođenje enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata opisane u poglavlju 3.1.2.3.

4.3. Probir niskotemperaturnih eutektičkih hidrofobnih otapala za esterifikaciju (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata

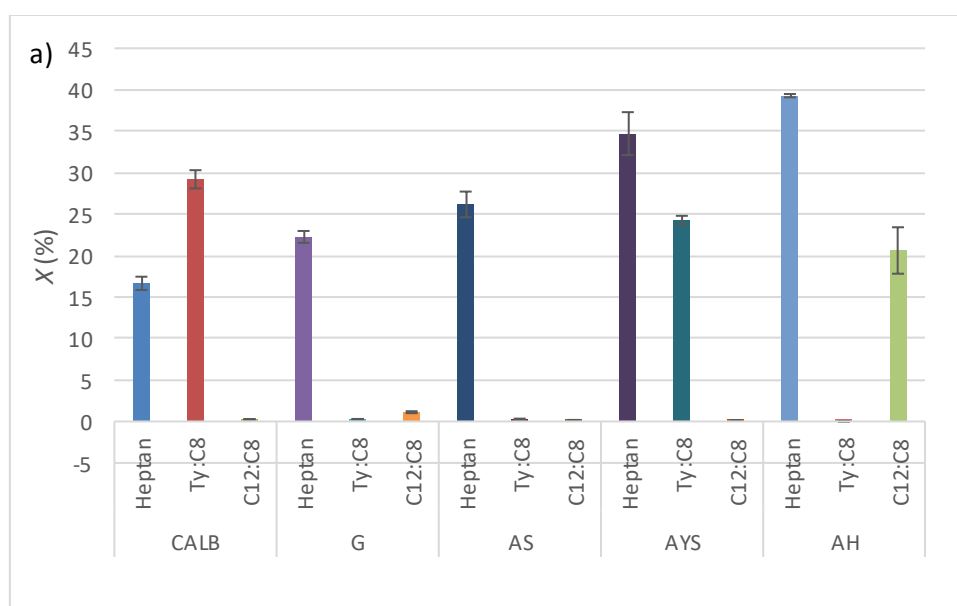
Niskotemperaturna eutektička otapala našla su primjenu i u visoko kemo-, regio- i stereoselektivnim biotransformacijama. Pogodna su za primjenu u biotransformacijama zbog zahtjeva za visokim stupnjem enantiomerne čistoće biološki aktivnih kiralnih spojeva koji se koriste u proizvodnji lijekova, poljoprivrednih i drugih kemikalija (Ai Nguyen i sur., 2006). Isto tako, karakterizira ih nezapaljivost, neznatna hlapljivost i niska toksičnost za razliku od organskih otapala, koja se i dalje široko primjenjuju u industriji. S obzirom na navedeno, posljednjih godina sve više se istražuju prirodna eutektička otapala kao potencijalna otapala u biokatalizi, kao kootapala ili reakcijski medij (Kim i sur., 2016). U ovom radu ispitana je mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala u enantioselektivnoj esterifikaciji kiralnog

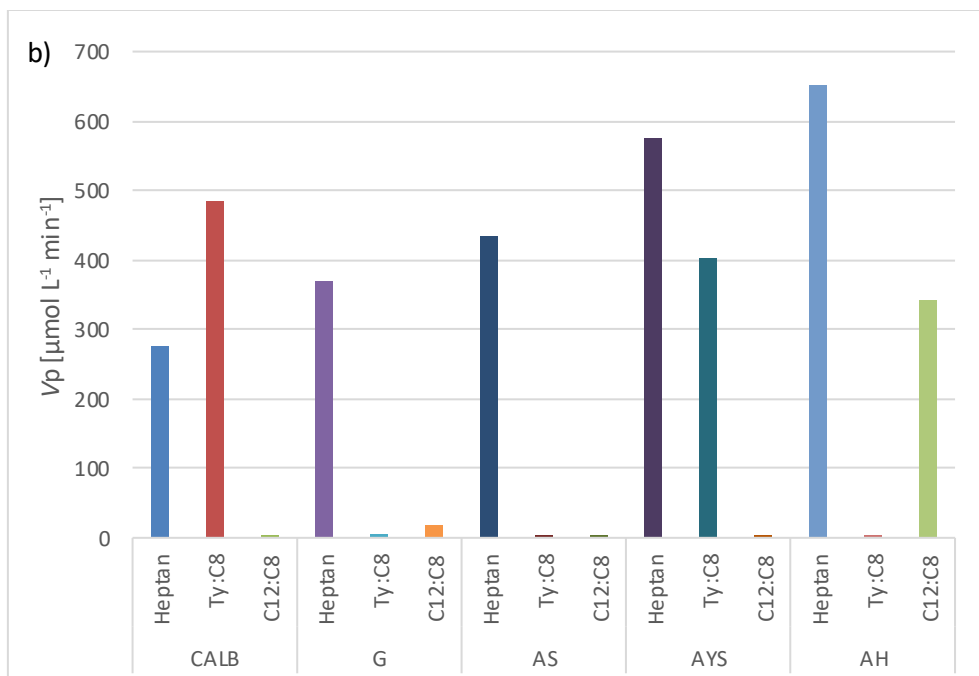
alkohola (*R,S*)-1-fenil-etanola s vinil acetatom, pri čemu jesu kao biokatalizator korištene lipaze izolirane iz različitih mikroorganizama (CALB, G, AS, AYS i AH). Kvantitativne vrijednosti (*R,S*)-1-feniletil-acetata izračunate su iz jednadžbe baždarnog pravca prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Jednadžba baždarnog pravca

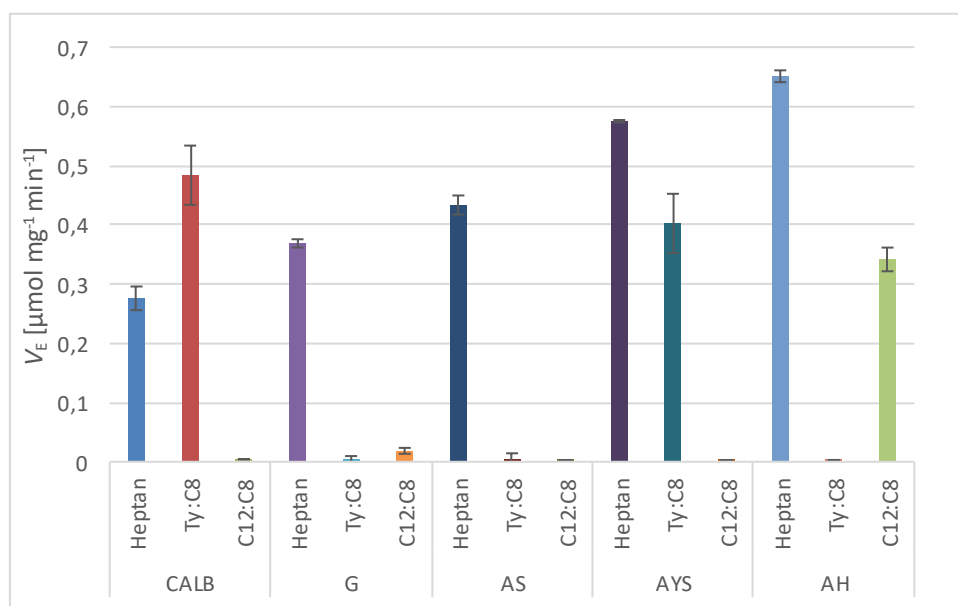
Standard	Jednadžba pravca	Koeficijent determinacije
(<i>R,S</i>)-1-feniletil-acetat	$y=2443,8x+226,78$	$R^2=0,9991$

Niskotemperaturna eutektička otapala razmatrana u ovom dijelu eksperimenata selektirana su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije (Galović, 2021). Rezultati su prikazani na slici 8. Kao konvencionalno otapalo korišteno je otapalo heptan.





c)



Slika 8. Konverzija enantioselektivne esterifikacije (a), volumetrijska produktivnost (b) i specifična produktivnost enzima (c) enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-fenil-etanola katalizirane različitim lipazama u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletanola; 1 mg lipaze; 25 °C; 30 min.

Sve ispitivane lipaze su aktivne u heptanu ($X= 16-39 \%$). U eutektičkom otapalu Ty:C8 najaktivnije su lipaze CALB ($X= 29,2 \%$) te AYS ($X= 24,3 \%$). Aktivnost ostalih lipaza je $< 5\%$. U drugom ispitivanom eutektičkom otapalu C12:C8 najaktivnije je lipaza AH ($X= 20,6 \%$) dok je aktivnost ostalih lipaza u ispitivanom otapalu $< 1 \%$. Najaktivnija lipaza u eutektičkom otapalu Ty:C8 je CALB te su u tom sustavu nastavljena daljnja istraživanja.

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti ispitivanih lipaza u organskom otapalu heptanu su u rasponu $V_p = 275,9\text{--}650,8 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. U hidrofobnom eutektičkom otapalu Ty:C8 najveću volumetrijsku produktivnost imaju lipaze CALB ($V_p = 483,7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i AYS ($V_p = 402,4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Volumetrijska produktivnost ostalih lipaza (G, AS i AH) u tom otapalu je manja od $4,3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. U drugom hidrofobnom eutektičkom otapalu C12:C8 najveću volumetrijsku produktivnost ima lipaza AH ($V_p = 341,6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) dok ostale lipaze imaju volumetrijsku produktivnost manju od $4,3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

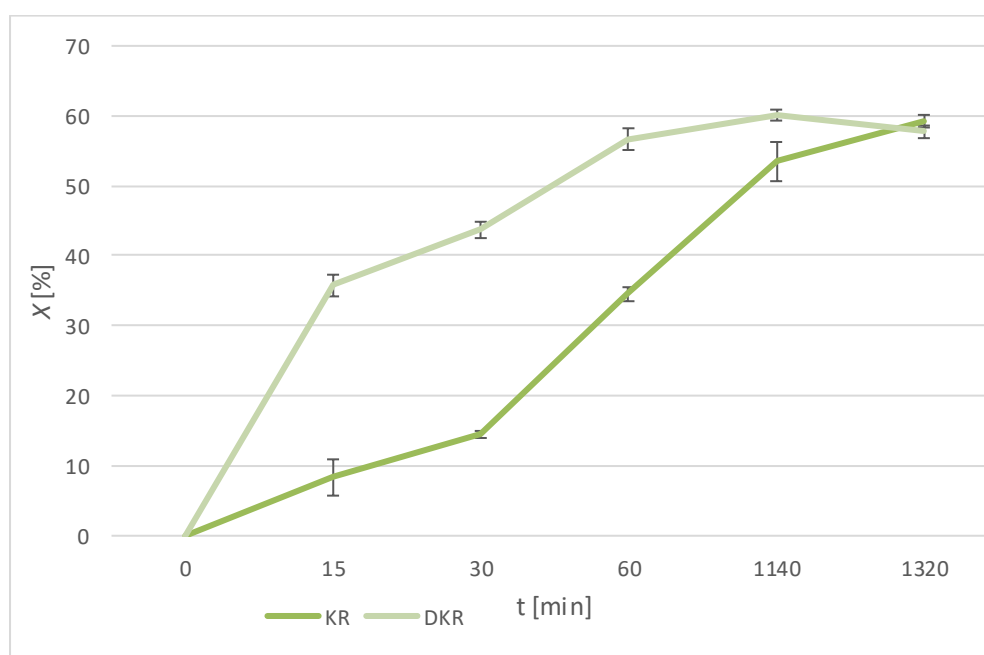
Vrijednosti specifične produktivnosti lipaza (V_E) u heptanu su u rasponu od $0,27\text{--}0,65 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. U ispitivanom eutektičkom otapalu Ty:C8 najveću specifičnu produktivnost imaju lipaze CALB ($V_E = 0,48 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i AYS ($V_E = 0,4 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Vrijednosti specifične produktivnosti drugih ispitivanih lipaza u tom otapalu je manja od $0,004 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. U drugom hidrofobnom eutektičkom otapalu C12:C8 lipaza AH ima najveću specifičnu produktivnost ($V_E = 0,34 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Ostale lipaze u tom otapalu imaju specifičnu produktivnost $< 0,02 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Sve ispitivane lipaze CALB, AYS, AS,G i AH su stereoselektivne i u svim slučajevima je *ee* (enantiomerni višak) u rasponu od 97 do 99 %.

Najveće vrijednosti pokazatelja uspješnosti enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola su u hidrofobnom eutektičkom otapalu Ty:C8 ima lipaza CALB (lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama) te je taj sustav korišten u daljnjem istraživanju. Vrijednost konverzije procesa esterifikacije iznosi $X = 29,2 \%$, volumetrijske produktivnosti ($V_p = 483,7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) te specifične produktivnosti enzima ($V_E = 0,48 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) za lipazu CALB u ispitivanom otapalu Ty:C8.

4.4. Lipazom katalizirana kinetička i dinamička kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola

Posljednjih godina povećala se svijest o važnosti kiralnosti i njezinoj povezanosti s biološkom aktivnošću spojeva koja je važna za farmaceutsku, prehrambenu i poljoprivrednu industriju te je stvorena potreba za razvojem enantiomerno čistih spojeva te smanjenjem njihovih cijena (Ahmed i sur., 2012). Jedna od važnih skupina kiralnih spojeva su kiralni sekundarni alkoholi, u koje spada (*R,S*)-1-feniletanol, koji se upotrebljava kao konzervans, boja, inhibitor apsorpcije kolesterola, kao blagi cvjetni miris i kao prekursor za sintezu enantiomerno čistih aktivnih farmaceutskih sastojaka (Stradomska i sur., 2021).

Kinetička rezolucija je reakcija tijekom koje se enantiomeri u racemičnoj smjesi prevode u odgovarajuće produkte različitim brzinama te se smatra jednom od najčešćih metoda dobivanja kiralnih spojeva (Pellissier, 2011). Unatoč njenim pozitivnim karakteristikama, primjena kinetičke rezolucije je ograničena u industrijskom mjerilu zbog maksimalnog teorijskog prinosa reakcije koji iznosi tek 50 %. Zbog toga je razvijena dinamička kinetička rezolucija koja uključuje prevođenje jednog od enantiomera u odgovarajući proizvod uz dodatan korak *in situ* racemizacije zaostalog, neizreagiranog enantiomera. Dakle, primjenom dinamičke kinetičke rezolucije moguće je dobiti enantiomerno čisti spoj uz 100 %-tni teorijski prinos reakcije (Humphrey i sur., 2014; Ahmed i sur., 2012).



Slika 9. Konverzija kinetičke i dinamičke kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletanola; 5 mg lipaze; 25°C; 22 h.

Na temelju vrijednosti konverzije kinetičke i dinamičke kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola u heptanu dobivenih na temelju rezultata analize pomoću GC-MS uređaja, izrađen je dijagram ovisnosti konverzije za kinetičku i dinamičku rezoluciju (*R,S*)-1-feniletanola kroz vrijeme (Slika 9). Iz dijagrama je vidljivo da se vrijednost konverzije i kinetičke i dinamičke kinetičke rezolucije kontinuirano povećava kroz vrijeme. Vrijednost konverzije kinetičke rezolucije je u rasponu $\eta = 8,3$ -59,2 %. Početna vrijednost konverzije dinamičke kinetičke rezolucije ($\eta = 35,8$ %) je znatno veća od početne vrijednosti kinetičke rezolucije ($\eta = 8,3$ %). Maksimalna vrijednost konverzije dinamičke kinetičke rezolucije iznosi $\eta = 60,1$ % te je postignuta u 1320. minuti.

Nakon provedene kinetičke i dinamičke kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola te analize na HPLC-u izračunate su vrijednosti konverzije procesa esterifikacije (*X*), enantiomerni višak reakcije (*ee*), volumetrijska produktivnost esterifikacije (V_P) i specifična produktivnost enzima (V_E) u 1140.-oj minuti. U tablicama 5 i 6 prikazani su svi rezultati izračunatih vrijednosti za ispitivana otapala heptan te Ty:C8.

Tablica 5. Prikaz rezultata kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola

otapalo	<i>X</i> (%)	<i>ee</i> (%)	V_P (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	V_E (μmol mg ⁻¹ min ⁻¹)
heptan	42,06±1,5	97-99±1,2	0,01±0,0056	0,003±0,0003
Ty:C8	32,32±0,5	97-99±1,6	0,01±0,009	0,002±0,0001

*Kratice: timol:oktanska kiselina (Ty:C8), enantiomerni višak (*ee*), konverzija procesa esterifikacije (*X*), volumetrijska produktivnost esterifikacije (V_P), specifična produktivnost enzima (V_E)

Konverzija procesa esterifikacije (*X*) za kinetičku rezoluciju u heptanu iznosi 42,06 % dok je u ispitivanom eutektičkom otapalu Ty:C8 nešto niža te iznosi *X*= 32,32 %. Kao što je već spomenuto, lipaza CALB je stereoselektivna te je enantiomerni višak u oba otapala u rasponu *ee*= 97-99 %. Volumetrijska produktivnost (V_P) u organskom otapalu heptanu iznosi 0,01 mmol L⁻¹ min⁻¹ dok je u Ty:C8 0,01 mmol L⁻¹ min⁻¹. Vrijednost specifične produktivnosti enzima (V_E) je u heptanu (V_E = 0,003 μmol mg⁻¹ min⁻¹) također nešto viša od one u Ty:C8 (V_E = 0,002 μmol mg⁻¹ min⁻¹).

Tablica 6. Prikaz rezultata dinamičke kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola

otapalo	<i>X</i> (%)	<i>ee</i> (%)	V_P (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	V_E (μmol mg ⁻¹ min ⁻¹)
heptan	33,23±2,8	97-99±2,5	0,01±0,003	0,003±0,00012
Ty:C8	26,99±2,2	97-99±1,3	0,01±0,0015	0,002±0,0004

*Kratice: timol:oktanska kiselina (Ty:C8), enantiomerni višak (*ee*), konverzija procesa esterifikacije (*X*), volumetrijska produktivnost esterifikacije (V_P), specifična produktivnost enzima (V_E)

Konverzija procesa esterifikacije (*X*) za dinamičku kinetičku rezoluciju u heptanu (*X*= 33,23 %) je viša od one u hidrofobnom eutektičkom otapalu Ty:C8 (*X*= 26,99 %). Lipaza CALB je stereoselektivna biokatalizator te je enantiomerni višak u oba otapala u rasponu *ee*= 97-99 %.

Volumetrijska produktivnost (V_P) u heptanu iznosi $0,01 \text{ mmol L}^{-1}\text{min}^{-1}$ dok je u ispitivanom otapalu Ty:C8 $0,009 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Vrijednost specifične produktivnosti enzima (V_E) je u heptanu ($V_E = 0,002 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) također nešto viša od one u Ty:C8 ($V_E = 0, 0,001 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$).

Na ovaj način ispitana je mogućnost primjene hDES u enantioselektivnoj redukciji (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata uz primjenu lipaze CALB kao biokatalizatora. Rezultati su pokazali da se reakcije kinetičke i dinamičke kinetičke rezolucije mogu provoditi u hDES-u Ty:C8, no vrijednosti konverzije procesa esterifikacije (η), volumetrijska produktivnost esterifikacije (V_P) i specifična produktivnost enzima (V_E) su nešto niže u usporedbi s organskim otapalom heptanom. Također, uvođenjem metalnog shvo katalizatora, nije potaknuta racemizacija i iskorištenje je ostalo isto.

U radu Stradomske i sur. iz 2021. proveden je eksperiment za dvije vrste estera: alkil (etil i izopropil) i enol (vinil i izopropil) acetate te su kao katalizatori korišteni Novozym 435 i CALB imobiliziran na silicij dioksidu modificiranom metilnim skupinama (MCF-3.0Me), a reakcija je provedena u organskom otapalu toluenu. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da su i za CALB-MCF-3.9Me i Novozym 435 enol acetati (vinil i izopropil) najbolja acilirajuća sredstva. Za vinil acetat je uočena učinkovitost konverzije od 20 % nakon 5 sati za katalizator CALB-MCF-3.0Me, dok je značajna učinkovitost konverzije od 48 % nakon 5 sati dobivena za katalizator Novozym 435. Prema tome, konverzija procesa esterifikacije od 32,32 % dobivena primjenom imobilizirane lipaze CALB nakon 60 minuta u hDES-u Ty:C8 je dobar rezultat.

Lipaze, formalno triacilglicerol hidrolaze (EC 3.1.1.3), pripadaju najsvestranijim biokatalizatorima koji se primjenjuju u organskoj sintezi, bilo u reakcijama hidrolize ili sintezi estera (acilacijske reakcije), u kojoj obično pokazuju visoku enantioselektivnost i u organskim otapalima, no nisu specifični enzimi za esterifikaciju (*R*)-1-feniletanola (Stradomska i sur., 2021), te je dobivena konverzija od 53,04 % i teoretski maksimalna moguća jer lipaza kao enzim nije specifična za provedenu esterifikaciju (*R,S*)-1-feniletanola. Sljedeći korak u istraživanju bi bio razvoj metode izolacije i pročišćavanja produkta i neizreagiralog supstrata.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je aktivnost lipaza (CALB, AYS, AS, G, AH) u niskotemperaturnim hidrofobnim eutektičkim otapalima (hDES) te mogućnost korištenja hDES u enantioselektivnoj esterifikaciji (*R,S*)-1-feniletanola uz primjenu lipaze CALB kao biokatalizatora. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Lipaze (CALB, AYS, AS, G i AH) su aktivne u kalij-fosfatnom puferu. Uspoređujući inicijalnu brzinu reakcije hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u *p*-nitrofenol, najaktivnije lipaze su CALB ($A = 0,06 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i AH ($A = 0,06 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$).
2. Usporedbom konverzije reakcije, volumetrijske produktivnosti i specifične produktivnosti enzima u odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (Ty:C8 i C12:C8) i heptanu, enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola u (*R*)-1-feniletil-acetat pomoću prethodno ispitanih lipaza (CALB, AYS, AS, G i AH), najuspješnijim biokatalizatorom pokazala se lipaza CALB u hDES-u Ty:C8. U tom otapalu ostvarena je konverzija od 29,2 %, volumetrijska produktivnost od $483,7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ te specifična produktivnost enzima koja iznosi $0,48 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
3. Vrijednosti konverzije, volumetrijske produktivnosti i specifične produktivnosti enzima u kinetičkoj rezoluciji (*R,S*)-1-feniletanola u (*R*)-1-feniletil-acetat koju katalizira lipaza CALB niže su u hDES-u Ty:C8 nego u organskom otapalu heptanu. Enantiomerni višak u korist (*R*)-enantiomera je u rasponu 97-99 % u oba otapala.
4. Uspoređujući konverziju, volumetrijsku produktivnost i specifičnu produktivnost enzima u dinamičkoj kinetičkoj rezoluciji (*R,S*)-1-feniletanola u (*R*)-1-feniletil-acetat koju katalizira lipaza CALB niže su u hidrofobnom eutektičkom otapalu Ty:C8 nego u heptanu. Enantiomerni višak u korist (*R*)-1-feniletil-acetata je u rasponu 97-99 % u oba otapala. Primjenom metalnog katalizatora nije potaknuta racemizacija, a iskorištenje reakcije je ostalo isto.
5. Na temelju dobivenih rezultata je zaključeno da je hidrofobno eutektičko otapalo Ty:C8 moguća zamjena za organska otapala u enantioselektivnoj esterifikaciji (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi potaknula racemizaciju *S* estera u *R* te postiglo 100%-tno iskorištenje ili je potrebno razviti metodu izolacije i pročišćavanja produkta i neizreagiralog supstrata.

6. POPIS LITERATURE

- Adam W, Lazarus M, Saha-Möller CR, Weichold O, Hoch U, Häring D, Schreier P (1999) Biotransformations with Peroxidases. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* **63**, 74.
- Ahmed, M, Kelly, T, Ghanem, A (2012) Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. *Tetrahedron*. **68**, 6781-6802.
- Ai Nguyen, L, He, H, Pham-Huy, C. (2006) Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. Biomed. Sci.* **2**, 85–100.
- Allen JV, Roberts S.M, Williamson NM (1998) Polyamino Acids as Man-Made Catalysts. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* **63**, 126.
- Aroso IM, Craveiro R, Rocha A, Dionísio M, Barreiros S, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC (2015) Design of controlled release systems for THEDES – Therapeutic deep eutectic solvents, using supercritical fluid technology. *Int. J. Pharm.* **492**, 73–79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.038>.
- Bommarius AS, Riebel BR (2004) Biocatalysis, 1. izd., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, str. 3-20:356-361.
- Cheng, C, Ma, JH (1996) Enantioselective synthesis of s-(–)-1-phenylethanol in *Candida utilis* semifed-batch cultures. *Process Biochemistry*, **31(6)**, 119–124.
- Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol* **156**: 1701–1705
- Cvjetko M (2012) Synthesis, application in biotransformations and cytotoxicity of selected imidazolium-based ionic liquids, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu. *
- Cvjetko Bubalo M, Mazur M, Radošević K, Radojčić Redovniković I(2015) Baker's yeast-mediated asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutanoate in deep eutectic solvents. *Process Bio-chem.* **50**, 1788–1792. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.015>.

- Cvjetko Bubalo M, Panić M, Radošević K, Radojčić Redovniković I (2016) Metode pripreve eutektičkih otopala. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. **11**, 164–168. doi: <https://www.bib.irb.hr/855151>.
- Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Radojčić Redovniković I, Halambek J, Vorkapić-Furač I, Gaurina Srček V (2014) Ionske kapljevine – Razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem. Ind.* **63**, 163–171. doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2013.003>.
- 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. doi:10.1159/000442818.
- Galović P (2021) Racionala dizajn niskotemperaturnih eutektičkih otopala za lipazom kataliziranu kinetičku rezoluciju (R,S)-1-feniletanola, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu
- Grogan G (2009) Practical Biotransformations, 1. izd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, str.3-8:38-150.
- Humphrey, CE, Ahmed, M, Ghanem, A, Turner, NJ (2014) Application of enzymes in kinetic resolutions, dynamic kinetic resolutions and deracemization reactions. U: separation of enantiomers: synthetic methods, Wiley-VCH, Weinheim, str. 123-160.
- IUPAC (1990) Biotransformation- A useful tool in organic chemistry. *Pure & Appl. Chem.* **62**, 753-768.
- Jaeger KE, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* **13**, 390–397.
- Jukić M, Đaković S, Filipović-Kovačević Ž, Vorkapić-Furač J (2004) “Zelena” kemija – ekološki prihvatljivi procesi, *Kem. Ind.* **53** (5) 217–224
- Kim, SH, Park, S, Yu, H, Kim, JH, Kim, HJ, Yang, Y-H, Kim, KJ, Kan, E, Lee, SH (2016) Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **128**, 65–72.
- Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 565–571.

Leitner W, Tanchoux N (2002) Supercritical Carbon Dioxide as an Environmentally Benign Reaction Medium for Chemical Synthesis. Clark J, Macquarrie D (ured.) Handbook of Green Chemistry, Blackwell Science, str. 485-490.

Martins MAR, Pinho SP, Coutinho JAP (2019) Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures, *J. Solution Chem.* **48** (2019) 962–982. doi: <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>

Olivier-Bourbigou H, Magna L (2002) Ionic liquids: perspectives for organic and catalytic reactions. *Journal of Molecular Catalysis A* **182-183**:419-437.

van Osch DJGP, Dietz CHJT, van Spronsen J, Kroon MC, Gallucci BF, van Sint Annaland M, Tuinie R (2019) A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components, *ACS Sustainable Chem Eng* **7**, 2933-2942. [0.1021/acssuschemeng.8b03520](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03520)

Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2** 1063–1071. doi: <https://doi.org/10.1021/sc500096j>

Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2020) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents, *J. Chem. Technol. Biot.* doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.6545>.

Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syldatk C, Holtman D (2019) Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends in Biotechnology* **37**, 943-959. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>

Pellissier, H (2011) Recent developments in dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron.* **67**, 3769-3802.

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do., *Kem. Ind.* **70** (9-10) ,551–562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>

Sheldon RA (2008) E factors, green chemistry and catalysis: An odyssey. *Chem. Commun.* **39**. 3352–3365. doi: <https://doi.org/10.1039/b803584a.46>

Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem. Rev.* **114**. doi: <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

Stradomska D, Heba M, CzernekA, Ku´zник N, Gillner D, Maresz K, i sur. (2021) Lipase Immobilized on MCFs as Biocatalysts for Kinetic and Dynamic Kinetic Resolution of sec-Alcohols’, *Catalysts*, **11(4)**,518.<https://doi.org/10.3390/catal11040518>

Toledo ML, Pereira MM, Freire MG, Silva JPA, Coutinho JAP, Tavares APM (2019) Laccase Activation in Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**. doi: <https://doi.org/10.1021/acssusche-meng.9b02179>

Zhao BY, Xu P, Yang FX, Wu H, Zong MH, Lou WY (2015) Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**, 2746–2755. doi: <https://doi.org/10.1021/acssusche-meng.5b00619>

Izjava o izvornosti

Ja Paola Gregur izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Paola Gregur
Vlastoručni potpis