

Enzimski katalizirana hidroliza (R, S)-1-feniletil acetata u eutektičkim otapalima

Rajn, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:381555>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij - Biotehnologija

Martina Rajn

6964/BT

**ENZIMSKI KATALIZIRANA HIDROLIZA (*R, S*)-1-
FENILETIL ACETATA U EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**
ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Zelena otapala za zelene tehnologije

Mentorica: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Zagreb, 2017.

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

ENZIMSKI KATALIZIRANA HIDROLIZA (*R, S*)-1-FENILETIL ACETATA U EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Martina Rajn, 0058205614

Sažetak: Visokoučinkoviti i ekološki prihvatljivi procesi proizvodnje industrijski važnih kiralnih građevnih blokova, biokatalitičkih postupaka te postupaka u kojima se primjenjuju zelena otapala, posljednjih su godina predmet istraživanja. Cilj ovog rada bio je istražiti dvije vrste biokatalizatora, izoliranu lipazu CALB i korijen mrkve, za hidrolizu (*R, S*)-1-feniletal acetata u različitim eutektičkim otapalima. Obzirom na praćeno iskorištenje reakcije, enantiomerni višak, specifičnu produktivnost enzima i volumetrijsku produktivnost enzima može se zaključiti da su prirodna eutektička otapala superiornija za hidrolizu (*R, S*)-1-feniletal acetata s izoliranom lipazom od hlapljivih organskih otapala. Hidrolizom pomoću mrkve nema značajnijih pomaka u iskorištenju i produktivnosti u odnosu na organska otapala, no vidljivo je poboljšanje u enantioselektivnosti. Rezultati prikazani u ovom istraživanju doprinose su razvoju učinkovitih, ekonomičnih i održivih procesa za hidrolizu industrijski važnih spojeva.

Ključne riječi: biotransformacije, lipaza, mrkva, prirodna eutektička otapala, (*R, S*)-1-feniletal acetat

Rad sadrži: 31 stranica, 15 slika, 4 tablice, 19 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

Mentorica: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag. ing.

Datum obrane: 17. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor 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

Enzymic catalytic hydrolysis (*R, S*)-1-phenylethyl acetate in deep eutectic solvents

Martina Rajn, 0058205614

Abstract: Highly efficient and environmentally-acceptable processes for the production of industrially important chiral building blocks, biocatalytic processes and green solvent-based processes have been the subject of research for the last few years. The aim of this study was the application of two biocatalysts, isolated lipase CALB and carrot root, for hydrolysis (*R, S*)-1-phenylethyl acetate within natural deep eutectic solvents. Based on the observed reaction yields, enantiomeric excess, specific enzymatic productivity and enzyme volumetric productivity, it can be concluded that natural deep eutectic solvents were superior to hydrolysis of (*R, S*)-1-phenylethyl acetate with isolated lipase according to volatile organic solvents. Hydrolysis by carrot had no significant impact on yield and productivity compared to organic solvents, but there was a clear improvement in enantioselectivity. The presented results contribute to the development of an efficient, economical and sustainable processes for the hydrolysis of industrially important compounds.

Keywords: biotransformations, carrot root, lipase, natural deep eutectic solvents, (*R, S*)-1-phenylethyl acetate

Thesis contains: 31 pages, 15 figures, 4 tables, 19 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Marina Cyjetko Bubalo, Assistant professor

Technical support and assistance: Manuela Panić, M. Eng.

Defence date: July 17th 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PRIMJENA BIOTRANSFORMACIJA U PRIPRAVI KOMERCIJALNO ZANIMLJIVIH ORGANSKIH SPOJEVA	2
2.1.1. Uvod u biotransformacije	2
2.1.2. Biokatalizatori u biotransformacijama	2
2.1.3. Primjena biotransformacijskih postupaka	5
2.2. ZELENA OTAPALA.....	7
2.2.1. Općenito o zelenim otapalima.....	7
2.2.2. Eutektička otapala	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI I METODE	12
3.1.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1.1. Kemikalije.....	12
3.1.1.2. Oprema i uređaji	12
3.1.2. METODE RADA.....	13
3.1.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala	13
3.1.2.2. Hidroliza (<i>R</i> , <i>S</i>)-1-feniletil acetata katalizirana lipazom CALB.....	13
3.1.2.3. Hidroliza (<i>R</i> , <i>S</i>)-1-feniletil acetata katalizirana mrkvom <i>Daucus carota</i> L.	15
3.1.2.4. Određivanje koncentracije (<i>R</i> , <i>S</i>)-1-feniletil acetata	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Priprava prirodnih eutektičkih otapala.....	18
4.2. Hidroliza (<i>R</i> , <i>S</i>)-1-feniletil acetata katalizirana lipazom	18
4.3. Hidroliza (<i>R</i> , <i>S</i>)-1-feniletil acetata pomoću mrkve (<i>Daucus carota</i> L.)	25
5. ZAKLJUČCI.....	29
6. LITERATURA	30

1. UVOD

Tijekom posljednja dva desetljeća ljudi su počeli intenzivnije shvaćati problem onečišćenja okoliša te razmišljati o načinima očuvanja istog, posebice u kemijskim i biološkim znanostima. Stoga *zelena* kemija postaje prepoznatljiva disciplina zbog svog programa implementacije održivog razvoja u kemijske tehnologije. Prema načelima *zelene* kemije, idealno otapalo trebalo bi biti netoksično, kemijski i fizički stabilno, imati nisku hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe te biti jednostavno za rukovanje (Cvjetko, 2012). Zbog toga se posljednjih godina intenzivno proučavaju i razvijaju zelena otapala, između kojih i eutektička otapala. Zbog svojih svojstva poput nehlapljivosti, nezapaljivosti, velike toplinske, kemijske i elektrokemijske stabilnosti te mogućnosti reciklacije u upotrebi su u organskim sintezama, elektrokemiji, proizvodnji polimera, u procesima separacije, ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala te u biotransformacijama (Paiva i sur., 2014). Pored korištenja alternativnih zelenih otapala, cilj zelene kemije je i provođenje biološke pretvorbe organskih spojeva primjenom enzima ili cijelih stanica.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala u hidrolizi (*R*, *S*)-1-feniletil acetata primjenom dvije vrste biokatalizatora – izolirane lipaze CALB i korijena mrkve.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PRIMJENA BIOTRANSFORMACIJA U PRIPRAVI KOMERCIJALNO ZANIMLJIVIH ORGANSKIH SPOJEVA

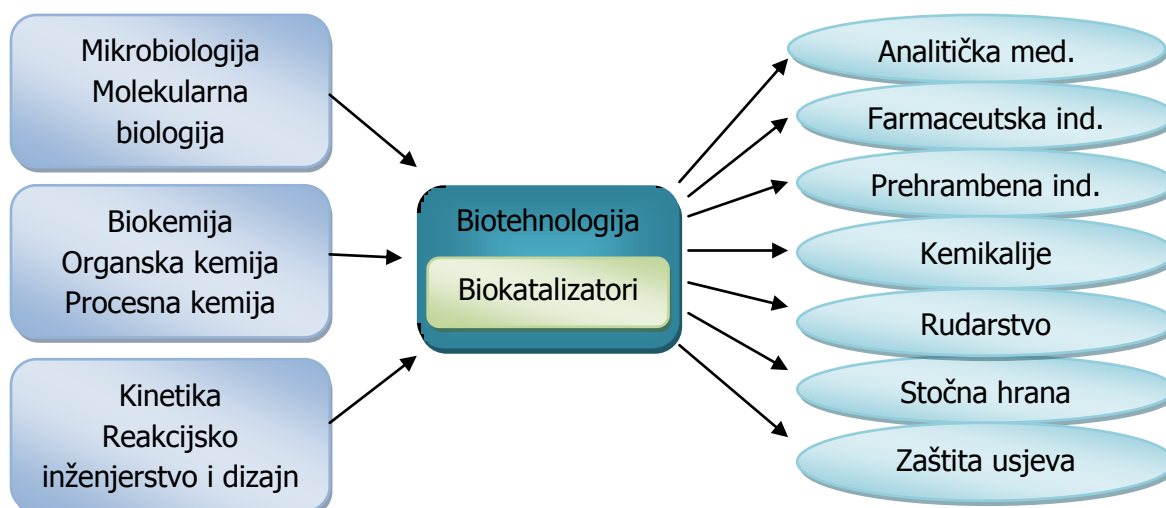
2.1.1. Uvod u biotransformacije

Pretvorbe organskih spojeva djelovanjem biološkog sustava u industrijski važne kemikalije nazivaju se biotransformacijama. Povijest biotransformacija vezana je uz proučavanje fermentacijskih procesa u 19. stoljeću, no ubrzani razvoj ove discipline započeo je tijekom 20. stoljeća korištenjem mikroorganizama za dobivanje kemijskih spojeva poput šećera i aminokiselina, ali i različitih složenijih kiralnih spojeva s ljekovitim djelovanjem. Iako su se ti stari postupci kasnije razvili u tehnološke postupke u industrijskom mjerilu, biotransformacije su dobile svoje sadašnje značenje tek otkrićem mikrobnih transformacija steroida kao što su redukcija androstendiona u testosteron sa *Saccharomyces cerevisiae*, 11 α -hidroksilacija progesterona s *Rhizopus arrhizus* ili uvođenje dvostruke veze u 3-okso-4-en-steroida s *Corynebacterium simplex*. Razvoj biotransformacijskih znanosti u posljednja dva desetljeća predstavlja jedan od najboljih primjera sinergističkih odnosa u svim disciplinama biološke i kemijske znanosti, uključujući stručnost mikrobiologa, molekularnih biologa i enzimologa (Grogan, 2009).

Svrha i opći ciljevi biotransformacija su dobivanje željenog metabolita pomoću kontroliranih mikrobnih reakcija, ali i izoliranih enzima, djelomičnom razgradnjom supstrata, dobivanje novih struktura proširenjem izvorne strukture supstrata pomoću biosintetskih reakcija te dobivanje nove strukture supstrata preko selektivnih transformacijskih reakcija specifičnim modifikacijama (Bommarius i Riebel, 2004).

2.1.2. Biokatalizatori u biotransformacijama

U biotransformacijama se kao biokatalizatori koriste enzimi (sirovi ili pročišćeni), biljne i životinjske stanice i tkiva, čiste kulture mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni, alge) te umjetni enzimi (abzimi) (Grogan, 2009) koji imaju središnju ulogu između interdisciplinarnih znanosti i industrije (slika 1) (Bommarius i Riebel, 2004).



Slika 1. Uloga biokatalizatora i biotehnologije između interdisciplinarnih znanosti i industrije (Bommarius i Riebel, 2004).

Svaki katalizator, a time i svaki biokatalizator, može se okarakterizirati sa tri osnovne veličine: aktivnost, selektivnost i stabilnost (Bommarius i Riebel, 2004).

Biokatalizatori često imaju mnogo bolju selektivnost od nebioloških katalizatora, bilo da je u pitanju enantio-, kemo- ili regioselektivnost. Zahvaljujući važnosti enantiomerne čistoće ciljanog proizvoda, enantioselektivnost je najvažnija vrsta selektivnosti u biokatalizi. Ona se kontrolira enantiomernim viškom (*ee*), koji obuhvaća ukupnu selektivnost do točke izolacije proizvoda, te enantiomernim odnosom ili *E* vrijednošću, koja označava enantioselektivnost u određenom stupnju konverzije (Bommarius i Riebel, 2004).

Aktivnost enzima jednostavna je za mjerenje i nužna čak i u osnovnim eksperimentalnim protokolima. U usporedbi s drugim katalizatorima, većina enzima je aktivna i stabilna pri određenoj temperaturi i pH području (uglavnom između 15 °C i 50 °C te pH 5 i 10). Ukupna aktivnost enzima izražava se u internacionalnim jedinicama, ali aktivnost enzima može se izraziti i kao specifična aktivnost, svedena na masu katalizatora, te volumetrijska aktivnost koja se temelji na aktivnosti katalizatora po jedinici volumena:

$$\text{ukupna aktivnost} \equiv 1 \text{ I.J.} = 1 \mu\text{mol min}^{-1}$$

$$\text{specifična aktivnost} \equiv 1 \text{ I.J. (mg enzima)}^{-1} = 1 \mu\text{mol (min mg enzima)}^{-1}$$

$$\text{volumetrijska aktivnost} \equiv 1 \text{ I.J. mL}^{-1} = 1 \mu\text{mol (min mL)}^{-1}$$

Aktivnost katalizatora je valjani parametar tijekom procesa samo ako se navedu specifikacije uvjeta mjerenja iste. Za povećanje volumetrijske aktivnosti katalizatora potrebno je dodati više katalizatora u sustav dok se specifična aktivnost poboljšava optimiranjem reakcijskih uvjeta (Bommarius i Riebel, 2004).

Za razliku od aktivnosti, stabilnost enzima se tumači kao toplinska stabilnost, tj. temperatura iznad koje enzim gubi stabilnost. Iako je ta vrijednost važna, svaka stabilnost na određenoj temperaturi ovisi o vremenu izlaganja pa je često takva konstatacija nejasna. Zbog toga je za biokatalitičke procese važnija stabilnost rada, koja označava dugotrajnu stabilnost u određenim uvjetima (Bommarius i Riebel, 2004).

Primjene čistih, izoliranih enzima kao biokatalizatora provode se u blagim reakcijskim uvjetima čime se smanjuju problemi s neželjenim nusreakcijama koje često prate konvencionalne kemijske metode (npr. razgradnja, izomerizacija, racemizacija i pregradnja). Nedostaci njihove primjene su ograničena stabilnost enzima, potreba za kofaktorima te cijena izolacije enzima (Grogan, 2009). Bez obzira u kojem obliku, postoji niz prednosti korištenja cijelih stanica kao biokatalizatora (četiri glavna oblika: kulture u fazi rasta, fazi mirovanja, u obliku pora i imobilizirane kulture) u biotransformacijama. Provođenje reakcija s cijelim stanicama kao biokatalizatorima je jeftina i jednostavna tehnika kao i izdvajanje biokatalizatora iz reakcijske smjese. Reakcije se odvijaju u vodenom mediju i nema potrebe za korištenjem enzimskih kofaktora (skupi i krhki) jer se isti većinom proizvode i recikliraju u samoj stanici. Imobilizirane kulture se primjenjuju kod potrebe aktivnosti biokatalizatora kroz dulji vremenski period, te njihove ponovne upotrebe. Još jedna od prednosti upotrebe imobiliziranih stanica je i lako uklanjanje i pročišćavanje produkta iz reakcijske smjese. Nedostatak upotrebe imobiliziranih kultura je smanjenje katalitičke aktivnosti enzima zbog ograničenja difuzije supstrata/produkta, a taj se nedostatak nastoji izbjeći povećanjem gustoće imobiliziranih stanica (Faber, 2011).

Biljne i životinjske stanice se upotrebljavaju u manjoj mjeri od mikroorganizama jer rastu sporije. Imaju sposobnost enantioselektivno transformirati specifične egzogene supstrate dodane uzgojenim stanicama. Također, prednost je što se kao medij može koristiti voda bez dodatka izvora ugljika, što je potrebno dodavati kada se rabe mikroorganizmi. Isto tako značajne su ekološke i ekonomske prednosti zbog njihove lake dostupnosti u velikim količinama na svim područjima. S druge strane mikroorganizmi zbog velike brzine staničnog metabolizma brže provode biotransformacije te mogu transformirati širok spektar supstrata. Također su manje osjetljivi na uvjete različitih tehnika kultiviranja od biljnih i životinjskih stanica (Bommarius i Riebel, 2004). U ovom radu su kao biokatalizatori korišteni izolirani enzim lipaza B iz kvasca *Candida antarctica* i cijele biljne stanice mrkve *Daucus carota* L.

2.1.3. Primjena biotransformacijskih postupaka

Primjena biotransformacija u industriji je u zadnjih dvadeset godina značajno porasla zahvaljujući dostupnosti velike količine enzima, razvitku genetičkog inženjerstva te zbog povećane potrebe za enantiomerno čistim spojevima u farmaceutskoj industriji i poljoprivredi. Učinkovita primjena biotransformacija u industriji ovisi o dostupnosti i cijeni enzima i mikroorganizama, pripremi hranjivog supstrata ili reakcijske smjese, pripremi biokatalizatora, izdvajanju proizvoda iz biološki promijenjene hranjive podloge ili prirasle biomase, odnosno enzimski promijenjene reakcijske smjese, prednostima nad uspostavljenim kemijskim metodama i procesima, vremenskim zahtjevima, zbrinjavanju nastalog otpada te se krajnja odluka o izboru procesa donosi s obzirom na pripravu traženog proizvoda (Faber, 2011).

Učestalost upotrebe određenih biokatalizatora nije jednoliko raspoređena među različitim tipovima biotransformacija koje uključuju reakcije hidrolize, redukcije, oksidacije, oksigenacije, adicije i eliminacije te stvaranje C-C veza (tablica 1) (Faber, 2011).

Tablica 1. Biokatalizatori u različitim biotransformacijskim reakcijama (Faber, 2011).

Tip reakcije	Biokatalizatori
Hidroliza	Proteaze, esteraze, lipaze
Redoks-reakcije	Dehidrogenaze, oksidaze, oksigenaze
Stvaranje C-C veza	Aldolaze, transketolaze
Adicija i eliminacija	Oksinitrilaza, fumaraza

Hidrolitičke transformacije izvode se uporabom proteaza, esteraza i lipaza i od svih tipova reakcija kataliziranih enzimima one se najlakše i jednostavno izvode. Ne zahtijevaju posebne aparature te ne postoji problem recikliranja koenzima budući da velik broj hidrolitičkih enzima ne zahtjeva dodatak koenzima. Također, stereo- i kemoselektivnost tih enzima je dobro proučena, a hidrolitički enzimi ujedno imaju i širok spektar supstratne aktivnosti. Esteraze kataliziraju hidrolizu estera karboksilnih kiselina, a na tržištu je dostupan velik broj esteraza iz životinjskih izvora: esteraza svinjske jetre, konjske jetre, kolesterol-esteraza i dr. U organskoj kemiji se najviše upotrebljava esteraza svinjske jetre jer je jeftina, lako dostupna i nisu joj potrebni koenzimi te pokazuje široku supstratnu specifičnost. S druge strane, kolesterol-esteraza je jedina hidrolaza koja za svoje djelovanje treba koenzim (soli žučnih kiselina) te su joj najrašireniji izvori goveđi i svinjski pankreas. Neke proteaze također

posjeduju esteraznu aktivnost i mogu katalizirati selektivne hidrolize, ali i stvaranje esterskih veza (α -kimotripsin, tripsin, papain, pepsin i dr). Lipaze mogu katalizirati i sintezu i hidrolizu na granici vodene i organske faze u vodi netopljivih estera, prirodnih ili sintetskih, uz zadržavanje enantio- i regioselektivnosti (Bommarius i Riebel, 2004). Posjeduju širok spektar supstratne aktivnosti i selektivnosti, imaju izvrsnu sposobnost prepoznavanja kiralnosti te im nisu potrebni kofaktori što ih čini idealnim katalizatorima (Yongxian i sur., 2011). Upotrebljavaju se u mnogim granama industrije zbog svoje raznolikosti poput proizvodnje biodizela, prehrambene industrije, medicine, farmaceutske i kozmetičke industrije te u obradi otpadnih voda. Neke lipaze karakterizira visoka stabilnost i aktivnost u alkilnom mediju što omogućava njihovu upotrebu kao biokatalizatora u formulaciji detergenata. Proizvode ih biljke, životinje i mikroorganizmi, no jedino su mikrobne lipaze značajne zbog visoke produktivnosti i raznolikosti (Maldonado i sur., 2016). Njihova se katalitička aktivnost poboljšava dodatkom otapala koje se ne miješa s vodom, najistraživanija su skupina enzima te se 40 % svih biotransformacija danas izvodi upravo pomoću njih (Faber, 2011).

U biotransformacijama koje obuhvaćaju redoks-reakcije kao biokatalizatori se upotrebljavaju dehidrogenaze, oksigenaze i oksidaze. Tim enzimima su potrebni koenzimi (najčešće NAD(H), NADP(H), FMN, FAD i PQQ) koji daju ili primaju kemijske ekvivalente za redukciju ili oksidaciju. Koenzimi su relativno skupi i nestabilni za upotrebu, no ne mogu se zamijeniti ekonomičnijim sintetskim produktima te ih je potrebno regenerirati. Dehidrogenaze su u širokoj upotrebi za redukciju karbonilne skupine aldehida i ketona te ugljik-ugljik dvostruke veze, dok se oksigenaze upotrebljavaju u oksidacijskim reakcijama katalizirajući funkcionalizaciju neaktiviranih C-H i C=C veza, a oksidaze sudjeluju u prijenosu elektrona (Bommarius i Riebel, 2004).

Stvaranje novih C-C veza na visoko stereoselektivan način omogućeno je aldolazama koje kataliziraju aldolne reakcije u kojima se produžuje ugljikovodični lanac aldehida, za dvije ili tri jedinice. Reakcije se izvode u organskim otapalima pri niskim temperaturama, a aldolaze djeluju na niz supstrata uključujući ugljikohidrate, aminokiseline i hidroksi-kiseline. Razlikujemo dvije skupine aldolaza s obzirom na mehanizam djelovanja. Prva skupina su aldolaze tipa I koje se nalaze u višim biljkama i životinjama, kataliziraju reakcije preko intermedijera Schiffovih baza te za njihovo djelovanje nisu potrebni metalni koenzimi. U bakterijama i gljivama su nađene aldolaze tipa II koje ovise o Zn^{2+} ionima – transketolaze. Dobivaju se iz kvasca i špinata, no ne u značajnim količinama stoga se to nadoknađuje genetičkim inženjerstvom. Upotrebljavaju se za produljivanje lanaca različitih aldolaza za dva ugljikova atoma, ovisne su o Mg^{2+} ionima te zahtjevaju tiamin pirofosfat (TPP) za svoju aktivnost (Faber, 2011).

Reakcije adicije i eliminacije katalizirane su liazama koje su karakterizirane uskom specifičnošću supstrata i dozvoljavaju male strukturne varijacije istih. U reakcijama se asimetrično adiraju male molekule (poput vode ili amonijaka) na ugljik-ugljik dvostruke veze (fumaraza) ili cijanovodik (oksinitrilaza) na C=O veze čime iz prokiralnog supstrata nastaju kiralni centri (Faber, 2011).

2.2. ZELENA OTAPALA

2.2.1. Općenito o zelenim otapalima

Otapala su nužna u procesima kao što su ekstrakcija, razdvajanje, pročišćavanje i sušenje produkta, kod sintetskih reakcija, ali i analitičkih metoda budući da omogućavaju međusobni kontakt komponenata u sustav. U industrijskim procesima organska otapala su najčešće korišten medij za provođenje kemijskih reakcija. Činjenica da organska otapala čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih emisija hlapljivih spojeva, uz niz nedostataka na okoliš i ljude koji njima rade, potaknula je znanstvenike na istraživanje alternativnih otapala koja bi zadržala tehnološka svojstva organskih otapala, ali s povoljnijim učinkom za ljude i okoliš. *Zelena kemija* ima sve veći značaj za održivi razvoj s ciljem smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanih tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje. Jedan od prioriteta *zelene kemije* je smanjenje opasnih otapala u industriji te su sukladno tome predložene dvije glavne strategije razvoja zelenih otapala, a to su zamjena opasnih otapala s onima koja pokazuju bolja svojstva prema okolišu, zdravlju i sigurnosti općenito te zamjena otapala koja se dobivaju iz nafte s otapalima iz obnovljivih izvora (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Unutar programa *zelene kemije* procesi se temelje na dvanaest načela (tablica 2), no iako je nemoguće istovremeno zadovoljiti sva načela tijekom provedbe procesa, nastoji ih se primijeniti u što većoj mjeri (Jukić i sur., 2004).

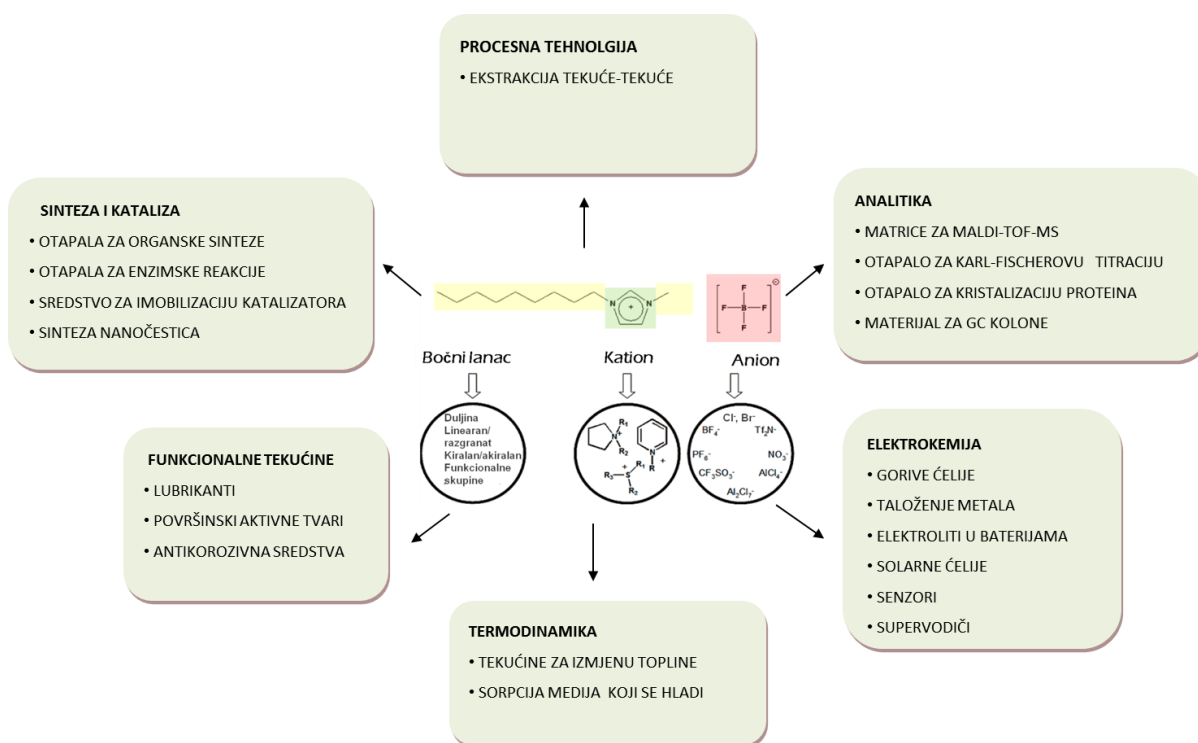
Tablica 2. Dvanaest načela *zelene kemije* (Jukić i sur., 2004).

1. Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati nakon što je nastao. 2. Tok kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni proizvod. 3. Sintetske procese, ako je moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i okoliš. 4. Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost. 5. Uporabu pomoćnih kemijskih tvari (npr. otapala, sredstava za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće. 6. Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.	7. Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo. 8. Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštićivanje funkcionalnih skupina, privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa itd.). 9. Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama. 10. Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja. 11. Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari. 12. U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).
---	--

Voda kao otapalo u većini je slučajeva prvi izbor, izrazito je polarna, nezapaljiva, netoksična, sigurna za okoliš, vrlo dostupna te niske cijene. Iako je korištena na industrijskoj razini većim dijelom u procesima emulzijske polimerizacije i hidrodistiliranja, njena je primjena ograničena jer se mnogi organski i organo-metalni spojevi slabo tope u njoj te je potrebna velika energija za njeno uklanjanje na kraju procesa. Zbog navedenih se razloga proučavaju druga alternativna otapala poput ionskih kapljevina, prirodnih eutektičkih otapala, superkritičnih i subkritičnih fluida (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

Ionske kapljewine su organske soli u potpunosti sastavljene od iona i to od većeg asimetričnog organskog kationa i manjeg organskog ili anorganskog aniona, a tale se pri niskim (<100 °C) ili sobnim temperaturama (Ajam, 2005). Karakterizira ih nezapaljivost,

nezatna hlapljivost, stabilnost (kemijska, termalna i elektrokemijska), niski tlak para, što ih čini prikladnom zamjenom za hlapljiva organska otapala u organskoj i organometalnoj sintezi te (bio)katalizi (Olivier-Bourbigou i Magna, 2002). Pri sintezi ionskih kapljevina moguće su mnoge kombinacije kationa i aniona (10^{18} različitih) što osigurava veliki broj ionskih kapljevina različitih fizikalno-kemijskih svojstva koja mogu biti odabrana prema željenoj primjeni. Primjenjuju se u elektrokemiji zbog svoje dobre električne vodljivosti te elektrokemijske inertnosti, u kemijskoj i procesnoj tehnologiji te biotehnologiji, analitici kao i u farmaceutskoj industriji (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Zbog sposobnosti otapanja širokog spektra spojeva poput soli, lipida, proteina, aminokiselina, površinski aktivnih tvari, šećera, polisaharida i organskih otapala ionske su kapljevine zanimljive za primjenu u procesima ekstrakcije i separacije biološki važnih komponenata (slika 2) (Cvjetko, 2012). Također, omogućavaju poboljšanje postojećih te uspostavu novih visokoučinkovitih procesa koji su sigurniji za ljude i okoliš, te se posljednjih 15 godina intenzivno proučavaju u znanosti, ali još nisu u komercijalno široj upotrebi (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).



Slika 2. Primjena ionskih kapljevina (Cvjetko, 2012).

Superkritični fluidi su tekućina ili plin u stanju iznad kritične temperature i tlaka (plin i tekućina koegzistiraju u tom području) te pokazuju drugačija svojstva od plina i tekućina u njihovim standardnim uvjetima. U superkritičnom stanju posjeduju svojstva

tekućine i plina kao što su relativno velika gustoća, dobra difuzivnost, mali viskozitet i mala površinska napetost. Bilo koje otapalo se može koristiti kao superkritično, no kritične vrijednosti, toksičnost, cijena i solvacijska snaga su parametri koji određuju najbolje otapalo kao superkritično za neku primjenu. Temeljem tih parametara CO₂ i voda su najbolje superkritične tekućine (Brunner, 2005).

Ugljikov dioksid je najčešće korištena superkritična tekućina zbog niskih kritičnih konstanti ($T_k=31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p_k=7,38\text{ MPa}$), netoksičan je, nije eksplozivan, lako je dostupan, može se lako ukloniti iz proizvoda i ima GRAS (eng. *Generally recognized as safe*) status. Otapa blago polarne i nepolarne spojeve, povećanjem tlaka odvaja manje hlapive spojeve veće molekulske mase i/ili veće polarnosti, također se često koristi kao zamjena za toksične freone te određena organska otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

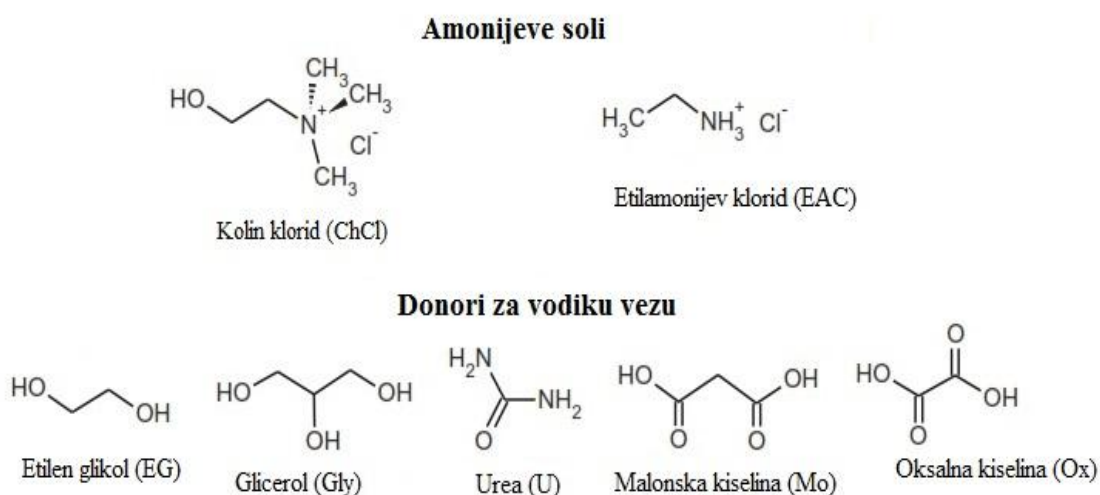
Voda je u superkritičnom stanju iznad svojih vrijednosti kritične temperature ($374,2\text{ }^{\circ}\text{C}$) i tlaka ($22,1\text{ MPa}$). U subkritičnom je stanju iznad svoje temperature vrelišta ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) i ispod kritične temperature te dovoljno visokog tlaka kako bi bila u tekućem agregatnom stanju. Općenito je voda u subkritičnom i/ili superkritičnom stanju poznata kao vruća voda pod tlakom. Odlikuje ju manja viskoznost, ali veća difuzija u odnosu na vodu sobne temperature. Superkritična voda je nepolarno otapalo te su organski spojevi i plinovi izrazito topivi u njoj (Brunner, 2005).

Također, grupi zelenih otapala pripadaju otapala sintetizirana iz prirodnih komponenti poput eutektičkih otapala i ionskih kapljevina baziranih na kolinu te otapala iz obnovljivih izvora poput glicerola, metanola, etanola, estera, 2-metil-tetrahidrofurana i ugljikovodičnih otapala. Razvila su se iz potrebe za ekološki prihvatljivijim, biorazgradivim i prilagodljivim otapalima koja bi zamijenila postojeća na bazi nafte i primjenjivala se kao sigurnija u biokatalizama, organskim reakcijama, procesima pročišćavanja produkta, separacijama te ekstrakcijama (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

2.2.2. Eutektička otapala

Eutektička otapala, nova generacija zelenih otapala, su smjese nabijenog akceptora vodika (najčešće amonijeve soli) poput kolin-klorida i nenabijenog donora vodika poput amina, amida, vitamina, šećera, alkohola i organskih kiselina u određenom molarnom omjeru (slika 3). Eutektička otapala se pripremaju od lako dostupnih, jeftinih, sigurnih, netoksičnih i biorazgradivih tvari koje imaju sposobnost samoudruživanja uslijed nastalih nekovalentnih interakcija, najčešće vodikovih veza. Raznolikost DES-ova (eng. *Deep Eutectic Solvents*)

omogućena je velikim brojem mogućih kombinacija ishodnih tvari korištenih za sintezu (Kudlak i sur., 2015). Klasičan primjer je smjesa kolin-klorida (ChCl) ($T_t = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$) i uree ($T_t = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$) u molarnom omjeru 1:2, temperatura tališta navedenog eutektičkog otapala je $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Zbog sličnih svojstava ionskim kapljevina poput nehlapljivosti, nezapaljivosti i visoke viskoznosti, eutektička otapala se ponekad smatraju četvrtom generacijom ionskih kapljevina iako je upitno mogu li se smatrati jer su sastavljena od neutralnih molekula povezanih vodikovim vezama (Zhang i sur., 2012).



Slika 3. Akceptori (amonijeve soli) i donori vodika koji se najčešće koriste u pripravi eutektičkih otapala (Durand i sur., 2012).

Primjenjuju se kao otapala u organskim sintezama i (bio)katalizama zbog mogućnosti prilagodbe njihovih svojstava odabirom početnih sirovina, elektrokemiji, proizvodnji polimera, u procesima separacije i analize te pri ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala (otapaju ih 10 do 100 puta bolje nego voda) (Zhang i sur., 2012). U biotransformacijama se mogu koristiti kao čista otapala, kootapala u vodenom mediju i kao dio dvofaznog sustava (Faber, 2011). Eutektička su otapala bazirana na spojevima sigurnima za ljudsku konzumaciju stoga se primjenjuju u terapiji kostiju i u raznim drugim područjima unutar biomedicine (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. MATERIJALI

3.1.1.1. Kemikalije

- Destilirana voda
- D-(+)-ksiloza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen glikol, puriss. p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij-fosfatni pufer, pripravljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF (KH_2PO_4 , Fisher Chemical, UK)
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Mrkva (*Daucus carota* L.)
- Novozym 435 (lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* (CALB) imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama sa sadržajem vode 1-2 w/w %) - Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Otapala heksan, heptan, toluen, etanol
- (*R*, *S*)-1-feniletil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.1.2. 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
- Savant SPD131DDA SpeedVac koncentrator, Thermo scientific, SAD
- Tikvice s okruglim dnom

3.1.2. METODE RADA

3.1.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

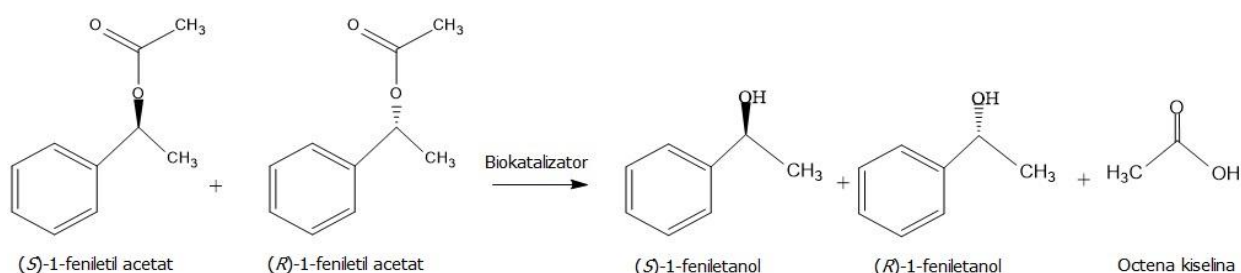
Prirodna eutektička otapala su sintetizirana dodatkom preračunate količine komponenata prema molarnim omjerima (tablica 3) u tikvicu s okruglim dnom. Tikvica s reakcijskom smjesom je stavljena na magnetsku miješalicu gdje je pri 50 °C miješana tijekom 2 sata sve dok nije nastala homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Zatim su pripremljena otapala razrijeđena dodatkom deionizirane vode kako bi se postigle koncentracije vode u eutektičkom otapalu od 30, 50 i 80 % (v/v), zatvorena parafilmom te skladištena na tamnom mjestu do korištenja za biokatalizu.

Tablica 3. Sintetizirana prirodna eutektička otapala.

Prirodno eutektičko otapalo	Kratika	Molarni omjer	Udio vode (% v/v)
Kolin-klorid: etilen glikol	ChEG	1:2	30
			50
			80
Kolin-klorid: ksiloza	ChXyl	2:1	30
			50
			80

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

Enzimska hidroliza (*R*, *S*)-1-feniletil acetata u (*R*, *S*)-1-feniletanol u ovom radu provedena je na dva načina: primjenom imobilizirane lipaze te korijena mrkve.



Slika 4. Hidroliza (*R*, *S*)-1-feniletil acetata.

Kod hidrolize (*R*, *S*)-1 feniletil acetata katalizirane lipazom CALB, u epruvetu se doda 2976 μL otapala (organska otapala, 0,025 M kalij-fosfatni pufer ili prirodno eutektičko otapalo), 24 μL supstrata (*R*, *S*)-1-feniletil acetata i 5 mg imobiliziranog enzima lipaze CALB čime i započinje reakcija (slika 4). Uvjeti reakcije: miješanje pri 25 °C 240 min. Kod provođenja reakcije u prirodnim eutektičkim otapalima (ChEG ili ChXyl sa 30%, 50% ili 80% vode (v/v)) i puferu, u odabranim vremenskim intervalima izuzima se alikvot od 200 μL reakcijske smjese iz kojih se (*R*, *S*)-1-feniletil acetat ekstrahira s 200 μL heptana, uz snažno miješanje na vorteksu (650 okretaj min^{-1}) kroz 2 minute te se izuzima 1 μL heptanskog sloja i analizira plinskom kromatografijom. Kod provođenja reakcije u organskim otapalima, u odabranim vremenskim intervalima se izuzima 1 μL reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom.

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u različitim otapalima i s različitim prirodom katalizatora, za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se iskorištenje, volumetrijska produktivnost hidrolize, enantiomerni višak te specifična produktivnosti enzima.

Iskorištenje procesa hidrolize η (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{c_A}{c_{AT}} \times 100 \quad [1]$$

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

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

$$V_P = \frac{c_A - c_{A1}}{t} \quad [2]$$

gdje c_{A1} predstavlja početnu molarnu koncentraciju (*R*)-1-feniletanola ($\mu\text{mol L}^{-1}$), c_A molarnu koncentraciju (*R*)-1-feniletanola na kraju procesa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a t vrijeme trajanja procesa (min).

Enantiomerni višak ee (%) izračuna se prema jednadžbi:

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

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

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

$$V_E = \frac{n_{P2} - n_{P1}}{m_E \cdot t} \quad [4]$$

gdje n_{P1} predstavlja početnu množinu (*R*)-1-feniletanola (μmol), n_{P2} množinu (*R*)-1-feniletanola na kraju procesa (μmol), m_E masu pripravka Novozym 435 (mg), a t vrijeme trajanja procesa (min).

3.1.2.3. Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil acetata katalizirana mrkvom *Daucus carota* L.

U epruvetu se doda 15 mL otapala (organsko otapalo, pufer kalijeva fosfata 0,025 M ili eutektičko otapalo), 10 μL (*R, S*)-1-feniletil acetata i 5 g sitno, na kockice 5 mm x 5 mm x 2 mm narezane mrkve koja je prethodno oprana detergentom i vodom. Reakcija se provodi pri 25 °C kontinuirano miješajući na tresilici tijekom 2 dana. Uspješnosti reakcije provjerena je tankoslojnom kromatografijom. Kao nepokretna faza korišten je silikagel, a kao pokretna faza smjesa otapala heksan:etil-acetat (4:1, v/v). Nakon 2 dana izuzima se 500 μL reakcijske smjese iz koje se produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju s 4500 μL heptana, uz snažno miješanje na vorteksu (2000 okretaj min^{-1}) kroz 5 min. Heptanski ekstrakt se upari do suha i čuva na -4 °C. Za analizu plinskom kromatografijom, uzorak se resuspendira sa 100 μL heptana te se analizira plinskom kromatografijom. Kod provođenja reakcije u organskim otapalima izuzima se alikvot reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom.

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u različitim otapalima za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se iskorištenje, volumetrijska produktivnost hidrolize, enantiomerni višak te specifična produktivnost enzima.

Iskorištenje procesa hidrolize η (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{c_A}{c_{AT}} \times 100 \quad [5]$$

gdje c_A predstavlja izmjerenu koncentraciju alkohola (mol L^{-1}), a c_{AT} teoretski moguću koncentraciju alkohola (mol L^{-1}).

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

$$V_P = \frac{c_A - c_{A1}}{t} \quad [6]$$

gdje c_{A1} predstavlja početnu molarnu koncentraciju alkohola ($\mu\text{mol L}^{-1}$), c_A molarnu koncentraciju alkohola na kraju procesa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a t vrijeme trajanja procesa (min).

Enantiomerni višak ee (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(R_{1-feniletanol} - S_{1-feniletanol})}{(R_{1-feniletanol} + S_{1-feniletanol})} \times 100 \quad [7]$$

gdje $R_{1-feniletanol}$ predstavlja površinu ispod pika (R)-1-feniletanola, a $S_{1-feniletanol}$ površinu ispod pika (S)-1-feniletanola.

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

$$V_E = \frac{n_{P2} - n_{P1}}{m_E \cdot t} \quad [8]$$

gdje n_{P1} predstavlja početnu množinu alkohola (μmol), n_{P2} množinu alkohola na kraju procesa (μmol), m_E masu pripravka Novozym 435 (mg), a t vrijeme trajanja procesa (min).

3.1.2.4. Određivanje koncentracije (R , S)-1-feniletil acetata

Kvalitativna i kvantitativna analiza hidrolize (R , S)-1-feniletil acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

Kromatografski uvjeti za određivanje:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 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 (*R, S*)-1-feniletil acetat iznosi 15,72 min, R_t za (*R*)-1-feniletanol 15,54 min i R_t za (*S*)-1-feniletanol 16,06 min.

Izrada baždarnog dijagrama

Pripreme se otopine (*R, S*)-1-feniletil acetata u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 i 0,05 mol L⁻¹. Na ordinatu se nanese izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika, a na apcisu pripadajuće vrijednosti koncentracija. Dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R, S*)-1-feniletil acetata o površini ispod pika se nacrtava pomoću računala te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije (*R, S*)-1-feniletil acetata u uzorcima (slika 5).

Koncentracija (*R, S*)-1-feniletil acetata tijekom hidrolize u organskim otapalima (heptanu, heksanu i toluenu) se računa izravno prema jednadžbi pravca dobivenoj iz baždarnog dijagrama, dok se koncentracija (*R, S*)-1-feniletil acetata c_E (mol L⁻¹) tijekom hidrolize u prirodnim eutektičkim otapalima i puferu računa prema jednadžbi:

$$c_E = \frac{c_{Eheptan}}{K_p} \quad [9]$$

gdje je $c_{Eheptan}$ ravnotežna koncentracija (*R, S*)-1-feniletil acetata u heptanu (mol L⁻¹), a K_p koeficijent razdjeljenja (*R, S*)-1-feniletil acetata između heptana i prirodnog eutektičkog otapala.

Koeficijent razdjeljenja (*R, S*)-1-feniletil acetata (K_p) heptan/prirodno eutektičko otapalo određuje se na sljedeći način:

u staklenu kivetu se doda 2988 μL prirodnog eutektičkog otapala, 3000 μL heptana i 12 μL (0,025 M) (*R, S*)-1-feniletil acetata. Uzorak se miješa na vorteksu tijekom 3 min pri temperaturi 25 °C. Koncentracija (*R, S*)-1-feniletil acetata u heptanu određuje se plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja K_p izračunava se kao omjer ravnotežne koncentracije (*R, S*)-1-feniletil acetata u heptanu i prirodnom eutektičkom otapalu prema jednadžbi:

$$K_p = \frac{c_{heptan}}{c_D} \quad [10]$$

gdje je c_{heptan} koncentracija (*R, S*)-1-feniletil acetata u heptanu (mol L⁻¹), a c_D koncentracija (*R, S*)-1-feniletil acetata u prirodnom eutektičkom otapalu (mol L⁻¹).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Priprema enantiomerno čistih spojeva je ključna u biotehnologiji, medicinskoj i farmaceutskoj industriji zbog visokih zahtjeva za optički čistim proizvodima. Stoga enzimski procesi postaju superiorniji od klasične kemijske sinteze zbog visoke enantio- i regioselektivnosti pod blagim uvjetima rada, a i ekološki su prihvatljiviji od organometalnih katalizatora. Primjer važnog kiralnog građevnog bloka u proizvodnji lijekova i finih kemikalija je optički čisti sekundarni alkohol (*R*)-1-feniletanol koji smanjuje razinu kolesterola inhibiranjem crijevne adsorpcije kolesterola te je u širokoj upotrebi i kao miris u kozmetičkoj industriji zbog blagog cvjetnog mirisa (Liang i sur., 2015). Oba enantiomera, ((*R*)-1-feniletanol i (*S*)-1-feniletanol) dobivena hidrolizom kiralnog acetata, koriste se u kemijskoj analizi kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerne čistoće te u asimetričnoj diciklizaciji cikličnih anhidrida i epoksida (Yongxian i sur., 2011). Stoga je u ovom radu, u cilju ekološki prihvatljivog postupka hidrolize estera, ispitana mogućnost provođenja hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil acetata katalizirane imobiliziranom lipazom te pomoću mrkve u prirodnim eutektičkim otapalima (kolin-klorid:etilen glikol (1:2) (ChEG) i kolin-klorid:ksiloza (2:1) (ChXyl)). Hidroliza je također provedena i u klasičnim reakcijskim medijima (heptan, heksan i toluen) te puferu kako bi se usporedila uspješnost provedenih hidroliza.

4.1. Priprava prirodnih eutektičkih otapala

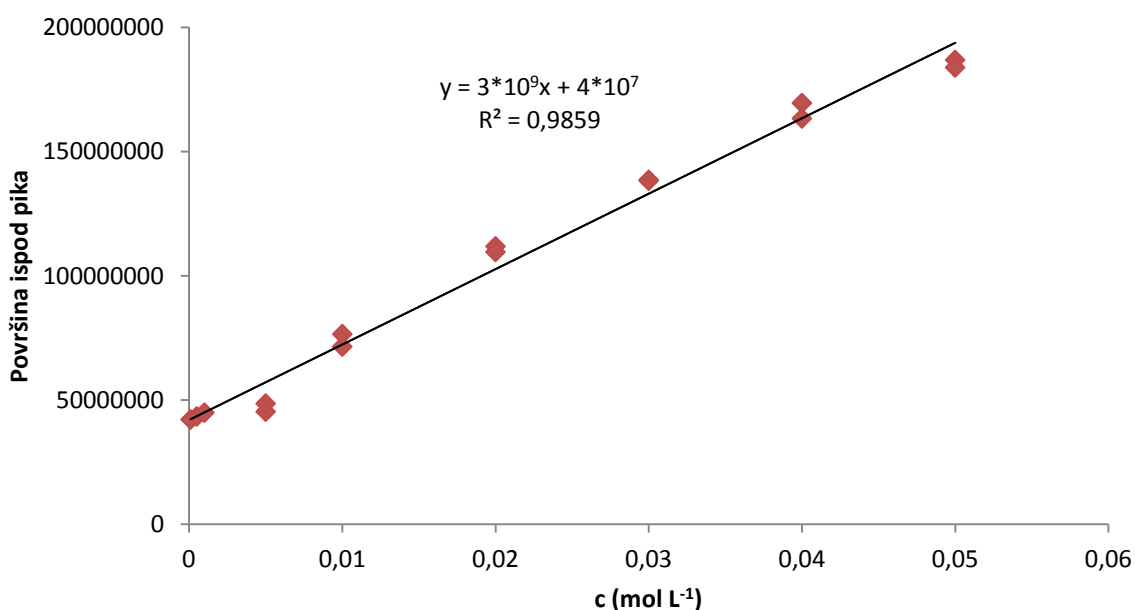
Priprava prirodnih eutektičkih otapala ChEG i ChXyl provodila se jednostavnim postupkom sinteze u kojem se polazne sirovine (kolin-klorid i etilen glikol te kolin-klorid i ksiloza) pomiješaju u molarnom omjeru 1:2 i 2:1 te se kontinuirano zagrijevaju uz miješanje dok se ne dobije homogena kapljevina (tablica 3). Iskorištenje ovih reakcija je 100% što je ujedno i značajna prednost prilikom sinteze prirodnih eutektičkih otapala.

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

Lipaze izolirane iz različitih izvora imaju širok spektar aktivnosti, visoko su selektivne, stabilne i reagiraju sa u vodi netopljivim supstratima. Također, lipaze su jeftini enzimi, za njihovu aktivnost nisu potrebni koenzimi te su time idealni biokatalizatori (Faber, 2011) što je i razlog uporabe lipaze CALB za enantioselektivnu hidrolizu u ovome radu.

Za hidrolizu (*R*, *S*)-1-feniletil acetata u svrhu dobivanja (*R*)-1-feniletanola koristila su se prirodna eutektička otapala i imobilizirana lipaza B iz kvasca *Candida antarctica* (pripravak Novozym 435) kao katalizator. Za potrebe eksperimenta je u prirodno eutektičko otapalo ChEG ili ChXyl (sa dodatkom 30%, 50% i 80% (v/v) vode) dodano 0,025 mol L⁻¹ (*R*, *S*)-1-feniletil acetata te 5 mg pripravka Novozym 435. Reakcijska smjesa je zatim intenzivno miješana na vorteksu pri temperaturi 25 °C, a tijek reakcije praćen izdvajanjem uzorka i analizom uz pomoć plinske kromatografije. Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize, reakcija je provedena u organskim otapalima i puferu.

Baždarni dijagram prema kojem je provedena kvantitativna analiza supstrata prikazan je na slici 5. Kako bi se izračunala koncentracija (*R*, *S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima, prema protokolu opisanom u poglavlju 3.1.2.4. određen je koeficijent razdjeljenja između heptana i prirodnog eutektičkog otapala (K_p), a vrijednosti su prikazane u tablici 4.

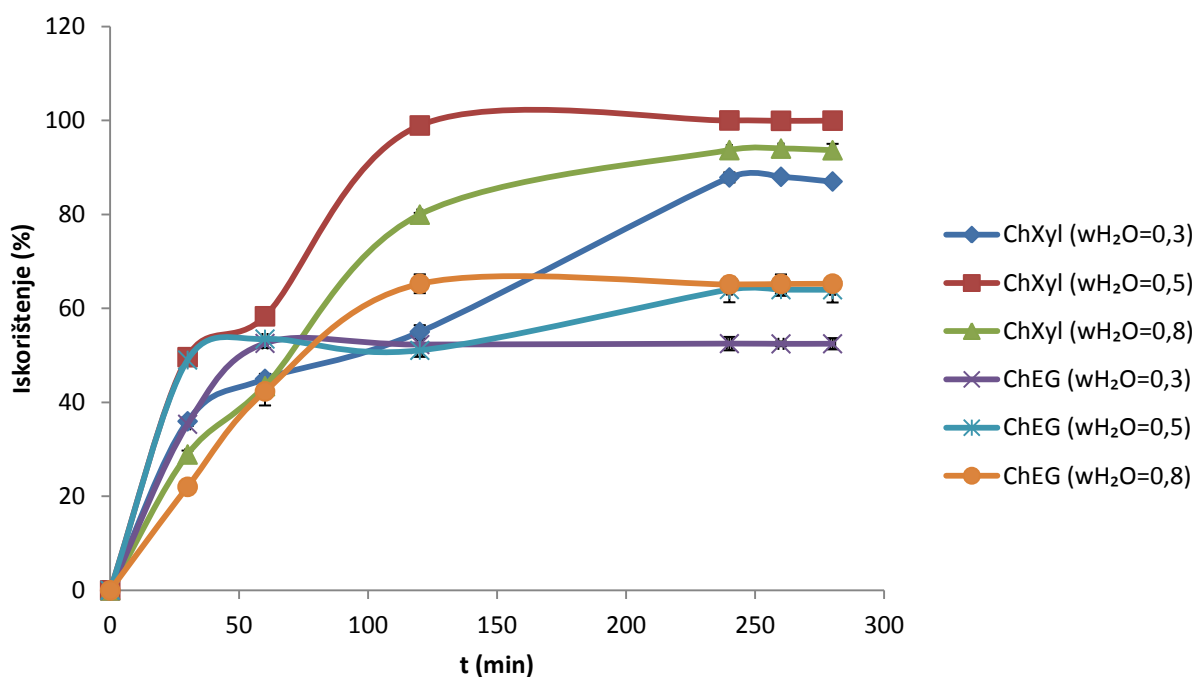


Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R*, *S*)-1-feniletil acetata.

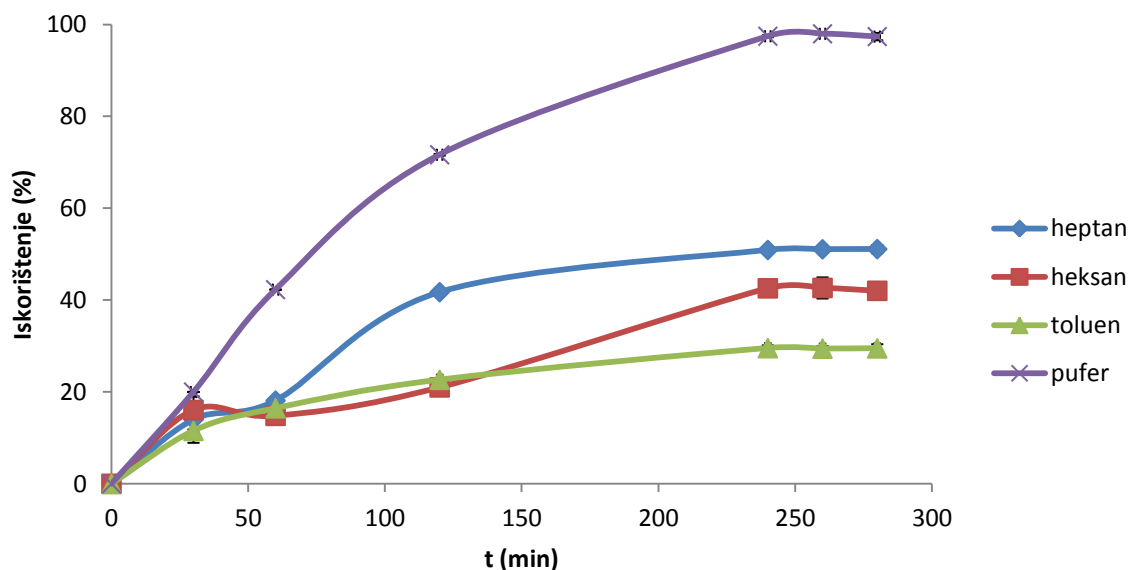
Tablica 4. Koeficijent razdjeljenja između heptana i prirodnih eutektičkih otapala (K_p).

Otapalo	Udio vode (% v/v)	K_p
ChEG	30	0,82
	50	0,94
	80	0,81
ChXyl	30	0,69
	50	0,99
	80	1,00
Kalij-fosfatni pufer		0,94

Tijek hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima, organskim otapalima te puferu prikazan je na slikama 6a i 6b.



Slika 6a. Tijek lipazom katalizirane hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R*, *S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min.

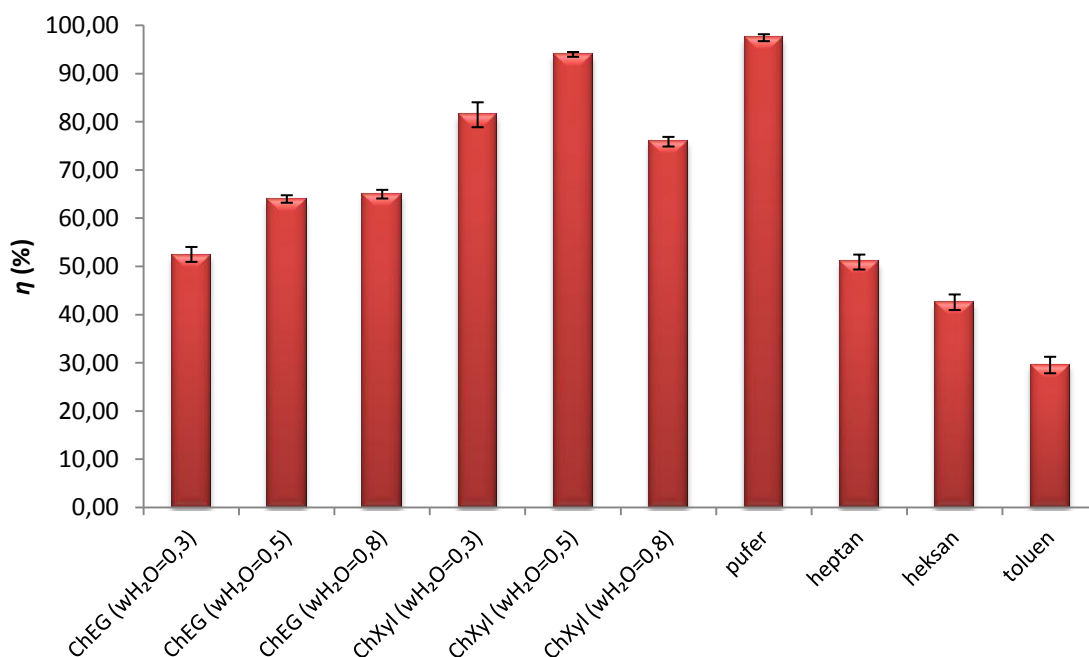


Slika 6b. Tijek lipazom katalizirane hidrolize (*R, S*)-1-feniletil acetata u organskim otapalima (heptan, heksan, toluen) te puferu. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min.

Iz grafičkih prikaza tijeka hidrolize (slika 6a i 6b) vidljivo je kako je najbolje otapalo za enantioselektivnu hidrolizu (*R, S*)-1-feniletil acetata prirodno eutektičko otapalo ChXyl sa 50 % (v/v) vode (slika 6a). Iskorištenje navedene reakcije je najveće, odnosno nastaje najviše produkta (*R*)-1-feniletanola. Prirodno eutektičko otapalo ChEG je također pogodno za hidrolizu, no postižu se puno manja iskorištenja od onih u ChXyl. Općenito je iz grafičkih prikaza vidljivo kako je iskorištenje reakcije u prirodnim eutektičkim otapalima veće nego u organskim otapalima (slika 6b), te su se eutektička otapala pokazala kao moguća zamjena za organska otapala što su Yongxian i sur. (2011) također primijetili. Isto tako, dodatak različitog udjela (v/v) vode u prirodno eutektičko otapalo značajno utječe na iskorištenje reakcije (slika 6a) što su Durand i sur. (2013) objasnili slabljenjem vodikovih veza između supstrata i prirodnog eutektičkog otapala zbog dodatka vode koja stvara izrazito jake vodikove veze s komponentama prirodnog eutektičkog otapala, oslobađajući molekule supstrata iz mreže vodikovih veza. Iskorištenje reakcije izoliranom lipazom kataliziranoj hidrolizi (*R, S*)-1-feniletil acetata u puferu (slika 6b) je veće nego ono uporabom prirodnog eutektičkog otapala ChXyl sa 50 % (v/v) vode (slika 6a), no konverzija supstrata je puno sporija što su Yongxian i sur. (2011) također primijetili i objasnili kao uzrok adsorpcije supstrata pomoću biokatalizatora.

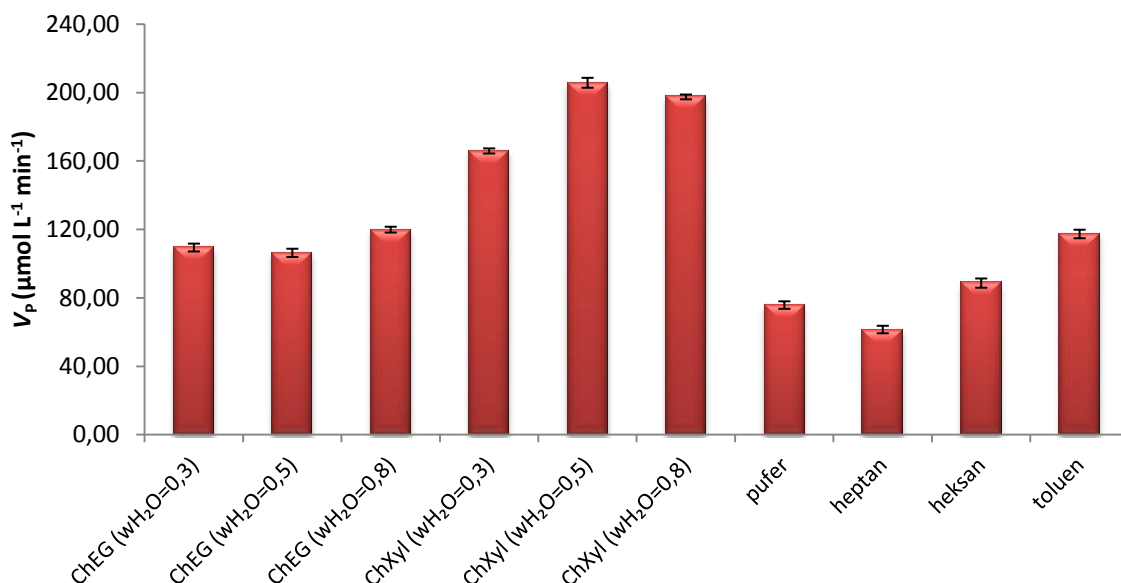
Iako je iz prikaza tijeka hidrolize u pojedinim otapalima vidljivo da odabir otapala značajno utječe na tijek reakcije, zbog bolje interpretacije rezultata prema jednadžbama [1],

[2], [3] i [4] izračunata su iskorištenja hidrolize, volumetrijska produktivnost, enantiomerni višak te specifična produktivnost enzima, a rezultati su prikazani na slikama 7, 8, 9 i 10.



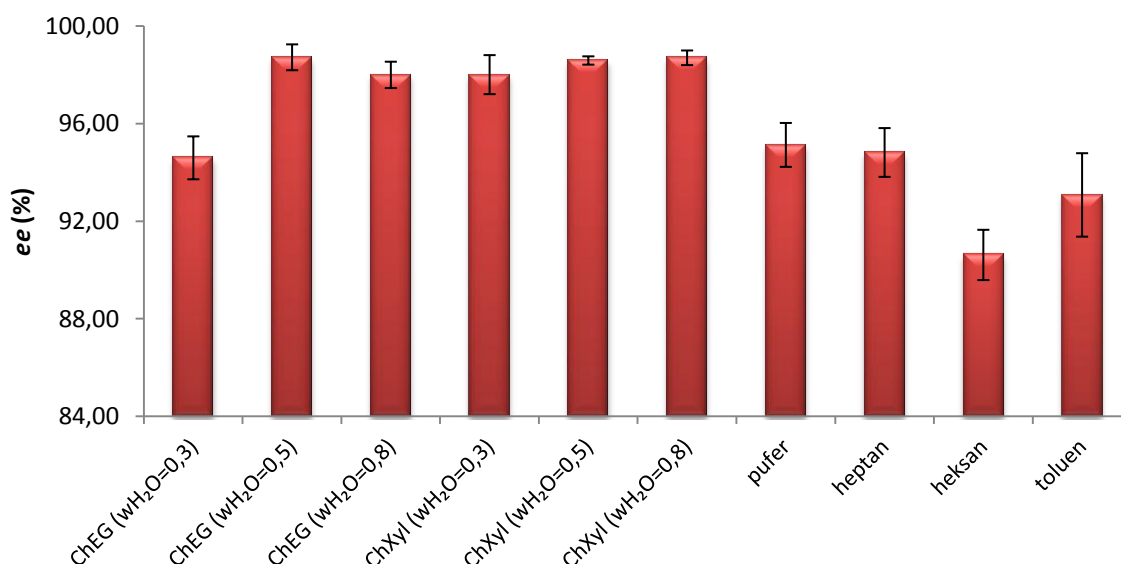
Slika 7. Iskorištenje lipazom katalizirane hidrolize (η) u različitim otopalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min.

Iskorištenja (η) lipazom katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otopalima su od 52,5 % u ChEG s 30 % vode do 94,0 % u ChXyl s 50 % vode te su viša nego u organskim otopalima (heptan 50,9 %, heksan 42,6 % i toluen 29,6 %), ali su gotovo jednaka kao u puferu (97,5 %) (slika 7). Na vrijednosti iskorištenja hidrolize utječe udio vode u prirodnom eutektičkom otopalu. Tako se promjenom vode u ChEG s 30 % do 80 % iskorištenja reakcije mijenjaju od 52,5 % do 65,0 %. Najbolje iskorištenje hidrolize je postignuto s prirodnim eutektičkim otopalom ChXyl (wH₂O=0,3) te iznosi 94,0 %.



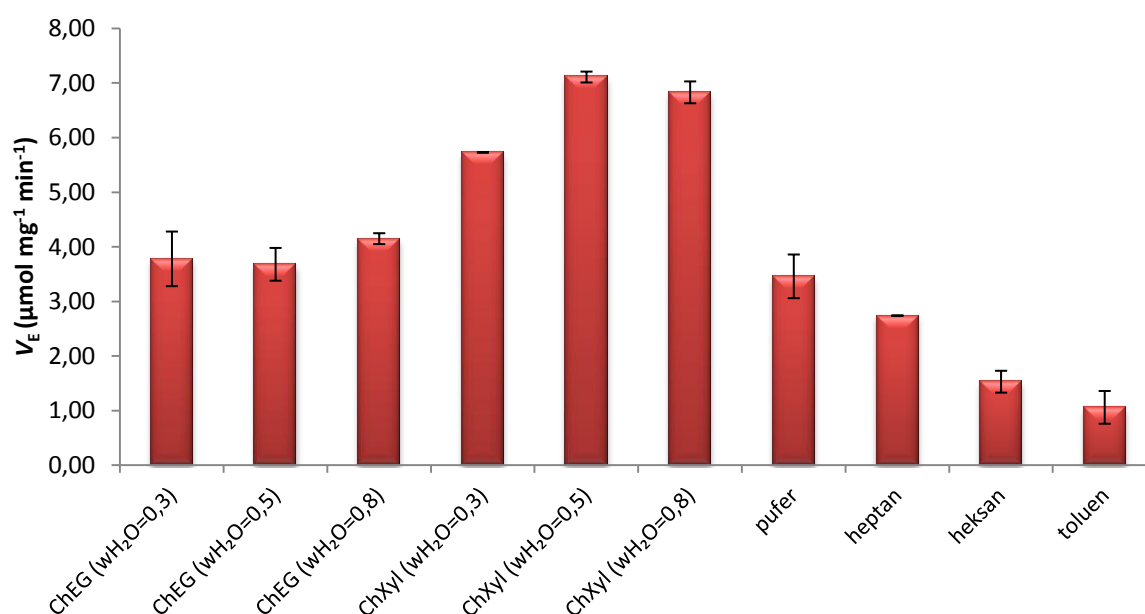
Slika 8. Volumetrijska produktivnost (V_p) hidrolize katalizirane lipazom u različitim otopalima. Reakcijski uvjeti: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 240 min.

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti lipazom katalizirane hidrolize (V_p) su u prirodnim eutektičkim otopalima u rasponu od $106,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ (ChEG wH₂O=0,5) do $205,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ (ChXyl wH₂O=0,5) što je ujedno i najbolja postignuta vrijednost. Nešto su niže nego u referentnim otopalima (pufer= $75,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, heptan= $61,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, heksan= $88,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ te toluen= $117,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) (slika 8).



Slika 9. Enantiomerni višak (ee) hidrolize katalizirane lipazom u različitim otopalima. Reakcijski uvjeti: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 240 min.

Enantiomerni višak hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil acetata u svim ispitanim prirodnim eutektičkim otapalima je od 94,6 % do 98,7 %, dok je u referentnim otapalima od 90,6 % za heksan do 95,1 % za kalij fosfatni pufer (slika 9). U pravilu, enantiomerni višak u svim prirodnim eutektičkim otapalima se povećava povećavanjem udjela vode. Najveća vrijednost enantiomernog viška hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil acetata je u eutektičkom otapalu ChXyl ($w_{H_2O}=0,8$) (98,7 %) pri čemu nastaje (*R*)-1-feniletanol, a (*S*)-1-feniletanol gotovo da ne nastaje što je vrijedno pošto se *R* - enantiomer koristi za proizvodnju lijekova i finih kemikalija.



Slika 10. Specifična produktivnost enzima (V_E) hidrolize katalizirane lipazom u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (*R*, *S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 240 min.

Uspoređujući iskorištenje (η), volumetrijsku produktivnost (V_P), enantiomerni višak (ee) te specifičnu produktivnost enzima (V_E) u prirodnim eutektičkim i konvencionalnim organskim otapalima koja su u literaturi poznata kao izvrsni mediji za lipazom kataliziranu hidrolizu (Yongxian i sur., 2011), prirodna eutektička otapala pokazala su se učinkovitijima u hidrolizi (*R*, *S*)-1-feniletil acetata sa višim dobivenim eksperimentalnim vrijednostima pa su moguća zamjena za konvencionalna organska otapala. Kao najpovoljnije otapalo za hidrolizu se istaknulo prirodno eutektičko otapalo ChXyl ($w_{H_2O}=0,5$) sa vrijednostima $\eta = 40 \text{ } \%$, $ee = 98,6 \text{ } \%$, $V_P = 25,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ i $V_E = 7,1 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

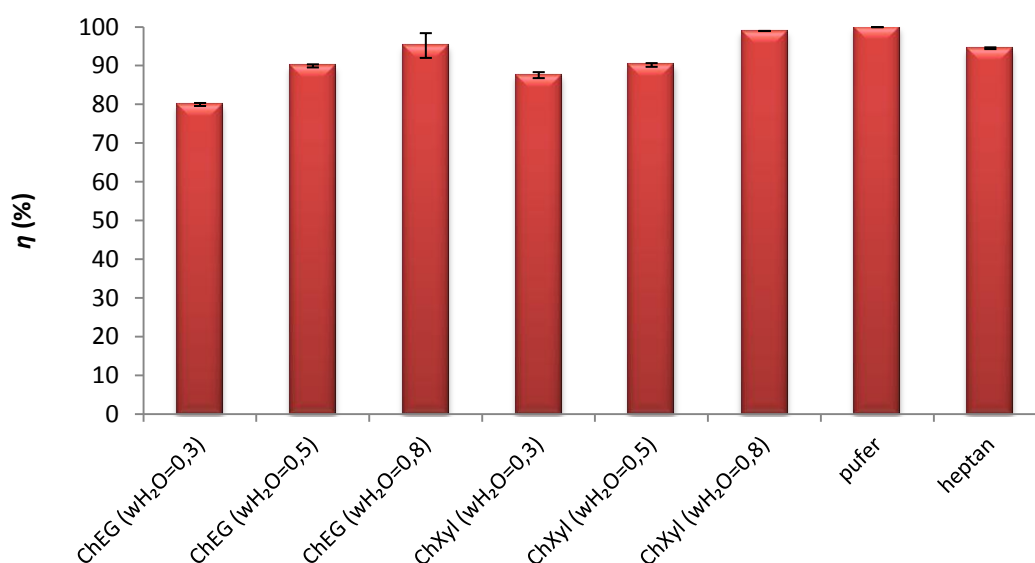
4.3. Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil acetata pomoću mrkve (*Daucus carota* L.)

Biljke kao biokatalizatori imaju sposobnost enantioselektivno transformirati egzogene supstrate dodane uzgojenim stanicama te zbog posebnosti enzimskih sustava nalaze primjenu u reakcijama koje mikroorganizmi ne mogu provesti (Faber, 2011). Zbog toga se u ovom radu provodila biokataliza (*R, S*)-1-feniletil acetata pomoću mrkve, za usporedbu sa hidrolizom pomoću lipaze CALB.

Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil acetata pomoću mrkve *Daucus carota* L. provodila se dodatkom 0,004 mol L⁻¹ (*R, S*)-1-feniletil acetata, 5 g narezane mrkve te u organskom otapalu (heptan), prirodnim eutektičkim otapalima i kalij-fosfatnom puferu (0,025 M). Reakcijska smjesa je miješana na tresilici 2 dana pri temperaturi od 25 °C.

Baždarni dijagram prema kojem je provedena kvantitativna analiza supstrata prikazan je na slici 5.

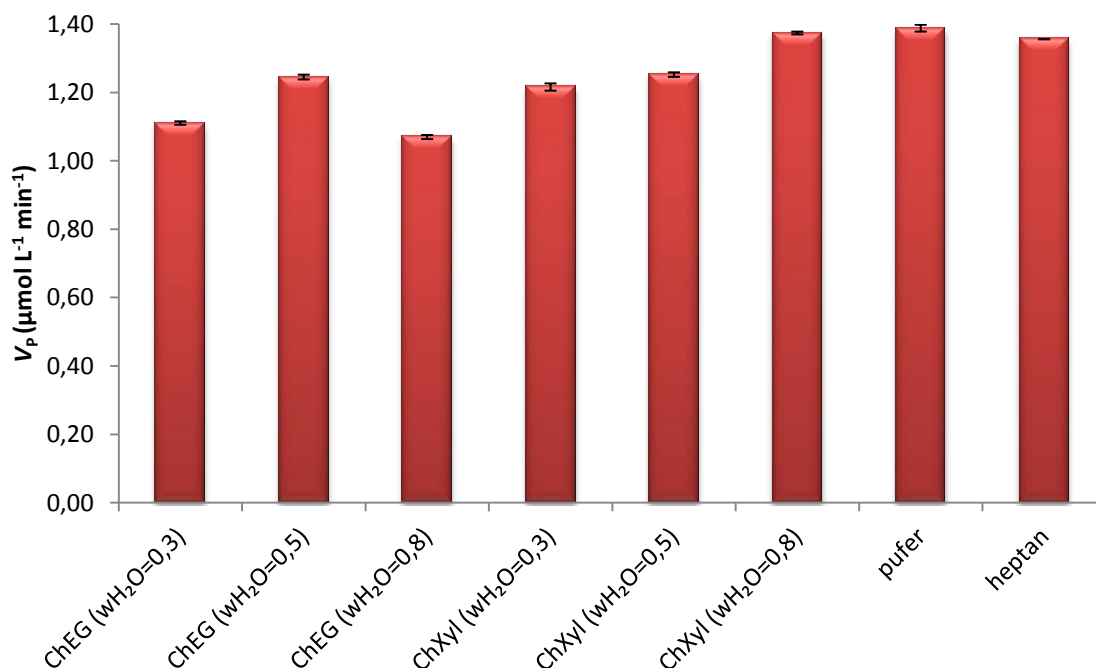
Poznato je da odabir otapala značajno utječe na uspješnost reakcije pa su zbog bolje interpretacije rezultata prema jednadžbama [5], [6], [7] i [8] izračunata iskorištenja hidrolize, volumetrijska produktivnost, enantiomerni višak te specifična produktivnost enzima, a rezultati prikazani na slikama 11, 12, 13 i 14.



Slika 11. Iskorištenje mrkvom katalizirane hidrolize (η) u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,004 mol L⁻¹ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 g mrkve; 25 °C; 2 dana.

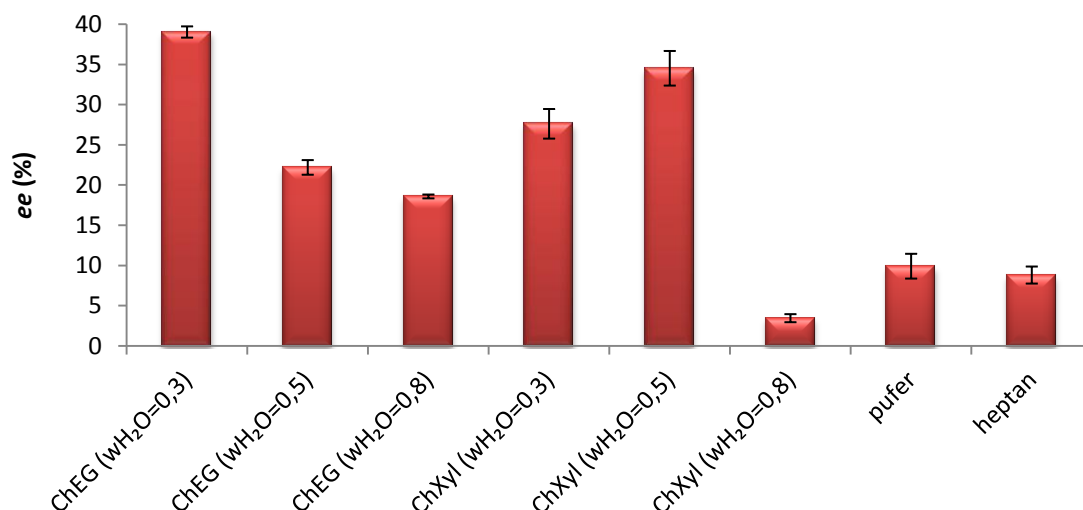
Iskorištenja (η) mrkvom katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil acetata u eutektičkim otapalima su od 80 % u ChEG s 30 % vode do 99 % u ChXyl s 80 % vode te su visoka kao i u referentnim otapalima (pufer 99,9 %, heptan 94,5 %) (slika 11).

Na vrijednosti iskorištenja hidrolize utječe udio vode u eutektičkom otapalu. Slične rezultate dobili su i Cvjetko Bubalo i sur. (2015b). Tako se promjenom vode u ChEG s 30 % do 80 % iskorištenja reakcije mijenjaju od 80 % do 95,2 %. Najbolje iskorištenje hidrolize je postignuto s prirodnim eutektičkim otapalom ChXyl ($w_{H_2O}=0,8$) te iznosi 99 % (slika 11).



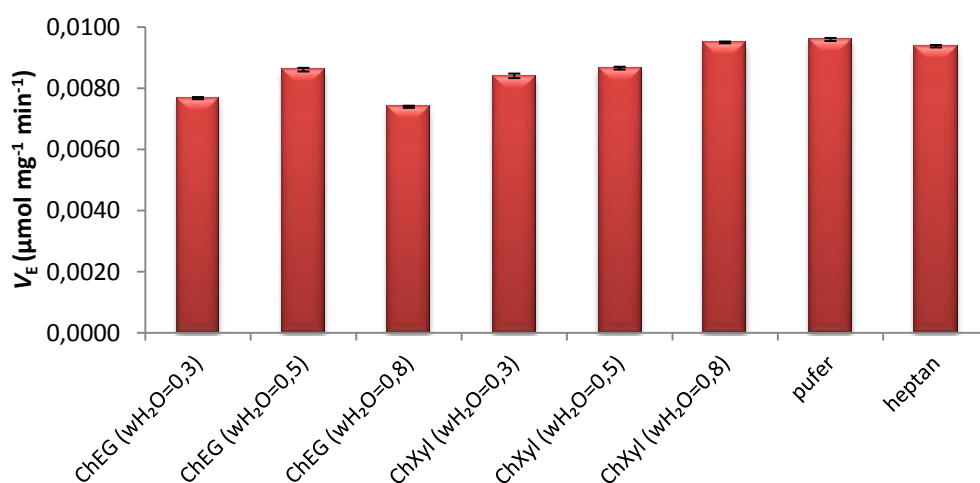
Slika 12. Volumetrijska produktivnost mrkvom katalizirane hidrolize (V_p) u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 g mrkve; 25°C ; 2 dana.

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti mrkvom katalizirane hidrolize (V_p) su u prirodnim eutektičkim otapalima od $1,1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ do $1,4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, dok su u puferu i heptanu približne maksimalnoj vrijednosti u prirodnom eutektičkom otapalu. Najniža volumetrijska produktivnost je postignuta pri hidrolizi u prirodnom eutektičkom otapalu ChEG sa 80 % vode ($1,1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$), dok je najbolja postignuta u eutektičkom otapalu ChXyl sa 80 % vode ($1,4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) (slika 12).



Slika 13. Enantiomerni višak mrkvom katalizirane hidrolize (*ee*) u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,004 mol L⁻¹ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 g mrkve; 25 °C; 2 dana.

Enantiomerni višak hidrolize (*R, S*)-1-feniletil acetata u svim ispitanim eutektičkim otapalima je od 3,5 % do 39,0 %, dok je u referentnim otapalima 8,8 % za heptan i 11,0 % za kalij-fosfatni pufer. U pravilu, enantiomerni višak u svim eutektičkim otapalima se smanjuje povećavanjem udjela vode. Najmanja vrijednost enantiomernog viška hidrolize (*R, S*)-1-feniletil acetata je u eutektičkom otapalu ChXyl (wH₂O=0,8) (3,5 %). Pošto je enzim mrkve sposoban hidrolizirati oba enantiomera, nije stereospecifičan za hidrolizu (*R, S*)-1-feniletil acetata, što su zaključili i Vandenberghe i sur. (2013), no ipak je vidljivo poboljšanje u enantioselektivnosti u eutektičkim otapalima u odnosu na enantioselektivnost u puferu i heptanu (slika 13).



Slika 14. Volumetrijska produktivnost enzima mrkvom katalizirane hidrolize (V_E) u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,004 mol L⁻¹ (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 g mrkve; 25 °C; 2 dana.

Volumetrijske produktivnosti enzima su u referentnim otapalima podjednakih vrijednosti kao i u prirodnim eutektičkim otapalima (slika 14). Usporedbom grafičkih prikaza volumetrijske produktivnosti (V_p), enantiomernog viška (ee) te volumetrijske produktivnosti enzima (V_E) pomoću mrkve, koja kao biokatalizator ima mnoge prednosti nad klasičnim organskim sintezama (Vandenberghe i sur., 2013), u eutektičkim otapalima, konvencionalnom organskom otapalu te puferu vidljivo je kako generalno organsko otapalo i pufer imaju više vrijednosti dobivenih rezultata.

Usporedbom korištenih biokatalizatora u ovom radu vidljivo je da su iskorištenja enantioselektivne hidrolize (*R*, *S*)-1-feniletil acetata (katalizirane lipazom te pomoću mrkve) približno jednakih vrijednosti, uz veće vrijednosti enantiomernog viška u korist lipaze kao biokatalizatora. Isto tako su vrijednosti volumetrijske produktivnosti hidrolize katalizirane lipazom 100 puta veće od onih u reakciji pomoću mrkve, kao i vrijednosti volumetrijske produktivnosti enzima lipaze koje su 1000 puta veće od onih u reakcijama kataliziranim mrkvom. Iako su rezultati pokazali da je učinkovitija primjena lipaze kao biokatalizatora u hidrolizi (*R*, *S*)-1-feniletil acetata, slična se iskorištenja mogu postići i pomoću mrkve koja je lako dostupna, jeftina, visoko enantioselektivna što ju čini atraktivnom alternativom u deracemizaciji kiralnih acetata u odgovarajuće, optički aktivne, sekundarne alkohole sa mogućnošću primjene u industrijskom mjerilu (Vandenberghe i sur., 2013).

U ovom radu je pokazano da se probirom prirodnih eutektičkih otapala, vrste biokatalizatora kao i uvjeta u kojima se vodi reakcija može značajno utjecati na iskorištenje i produktivnost hidrolize u usporedbi sa do sada korištenim konvencionalnim organskim otapalima. Također, primjena prirodnih eutektičkih otapala u biokatalitičkim reakcijama predstavlja doprinos razvoju novih *zelenih* procesa.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene ekološki prihvatljivih otapala u lipazom i mrkvom kataliziranoj hidrolizi (*R, S*)-1-feniletil acetata za dobivanje industrijski važnog sekundarnog, optički aktivnog alkohola. U tu svrhu pripravljena su prirodna eutektička otapala. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Prirodno eutektičko otapalo kolin-klorid:etilen glikol i kolin-klorid:ksiloza pripravljeno je zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida i donora vodika (etilen glikol i ksiloza) u molarnom omjeru 1:2 te 2:1. Također su pripravljena i prirodna eutektička otapala sa određenim volumnim udjelom vode.
2. Dodatkom određene količine vode prirodnom eutektičkom otapalu, za kolin-klorid:etilen glikol i kolin-klorid:ksilozu uočena je veća aktivnost lipaze od one zabilježene u organskim otapalima.
3. Uspoređujući hidrolizu (*R, S*)-1-feniletil acetata kataliziranu lipazom B izoliranom iz *Candida antarctica* i mrkvom *Daucus carota* L. u prirodnim eutektičkim otapalima učinkovitiji biokatalizator je izolirana lipaza uz veća iskorištenja i enantiomerni višak pri čemu se kao najbolje otapalo pokazalo ChXyl ($w_{H_2O}=0,5$).
4. Hidrolizom pomoću mrkve nema značajnijih pomaka u iskorištenju i produktivnosti u odnosu na organska otapala i pufer, no vidljivo je poboljšanje u enantioselektivnosti.
5. Racionalnim odabirom prirodnih eutektičkih otapala i vrste biokatalizatora moguće je utjecati na aktivnost enzima i kemijsku ravnotežu hidrolize.
6. Rezultati prikazani u ovom istraživanju doprinose su razvoju učinkovitih, ekonomičnih i održivih procesa za hidrolizu industrijski važnih spojeva.

6. LITERATURA

Ajam M. (2005) Metathesis and hydroformylation reactions in ionic liquids, Magistarski rad, University of Johannesburg.

Bommarius A. S., Riebel B. R. (2004) Biocatalysis. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. I. str. 7, 30 - 34.

Brunner G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* **67**: 21 - 33.

Cvjetko M. (2012) Synthesis, application in biotransformations and cytotoxicity of selected imidazolium-based ionic liquids, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu.

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

Cvjetko Bubalo M., Mazur M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. (2015b) Baker's yeast-mediated asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutanoate in deep eutectic solvents. *Process Biochemistry* **50**: 1788 - 1792.

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

Durand E., Villeneuve P., Lecomte J. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology* **115**: 379 - 385.

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

Grogan G. (2009) Practical Biotransformations. A John Wiley and Sons, Ltd. str. 1 - 8, 147 - 151.

Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2004) "Zelena" kemija – ekološki prihvatljivi procesi. *Kemija u industriji* **53**: 217 - 224.

Kudlak B., Owczarek K., Namieśnik J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents - a review. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 11975 - 11992.

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. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **178**: 559 - 575.

Maldonado R. R., Lopes D. B., Aguiar-Oliveira E., Kamimura E. S., Macedo G. A. (2016) A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **30**: 439 - 454.

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

Paiva P., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents - Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2**: 1063 - 1071.

Vandenberghe A., Marko E. I., Lucaccioni F., Lutts S. (2013) Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Industrial Crops and Products* **42**: 380 - 385.

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

Yongxian F., Zhangming X., Huawei Z., Junqing Q. (2011) Kinetic Resolution of Both 1-Phenylethanol Enantiomers Produced by Hydrolysis of 1-Phenylethyl Acetate with *Candida antarctica* Lipase B in Different Solvent Systems. *Kinetics and Catalysis* **52**: 686 - 690.

Izjava o izvornosti

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



Martina Rajn