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

Šarac, Andrea

Master's thesis / Diplomski 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:159:516762

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Andrea Šarac
792/MB

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

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

Rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta 9550.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na razumijevanju i pomoći tijekom izrade ovog rada te Manueli Panić, mag. ing. koja mi je svojim znanjem, savjetima i strpljenjem pomogla pri pisanju i izradi ovog rada. Hvala svim članovima Laboratorija za tennologiju i primjenu stanica i biotransformacije na uvijek prisutnoj ugodnoj i opuštenoj radnoj atmosferi. Veliko hvala i mojoj obitelji i prijateljima za potporu tijekom cijelog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveni polje: Biotehnologija

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

Andrea Šarac, 792/MB

Sažetak: Eutektička otapala pripadaju novoj generaciji nehlapljivih i stabilnih otapala te se intenzivno proučavaju kao zamjena za organska otapala u kemijskoj i biotehnološkoj industriji. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida u enantioselektivnoj hidrolizi (*R, S)*-1-feniletil-acetata uz lipazu B kao biokatalizator. Prirodna eutektička otapala pokazala su se povoljnijim otapalima od konvencionalnih otapala (organska otapala i pufer) za ispitivanu hidrolizu obzirom na ispitane parametre (η, *ee*, V_P i V_E), pri čemu se otapalo $ChGlc_{50\ \%}$ pokazalo kao najbolje. Optimiranjem reakcijskih uvjeta u $ChGlc_{50\%}$ pronađeni su optimalni uvjeti za hidrolizu koji se odnose na omjer enzima i supstrata, temperaturu i broj okretaja. Također, ispitan je utjecaj ultrazvuka i mikrovalova, bilo da su korišteni istovremeno ili samostalno, na volumetrijsku produktivnost enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata pri čemu se najveće povećanje produktivnosti postiglo istovremenom upotrebom ultrazvuka i mikrovalova.

Ključne riječi: biokataliza, lipaza, prirodna eutektička otapala, (*R, S*)-1-feniletil-acetat, ultrazvuk i mikrovalovi

Rad sadrži: 45 stranica, 19 slika, 4 tablice, 52 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*
2. Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo*
3. Izv.prof.dr.sc. *Vlatka Petravić Tominac*
4. Doc.dr.sc. *Mojca Čakić Semenčić* (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

LIPASE CATALYZED HYDROLYSIS OF (R,S)-1-PHENYLETHYL ACETATE IN EUTECTIC SOLVENTS

Andrea Šarac, 792/MB

Abstract: Natural eutectic solvents belong to the new generation of non-volatile and stabile solvents, and are intensively studied as a replacement for organic solvents in chemical and biotechnological industry. Within this work the possibility of application cholinum-based natural deep eutectic solvents for enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate with lipase B as biocatalyst was studied. All enantioselective reactions in natural deep eutectic solvents were successfully conducted, and those solvents were superior to organic solvents according to all tested parameters (η, *ee*, V_P and V_E) where solvent $ChGlc_{50\%}$ was found to be the best between all used. By optimizing the reaction conditions within the solvent $ChGlc_{50\%}$ the most optimal conditions have been shown and are refer to ratio of enzyme and substrate, temperature and number of turnovers. The impact of ultrasound (US) and microwave irradiation (MW), either used independently or simultaneously, on volumetric productivity of enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate, was also examined and the highest productivity was achieved by simultaneous use of US and MW.

Keywords: biocatalysis, lipase , natural deep eutectic solvents, (*R,S*)-1-phenylethyl acetate, ultrasound and microwave

Thesis contains: 45 pages, 19 figures, 4 tables, 52 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor

Tehnical support snd assistance: Manuela Panić, mag.ing.

Reviewers:
1. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
2. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo.* Assistant professor
3. PhD. *Vlatka Petravić Tominac,* Associate professor
4. PhD. *Mojca Čakić Semenčić,* Assistant professor (Substitute)

Thesis defended: 29 September 2017

Sadržaj

1. UVOD ... **1**
2. TEORIJSKI DIO ... **2**
2.1. ZELENA KEMIJA ... **2**
2.1.2. *Zelena* otapala ... 4
2.1.2.2. Eutektička otapala ... 4
2.1.2.3. Svojstva i priprava eutektičkih otapala ... 6
2.1.2.4. Primjena eutektičkih otapala ... 7
2.2. MIKROBNE LIPAZE: SVOJSTVA I INDUSTRIJSKA PRIMJENA ... **8**
2.2.1. Svojstva lipaza ... 8
2.2.2. Proizvodnja lipaza ... 8
2.2.3. Primjena lipaza ... 9
2.2.3.1 Hidroliza estera i karbonata ... 12
2.2.3.2 Proizvodnja novih biopolimernih materijala ... 13
2.2.3.3 Proizvodnja biodizela ... 13
2.2.3.4. Sinteza finih kemikalija ... 14
2.2.3.5 Dijagnostika i medicina ... 14
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... **15**
3.1. MATERIJALI ... **15**
3.1.1. Enzimski preparat ... 15
3.1.2. Kemikalije ... 15
3.1.3. Oprema i uređaji ... 15
3.2. METODE ... **16**
3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala ... 16
3.2.2. Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata katalizirana lipazom ... 17
3.2.3. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata pri različitim reakcijskim uvjetima ... 19
3.2.4. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata u mikrovalno-ultrazvučnom reaktoru ... 20
3.2.5. Određivanje koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata ... 20
3.2.6. Statistička obrada rezultata ... 22
4. REZULTATI I RASPRAVA ... **23**
4.1. PRIPRAVA PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ... **24**
4.2. HIDROLIZA (*R, S*)-1-FENILETIL-ACETATA KATALIZIRANA LIPAZOM ... **25**
4.2.1. Probir prirodnih eutektičkih otapala za hidrolizu (*R, S)*-1-feniletil-acetata ... 25
4.2.2 Utjecaj odnosa supstrat-enzim, temperature i broja okretaja na hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata u $ChGlc_{50\%}$ ... 33
4.2.3. Utjecaja mikrovalnog zračenja i ultrazvuka na volumetrijsku produktivnost hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u $ChGlc_{50\%}$ ... 36
5. ZAKLJUČCI ... **39**
6. LITERATURA ... **40**

1. UVOD

U posljednjem desetljeću razvija se potreba za smanjenjem primjene štetnih tvari u kemijskoj i biotehnološkoj industriji kroz program nazvan *zelena kemija*. Cilj tog programa jest pronaći kompromis između ekoloških, ekonomskih i socijalnih zahtjeva, a jedan od prioriteta je i pronalazak novih ekološki i ekonomski prihvatljivih otapala. *Zelena* otapala trebala bi biti netoksična, imati nisku hlapljivost, biti kemijski i fizički stabilna, imati mogućnost višekratne upotrebe te biti jednostavna za rukovanje. Otapala koja su se najviše približila ovim zahtjevima su između ostalih (ionske kapljevine, super- i subkritični fluidi) i prirodna eutektička otapala. Zahvaljujući njihovim osnovnim karakteristikama kao što su neznatna hlapljivost, nezapaljivost, velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost, mogućnosti reciklacije te veliki broj mogućih struktura ovih otapala koji u konačnici rezultiraju različitim fizikalno-kemijskim svojstvima, prirodna eutektička otapala pokazala su se prikladnima za raznovrsnu upotrebu u organskoj kemiji, (bio)katalitičkim procesima te procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenti. Upotreba niskotoksičnih, *zelenih* otapala u pripravi komercijalno zanimljivih kiralnih spojeva primjenom enzima, je bez sumnje korisna s ekološkog stajališta.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala u enantioselektivnoj hidrolizi (*R, S*)-1-feniletil-acetata primjenom imobilizirane lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antartica*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA KEMIJA

Zelena kemija, program implementacije održivog razvoja u kemijske tehnologije, postaje sve prepoznatljivija u akademskim krugovima i u industriji te u svojim smjernicama jasno ukazuje na nužnost smanjenja primjene štetnih organskih otapala koja su sveprisutna u industriji. Pojmovi održivog razvoja i *zelene* kemije u upotrebi su manje od 15 godina. Pokret za zaštitu okoliša, utemeljen na znanstvenim i ekonomskim načelima, a poznat kao *zelena* kemija utemeljen je 1990. u SAD-u, a od godine 1995. pokrenut je *Green Chemistry Challenge Awards* program s ciljem prepoznavanja i podupiranja fundamentalnih i razvojnih kemijskih industrijskih metodologija kojima se postiže prevencija onečišćivača (Anastas, 1998). Iz toga je proizašla definicija održivog razvoja: razvoj koji ide ususret potrebama današnjice bez da kompromitira mogućnosti budućih generacija da idu ususret svojim potrebama (Clark i Macquarrie, 2002). Održivi razvoj je posebno važan za kemijsku industriju jer poseban naglasak stavlja na izbjegavanje onečišćenja kao i prekomjernu upotrebu prirodnih izvora.

Procesi *zelene* kemije temelje se na 12 načela koja govore o smanjenju, odnosno uklanjanju opasnih ili štetnih tvari iz sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih produkata te se time upotreba supstancija opasnih za ljudsko zdravlje i okoliš smanjuje ili eliminira. Prema Jukić i sur. (2004) dvanaest načela *zelene* kemije su:

1. Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je već nastao;
2. Tijek kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni proizvod;
3. Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i za okoliš;
4. Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost;
5. Upotrebu pomodnih kemijskih tvari (otapala, sredstva 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 energetski 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. zaštita funkcijskih skupina, privremene modifikacije fizikalno-kemijskog procesa itd.);
9. Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagensa 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 upotrebu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

Prilikom osmišljavanja procesa *zelene* kemije nemoguće je istodobno maksimalno udovoljiti zahtjevima svih 12 načela, ali se tijekom pojedinih stupnjeva sinteze pokušava primijeniti što veći broj istih. Do ostvarenja ciljeva *zelenog* programa dolazi se kroz nekoliko trendova (Jukić i sur., 2004):

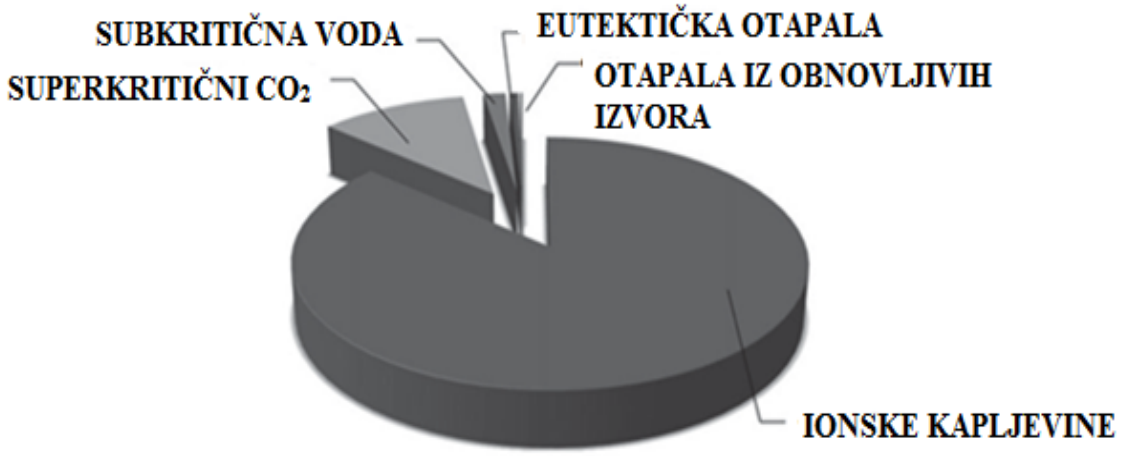
- istraživanja na području katalitičkih i biokatalitičkih reakcija u svrhu dobivanja visokoselektivnih, čistih spojeva bez nastanka štetnih međuprodukata;
- traženje novih sirovina, neškodljivih i obnovljivih;
- osmišljavanje manje toksičnih eko-kompatibilnih kemikalija;
- pronalaženje i ispitivanje novih alternativnih reakcijskih medija, netoksičnih i obnovljivih kao što je voda i superkritične tekućine;
- istraživanja alternativnih puteva za pročišćavanje onečišćenog zraka i vode radi poboljšanja njihove kvalitete, kao što su npr. fotokatalitičke reakcije .

Zelena kemija sastoji se od različitih smjerova pa se tako u kemijskim procesima primjenjuju katalitičke i biokatalitičke reakcije (heterogena i homogena kataliza), reakcije u *zelenim* alternativnim medijima (npr. voda, superkritični fluidi, ionske kapljevine i eutektička otapala) i reakcijskim uvjetima (npr. reakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima, fotokatalitičke reakcije) koje otvaraju put ekološki i ekonomski prihvatljivom razvoju tih procesa. Biokataliza je korisno oružje kada se ispituju kemijski procesi iz tzv. *zelene* perspektive, a upotreba niskotoksičnih, *zelenih* otapala u kombinaciji s biotransformacijama je bez sumnje korisno s ekološkog stajališta. Stoga, zamjenom nekih koraka kemijske sinteze s odgovarajućim biokatalitičkim korakom povećava se *zeleni* karakter cijelog procesa (Hernáiz i sur., 2010).

2.1.2. *Zelena* otapala

Prema smjernicama *zelene* kemije idealno otapalo treba biti netoksično, imati nisku hlapljivost, biti kemijski i fizički stabilno, imati mogućnost višekratne upotrebe i biti jednostavno za rukovanje. Kao nova *zelena* otapala posljednjih se godina razmatraju ionske kapljevine i eutektička otapala. Naime, osnovne karakteristike ove skupine otapala su neznatna hlapljivost, nezapaljivost, velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost te posebice mogućnosti reciklacije. Otapala koja su se najviše približila ovim zahtjevima su superkritični i subkritični fluidi, ionske kapljevine, eutektička otapala i otapala iz prirodnih/obnovljivih sirovina (slika 1).

Ionske kapljevine i eutektička otapala nose i naziv *dizajnirana otapala* (*eng.* designer solvents) jer imaju veliki broj mogućih struktura, te samim time i fizikalno-kemijskih svojstava, te su se pokazala prikladnima za raznovrsnu upotrebu u organskoj kemiji, (bio)katalitičkim procesima, kao i u procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenata.

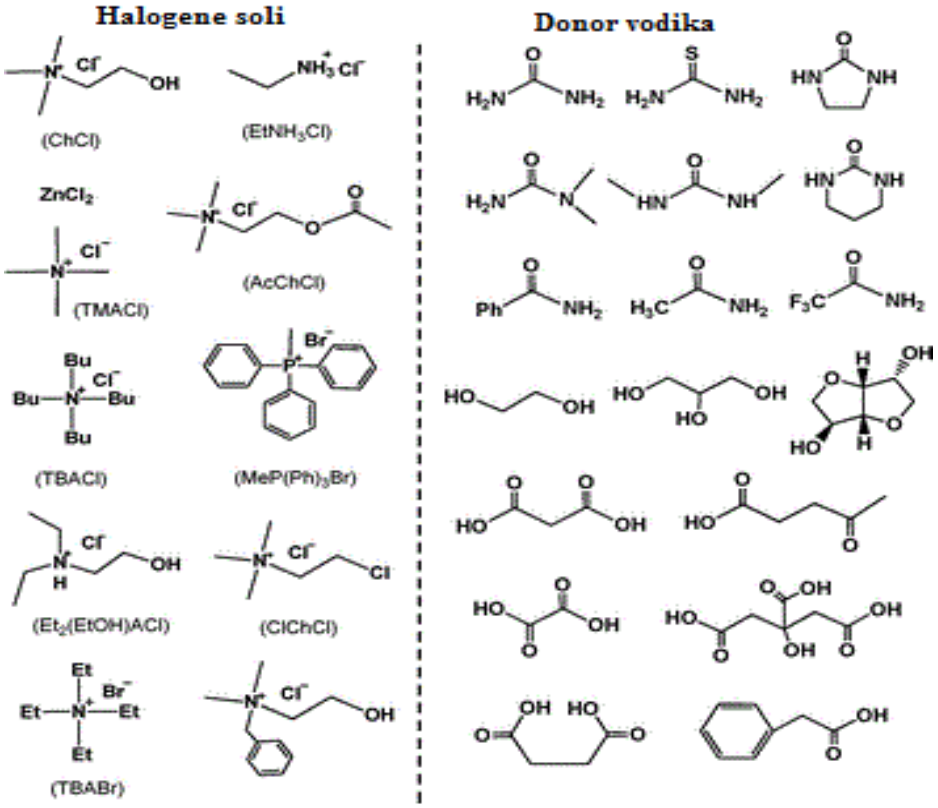


Slika 1. Omjeri objavljenih članaka o otapalima navedenim u ovom radu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.1.2.2. Eutektička otapala

Eutektička otapala (*eng.* Deep Eutentic Solvents, DES) predstavljaju novu generaciju tekućih soli baziranih na ionskim kapljevinama. Takva otapala su smjese akceptora vodika poput kvaternih amonijevih soli (npr. kolin-klorid) i prirodno izvedenog, nenabijenog donora vodika (npr. amini, šećeri, alkoholi i karboksilne kiseline) u određenom molarnom omjeru

(slika 2). Kad su spojevi koji čine eutektičko otapalo primarni metaboliti (šećeri, aminokiseline, organske kiseline itd.), dobivena otapala se nazivaju prirodna eutektička otapala (*eng.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) i u potpunosti predstavljaju koncept *zelene* kemije (Paiva i sur., 2014). Glavna karakteristika ovih otapala jest da imaju nižu točku tališta od točke tališta svake pojedine komponente (Paiva i sur., 2014). Iako DES-ovi nisu u potpunosti sastavljeni od ionskih vrsta, često se nazivaju četvrtom generacijom ionskih tekućina. Razlog tome su slična svojstva ILs-a i DES-ova (nehlapljivost, nezapaljivost, velika viskoznost, slične sirovine za njihovu pripravu). Također, niska cijena komponenata, jednostavna priprema, niska ili zanemariva toksičnost te održivost obzirom na okoliš i ekonomsku korist čine DES-ove poželjnim otapalima (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Danas se koriste kao otapala u organskoj sintezi i (bio)katalizi, proizvodnji polimera, elektrokemiji, proizvodnji nanomaterijala, procesima razdvajanja i analizi, biomedicini i ekstrakciji biološki aktivnih komponenata iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).



Slika 2. Primjeri akceptora i donora vodika za sintezu DES-a (Zhang i sur., 2012).

2.1.2.3. Svojstva i priprava eutektičkih otapala

Priprava eutektičkih otapala u laboratorijskom mjerilu je relativno jednostavan postupak koji se sastoji od izravnog dodavanja donora vodikove veze i soli u tikvicu u određenom molarnom odnosno masenom omjeru, a potom slijedi zagrijavanje i miješanje, sve dok se ne formira bezbojna tekućina (obično 2 sata pri 60 ºC). Zbog velike higroskopnosti komponenata, ali i eutektičkog otapala, moraju se poduzeti sve mjere opreza za sprječavanje kontakta smjese s vlagom iz zraka (Abbott i sur., 2003).

Do sada je sintetiziran velik broj eutektičkih otapala, a jedna od najpopularnijih kvaternih soli koja se koristi za sintezu eutektičkih otapala je kolin-klorid (ChCl) jer je jeftina, biorazgradiva i netoksična sol (slika 2) koja je opće prihvaćena za upotrebu u svim vrstama proizvoda. Sama sol (kolin-klorid) proizvodi se vrlo ekonomičnim procesom u kojem gotovo nema otpada (Durand i sur., 2012). Upravo zbog niže točke tališta (niže od čistih sastojaka) pri sobnoj temperaturi je otapalo. Do danas, većina pripravljenih eutektičkih otapala su tekućine ispod 70 ºC. Pretpostavlja se da donor vodika djeluje kao tvorac kompleksa i djeluje na anionsku vrstu koja zbog toga povećava efektivnu veličinu, što pak smanjuje interakcije s kationom i na kraju dovodi do smanjenja točke tališta smjese (Durand i sur., 2013). Jedan od najistaknutijih primjera je smjesa kolin-klorida i uree (u omjeru 1:2), kojima su točke tališta 247 ºC odnosno 133 ºC, dok je točka tališta ovog eutektičkog otapala 12 ºC (Abbott i sur., 2003).

Svojstva eutektičkih otapala pod snažnim su utjecajem vodikovih veza. Bez obzira što se fluidnost otapala lako prilagođava ovisno o prirodi kationske soli, prirodi donora vodika, veličini komponenata, molarnom omjeru, prisutnosti vode i o temperaturi, viskoznost eutektičkih otapala je značajno veća od viskoznosti mnogih uobičajenih otapala, ali je slična viskoznosti ionskih kapljevina (> 0,100 Pa s pri 25 ºC) (Durand i sur., 2013). Razlog tome je utjecaj vodikovih, ali i van der Waalsovih te elektrostatskih interakcija. Značajka viskoznosti je da se značajno smanjuje povećanjem temperature i također je obrnuto proporcionalna s vodljivošću. Dakle, vodljivost, koja je početno niska u ovim otapalima (< 2 mS cm^{-1}), povećava se s povećanjem temperature, što dokazuje da su ioni disocirani u tekućini i mogu se kretati samostalno (Abbott i sur., 2003).

Gustoća varira ovisno o molarnom sastavu smjese, ali u usporedbi s vodom eutektička otapala obično imaju veću gustoću i polarnost, veću od većine konvencionalnih polarnih organskih otapala (metanol, acetonitril, dimetil sulfoksid) (Durand i sur., 2013; Gorke i sur., 2008). Otapala kao što su metanol, etanol ili voda, imaju tendenciju miješanja s eutektičkim

otapalima, dok se npr. toluen, heksan, etil-acetat, acetonitril, dietil-eter, itd. sa istim ne miješaju. Prema tome, heksan ili etil-acetat se mogu koristiti za ekstrakciju molekula male ili srednje polarnosti, čime omogućuju ponovno korištenje eutektičkog otapala.

Eutektička otapala imaju veliki potencijal za primjenu u *zelenim* tehnologijama upravo zbog niske toksičnosti, međutim, ta pretpostavka bazirana je na podacima o toksičnosti pojedinih komponenata od kojih su načinjena, a koja su već biološki dobivena i farmaceutski prihvatljiva. Takva pretpostavka ne uzima u obzir mogućnost sinergističkog efekta kombiniranja spojeva u eutektičkim otapalima, a koji bi mogao imati značajan utjecaj na biološka svojstva ovih otapala (Hayyan i sur., 2015). Iako su eutektička otapala našla potencijal u *zelenim* tehnologijama, prije upotrebe ovih otapala u industrijskim mjerilima potrebno je opširno i kritično pristupiti ispitivanju njihovog utjecaja na okoliš (biorazgradivost, toksičnost) (Tanneberger, 2010).

2.1.2.4. Primjena eutektičkih otapala

Eutektička otapala predstavljena su kao *zelenija* verzija ionskih kapljevina te su našla svoju primjenu u sintezi, organskim reakcijama s metalom kao katalizatorom, elektrokemiji, biokemiji, separacijama i u proizvodnji nanomaterijala. Uspješno su testirana u biokatalitičkim reakcijama, međutim u usporedbi s ostalim primjenama niže navedenim, biokatalitičke reakcije u eutektičkim otapalima nisu opsežno istraživane. Tek 2008. godine je po prvi put pokazano da je moguće provesti alkoholizu i aminolizu alifatskih estera u eutektičkim otapalima, bez očite denaturacije enzima (Gorke i sur., 2008). Primjenjuju se i za aktivaciju proteaza na način da proteaze u eutektičkim otapalima s glicerolom kao donorom vodika imaju aktivnost i selektivnost koji ovise o udjelu vode u otapalu, pa stoga mala količina vode od oko 5 % može povećati enzimsku aktivnost, uz smanjenje selektivnosti.

Glicerol, koji je glavni nusproizvod industrije biodizela, može se odvojiti raznim metodama, no sve te tehnike nisu pogodne za industrijsko mjerilo, zbog visoke cijene i drugih poteškoća, pa su tako ova otapala primjenu našla i u ekstrakciji glicerola iz biodizela (Durand i sur., 2013). Također, eutektička otapala se mogu koristiti kao katalizatori ili kao katalizator i medij u elektrofilnim supstitucijama, nukleofilnim reakcijama, Diels-Alder kondenzaciji, kopolimerizaciji, dehidrataciji ugljikohidrata te reakcijama redukcije (Durand i sur., 2013). Eutektička otapala se mogu koristiti i kao medij koji poboljšava kontakt između reaktanata i na taj način promiču organske sinteze ili katalize. Njihova karakteristika je da ih i donori i akceptori elektrona čine vrlo dobrim kandidatima za otapanje raznolikih spojeva, uključujući

soli, proteine, aminokiseline, lijekove, tenzide, šećere i polisaharide. Kako mogu otapati i razne metalne okside, eutektička otapala se mogu koristi u elektrokemijskim procesima. Osim toga, neka istraživanja su pokazala da imaju jaku sposobnost otapanja CO_2, zbog čega su vrlo atraktivni u sustavima za pročišćavanje plina, katalizi i kemijskog fiksaciji CO_2.

2.2. MIKROBNE LIPAZE: SVOJSTVA I INDUSTRIJSKA PRIMJENA

2.2.1. Svojstva lipaza

„ Istinske“ lipaze definirane su kao karboksilesteraze koje kataliziraju hidrolizu i sintezu dugolančanih acil-glicerola koristeći trigliceride kao standardni supstrat. Lipaze su zanimljive jer pokazuju izuzetnu kemoselektivnost, regioselektivnost i stereoselektivnost, ali i mnoge od njih mogu se proizvesti u velikim količinama u mikrobnim organizmima kao što su bakterije te u gljivama (Eggert i Jaeger, 2002). Od 80-tih godina prošlog stoljeća raste broj dostupnih lipaza te se zahvaljujući svojstvima kao što su biorazgradivost, visoka specifičnost i visoka katalitička učinkovitost koriste kao industrijski biokatalizatori. Najpoželjnije karakteristike lipaza su njihova sposobnost da koriste mono-, di-, i trigliceride kao i slobodne masne kiseline u transesterifikaciji; niska inhibicija produktom; visoka aktivnost/prinos u nevodenom mediju; kratko reakcijsko vrijeme; otpornost na promjene temperature i pH, te mogućnost višekratne upotrebe imobiliziranih lipaza (Kumar i sur., 2012). Također, jedan od razloga njihove biotehnološke primjene je stabilnost u organskim otapalima te aktivnost bez dodatka kofaktora (Jaeger i Reetz, 1998). Međutim, metalni ioni mogu stimulirati ili inhibirati mikrobnu proizvodnju enzima pa tako ioni soli kao što su Ca^{2+}, Cd^{2+} i Fe^{2+} poboljšavaju aktivnost imobiliziranih biokatalizatora dok neki od iona kao Co^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Al^{3+} i Na^{+} imaju blagi inhibicijski učinak. Iako su pronađene lipaze s optimumom pri nižim i višim rasponima pH-vrijednosti i temperature, ovisno o mikrooganizmu iz kojeg potječu, poznato je da većina bakterijskih lipaza ima neutralnu ili lužnatu optimalnu pH-vrijednost. Općenito, optimalna temperatura za rad bakterijskih lipaza kao biokatalizatora je u rasponu od 30 do 60 °C (Verma i sur., 2012).

2.2.2. Proizvodnja lipaza

Lipaze su sveprisutne u prirodi i proizvode ih razne životinje, biljke i mikroorganizmi. Sa stanovišta industrijske proizvodnje enzima, prednost primjene mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni) vezan je uz visok koeficijent rasta stanica na relativno jeftinom mediju, dobra

iskorištenja te činjenicu da su mnogi mikroorganizmi izvor ekstracelularnih lipaza što olakšava i smanjuje troškove izolacije enzima pri proizvodnji (Hasan i sur., 2006). Prilikom izolacije lipaza za biotehnološku upotrebu obično se prvo eksprimira odgovarajući gen u određenom mikroorganizmu. Ovaj korak često se smatra jednostavnim jer se nekoliko proteina može lako prekomjerno eksprimirati i ponekad čak ekstracelularno izlučiti koristeći komercijalno dostupne sustave (Baneyx, 1999). Kako bi se osiguralo točno smatanje i pravilno izlučivanje lipaza potrebni su periplazmatski katalizatori procesa smatanja koji uključuju specifične intermolekulske pratioce koji se nazivaju Lif proteini (lipaze specifične foldaze). Za identifikaciju i izolaciju novih lipaznih gena te optimizaciju postojećih gena obzirom na željena svojstva koristi se usmjerena evolucija (Jaeger i sur., 1994). S brzim porastom zahtjeva za enantiomerno čistim spojevima koji se proizvode biokatalitičkim procesima najvažniji pristup je evolucija visoko enantioselektivnih lipaza. U tu svrhu razvile su se alternativne metode bazirane na odabiru kao što je prikaz faga koji u principu omogućava identifikaciju bolje varijante enzima u vrlo velikoj knjižnici koja se sastoji od 108 do 1012 članova (Soumillion i Fastrez, 2001). Bakterijske lipaze iz *P. aeruginosa* i *B. subtillis* poslužile su kao modeli enzima kako bi se pokazao potencijal usmjerene evolucije.

2.2.3. Primjena lipaza

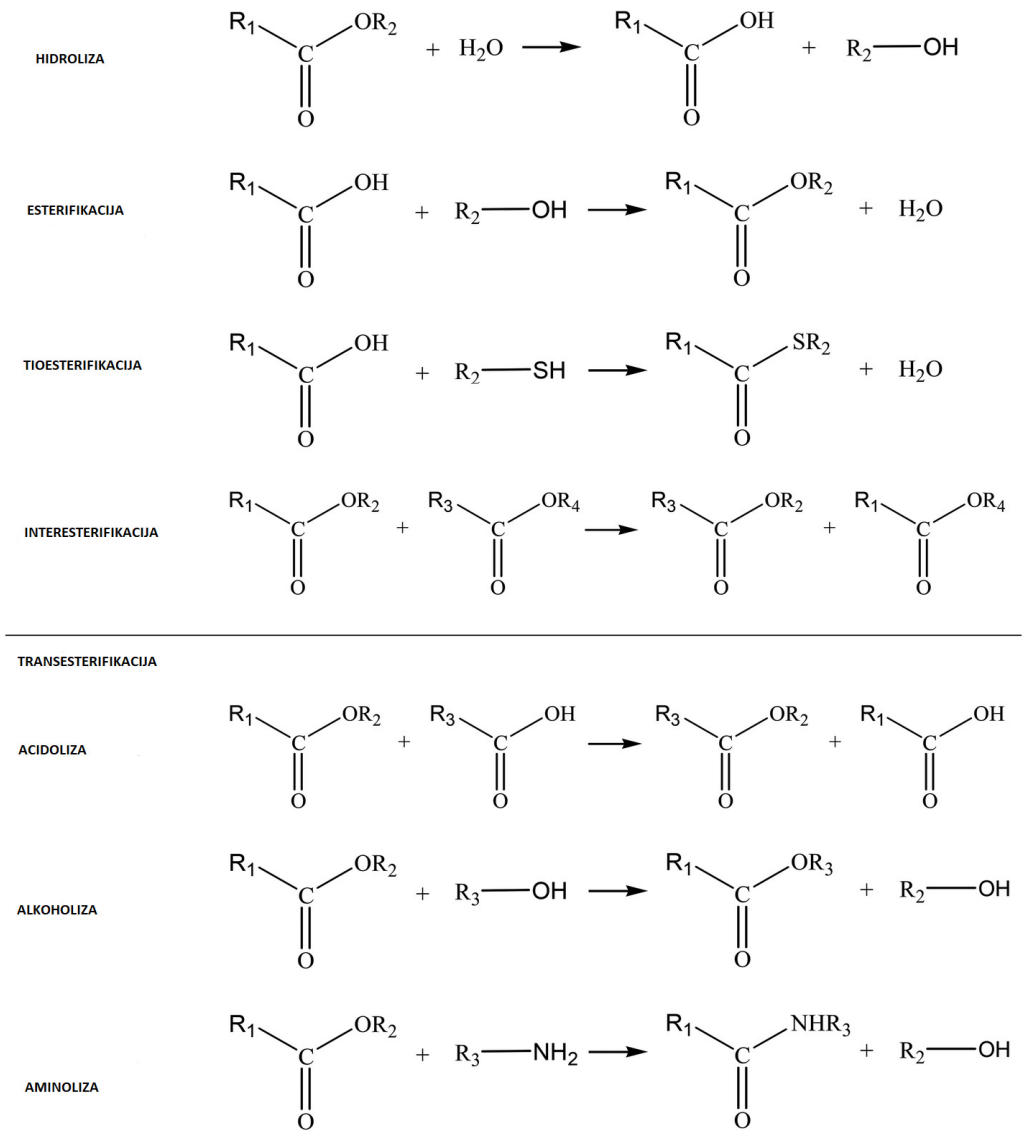
Lipaze se primjenjuju u različitim područjima industrije od hrane, mliječnih proizvoda, farmaceutskih proizvoda, agrokemikalija i deterdženata do oleo-kemikalija, industrije čajeva, kozmetike, kože i nekih procesa bioremedijacije (tablica 1). Upravo zato noviji mikroorganizmi namijenjeni su za proizvodnju lipaza željenih svojstava. Razumijevanje odnosa između funkcije i strukture omogućit će istraživačima da prilagode nove lipaze za biotehnološku primjenu (Verma i sur., 2012).

Tablica 1. Industrijske primjene lipaza (Verma i sur., 2012).

Industrija	Postupak	Produkt primjene
Mliječni proizvodi	Hidroliza mlijeka, masti, modifikacija masti iz maslaca	Razvoj okusa u mlijeku, siru i maslacu
Pekarski proizvodi	Poboljšanje okusa	Produljenje roka trajanja
Napitci	Poboljšanje arome	Alkoholna pića, npr. sake vino
Meso i riba	Poboljšanje okusa	Uklanjanje masti iz mesa i ribe
Deterdženti	Smanjenje biodegradirajućih mrlja	Čišćenje odjeće
Agrokemikalije	Esterifikacija	Herbicidi kao fenoksipropionat
Farmaceutici	Hidroliza ekspoliesternih alkohola	Proizvodnja raznih intermedijera
Kontrola onečišćenja	Hidroliza i transesterifikacija ulja i masti	Uklanjanje tvrdokornih mrlja, hidroliza ulja i masti

Lipaze su jeftini enzimi te za njihovu aktivnost nisu potrebni koenzimi. Topive su u vodi, a katalitička aktivnost im je smanjena u jednofaznim sustavima u odnosu na dvofazne sustave zahvaljujući pojavi koja se naziva aktivacija na granici faza. U dvofaznim sustavima s organskom i vodenom fazom, lipaza se veže na granici faza, gdje ima najveću katalitičku vrijednost i ondje provodi reakciju (Ghanem, 2007). Lipaze izolirane iz različitih izvora imaju širok spektar aktivnosti, visoko su selektivne i stabilne. Također kataliziraju hidrolizu velikog broja prirodnih i sintetskih estera uz zadržavanje enantio- i regioselektivnosti pa ih kombinacija širokog spektra supstratne aktivnosti, visoke selektivnosti i reakcija sa u vodi netopljivim supstratima čini idealnim katalizatorima. Upotreba lipaza u biotransformacijama obuhvaća različite reakcije solvolize na karboksilnoj skupini, kao što je esterifikacija, transesterifikacija (alkoholiza), perhidroliza i aminoliza (slika 3) (Park i Kazlauskas, 2001). Lipazama katalizirane reakcije u bezvodnim uvjetima, prvenstveno organskim otapalima, proučavaju se već više od dva desetljeća jer je voda nepovoljno otapalo u gotovo svim industrijski važnim

biotransformacijama (organski spojevi od komercijalnog interesa slabo su topljivi u vodi; procesi uklanjanja vode iz reakcijske smjese vrlo su skupi; u vodi se često odvijaju nepoželjne sporedne reakcije kao što su hidroliza, racemizacija i polimerizacija). 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 je manja mogućnost denaturacije enzima (Ghanem, 2007). U posljednje vrijeme upotreba lipaza u bezvodnom mediju proširena je na alternativna otapala poput ionskih kapljevina i eutektičkih otapala. U biotransformacijama ionske kapljevine i eutektičke smjese mogu se koristiti kao čista otapala, kao kootapala u vodenom mediju i kao dio dvofaznog sustava (Sheldon i Rantwijk, 2008; Durand i sur., 2013). Brojna istraživanja pokazala su da ionske kapljevine i eutektička otapala mogu biti izvrsna zamjena za klasična organska otapala jer su pogodnija. Dizajniranjem ionskih kapljevina i eutektičkih otapala moguće je utjecati na topivost supstrata i produkta; aktivnosti, selektivnosti i stabilnosti enzima te na kemijsku ravnotežu reakcije (Cvjetko i sur., 2012). Upravo zbog nehlapljivosti i nezapaljivosti ovih otapala, njihova primjena u lipazama kataliziranim reakcijama predstavlja značajan doprinos razvoju ekološki prihvatljivih postupaka (Cvjetko i sur., 2012; Durand i sur., 2012).

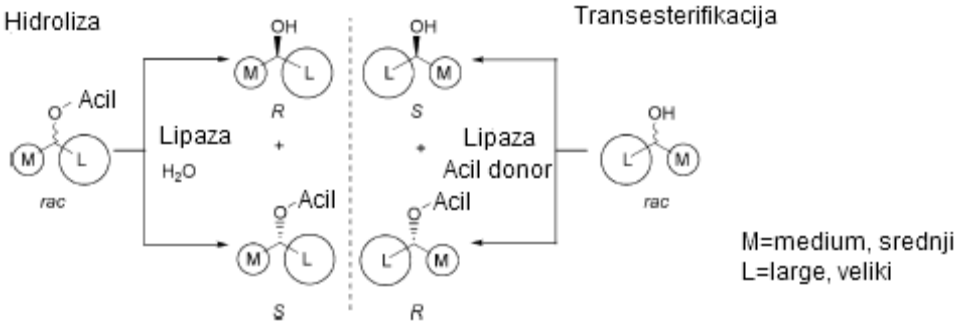


Slika 3. Primjeri reakcija kataliziranih lipazama (Aouf i sur., 2014).

2.2.3.1. Hidroliza estera i karbonata

Danas je enzimska transesterifikacija proces koji se široko primjenjuje za pripremu kiralnih komponenata. No, enzimska hidroliza (prirodna reakcija lipaza) također je korisna u pripravi kiralnih spojeva iz prokiralnih komponenata. Postoje reakcije enzimske hidrolize koje su od velike koristi za sintezu farmaceutika ili njihovih intermedijera poput *β*-adrenergičnih blokatora (npr. propanolol) koji su sintetizirani kemoenzimskim metodama gdje je ključni korak enzimska hidroliza. Glavni razlog za pripremu ovih aminoalkohola u optički čistom obliku je zadržavanje ovih farmaceutika u (*S*)-enantiomeru (Gotor, 2002). Hidroliza i

transesterifikacija mogu biti komplementarni procesi za rezoluciju sekundarnih alkohola (slika 4) gdje (*R*)-izomer u oba procesa reagira brže nego (*S*)-izomer (Kazlauskas i sur., 1991).



Slika 4. Simetrija hidrolize i transesterifikacije (Gotor-Fernández i Gotor, 2007).

Kod enzimske hidrolize karbonata, praktičan primjer je kemoenzimska sinteza (*S*)-zoplikona, hipnotika visoke učinkovitosti i niske toksičnosti, a hidroliza se odvija uz pomoć lipaza kao biokatalizatora (Fernández-Solares i sur., 2002).

2.2.3.2. Proizvodnja novih biopolimernih materijala

Biorazgradivi materijali proizvedeni iz prirodnih obnovljivih izvora poput polifenola, polisaharida i poliestera pokazuju značajan stupanj različitosti i složenosti te poprimaju sve veću važnost. Kao biokatalizatori sinteze takvih polimera koriste se razne lipaze i esteraze zbog njihovih svojstava kao što su visoka selektivnost (npr. stereoselektivnost, regioselektivnost i kemoselektivnost) i odvijanje sinteze pri blagim reakcijskim uvjetima (Gross i sur., 2001). Slobodnom kombinacijom diestera i diolnih monomera, različitih reakcijskih uvjeta i lipazama iz različitih izvora postigla se visoka raznolikost knjižnica lipazom kataliziranih polimera (Egger i Jaeger, 2002).

2.2.3.3. Proizvodnja biodizela

Biodizel je smjesa alkilnih monoestera i dobiva se transesterifikacijom biljnih ulja (uljane repice, soje, suncokreta) metanolom, etanolom ili drugim alkoholom. Te reakcije transesterifikacije mogu biti katalizirane lipazama u organskim otapalima. Međutim, visoka cijena odgovarajućeg biokatalizatora predstavlja problem prilikom proizvodnje u industrijskom mjerilu. Nedavno su predstavljene dvije strategije za rješenje ovog problema: imobilizacijom lipaze iz bakterije *Pseudomonas fluorscens* povećana je stabilnost čak i nakon ponovnog

korištenja; i citoplazmatska prekomjerna ekspresija lipaze iz plijesni *Rhizopus oryzae* u kvasac *Saccharomyces cerevisiae* uz naknadno zamrzavanje-odmrzavanje i sušenje zrakom rezultiralo je u stanični biokatalizator koji katalizira metanolizu u reakcijskom sustavu bez otapala (Iso i sur, 2001).

2.2.3.4. Sinteza finih kemikalija

Prilikom sinteze terapeutika, agrokemikalija i aroma ključni intermedijeri su obično složeni i/ ili kiralni spojevi koji se teško sintetiziraju kemijskim metodama. Obzirom da je samo jedan od dva ljekovita enantiomera farmaceutski funkcionalan jako je važna sinteza enantiočistih građevnih jedinica što je i osnovni razlog proširenja biokatalize s lipazama na čelu tog razvoja (Patel, 2001). Lipaze su našle primjenu u kozmetičkoj industriji i proizvodnji različitih aroma pa je tako izvješteno nekoliko primjera lipazom katalizirane sinteze aroma i mirisnih komponenti s (-)-mentolom kao najistaknutijim (Egger i Jaeger, 2002).

2.2.3.5. Dijagnostika i medicina

Obećavajuće novo područje u dijagnostici je upotreba mikrobnih lipaza kao biosenzora. Generiranje glicerola iz triacilglicerola i kvantificiranje oslobođenog glicerola ili alternativno neesterificirane masne kiseline kemijskim i enzimskim metodama omogućava liječnicima preciznu dijagnozu pacijentima s kardiovaskularnim problemima. Koriste se u enzimskoj analizi triglicerida seruma kako bi generirali glicerol koji se zatim određuje kolorimetrijskim reakcijama vezanim enzimom. Nespecifične lipaze, posebno lipaza iz kvasca *Candida rugosa* s visokom specifičnom aktivnošću izabrana je kako bi se omogućilo brzo oslobađanje glicerola. Biosenzor lipaze iz kvasca *Candida rugosa* razvijen je kao sonda koja se optički konjugira u bio-prepoznavajuću grupu u DNA (Pandey, 2009). Također, njihov povećani nivo može indicirati određenu infekciju ili bolest pa se tako detekcija stanja kao što su akutni pankreatitis i ozljede gušterače određuje mjerenjem razine lipaze u serumu (Lott i Lu, 1991).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Enzimski preparat

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

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda
- Etilen glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Fruktoza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, 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
- Heptan, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R,S*)-1-feniletil-acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sorbitol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sorboza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Toluen, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- pH/ion metar S220, Mettler Toledo, SAD
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor, Lab Kits, Hong Kong, Kina
- Tikvice s okruglim dnom

3.2. METODE

3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

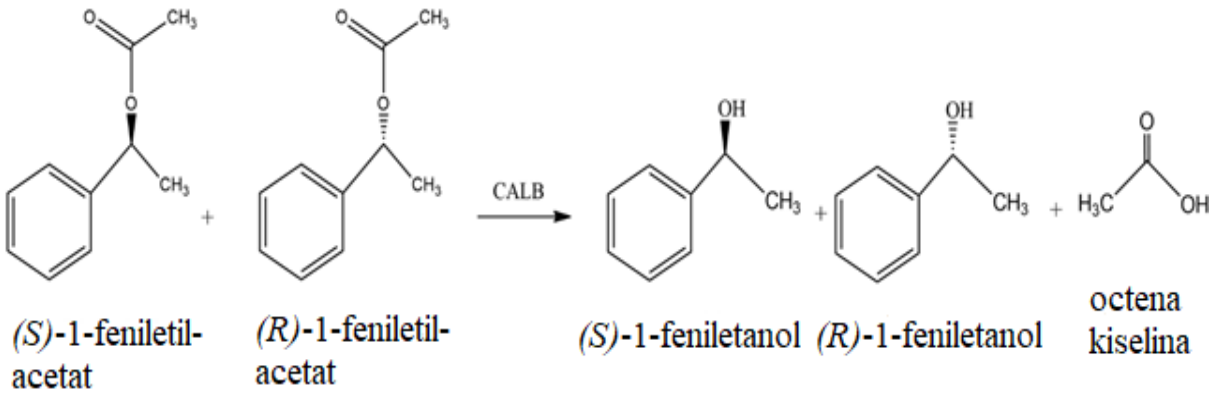
U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se određene količine komponenti prema molarnim omjerima (tablica 2) s određenom količinom vode kako bi se postigle koncentracije vode u eutektičkom otapalu od 30, 50 i 80 % (v/v) te se reakcijska smjesa zagrije do 50 °C na magnetskoj miješalici tijekom 2 sata dok ne nastane homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Prije daljnje primjene, eutektička otapala se zatvore parafilmom i čuvaju na tamnom mjestu. pH-vrijednost izmjerena je pomoću multimetra pH/ion metar S220, Mettler Toledo pri temperaturi od 25°C.

Tablica 2. Prirodna eutektička otapala sintetizirana u ovom radu.

Prirodno eutektičko otapalo	**Kratica**	**Molarni omjer komponenata**	**Udio vode (%, v/v)**	**Kratica**
Kolin-klorid: glukoza	ChGlc	1:1	30	$ChGlc_{30\%}$
			50	$ChGlc_{50\%}$
			80	$ChGlc_{80\%}$
Kolin-klorid: fruktoza	ChFru	1:1	30	$ChFru_{30\%}$
			50	$ChFru_{50\%}$
			80	$ChFru_{80\%}$
Kolin-klorid: sorboza	ChSor	1:1	30	$ChSor_{30\%}$
			50	$ChSor_{50\%}$
			80	$ChSor_{80\%}$
Kolin-klorid: sorbitol	ChSol	1:1	30	$ChSol_{30\%}$
			50	$ChSol_{50\%}$
			80	$ChSol_{80\%}$
Kolin-klorid: etilen glikol	ChEG	1:2	30	$ChEG_{30\%}$
			50	$ChEG_{50\%}$
			80	$ChEG_{80\%}$

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

Reakcija hidrolize (*R, S*)-1 feniletil-acetata katalizirane lipazom provedena je na način da se u epruvetu doda 2976 µL otapala (organska otapala, 0,025 mol L^{-1} kalij-fosfatni pufer ili prirodno eutektičko otapalo), 24 µL supstrata (*R, S*)-1-feniletil-acetata i 5 mg imobiliziranog enzima lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antartica* (pripravak Novozym 435) čime i započinje reakcija (slika 5). Reakcija se provodi pri temperaturi od 25 °C i 650 o min^{-1} tijekom 280 minuta. Pri provođenju reakcije u prirodnim eutektičkim otapalima 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 homogenizatoru (650 o min^{-1}) kroz 3 minute te se izuzima 50 µL heptanskog sloja i analizira plinskom kromatografijom. Kod provođenja reakcije u organskim otapalima, u odabranim vremenskim intervalima (nakon 30, 60, 120, 240, 260, 280 minuta) se izuzima 50 µL reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom.



Slika 5. Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata.

Za usporedbu uspješnosti hidrolize u različitim otapalima za reakciju u pojedinom otapalu računaju se iskorištenje, enantiomerni višak, specifična produktivnost enzima te volumetrijska produktivnost enzima.

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

$$\eta = \frac{c_A}{c_{AT}} \cdot 100 \qquad [1]$$

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

Enantiomerni višak (eng. *enantiomeric excess, ee*) (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(R_{1-feniletanol} - S_{1-feniletanol})}{(R_{1-feniletanol} + S_{1-feniletanol})} \cdot 100 \qquad [2]$$

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

Volumetrijska produktivnost V_P (µmol L^{-1} min^{-1}) hidrolize računa se prema jednadžbi:

$$V_P = \frac{c_A - c_{A1}}{t} \qquad [3]$$

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

Specifična produktivnost enzima V_E (µmol mg^{-1} min^{-1}) računa se prema jednadžbi:

$$V_E = \frac{n_{p2} - n_{p1}}{m_E * t} \qquad [4]$$

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).

3.2.3. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata pri različitim reakcijskim uvjetima

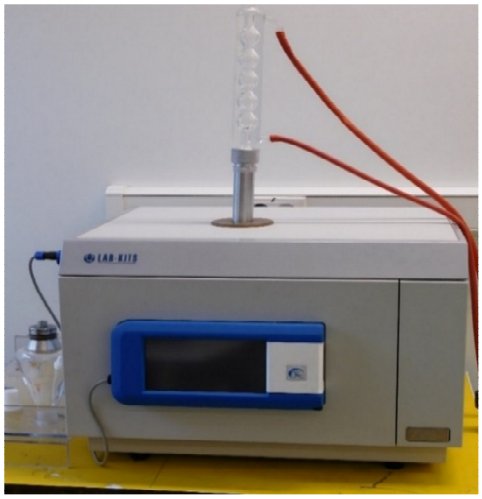
Nakon odabira najboljeg otapala za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata, s obirom na η, *Vp*, *Ve* i *ee*, u homogenizatoru s regulacijom temperature (slika 6) optimirana je reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata. Reakcija je provedena u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$ uz promjenu temperatura reakcije (20 °C, 40 °C, 50 °C i 80 °C), promjenu omjera enzima i supstrata (0,1; 0,2; 1,05; 2 mg mol^{-1} L^{-1}) te broja okretaja (100, 300, 650 i 1000 o min^{-1}). Svaka od provedenih reakcija je započeta dodatkom 2,5 mg imobilizirane lipaze u 5000 μL prirodnog eutektičkog otapala, 0,03 mol L^{-1}, 0,003 mol L^{-1} ili 0,001 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil-acetata te su postavljeni različiti reakcijski uvjeti (omjer enzima i supstrata, temperatura, broj okretaja). Reakcija je praćena kroz vrijeme (120 minuta), izuzimani su alikvoti iz reakcijske smjese u vremenskim intervalima (nakon 1, 3, 5, 15, 30, 90, 120 minuta) te su ekstrahirani heptanom i analizirani plinskom kromatografijom. Za usporedbu uspješnosti hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata pri različitim reakcijskim uvjetima u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$ računa se iskorištenje [1] i enantiomerni višak [2].



Slika 6. Homogenizator s regulacijom temperature**,** EppendorfThermoMixer C, Njemačka (vlastita fotografija).

3.2.4. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata u mikrovalno-ultrazvučnom reaktoru

Nakon odabira najboljeg otapala za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata, s obirom na η i *ee*, u homogenizatoru s regulacijom temperature (slika 6), reakcija hidrolize provedena je u prirodnom eutektičnom otapalu $ChGlc_{50\%}$ u ultrazvučno-mikrovalnom bioreaktoru (slika 7) pri temperaturi 50 ºC tijekom 1 h potpomognuta istovremenim odnosno samostalnim djelovanjem ultrazvučnih (40 kHz, 50 W) i mikrovalova (300 W). Reakcija je započeta dodatkom 2,5 mg imoblizirane lipaze u 5 mL prirodnog eutektičkog otapala te dodatkom 0,03 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil-acetata. Za praćenje reakcije izuzimani su alikvoti iz smjese u vremenskim intervalima (nakon 0,5, 1, 1,5, 3, 5, 15, 45, 60 minuta). Alikvoti su zatim ekstrahirani heptanom te analizirani plinskom kromatografijom kako bi se odredila volumetrijska produktivnost.



Slika 7. Mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor, Lab Kits, Hong Kong, Kina (vlastita fotografija).

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

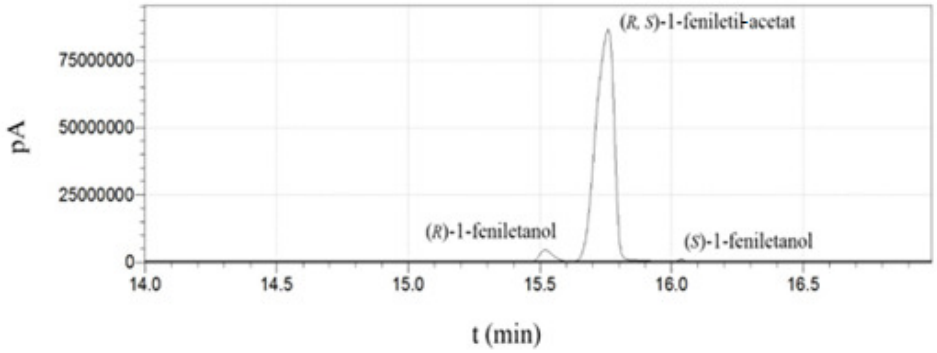
Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R, S*)-1-feniletil-acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

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 °C (2 min), T_2=140 °C (Δt=5 °C min^{-1})
- Vrijeme trajanja analize: 21 min

(Rt) za (*R, S*)-1-feniletil-acetat iznosi 15,72 min, Rt ((*R*)-1-feniletanol)=15,54 min i Rt ((*S*)-1-feniletanol)=16,06 min (slika 8).



Slika 8. Tipičan GC kromatogram analize reakcijske smjese lipazom katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata.

Izrada baždarnog dijagrama

Prirede 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}. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanesu se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrta dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata o površini ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata u uzorcima.

Koncentracija (*R, S*)-1-feniletil-acetata tijekom hidrolize u organskim otapalima (heptanu i toluenu) računa se izravno prema jednadžbi pravca dobivenoj iz baždarnog dijagrama, dok se koncentracija (*R, S*)-1-feniletil-acetata c_E (mol L^{-1}) tijekom hidrolize u prirodnom eutektičnom otapalu računa prema jednadžbi:

$$c_E = \frac{c_{E\,heptan}}{K_p} \qquad [5]$$

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

Koeficijent razdjeljenja (*R, S*)-1-feniletil-acetata (*Kp*) 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 mol L^{-1}) (*R, S*)-1-feniletil-acetata. Uzorak se miješa na vrtložnoj mješalici tijekom 3 min pri temperaturi 25 °C. Koncentracija (*R, S*)-1-feniletil-acetata u heptanu određuje se plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja *Kp* izračunava se kao omjer ravnotežne koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata u heptanu i prirodnom eutektičkom otapalu prema jednadžbi:

$$K_p = \frac{c_{heptan}}{c_D} \qquad [6]$$

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}).

3.2.6. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ($\bar{x}$) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{\mathrm{N}} \sum_{i=1}^{N} x_i \qquad [7]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{N(N-1)}} \qquad [8]$$

N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Uspostavljanje novih visokoučinkovitih i održivih procesa proizvodnje industrijski važnih kemikalija predmet je mnogih znanstvenih istraživanja u području kemijske tehnologije i biotehnologije. Stoga se eutektična otapala, nova generacija nehlapljivih i netoksičnih otapala, posljednjih godina intenzivno proučavaju kao zamjena za tradicionalna i škodljiva otapala u procesima organske sinteze i (bio)katalize. S druge strane, primjena lipaza kao važnih biokatalizatora u sintezi kiralnih spojeva uključuje kinetičku rezoluciju racemičnih alkohola, estera, kiselina ili amina (Ghanem i Aboul-Enein, 2004), kao i asimetričnu sintezu prokiralnih komponenti (García-Urdiales, 2005). Enzimska hidroliza (prirodna reakcija lipaza) također je korisna pripravi kiralnih spojeva iz prokiralnih komponenata. Postoje reakcije enzimske hidrolize koje su od velike koristi za sintezu farmaceutika ili njihovih intermedijera poput *β*-adrenergičnih blokatora (npr. propanolol) koji su sintetizirani kemoenzimskim metodama gdje je ključni korak enzimska hidroliza.

Enzimske reakcije imaju prednost pred klasičnim reakcijama kemijske sinteze zbog visoke enantio- i regioselektivnosti, a naročito ako se izvode u *zelenim* otapalima. Takav primjer pokazan je i u ovom radu gdje su hidrolizom kiralnog acetata, (*R, S*)-1-feniletil-acetata, dobivena dva enantiomera ((*R*)-1-feniletanol i (*S*)-1-feniletanol) koji imaju različite strukturne karakteristike te zbog toga imaju različite biološke aktivnosti (Liang i sur., 2015). Primjerice, (*R*)-1-feniletanol koristi se kao kiralni građevni blok i kao sintetski intermedijer za fine kemikalije u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji (Suan i Sarmidi, 2004), dok se oba enantiomerna oblika koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerne čistoće i asimetrično otvaranje cikličnih anhidrida i epoksida (Frings i sur., 1999).

Stoga je u ovom radu, u cilju ekološki prihvatljivog postupka hidrolize estera, ispitana mogućnost provođenja hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata katalizirane imobiliziranom lipazom u prirodnim eutektičkim otapalima (tablica 2). Kao katalizator je korištena lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama (Novozym 435) budući da je taj enzimski pripravak jeftin i lako dostupan, a u brojnim se radovima pokazao učinkovit i iznimno stabilan (Cvjetko, 2012). Hidroliza je također provedena i u organskim otapalima (heptan i toluen) te puferu kako bi se usporedila uspješnost provedenih hidrolitičkih reakcija s referentnim otapalima. Primjenom različitih reakcijskih uvjeta (omjer enzima i supstrata, temperatura i broj okretaja) optimirana je reakcija hidrolize katalizirane lipazom. Također, praćen je utjecaj alternativnih izvora energije (ultrazvuka i mikrovalova) na uspješnost reakcije hidrolize.

4.1. PRIPRAVA PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

U svrhu rada pripravljena su prirodna eutektička otapala klasičnim postupcima organske sinteze (tablica 2). Priprava prirodnih eutektičnih otapala provodila se jednostavnim postupkom u kojem se polazne sirovine pomiješaju u određenom molarnom omjeru te se lagano zagrijavaju uz miješanje dok se ne dobije homogena viskozna kapljevina (η = 100 %). Pripravljene su i vodene otopine prirodnih eutektičkih otapala s udjelima vode od 30, 50 i 80 % (v/v) (tablica 2). Prirodno eutektičko otapalo $ChSor_{30\%}$ nije moguće pripraviti jer dolazi do kristalizacije. Izmjerene pH-vrijednosti pomoću multimetra pH/ion metar S220, Mettler Toledo prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Prirodna eutektička otapala s pripadajućim pH-vrijednostima i cijenama.

Prirodno eutektičko otapalo	**Kratica**	**Molarni omjer komponenata**	**Udio vode (%, v/v)**	**Kratica**	**Cijena ($ kg-1)**	**pH-vrijednosti**
Kolin-klorid: glukoza	ChGlc	1:1	30	$ChGlc_{30\%}$	54	5,2
			50	$ChGlc_{50\%}$		4,0
			80	$ChGlc_{80\%}$		4,1
Kolin-klorid: fruktoza	ChFru	1:1	30	$ChFru_{30\%}$	128	4,3
			50	$ChFru_{50\%}$		5,0
			80	$ChFru_{80\%}$		5,1
Kolin-klorid: sorboza	ChSor	1:1	30	$ChSor_{30\%}$	669	kristalizira
			50	$ChSor_{50\%}$		3,8
			80	$ChSor_{80\%}$		4,2
Kolin-klorid: sorbitol	ChSol	1:1	30	$ChSol_{30\%}$	39	2,6
			50	$ChSol_{50\%}$		4,5
			80	$ChSol_{80\%}$		3,7
Kolin-klorid: etilen glikol	ChEG	1:2	30	$ChEG_{30\%}$	43	7,1
			50	$ChEG_{50\%}$		6,0
			80	$ChEG_{80\%}$		5,2

*Cijene otapala procijenjene su prema podatcima s web stranice *Fisher scientific (USA).*

Usporedbom pH-vrijednosti upotrijebljenih prirodnih eutektičkih otapala uočavamo da su sva otapala blago kiselih vrijednosti u rasponu od 2,6 kod $ChSol_{30\%}$ do 6 kod $ChEG_{50\%}$ osim $ChEG_{30\%}$ koji je neutralan. Ukoliko usporedimo cijene prirodnih eutektičkih otapala po

kilogramu, možemo uočiti da su među najpovoljnijima ChSol, ChGlc te ChEG (tablica 3). Cijene prirodnih eutektičkih otapala otprilike su u rangu s cijenama organskih otapala, iako postoje odstupanja u cijeni poput relativno jeftinog 99 %-tnog heptana (81,53 \$ kg^{-1}).

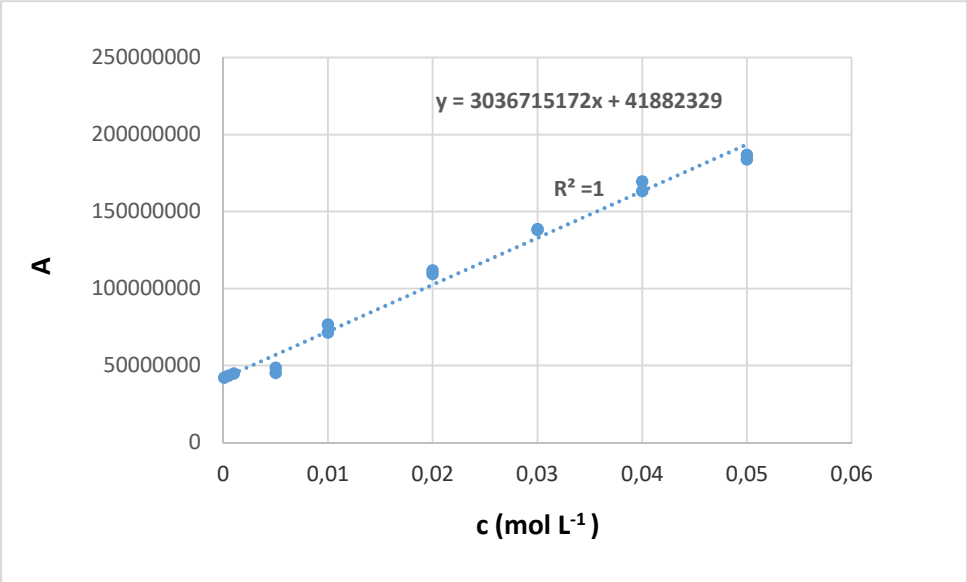
4.2. HIDROLIZA (*R, S*)-1-FENILETIL-ACETATA KATALIZIRANA LIPAZOM

Lipaze su važni biokatalizatori, s vrlo raznolikom primjenom, što dokazuju brojna istraživanja provedena s ovim enzimima vezana uz razne grane industrije. Svoju popularnost duguju sjajnim karakteristikama, kao što su aktivnost u velikom rasponu temperature i pH-vrijednosti, supstratna specifičnost i prihvaćanju raznih prirodnih i neprirodnih supstrata te regio- i enantioselektivnost. Još jedna karakteristika lipaza je da se mogu koristiti u slobodnom, ali i imobiliziranom obliku pri čemu imobilizirani enzimi generalno imaju veću katalitičku aktivnost i veću termalnu stabilnost u usporedbi s onima u slobodnoj formi (Lerin i sur., 2014). Upravo zato u ovom radu upotrebljena je lipaza CALB za enantioselektivnu hidrolizu.

4.2.1. Probir prirodnih eutektičkih otapala za hidrolizu (*R, S)*-1-feniletil-acetata

Reakcija hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata provedena je u prirodnim eutektičkim otapalima (tablica 2), u organskim otapalima (heptanu i toluenu) i 0,025 mol L^{-1} kalij-fosfatnom puferu u svrhu provjere uspješnosti hidrolize, uz lipazu B izoliranu iz kvasca *Candida antarctica* (pripravak Novozym 435) kao katalizator. Reakcijska smjesa (3 mL) sadržavala je 0,05 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil-acetata, a reakcija je započeta dodatkom 5 mg pripravka Novozym 435. Reakcijska smjesa intenzivno je miješana na homogenizatoru pri sobnoj temperaturi, a tijek reakcije praćen je izdvajanjem uzorka i analizom uz pomoć plinske kromatografije.

Prethodno je izrađen baždarni dijagram ovisnosti koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata o površini ispod pika prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta (slika 9).



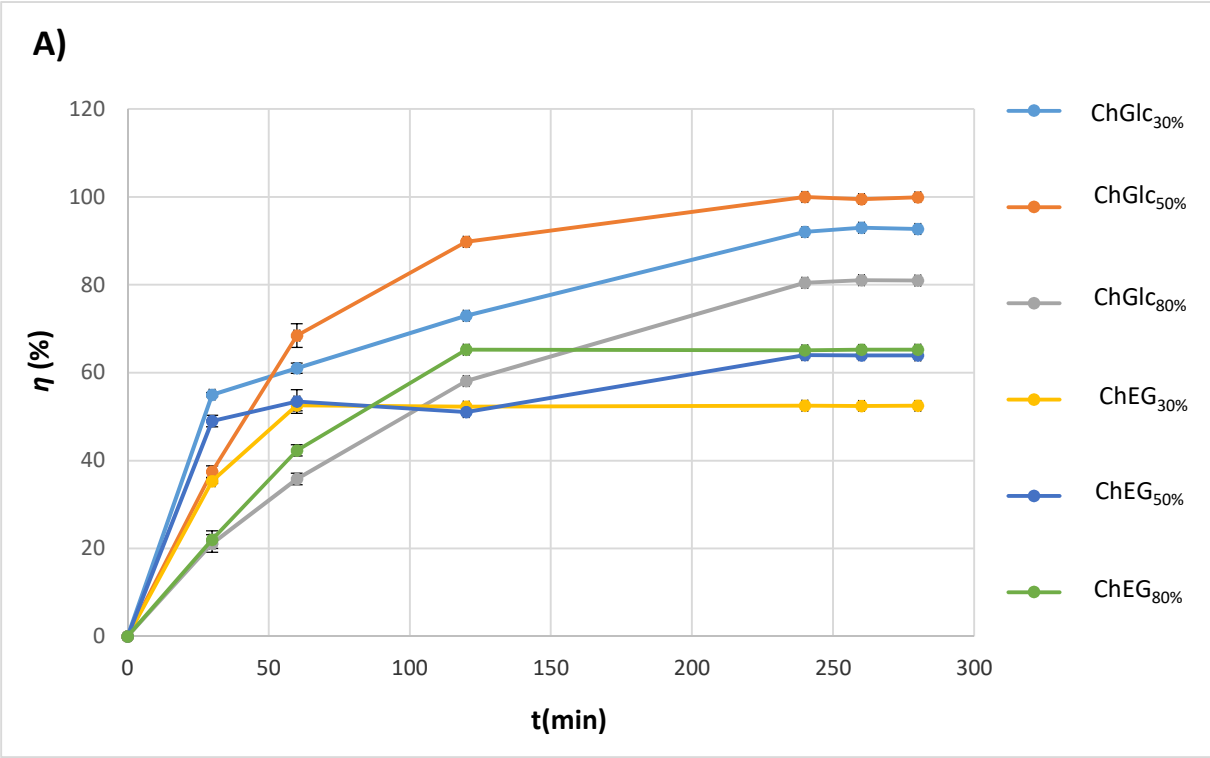
Slika 9. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata; A= površina ispod pika; c =koncentracija (mol L^{-1}).

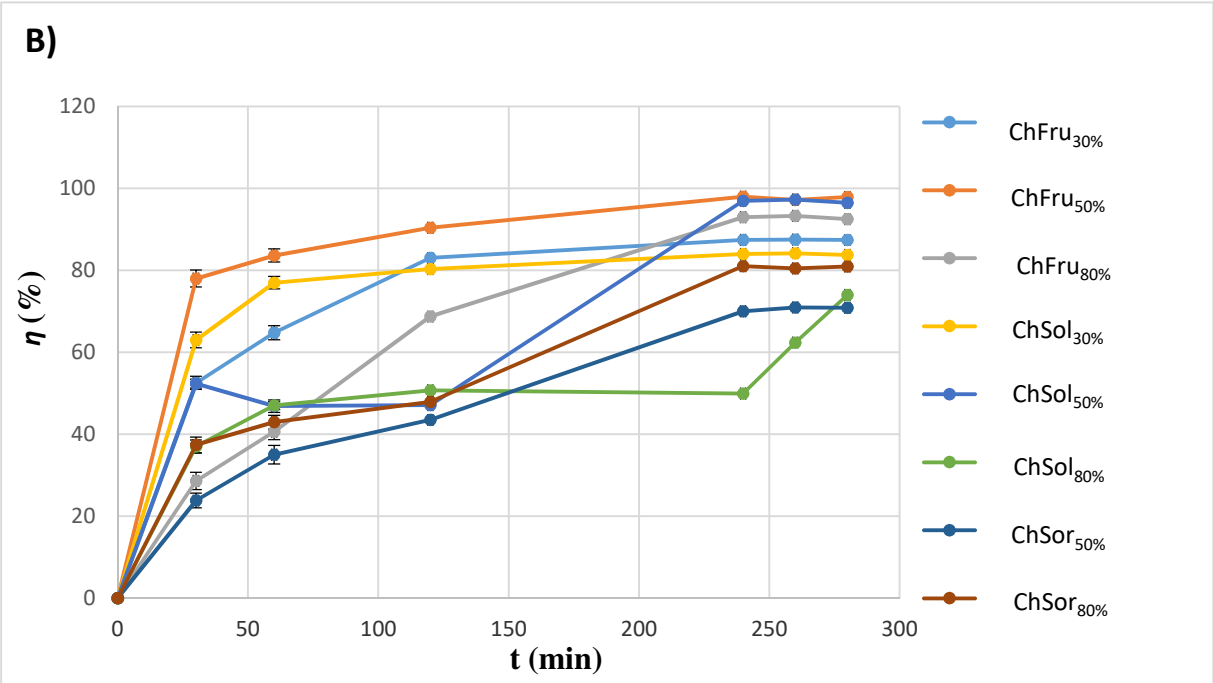
Kako bi se izračunala koncentracija (*R, S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima, određen je koeficijent razdjeljenja (*R, S*)-1-feniletil-acetata između heptana i prirodnog eutektičkog otapala (K_P), a vrijednosti su prikazane u tablici 4.

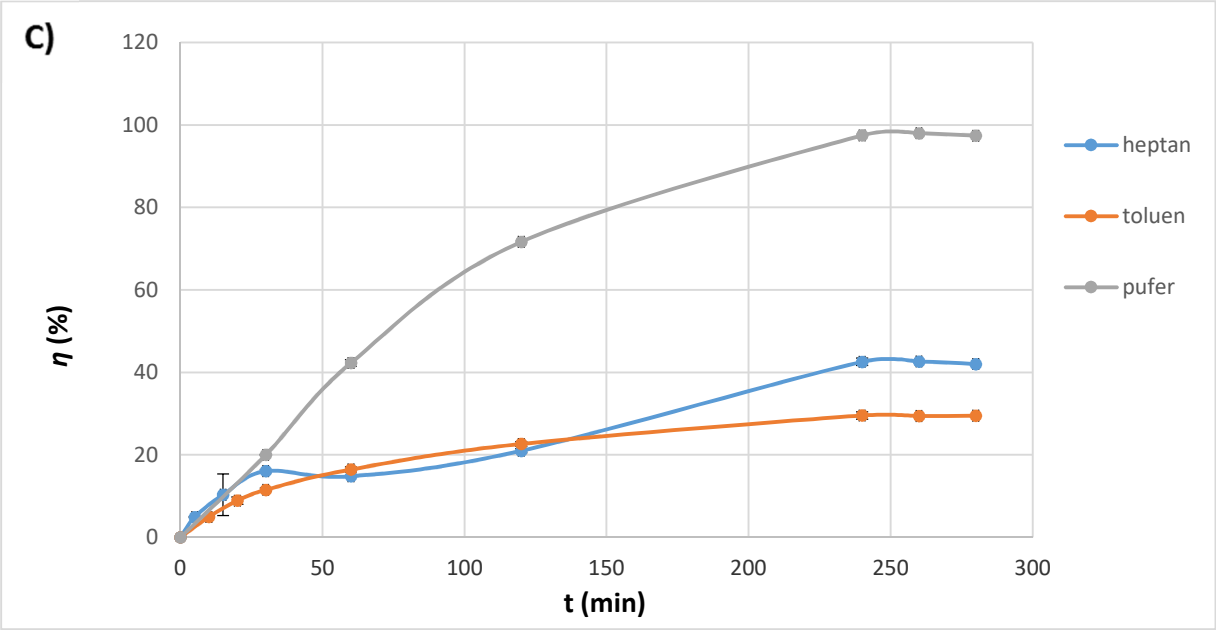
Tablica 4. Koeficijent razdjeljenja između heptana i prirodnih eutektičkih otapala (K_P).

OTAPALO	UDIO VODE (%,v/v)	K_P
ChGlc	30	0,95
	50	0,95
	80	0,86
ChEG	30	0,82
	50	0,94
	80	0,86
ChFru	30	1,00
	50	0,92
	80	0,90
ChSol	30	0,97
	50	0,84
	80	0,61
ChSor	30	/
	50	0,78
	80	0,72
Pufer KH_2PO_4		0,94

Tijek hidrolize (R, S)-1-feniletil-acetata u prirodnim eutektičkim otapalima, organskim otapalima te puferu prikazan je na slikama 10a -10c.



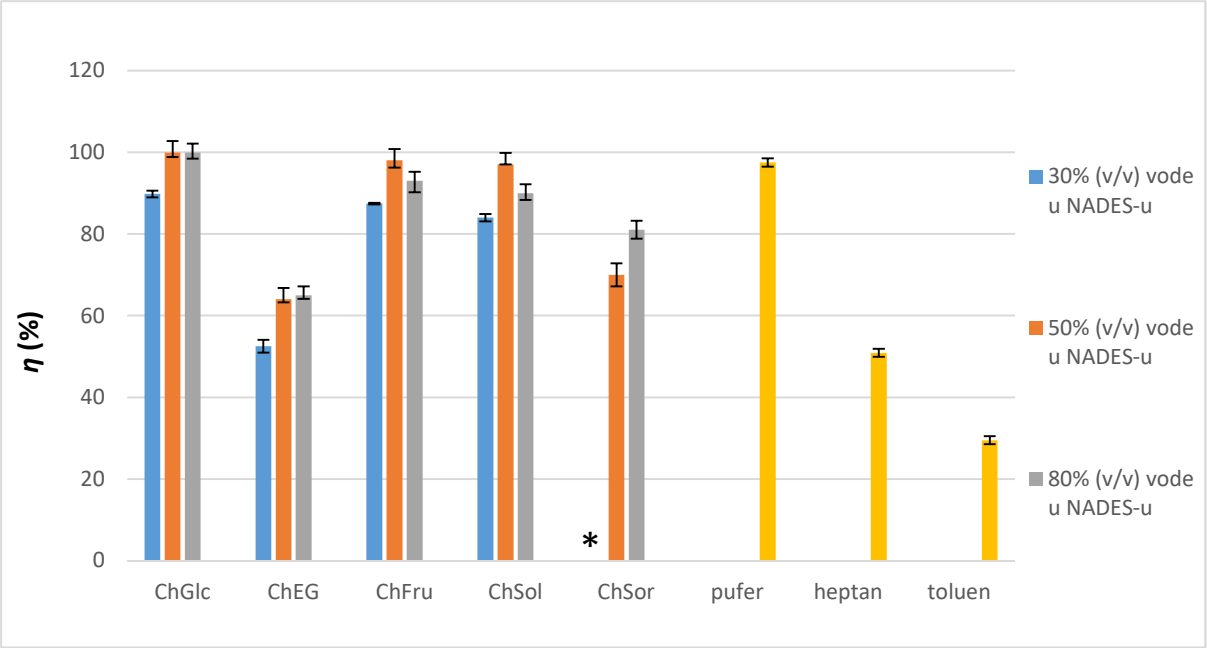




Slika 10. Tijek lipazom katalizirane hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u a) i b) prirodnim eutektičkim otapalima te c) organskim otapalima (heptan i toluen) i puferu. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25°C.

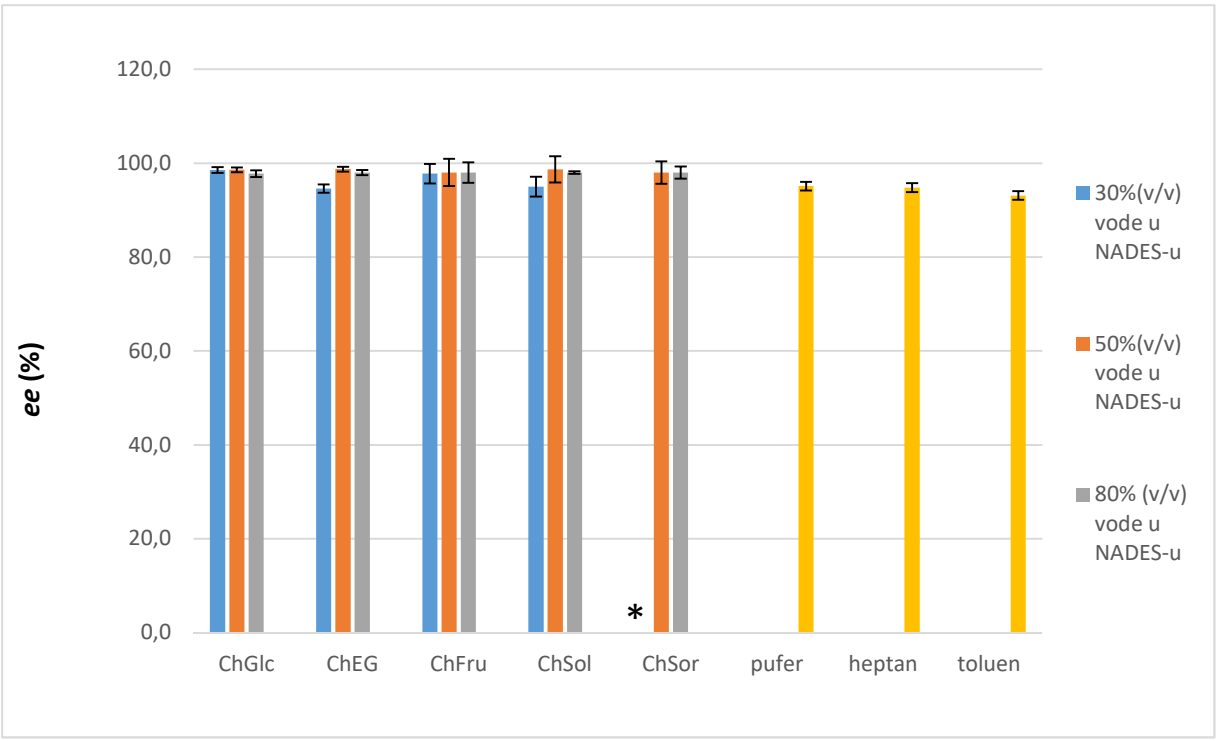
Tijek hidrolize prikazan je na slici 10 te je vidljivo kako je najbolje otapalo za enantioselektivnu hidrolizu (*R, S*)-1-feniletil-acetata prirodno eutektičko otapalo $ChGlc_{50\%}$ (slika 10a). Kod $ChSor_{30\ \%}$ došlo je do kristalizacije. Vidljivo je kako udio vode ima veliki utjecaj na katalitičku aktivnost enzima. Načelno, postizanje optimalnog udjela vode može se objasniti kao uspostavljanje ravnoteže između dvaju efekata koji se javljaju tijekom reakcije. Naime, kada je udio vode premali, supstrat se veže s eutektičkim otapalom jakim vodikovim vezama i postaje jedva dostupan enzimu za odvijanje same reakcije. U slučaju kada je udio vode veći od optimalnog, višak molekula vode u blizini aktivnog mjesta enzima dovodi do pojave kompetitivnih reakcija hidrolize estera što posljedično dovodi do nižih prinosa same reakcije (Huang i sur., 2014). Pri optimalnom udjelu vode, supstrat se ne veže s otapalom, a hidrofilni karakter eutektičnog otapala omogućuje vezanje molekula vode koje se stvaraju tijekom reakcije esterifikacije i sprječava ispoljavanje njihovog nukleofilnog karaktera u hidrolitičkim reakcijama (Durand i sur., 2014).

Zbog bolje interpretacije rezultata, prema jednadžbama [1], [2], [3] i [4] izračunata su iskorištenja, enantiomerni višak hidrolize, volumetrijska produktivnost te specifična produktivnost enzima u pojedinom otapalu, a rezultati su prikazani na slikama 11 - 14.



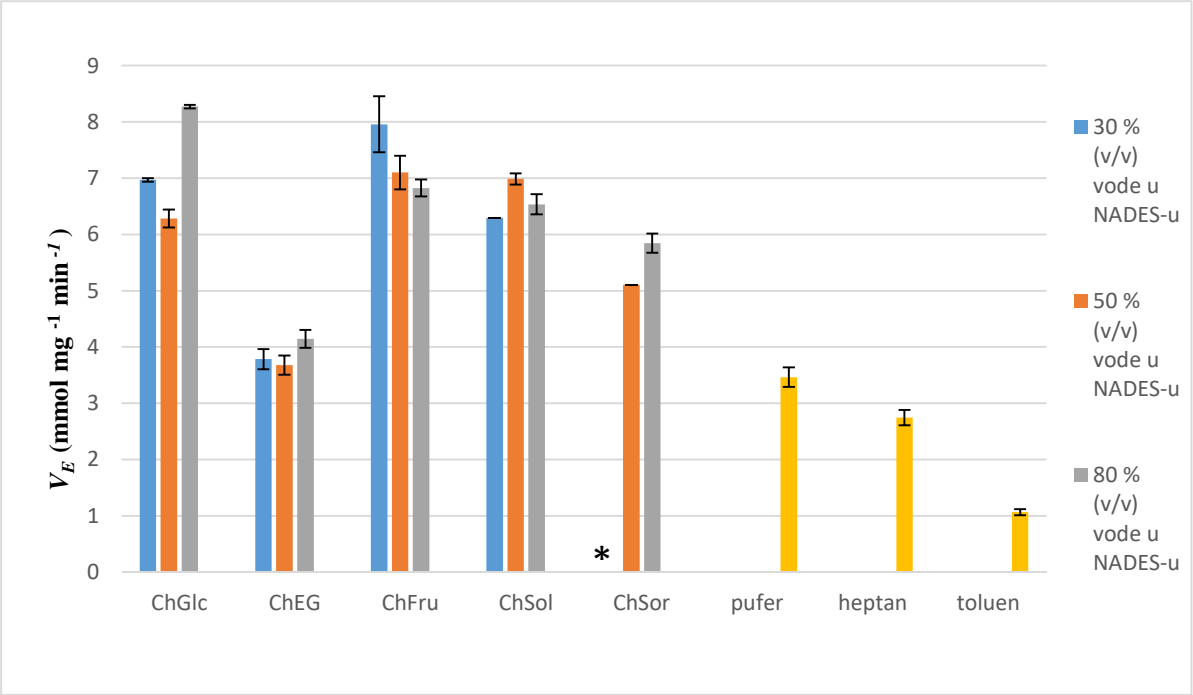
Slika 11. Iskorištenje lipazom katalizirane hidrolize (η) u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 280 min. *$ChSor_{30\%}$ nije bilo moguće sintetizirati jer dolazi do kristalizacije.

Iskorištenja (η) lipazom katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u prirodnim eutektičkim otapalima su od 52,5 % ± 1,6 u $ChEG_{30\,\%}$ do 99,9 % ±1,1 u $ChGlc_{50\%}$ te su viša nego u organskim otapalima (heptan 50,9 % ± 1,55 i toluen 29,6 % ± 1,71), ali su gotovo jednaka kao u puferu (97,5 % ± 0,72) (slika 11). Rezultati iskorištenja upućuju da se dodatkom vode eutektičkom otapalu može znatno utjecati na pomak ravnoteže ispitivane reakcije prema nastajanju produkta u odnosu na heptan i toluen. Tako se promjenom udjela vode u $ChEG_{30\,\%}$ do $ChEG_{80\,\%}$ iskorištenja reakcije mijenjaju od 52,5 % do 65,0 %. Najbolje iskorištenje hidrolize je postignuto s prirodnim eutektičkim otapalom $ChGlc_{50\%}$ te iznosi 99,9 % ± 1,1. Iskorištenje reakcije enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u puferu veće je nego ono upotrebom prirodnog eutektičkog otapala $ChGlc_{50\%}$, no konverzija supstrata je puno sporija (slika 10c).



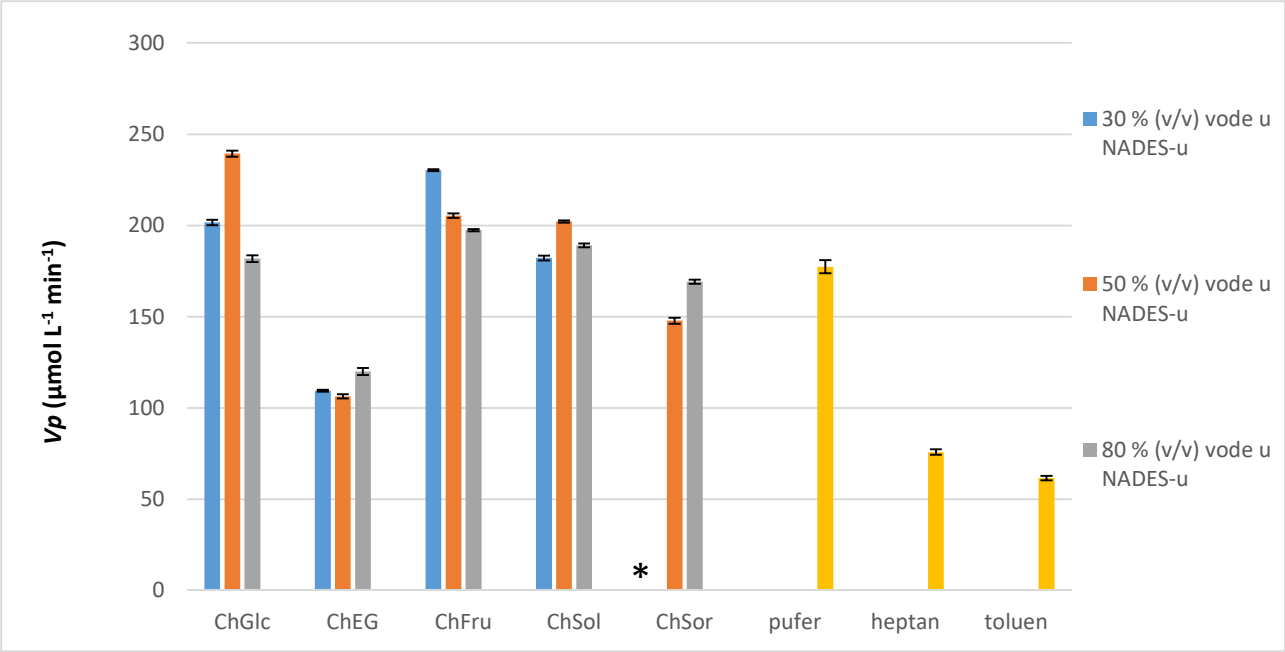
Slika 12. Enantiomerni višak (*ee*) hidrolize katalizirane lipazom u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min. *$ChSor_{30\%}$ nije bilo moguće sintetizirati jer dolazi do kristalizacije.

Enantiomerni višak hidrolize (*ee*) (*R, S*)-1-feniletil-acetata u svim ispitanim prirodnim eutektičkim otapalima je od 94,6 % ± 0,9 do 98,7 % ± 0,5, dok u referentnim otapalima iznosi 90,6 % ± 1,0 (heptan), 93,1% ± 1,7 (toluen) te 95,1 % ± 2,1 (kalij fosfatni pufer) (slika 12). 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 $ChGlc_{50\%}$ (98,6% ± 0,5) što znači da je korištena lipaza stereospecifična za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata, pri čemu značajniji utjecaj otapala na stereospecifičnost lipaze nije uočen.



Slika 13. Specifična produktivnost enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom provedene u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min. *$ChSor_{30\%}$ nije bilo moguće sintetizirati jer dolazi do kristalizacije.

Specifična produktivnost enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom u svim ispitanim prirodnim eutektičkim otapalima viša je od one referentnih otapala (slika 13).



Slika 14. Volumetrijska produktivnost hidrolize (V_p) (*R, S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom provedene u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil-acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min. *$ChSor_{30\%}$ nije bilo moguće sintetizirati jer dolazi do kristalizacije.

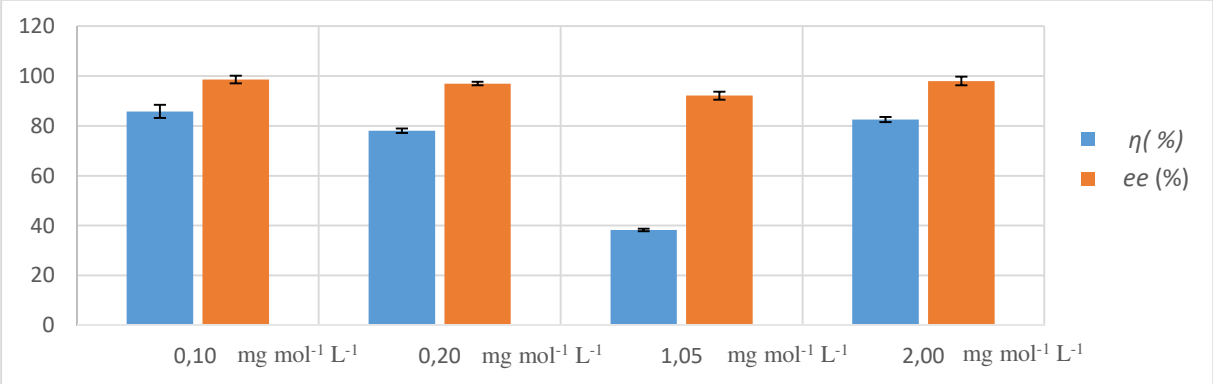
Volumetrijska produktivnost (V_p) hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom najviša je za $ChGlc_{50\ \%}$ te iznosi 239,3 µmol L^{-1} min^{-1} ± 1,62, a za $ChGlc_{80\ \%}$ 181,8 µmol L^{-1} min^{-1} ± 1,81 što nam ukazuje da i vrijednosti volumetrijske produktivnosti ovise o udjelu vode u otapalu. Za pufer i heptan vrijednosti su nešto niže dok je volumetrijska produktivnost u toluenu slična kao u prirodnim eutektičkim otapalima.

Uspješno je provedena hidroliza u prirodnim eutektičkim otapalima koja su se pokazala boljima s obzirom na konvencionalna organska otapala, prema svim ispitanim parametrima (η, *ee*, V_P i V_E) pri čemu se otapalo $ChGlc_{50\ \%}$ pokazalo kao najbolje. Daljnje istraživanje temelji se na optimiranju reakcijskih uvjeta (omjer enzima i supstrata, temperatura i broj okretaja) u $ChGlc_{50\%}$ kao najbolje odabranim otapalom, te praćenju utjecaja ultrazvuka i mikrovalova na reakciju hidrolize koja se odvija pri odabranim optimalnim uvjetima s ciljem povećanja volumetrijske produktivnosti reakcije.

4.2.2 Utjecaj odnosa supstrat-enzim, temperature i broja okretaja na hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata u $ChGlc_{50\%}$

Osnove kinetike enzimskih reakcija bitne su za odabir odgovarajućeg enzima ovisno o vrsti reakcije koju katalizira. Potrebno je odabrati odgovarajuće uvjete za postizanje što veće enzimske aktivnosti. Nekoliko je faktora koji utječu na enzimsku aktivnost: temperatura, pH-vrijednost, koncentracija enzima, koncentracija supstrata te prisutnost aktivatora ili inhibitora (Bugg, 2012).

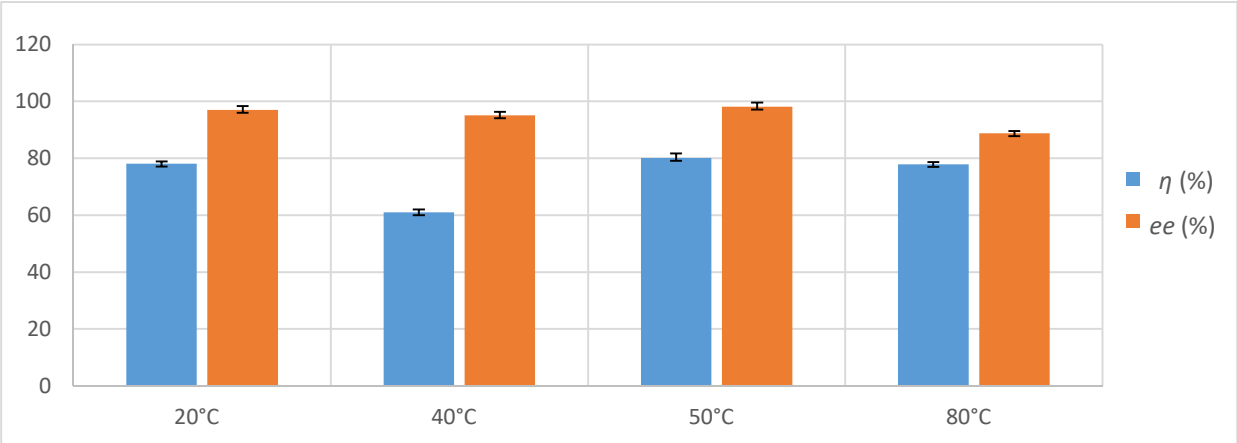
Reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata praćena je pri različitim reakcijskim uvjetima u svrhu optimiranja reakcijskih uvjeta za postizanje najvećeg iskorištenja reakcije i enantiomernog viška. Reakcije su međusobno uspoređene kroz iskorištenje i enantiomerni višak, a rezultati su prikazani na slikama 15, 16 i 17.



Slika 15. Iskorištenje (η) i enantiomerni višak (*ee*) lipazom katalizirane hidrolize u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$ pri različitim molarnim odnosima enzima i supstrata. Reakcijski uvjeti: 2,5 mg Novozym 435; 20 °C; 240 min; 1000 o min^{-1}.

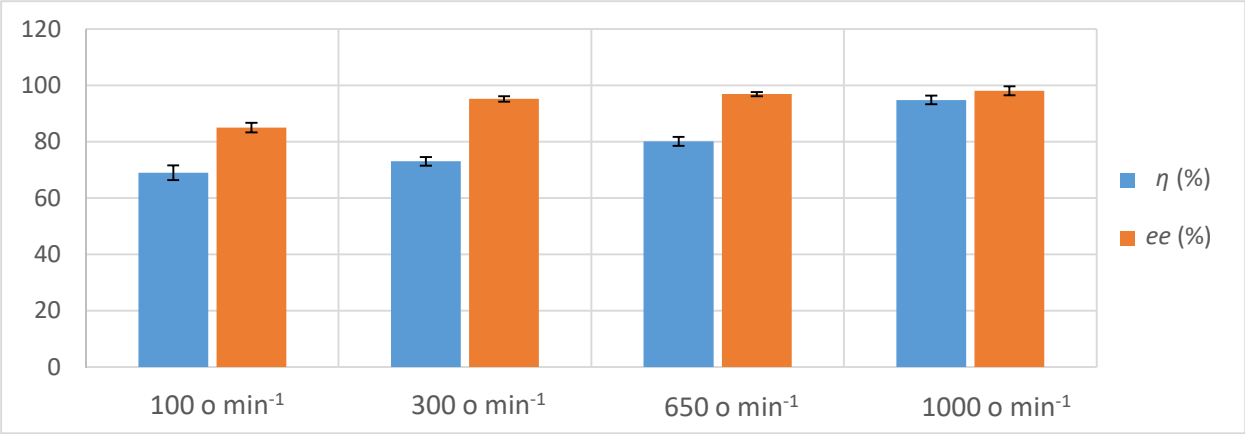
Optimiranjem uvjeta prikazano na slici 15 odnosilo se na primjenu različitih omjera enzima (Novozym 435) i supstrata (*R*, *S*)-1-feniletil-acetata, pri čemu je masa enzima bila 2,5 mg, a koncentracija supstrata se mijenjala ovisno o zadanom omjeru. Primjećeno je da iskorištenje reakcije značajno ovisi o omjeru enzima i supstrata te se kreće u rasponu od 38,3 % ± 0,3 kod omjera 1,05 mg mol^{-1} L^{-1} do 85,8 % ± 2,6 kod 0,10 mg mol^{-1} L^{-1}, dok je enantiomerni višak gotovo nezavisan o praćenim uvjetima reakcije u rasponu od 92,1% ± 1,6 za omjer 1,05 do 98,6 % ± 1,6 za 0,1. Najviše iskorištenje (85,8 % ± 2,6) i enantiomerni višak (98,6 % ± 1,6) postignuti su kod omjera enzima i supstrata 0,10 mg mol^{-1} L^{-1}; tj. mase enzima 2,5 mg i koncentracije supstrata 0,03 mol L^{-1}. Kada je količina enzima manja u odnosu na

supstrat onda enzim može u potpunosti reagirati sa supstratom čime se povećava stupanj hidrolize, odnosno iskorištenje reakcije kao što su primjetili Shu i sur. (2016) prilikom hidrolize kazeina mlijeka alkalazom.



Slika 16. Iskorištenje (η) i enantiomerni višak (*ee*) lipazom katalizirane hidrolize u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$ pri različitim temperaturama. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil-acetata; 2,5 mg Novozym 435; 120 min; 1000 o min^{-1}; E/S=0,1 mg mol^{-1} L^{-1}.

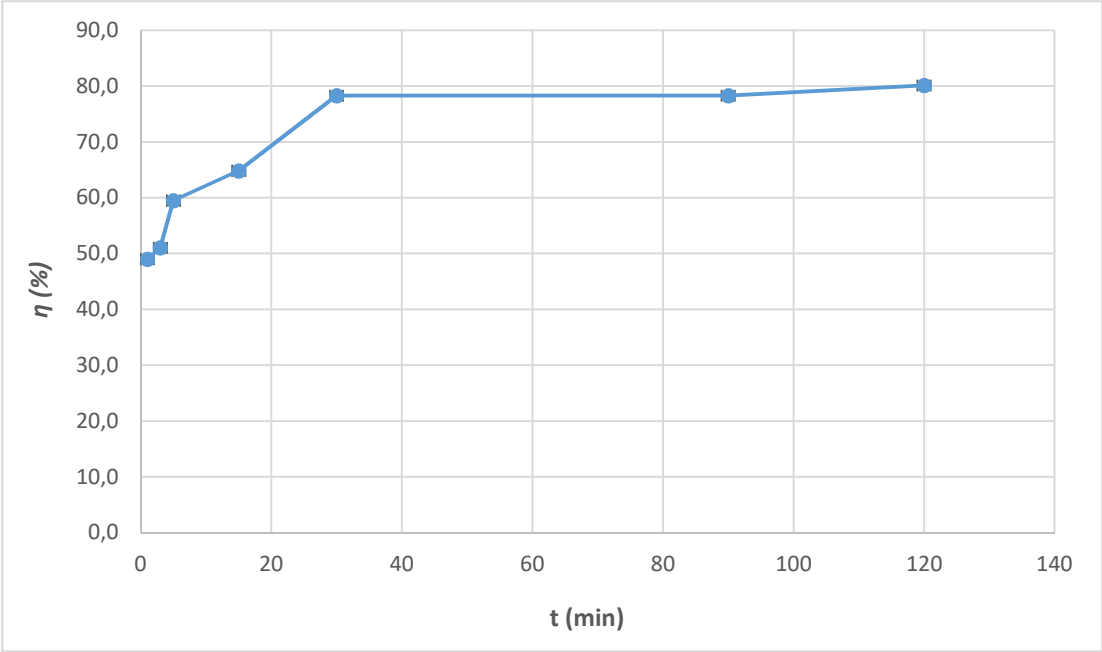
Primjećeno je da iskorištenje reakcije značajno ovisi o temperaturi te je u rasponu od 78,1 % ± 0,8 kod temperature 20°C do 80,1 % ± 1,5 kod temperature 50°C, a raspon enantiomernog viška od 88,8% ± 0,8 za temperaturu od 80°C do 98,1 % ± 1,6 za temperaturu 50°C. Iz rezultata prikazanih na slici 16 vidimo da se pri temperaturi od 50°C postižu najveće vrijednosti iskorištenja (80,1% ± 1,5) i enantiomernog viška (98,1 % ± 1,6) reakcije hidrolize. Daljnim povećanjem temperature do 80°C dolazi do pada vrijednosti iskorištenja (77,9% ± 0,7) i enantiomernog viška (88,8 % ± 0,8) pa se temperatura od 50°C pokazala najpogodnijom između četiri ispitane temperature. Pri nižim temperaturama manja je kinetička energija, a pri višim temperaturama dolazi do pada enzimske aktivnosti uzrokovane denaturacijom enzima. Bachu i sur. (2007) također su pokazali su da povećanje temperature dovodi do niže konverzije supstrata i nižih vrijednosti enantiomernog viška u lipazom kataliziranim enantioselektivnim reakcijama acetilacije sekundarnih alkohola.



Slika 17. Iskorištenje (η) i enantiomerni višak (*ee*) lipazom katalizirane hidrolize u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$ pri različitim brojevima okretaja. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L^{-1} (R, S)-1-feniletil-acetata; 2,5 mg Novozym 435; 50 °C; 120 min; E/S=0,1 mg mol^{-1} L^{-1}.

Kod ispitivanja utjecaja broja okretaja mješača na tijek hidrolize, raspon vrijednosti iskorištenja reakcije hidrolize bio je od 69 % ± 2,6 kod 100 o min^{-1} do 94,8 % ± 1,5 kod 1000 o min^{-1}. Najveće iskorištenje (94,8 % ± 1,5) i enantiomerni višak (98,1 % ± 1,6) postignuti su kod broja okretaja 1000 o min^{-1} (slika 17). Iz grafa zaključujemo da se povećanjem vrijednosti broja okretaja proporcionalno povećavaju vrijednosti iskorištenja i enantiomernog viška.

Naposlijetku, možemo zaključiti da su optimiranjem, odnosno primjenom različitih reakcijskih uvjeta pronađeni optimalni uvjeti za postizanje najvećih vrijednosti iskorištenja i enantiomernog viška reakcije hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata, a to su omjer enzima i supstrata E/S=0,10 mg mol^{-1} L^{-1}, temperatura T=50°C i broj okretaja 1000 o min^{-1}.



Slika 18. Tijek hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil acetata; 2,5 mg Novozym 435; 50 °C; 120 min; E/S=0,10 mg mol^{-1} L^{-1}; 1000 o min^{-1}.

Nakon odabira optimalnih uvjeta, pratili smo tijek reakcije enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata pri optimalnim uvjetima (slika 18) te zaključili da je reakcija završila u 30 minuta što znači da smo skratili vrijeme reakcije sa 240 minuta na 30 minuta.

4.2.3. Utjecaja mikrovalnog zračenja i ultrazvuka na volumetrijsku produktivnost hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u $ChGlc_{50\%}$

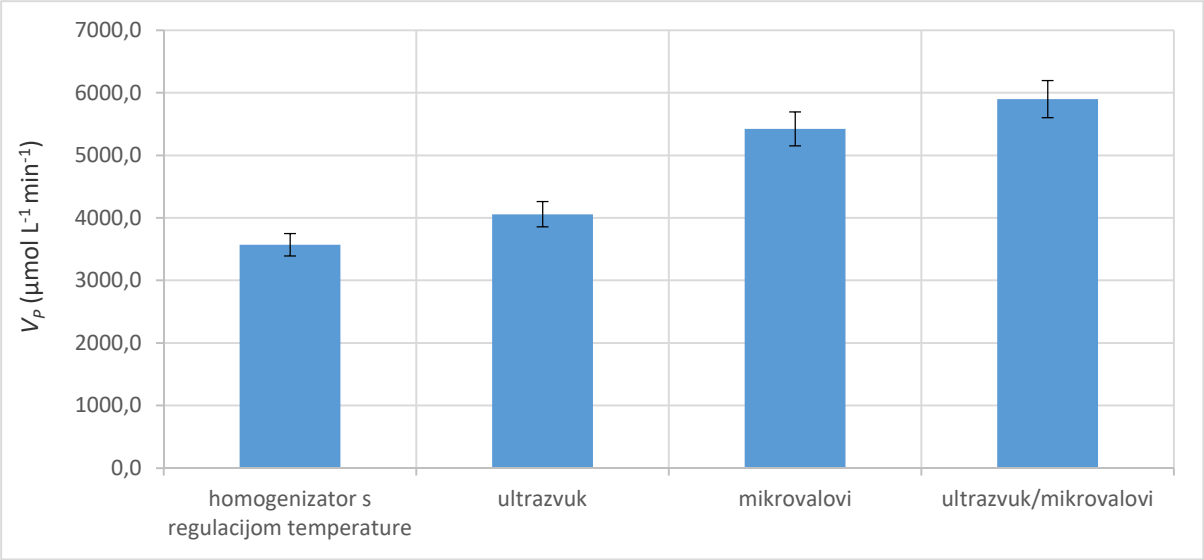
U posljednih nekoliko godina ultrazvuk je široko primjenjivan u enzimskim procesima kao što su sinteze estera poželjnih karakteristika za farmaceutsku, kozmetičku, ali i prehrambenu tehnologiju, za hidrolizu i glicerolizu biljnih ulja te proizvodnju dizela. Energija oslobođena djelovanjem ultrazvuka prilikom procesa kavitacije može se koristiti za poboljšanje prijenosa mase (enzima/supstrata), povećanje konverzije supstrata u produkt, te također pridonosi povećanju katalitičke aktivnosti enzima. Nadalje, ultrazvuk se smatra *zelenom* tehnologijom zbog visoke učinkovitosti, malog broja potrebnih instrumenata te znatnog smanjenja reakcijskog vremena u odnosu na druge tehnologije (Lerin, 2014). Fizikalni efekt ultrazvuka uglavnom se sastoji od modifikacije temperature i tlaka kao posljedice kavitacijskog efekta (Babicz, 2010). Neke od prednosti ultrazvuka u enzimski kataliziranim reakcijama mogu se sumirati na: smanjenje reakcijskog vremena, smanjenje količine reagensa, povećanje prinosa

reakcije, te kemo-, enantio- i stereoselektivnost reakcija koje se ne bi pojavile u normalnim uvjetima (Lerin, 2014). Mills i Holland (1995) ustanovili su tako da je za povećanje lipazne aktivnosti lipaze iz bakterije *Chromobacterium viscosum* odgovorna velika kontaktna površina enzima i supstrata na čije je stvaranje utjecala energija aktivacije ultrazvukom.

Primjenom mikrovalovalnog zračenja u (bio)katalizi može se povećati enzimska aktivnost npr. u enantioselektivnim, oksido-redukcijskim reakcijama ili u hidrolitičkim reakcijama. U kombinaciji s bezvodnim medijima mikrovalovi mogu utjecati na enzimsku aktivnost i stabilnost. Kombiniranjem tehnologija (ultrazvuka i mikrovalova) može se postići brzi prijenos toplinske energije u samo središte reakcije u značajno kratkom vremenu upravo zbog mikrovalova te učinkovitog prijenosa mase uzrokovanog ultrazvukom (Hernoux-Villière i sur., 2013).

U ovom radu, praćen je utjecaj alternativnih izvora energije, ultrazvuka i mikrovalova, korištenih samostalno ili istovremeno, na volumetrijsku produktivnost enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata.

Kako bi se međusobno usporedio utjecaj alternativnih izvora energije, ultrazvuka i/ili mikrovalova, na volumetrijsku produktivnost, enantioselektivna hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata s imobiliziranom lipazom u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$, izvedena je pod istim reakcijskim uvjetima koristeći mikrovalove i/ili ultrazvuk. Utjecaj mikrovalova i/ili ultrazvuka na volumetrijsku produktivnost uspoređen je s produktivnošću pri optimalnim uvjetima na homogenizatoru s regulacijom temperature (slika 6) određenima u poglavlju 4.2.2.



Slika 19. Volumetrijska produktivnost enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata imobiliziranom lipazom B u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$ u ultrazvučno-mikrovalnom reaktoru te homogenizatoru s regulacijom temparature. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil-acetata; 2,5 mg Novozym 435; 50°C; 5 min.

Rezultati ukazuju da ultrazvuk i mikrovalovi mogu uvelike poboljšati volumetrijsku produktivnost enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata imobiliziranom lipazom u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$. Najveća volumetrijska produktivnost je uočena kod istovremenog korištenja mikovalova i ultrazvuka te je iznosila 5899,8 µmol L^{-1} min^{-1} ± 0,3.

Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u ovom radu može se zaključiti da su iskorištenja reakcije enantioselektivne hidrolize (*R, S)*-1-feniletil-acetata u svim prirodnim eutektičkim otapalima veća od iskorištenja u organskim otapalima (heksan i toluen) te da je najpogodnije prirodno eutektičko otapalo $ChGlc_{50\%}$. Usporedbom cijena korištenih prirodnih eutektičkih otapala ChGlc je također među najpovoljnijima, što ga čini zanimljiv za primjenu u velikom mjerilu. Obzirom da se kao najpogodnije otapalo pokazalo $ChGlc_{50\%}$ u njemu je optimirana reakcija enantioselektivne hidrolize pa je ustanovljeno da su uvjeti pri kojima se postižu najveće vrijednosti iskorištenja i enantiomernog viška reakcije temperatura 50°C, omjer enzima i supstrata 0,10 mg mol^{-1} L^{-1} te broj okretaja 1000 o min^{-1}. Provođenjem reakcije pri tim uvjetima vrijeme reakcije skraćeno je sa 240 minuta na 30 minuta. Također, istovremenom primjenom ultrazvuka i mikrovalova na enantioselektivnu hidrolizu (*R, S)*-1-feniletil-acetata u otapalu $ChGlc_{50\%}$ pri optimalnim uvjetima volumetrijska produktivnost (5899,8 µmol L^{-1} min^{-1} ± 0,3) je povećana 39,5 % u odnosu na enantioselektivnu hidrolizu (*R, S)*-1-feniletil-acetata u otapalu $ChGlc_{50\%}$ u homogenizatoru s regulacijom temperature gdje je iznosila 3569,9 µmol L^{-1} min^{-1} ± 0,1.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Iskorištenja enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom B izoliranom iz kvasca *Candida antarctica* u svim prirodnim eutektičkim otapalima bila su u rasponu od 52,5 % ± 1,6 do 99,9 % ± 1,1 , dok su u referentnim organskim (heptan i toluen) od 29,55% ± 1,71 do 50,92 % ± 1,55 .

2. Najveće iskorištenje, enantiomerni višak i volumetrijska produktivnost reakcije hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u prirodnim eutektičkim otapalima postignuto je u otapalu $ChGlc_{50\ \%}$ uz vrijednost iskorištenja 99,9 % ±1,1, enantiomernog viška 98,6% ± 0,5 te volumetrijske produktivnosti 239,3 μmol L^{-1} min^{-1} ± 1,62.

3. Specifična produktivnost enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom u svim ispitanim prirodnim eutektičkim otapalima viša je od one u referentnim otapalima, a najveća vrijednost postignuta je kod otapala $ChFru_{30\%}$ te iznosi 8,0 mmol mg^{-1} min^{-1} ± 0,5.

4. Uočen je značajan utjecaj različitih donora vodika te različitih volumnih udjela vode na uspješnost reakcije. Racionalnim odabirom eutektičkih otapala, ovisno o udjelu vode, moguće je utjecati na aktivnost enzima.

5. Optimiranjem uvjeta reakcije hidrolize katalizirane lipazom B ustanovljeno je da su uvjeti pri kojima se postižu najveće vrijednosti iskorištenja i enantiomernog viška reakcije hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u otapalu $ChGlc_{50\ \%}$: temperatura 50 °C, omjer enzima i supstrata 0,10 mg mol^{-1} L^{-1} te broj okretaja 1000 o min^{-1}. Provođenjem reakcije pri tim uvjetima vrijeme reakcije skraćeno je sa 240 minuta na 30 minuta.

6. Primjena istovremenog ili samostalnog djelovanja ultrazvuka i mikrovalova na tijek reakcije enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u otapalu $ChGlc_{50\%}$ uspješno je provedena uz povećanje volumetrijske produktivnosti. Istovremenim djelovanjem mikrovalova i ultrazvuka najviše se pridonijelo povećanju volumetrijske produktivnosti reakcije (5899,8 μmol L^{-1} min^{-1} ± 0,3) koja je povećana 39,5 % u odnosu na enantioselektivnu hidrolizu (*R, S)*-1-feniletil acetata u otapalu $ChGlc_{50\%}$ u homogenizatoru s regulacijom temperature koja je iznosila 3569,9 μmol L^{-1} min^{-1} ± 0,1.

6. LITERATURA

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V. (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* **1**, 70-71.

Anastas, P. T., Warner, J. C. (1998) Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York.

Aouf, C., Durand, E., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M. C, Dubreucq, E., Fulcranda, H., Villeneuve P. (2014) The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. *Green Chem.* **16**, 1740-1754.

Babicz, I., Leite,S.G.F., de Souza, R., Antunes, O.A.C. (2010) Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. *Ultrason. Sonochem.***17**, 4–6.

Bachu, P., Gibson, J.S., Sperry, J., Brimble, M.A. (2007) The influence of microwave irradiation on lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic secondary alcohols. *Tetrahedron.* **18**, 1618–1624.

Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol*. **10**, 411-421.

Bugg, T.D.H. (2012) Introduction to enzyme and coenzyme chemistry, 3.izd, Wiley and sons, UK.

Clark, J., Macquarrie, D. (2002) Handbook of Green chemistry and technology, Blackwell science, Cornwall.

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

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotox. Environ. Safe*. **99**, 1-12.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J.Chem.Technol. Biotechnol*. **90**: 1631–1639.

Cvjetko, M., Vorkapić-Furač, J., Žnidaršič-Plazl, P. (2012) Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. *Process Biochem*. **47** 1344-1350.

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

Durand E, Lecomte J, Baréa B, Villeneuve P. (2014) Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 16-23.

Durand, E., Villeneuve, P., Lecomte, J. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 379–385.

Fernández-Solares, L., Díaz, M., Brieva, R., Sánchez, V.M., Bayod, M., Gotor, V. (2002) Enzymatic resolution of new carbonate intermediates for the synthesis of (S)–(±)-zopiclone. *Tetrahedron: Asymmetry*. **13**, 2577–2582.

Frings K., Koch M., Hartmeier W. (1999) Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. *Enzyme. Microb.Technol.* **25**: 303.

García-Urdiales, E., Alfonso, I.,Gotor, V. (2005) Enantioselective desymmetrization in organic synthesis. *Chem. Rev*. **105**, 313–354.

Ghanem, A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**, 1721-1754.

Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y. (2004) Lipase mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry.* **15**, 3331–3351.

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

Gotor, V. (2002) Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. *Org. Proc. Res. Dev.* **6**, 420–426.

Gotor-Fernandez, V., Gotor, V. (2007) Use of Lipases in Organic Synthesis. U: *Industrial Enzymes* (Polaina, J., MacCabe, A.P., ured.), Springer, Dordrecht, str. 301-315.

Gross, R.A., Kalra, B., Kumar, A. (2001) Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **55**, 655-660.

Hernáiz, M.J., Alcántara, A.R., García, J.I., Sinisterra, J.V., (2010) Applied Biotransformations in Green Solvents. *Chem. Eur. J.* **16:** 9422–9437.

Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A. (2015) *In Vitro* and *in Vivo* toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PLoS ONE.* **10(2)**:1–18.

Hasan, F, Shah, A. A, Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Tech*. **39**, 235–251.

Hernoux-Villière, A., Lassi, U., Hu, T., Paquet, A., Rinaldi, L., Cravotto, G., Molina-Boisseau, S., Maraise, M.F., Lévêque, J.M. (2013) Simultaneous Microwave/Ultrasound-Assisted Hydrolysis of Starch-Based Industrial Waste into Reducing Sugars. *Sustain. Chem. Eng.* **1**, 995 −1002.

Huang, Z., Wu,B.P., Wen, Q., Yang, T.X., Yang, Z. (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**, 1975–1981.

Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S. (2001) Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B Enz.* **16**, 53-58.

Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002) Lipases for biotechnology. *Els. Sci. Ltd*. **13**, 390-397.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.***15**, 29-63.

Jaeger, K.E., Reetz, T.M. (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396–403.

Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2004) "Zelena" kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kem. Ind.* **53:** 217-224.

Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E., Rappaport, A.T., Cuccia, L.A. (1991) A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia* and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem*. **56**, 2656–2665.

Kumar, A., Sharma, P., Kanwar S.S. (2012) Lipase catalyzed esters synthesis in organic media. *Int. J. Inst. Pharm. Life Sci*. **2**,91-119.

Lerin, L.A., Loss, R.A., Remonatto, D., Zenevicz, M.C., Balen,M., Netto, V.O., Ninow , J.L., Trentin, C.M., Oliveira, J.V., Oliveira, D. (2014) A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. *Bioprocess. Biosyst. Eng*. **12**:2381-2394.

Liang J., Zhang Y., Sun A., Deng D., Hu Y. (2015) Enantioselective Resolution of (±)-1-Phenylethanol and (±)-1-Phenylethyl Acetate by a Novel Esterase from Bacillus sp. SCSIO 15121. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **3**: 558-575.

Lott, J.A., Lu,C.J. (1991) Lipase isoforms and amylase isoenzymes assays and application in the diagnosis of a cute pancreatitis. *Clin. Chem*. **37**, 361–368.

Mills, A., Holland, C. (1995) Effect of ultrasound on the kinetics of oxidation of octan-2-ol and other secondary alcohols with sodium bromate, mediated by ruthenium tetraoxide in a biphasic system. *Ultrason.Sonochem*. **2**, 33–38.

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. Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.

Park S., Kazlauskas R. J. (2001) Improved preparation and use of room temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *J. Org.Chem.* **66**, 8395-840.

Patel, R.N. (2001) Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Adv. Synth. Catal*. **343**, 527-546.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol V.T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **29**, 119–131.

Sheldon, R. A., van Rantwijk, F. (2008) Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media. U: Ionic liquids as media for enzymatic transformations, (Carrea, G., Riva, S., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 227-255.

Soumillion, P., Fastrez, J. (2001) Novel concepts for selection of catalytic activity. *Curr. Opin. Biotechnol.***12**, 387-394.

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

Shu, G., Zhang, B., Zhang, Q., Wan, H., Hong, L. (2016) Effect of temperature, pH, enzyme to substrate ratio, substrate concentration and time on the entioxidative activity of hydrolysates from goat milk casein by alcalase. *Food Technol.* **20**, 29-38.

Tanneberger, K., (2010) Assessment of chemicals: fish cells as an alternative to whole fish. *Eawag. News*. **68e**, 25–27.

Verma, N., Thakur, S., Bhatt, A. K. (2012) Microbial lipases: industrial applications and properties (a review). *Int. Res. J. Biological. Sci.* **1**, 88-92.

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