Enantioselektivna hidroliza (R, S)-1-feniletil- acetata u prirodnim eutektičkim otapalima primjenom lipaze kao biokatalizatora

Štokić, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:718596

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

Preddiplomki studij Biotehnologija

Marina Štokić

7195/BT

ENANTIOSELEKTIVNA HIDROLIZA (*R, S*)-1-FENILETIL- ACETATA U PRIRODNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA PRIMJENOM LIPAZE KAO BIOKATALIZATORA

ZAVRŠNI RAD

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

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Zagreb, 2018.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na pomoći i razumijevanju prilikom izrade rada. Veliko hvala Manueli Panić, mag. ing. koja mi je, svojim strpljenjom i savjetima, omogućila što lakše pisanje rada, ali i rad u laboratoriju. Također, zahvaljujem obitelji i prijateljima na velikoj potpori.

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

ENANTIOSELEKTIVNA HIDROLIZA (*R, S*)-1-FENILETIL- ACETATA U PRIRODNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA PRIMJENOM LIPAZE KAO BIOKATALIZATORA

Marina Štokić, 0058208044

Sažetak: Implementacija pristupa zelene kemije u posljednje vrijeme postaje važan cilj mnogih industrija u proizvodnji kiralnih građevnih blokova, a razlog je štetni utjecaj dosad primjenjivanih metoda sinteze na ljudsko zdravlje i okoliš. Zelena otapala, posebice prirodna eutektička otapala, zelena su zamjena za dosada korištena štetna i hlapljiva otapala. Biokataliza kao primjena bioloških sustava je zeleniji način sinteze sa mogućnošću smanjenja otpada i energetskog troška. U ovom radu ispituje se mogućnost korištenja prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida u enantioselektivnoj hidrolizi (*R, S*)-1-feniletil-acetata, uz lipazu kao biokatalizator. Hidroliza je uspješno provedena u svim pripremljenim prirodnim eutektičkim otapalima, od kojih se kao najučinkovitije otapalo pokazalo kolin-klorid:glukoza s 50 % (v/v) vode (η=88,6 %, *ee*=98 %). Također, ispitan je i utjecaj ultrazvuka kao alternativnog izvora energije na prinos reakcije hidrolize, te je utjecaj bio pozitivan: vrijeme reakcije se skratilo, a produktivnost povećala.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 15 slika, 6 tablica, 37 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag. ing.

Datum obrane:

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

ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF (*R, S*)-1-PHENYLETHYL ACETATE IN NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS WITH APPLICATION OF LIPASE AS BIOCATALYST

Marina Štokić, 0058208044

Abstract: The implementation of green chemistry approach in industry for production of chiral building blocks has lately developed, with the main reason beeing bad impact of conventional synthesis on human health and environment. Natural deep eutectic solvents, as green solvents, are a green substitute for toxic and volatile solvents. Biocatalysis, as application of biological systems, represents a greener way of synthesis with reduction of waste and energetic expense. In this study, the application of choline-chloride based natural deep eutectic solvents in enantioselective hydrolisys of (*R, S*)-1-phenyletyl-acetate using lipase as biocatalyst will be examined. The hydrolisys was successfully carried out in all natural deep eutectic solvents, the most effective was choline-chloride:glucose solvent with 50%(v/v) of water (η =88,6%, *ee =98%*). Also, the impact of ultrasound as alternative energy source was examined, the results were positive and manifested in decrease of reaction time and productivity magnification.

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

Thesis contains: 33 pages, 15 figures, 6 tables, 37 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesisis 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 Cvjetko Bubalo, Assistant professor

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

Defence date:

Sadržaj:

1. Uvod 1

2. Teorijski dio 2

2.1. Zelena kemija 2

2.1.1. Principi zelene kemije 3

2.1.2. Smjerovi zelene kemije 4

2.1.3. Biokataliza u zelenoj kemiji 4

2.1.4. Zelena otapala 8

2.1.4.1. Prirodna eutektička otapala 8

2.2. Primjena lipaza u hidrolitičkim reakcijama 10

2.2.1. Općenito o hidrolazama 10

2.2.2. Tipovi hidrolaza 10

3. Eksperimentalni dio 12

3.1. Materijali 12

3.1.1. Enzimski preparat 12

3.1.2. Kemikalije 12

3.1.3. Oprema i uređaji 12

3.2. Metode 13

3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala (NADES-a) 13

3.2.2. Enantioselektivna hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata 14

3.2.2.1. Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata u ultrazvučnoj kupelji 15

3.2.3. Određivanje koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata 15

3.2.3.1. Izrada baždarnog dijagrama 16

3.2.4. Statistička obrada dobivenih rezultata 17

4. Rezultati i rasprava 18

4.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala 19

4.2. Probir prirodnih eutektičkih otapala za hidrolizu (*R, S*)-1-feniletil-acetata 20

4.3. Utjecaj ultrazvuka na tijek lipazom katalizirane hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata .26

5. Zaključak 29

6. Literatura.....30

1. Uvod

Industrijski napredak doveo je do sve većeg interesa znanstvenika za smanjenje štetnog utjecaja industrijskih procesa na ljudsko zdravlje i okoliš, a da se pritom zadržavaju tehnološka svojstva do sad korištenih metodologija. Zbog takvih razmišljanja, započet je program sprječavanja i smanjenja zagađenja okoliša uzrokovanog procesima konvencionalne sinteze, nazvan zelena kemija, a takav program teži zadovoljiti ekološke, ekonomske i socijalne potrebe. Jedan od ciljeva zelene kemije je i implemetacija zelenih otapala, te je u takvom smislu izbor sigurnog, jeftinog, netoksičnog i biorazgradivog otapala glavni cilj u organskoj sintezi (Sperry i Garcia-Alvarez, 2016). U takvu skupinu otapala spadaju ionske kapljevine, prirodna eutektička otapala te super- i subkritične kapljevine. Prirodna eutektička otapala posjeduju navedene karakteristike, a sintetiziranju se iz prirodnih metabolita izvora te se istražuju za moguću primjenu u raznim procesima. Jedan od moguće primjene je i u visoko selektivnim (kemo-, regio- i stereoselektivnim) biotransformacijama, koje se razvijaju u standardnu zelenu tehnologiju zbog zahtjeva za visokim stupnjem enantiomerne čistoće biološki aktivnih kiralnih spojeva ili kiralnih sintona u proizvodnji lijekova te poljoprivrednih i ostalih kemikalija. Naime, interakcija kiralnih spojeva s kiralnim okruženjem u biološkim sustavima može rezultirati biološki različitim, ponekad i suprotnim učincima enantiomera te je ovakva čistoća proizvoda od izuzetne važnosti (Ai Nguyen i sur., 2006). Jedna od glavnih prednosti primjene prirodnih eutektičkih otapala je dizajniranje idealnog otapala za biokatalitički sustav (Durand i sur., 2013; Cvjetko i sur., 2015a; 2016; Juneidi i sur., 2016) te dobra kontrola/poboljšanje topljivosti supstrata/produkta, brzine reakcije, aktivnosti, enantioselektivnosti (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b; Panić i sur., 2018), regioselektivnost i stabilnosti biokatalizatora. Cilj ovog rada je ispitati mogućnost korištenja prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida u enantioselektivnoj hidrolizi (*R, S*)-1-feniletil-acetata uz primjenu lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antarctica* kao biokatalizatora, te utjecaj primjene ultrazvuka na spomenutu hidrolizu.

2. Teorijski dio

2.1. Zelena kemija

Koncept *zelene* kemije uveden je 90-ih godina 20. stoljeća od strane američke Agencije za zaštitu okoliša (*engl.* Enviromental Protection Agency, EPA) kako bi se potaknula upotreba i proizvodnja kemikalija s manje otpada i štetnih učinaka. Relativno je nova grana kemije koja osmišljava i primjenjuje kemijske produkte i procese kako bi se smanjio negativan utjecaj kemikalija na okoliš i ljudsko zdravlje- ona nije program čišćenja, već prevencije (Tao i Kazlauskas, 2011). Program "zelena" kemija obuhvaća promjene dosad primjenjivanih metoda i materijala u industijskim procesima proizvodnje, a glavni je uvjet prihvaćanja tog programa je stvaranje ekonomske dobiti (Jukić i sur., 2004). Kao program održivog razvoja kemijskih tehnologija, bitna je u zadovoljavanju potreba današnjice i budućnosti u proizvodnji uspostavaljanjem kompromisa između ekoloških, ekonomskih i socijalnih aspekta. Program zelene kemije se temelji na 12 načela koja prema Lancaster (2002) koja govore o:

- maksimalnoj konverziji reagensa u korisne produkte (tzv. atom economy)
- minimalnoj proizvodnji otpada dizajniranjem reakcija
- korištenju bezopasnih te obnovoljivih sirovina i neštetnih produkata
- provođenju reakcija koje su sigurne
- maksimalnoj energetskoj učinkovitosti procesa

Organski otpad, škodljiv za ljude i okoliš, primarno nastaje pri proizvodnji u određenim stupnjevima sinteze, tzv. "prljavim reakcijama", tijekom kojih se upotrebljavaju toksični reaktanti i otapala, a zbog žestokih reakcijskih uvjeta, nastaje veliki broj toksičnih nusprodukata (Jukić u sur., 2004). Primjeri takvih reakcija su hidrogeniranje, alkiliranje, nitriranje, sulfoniranje i sl. Štetne i opasne tvari se pritom mogu reducirati tako da se zamijene bezopasnima i poveća se prinos reakcije, čime se smanjuje nastanak nepoželjnih međuprodukata (Tao i Kazlauskas, 2011). Zelena kemija nudi opcije u rješavanju najosjetljivijih problema održivosti u današnjem svijetu koji uključuju veliki porast ljudske populacije, proizvodnju i upotrebu energije i hrane, globalne klimatske promjene, toksičnost te potrošnja neobnovljivih izvora (Hjeresen, 2002).

2.1.1. Principi zelene kemije

Kao što je spomenuto u poglavlju 2.1., principi zelene kemije se temelje na 12 načela kojima je cilj smanjiti ili eliminirati upotrebu ili nastanak štetnih spojeva te povećati iskoristivost procesa. 12 načela zelene kemije osmislili su Anastas i Warner 1998. godine, fokus im je upotreba alternativnih sintetskih i reakcijskih puteva te osmišljavanje ekološki prihvatljivih kemikalija, a ona su:

1) Bolje je spriječiti nastanak otpada nego ga obrađivati kada nastane
2) Proces sinteze treba biti osmišljen tako da je što veća količina ulazne sirovine uključena u konačni proizvod
3) Po mogućnosti, postupak sinteze treba biti smišljen tako da se koristi što manje spojeva koji su štetni po ljudsko zdravlje i okoliš
4) Osmišljavanje djelotvornih kemijskih produkata s minimalnom toksičnošću
5) Što češća uporaba sigurnijih pomoćnih sredstava ili, ako je moguće, izbjeći njihovu upotrebu
6) Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku kako bi se energetski zahtjevi sveli na minimum
7) Upotrebljavati obnovljive sirovine kada je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo
8) Izbjegavati nepotrebna proširenja procesa
9) Katalitički reagensi trebaju biti selektivni koliko god je to moguće jer su prihvatljiviji od reagenasa u stehiometrijskim količinama
10) Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja
11) Primjena i razvijanje analitičkih metoda za praćenje kemijskog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari
12) Smanjiti primjenu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice u kemijskim procesima

Jedan od glavnih ciljeva zelene kemije je pokazati da provođenjem ovih načela u industriji se može stvoriti podloga za kompetitivni napredak, te se u tom smislu na zelenu kemiju može gledati kao na redukcijski proces (Lancaster, 2002). Prilikom osmišljavanja procesa "zelene" kemije nemoguće je istodobno maksimalno udovoljiti zahtjevima svih 12 načela "zelenog" procesa, ali se tijekom pojedinih stupnjeva sinteze pokušava primjeniti čim veći broj načela (Jukić i sur., 2004).

2.1.2. Smjerovi zelene kemije

Za postizanje zelenih uvjeta u kemijskim procesima koji će nuditi ekološka i ekonomska rješenja, koriste se razni smjerovi od kojih su značajne katalitičke (heterogena i homogena kataliza) i biokatalitičke reakcije. Razmatraju te koriste reakcije u zelenim alternativnim medijima (eutektička otapala, ionske kapljevine i sl.) i reakcije u različitim reakcijskim uvjetima (ultrazvuk, mikrovalovi i fotokatalitičke reakcije). Značaj katalize vrlo je bitan i primjenjuje se u industrijskim procesima, proizvodnji goriva, zaštiti okoliša itd., dok biokataliza ima obećavajuće rezultate kada se gleda kroz načela zelene kemije, posebice u kombinaciji sa nekim od gore navedenih smjerova (npr. korištenje zelenih alternativnih otapala).

2.1.3. Biokataliza u zelenoj kemiji

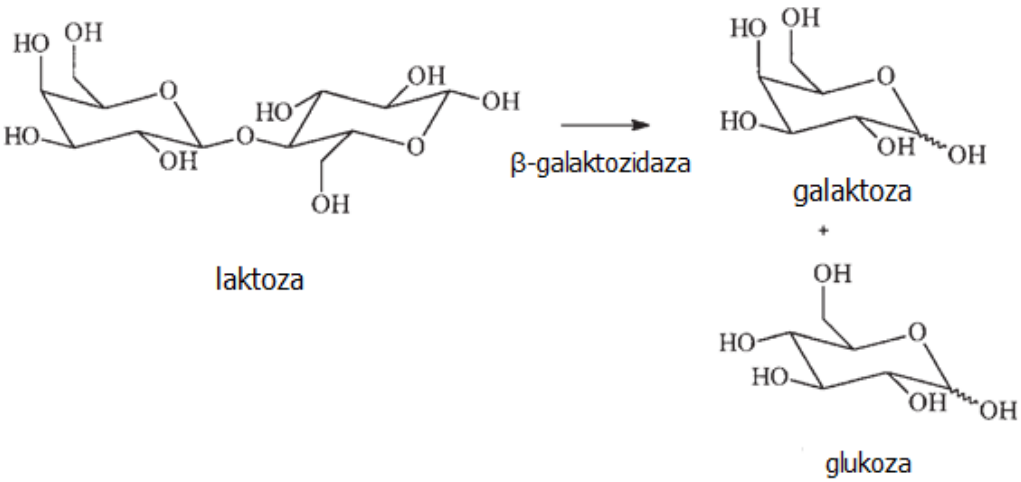
Biotransformacija označava pretvorbu jednog kemijskog oblika u drugi uslijed rada bioloških sustava (Grogan, 2009). Upravo korištenje animalnih, biljnih ili mikrobnih bioloških sustava daje odličnu podlogu za razvitak zelenog procesa. Iako "bio" upućuje na neštetnost, kataliza je zapravo ta koja omogućava provedbu reakcije kao zelenog procesa (Tao i Kazlauskas, 2011). Većina industrijskih procesa i reakcija u biološkim sustavima se odvijaju u prisutnosti katalizatora. Oni omogućavaju brzu pretvorbu većinu supstrata u produkte čime se izbjegava uporaba stehiometrijskih količina reagensa, vođenje procesa pri blažim uvjetima čime se ujedno ostvaruje energetska ušteda te povećanje iskoristivosti (Tao i Kazlauskas, 2011). Korisna činjenica biokatalize koja ju čini vrlo upotrebljivom u zelenim procesima jest selektivnost kojom se osigurava provođenje "težih" reakcijskih koraka, a time se smanjuje pojava otpadnih međuprodukata i upotreba tzv. zaštitnih grupa. Odnos načela zelene kemije i biokatalize nalazi se u tablici 1, a upravo ta načela svrstavaju katalizu kao jednu od najmoćnijih oružja u implementaciji zelene kemije (Anastas i sur., 2001).

Tablica 1. Odnos načela zelene kemije i biokatalize

Načela zelene kemije	Biokataliza
Smanjenje otpada	Novi, održivi i brzi put pretvorbe, selektivnost enzima omogućuje provođenje više koraka u jednom (bez nastajanja otpada)
Maksimalna konverzija	Pretvorba većine supstrata u produkte
Mala upotreba štetnih spojeva	Niska toksičnost (biološki sustavi)
Sigurna otapala i pomoćna sredstva	Reakcije se najčešće odvijaju u vodi, pri neutralnoj pH vrijednosti i sobnim temperaturama
Obnovljivost izvora	Biokatalizatori su obnovljivi
Energetska učinkovitost	Reakcije se provode u blagim uvjetima-ujedno i manji rizik
Izbjegavanje nepotrebnih proširenje procesa i kemijskih derivata	Nije potrebno koristiti zaštitne skupine i sl. zbog regio-, kemo- i stereoselektivnosti samih enzima

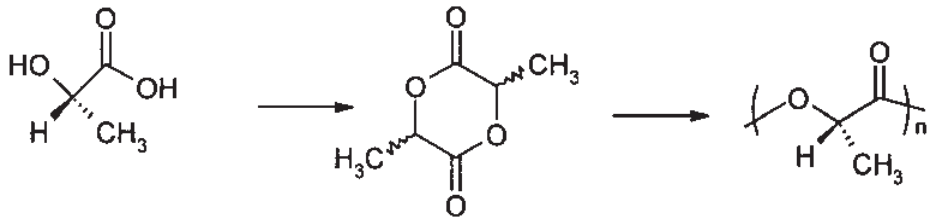
Zbog nepovoljnih uvjeta kemijske sinteze, biotransformacije pokrivaju široki spektar interdisciplinarnih područja i imaju primjenu u raznim načinima, njihovom upotrebom preusmjerava se tijek istraživanja i proizvodnje u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, u katalitičkoj industriji prilikom istraživanja ekološko prihvatljivih procesa, kod saniranja te čišćenja okoliša prilikom ekoloških katastrofa, istraživanju metabolizma lijekova i sl. (Doble i sur., 2004). Primjeri primjena biotransformacije u industriji su proizvodnja: glukoze iz škroba (*Aspergillus niger*), octene kiseline iz etanola (imobilizirane *Acetobacter* vrste), visoko fruktoznog sirupa iz glukoze (enzim glukoza izomeraza) čija godišnja proizvodnja iznosi 10 milijuna tona (Sime, 1999), te vrlo rasprostranjena primjena kvasca u proizvodnji alkoholnih pića. Prehrambena industrija koristi *β*-galaktozidazu za konverziju laktoze u glukozu i galaktozu (slika 1), najvažniji korak u prozvodnji mlijeka s niskom vrijednošću laktoze gdje se dnevno, na ovaj način, preradi 250 000 litara mlijeka (Holland, 2002). Obzirom na široki raspon mogućnosti kojima biokataliza može pridonijeti zelenoj kemiji, nije iznenađujuće da su mnogi dobitnici EPA-e nagrade u zelenoj kemiji koristili biokatalizu kao ključ poboljšanja, 2010. godine osmišljen je način poboljšanja proizvodnje sitagliptina, aktivnog sastojka lijeka za

dijabetes tipa 2, čime se eliminiralo 4 koraka kemijske sinteze koji su uključivali ekstremne uvjete tlaka (Tao i Kazlauskas, 2011).



Slika 1. Reakcija konverzije laktoze u glukozu i galaktozu uz β-galaktozidazu kao katalizator (Holland, 2002)

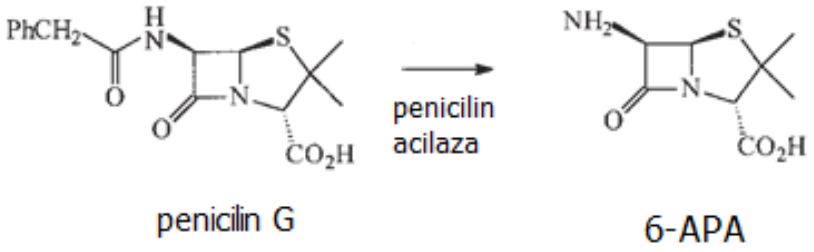
Korištenje obnovljivih materijala u proizvodnji polimera postalo je područje velikog interesa budući da polimeri naftnih derivata, zbog dodatka aditiva, nisu lako razgradivi te time sve više predstavljaju problem u okolišu. Interes je postavljen na proizvodnju biorazgradive plastike sa korisnim kemijskim i fizikalnim svojstvima (Lancaster, 2002). Nedavna poboljšanja u proizvodnji poliaktične kiseline (PLA) omogućila su da ona potencijalno zamjeni dosad korištene polimere, s jednakom čvrstoćom i otpornošću, ali i sa svojstvom biorazgradivosti. Proces se temelji na fermentaciji nerafinirane dektroze kako bi se dobila D- i L-laktoza, koja se konvertira u D-,L- i mezo- laktide prije same polimerizacije (slika 2).



Slika 2. Reakcija sinteze polilaktične kiseline (Lancaster, 2002)

U farmaceutskoj industriji jedna od najbitnijih i najvećih biokatalitičkig procesa je konverzija fermentacijskog produkta penicilina G u 6-aminopenicilansku kiselinu; 6-APA (slika 3), uz

enzim penicilin acilazu kao katalizator. Aminopenicilanska kiselina početni je spoj za daljnju proizvodnju kemijski modificiranih penicilina, a njegova godišnja proizvodnja se procjenjuje na 16 000 tona godišnje (Holland, 2002). Reakcija se provodi pod blagim uvjetima temperature i pH vrijednosti.



penicilin G 6-APA

Slika 3. Reakcija konverzije penicilina G u 6-aminopenicilansku kiselinu (Holland, 2002)

Budući da je voda nepovoljno otapalo u gotovo svim industrijski važnim biotransformacijama (organski spojevi od komercijalnog ineresa 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), lipazama katalizirane reakcije se već nekoliko desetljeća promatraju i provode u bezvodnim medijima ili u organskim otapalima. Eastman Kodak Company je 2009. dokazala da lipaza B iz *Candida antarctica,* najčešće korištena lipaza u reakcijama sinteze, pokazuje veliku aktivnost i stereoselektivnost u organskim otapalima (Tao i Kazlauskas, 2011). Zbog štetnosti organskih otapala za okoliš i ljude, istražuje se mogućnost provođenja lipazom kataliziranih reakcija u zelenim otapalima, primjerice u ionskim kapljevinama ili eutektičkim otapalima. U biotransformacijama, ionske kapljevine i eutektička otapala mogu se koristiti kao čista otapala, kao kootapala u vodenom mediju i kao dio dvofaznog sustava (Cvjetko Bubalo i sur., 2015c).

2.1.4. Zelena otapala

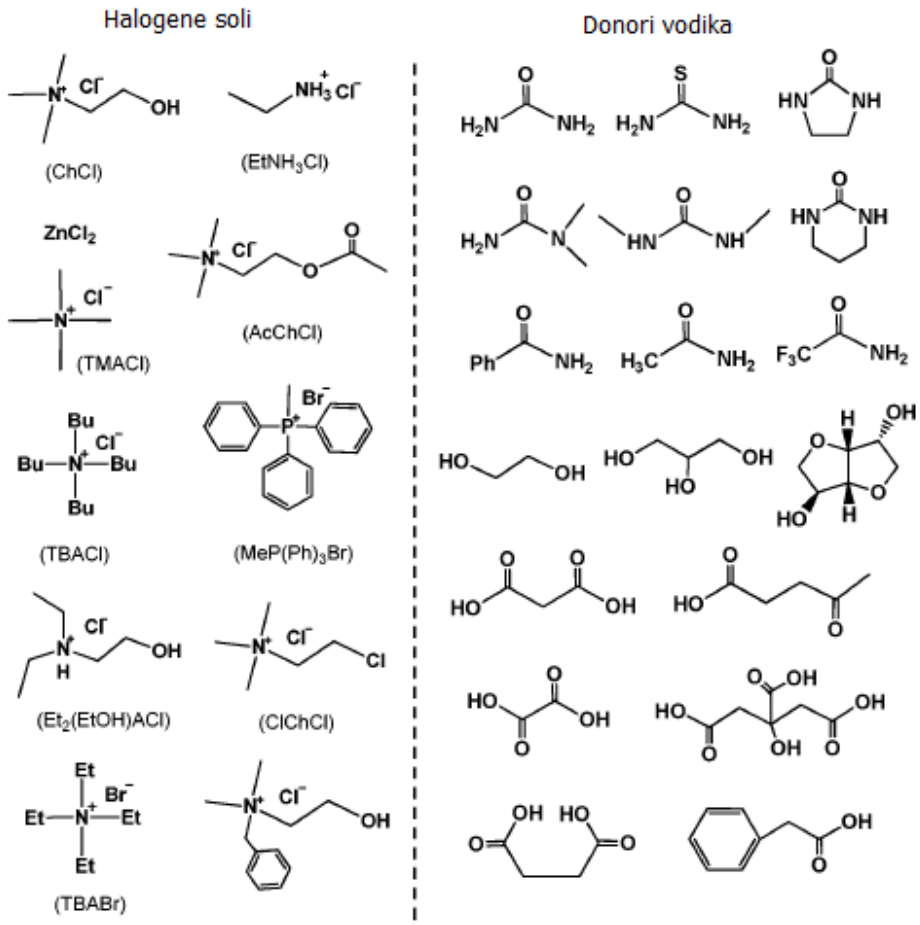
U mnogim industrijskim procesima, velike količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala se koriste u različitim reakcijskim sustavima i separacijskim koracima (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Otapala čine ≈ 60 % svih industrijskih emisija te ≈ 30% emisija svih hlapljivih organskih tvari na planetu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a; Anastas i Eghbali, 2010) te time predstavljaju veliki problem za okoliš (zagađenje i promjena klime te kvalitete zraka). Posljednjih godina, istražuju se zelena otapala koja bi zadržala tehnološka svojstva organskih otapala, ali s povoljnijim učinkom za ljude i okoliš te zamjenila štetna orgnska otapala u industriji. Idealno zeleno otapalo mora imati nisku cijenu, biti biorazgradivo, netoksično, visoko dostupno i mora postojati mogućnost reciklacije istog. (Clark i sur, 2018).

Voda je prvi izbor od zelenih otapala zbog gore navedenih razloga. Voda je prirodni medij za kemijske reakcije, koristi se često u industrijskim procesima npr. oksidacije i halogeniranje, a s druge strane je nezapaljiva, netoksična te joj je cijena niska. Međutim, slaba topljivost mnogih organskih spojeva u vodi ograničava njenu primjenu.

Kako bi se prevladali nedostaci organskih otapala i primjene vode u raznim industrijskim procesima, razvijaju se brojna benigna, ekološki prihvatljiva, biorazgradiva i pametna otapala kao što su ionske kapljevine, superkritične i subkritične tekućine te otapala iz prirodnih komponenata (prirodna eutektička otapala i prirodne ionske kapljevine) i obnovljivih izvora (npr.otapala dobivena iz derivata biljne biomase).

2.1.4.1. Prirodna eutektička otapala

Prirodna eutektička otapala (*eng*. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) su nova generacija zelenih otapala, a pripremaju se miješanjem nabijenog akceptora vodika (najčešće kvaterna amonijeva sol kolin-klorid) s donorom vodika (amini, šećeri, alkoholi i sl.), gdje se navedene komponente povezuju jakim vodikovim vezama (slika 4) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Točka tališta NADES-a niža je nego točke talište pojedinim komponenata od kojih je sastavljen (Clark i sur., 2018). Pozitivne karakteristike ovih otapala su niska cijena komponentana za njihovu sintezu, jednostavna priprema, niska ili zanemariva toksičnost, biorazgradivost te sigurnost za okoliš. Eutektička otapala poznata su kao nova, četvrta generacija ionskih tekućina zbog zajedničkih fizikalno-kemijskih karakteristika (nehlapljivost, nezapaljivost, velika viskoznost), iako se radi o dvije različite vrste otapala.



Slika 4. Strukture tipičnih akceptora i donora vodika koji se koriste u sintezi DES-ova (Zhang i sur., 2012)

Iako pripremljena iz prirodnih komponenata, eutektička otapala se ne trebaju smatrati potpuno netoksična (Clark i sur., 2018). Wen i sur. (2015) su testirali i toksičnost i biorazgradivost DES-ova tako da su koristili razne organizme. Rezultati su otkrili da DES-ovi na bazi kolin klorida i kolin acetata mogu negativno utjecati na stanične membrane iako su početne komponente za sintezu DES-a bile karakterizirane kao netoksične.

Prve primjene eutektičkih otapala bile su u elektrodepoziciji i elektropoliranju metala te u proizvodnji biodizela. Danas se istražuju kao mediji u reakcijama biokatalize, sintezi polimera, biomedicini, separaciji i analizi te u ekstrakciji biološki aktivnih tvari iz biljnih dijelova (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Dokazano je da su bioaktivne komponente do 100 puta bolje topive u NADES-ovima, nego što su u vodi ili lipidima.

2.2. Primjena lipaza u hidrolitičkim reakcijama

2.2.1. Općenito o hidrolazama

Hidrolaze su enzimi prisutni u prokariotima i eukariotima, a uloga im je cijepanje kemijskih veza u prisutnosti vode. Ova grupa enzima odlikuje se sposobnošću visoke kemo-, regio- i stereoselektivne transformacije, čak i sa niskom selektivnošću za supstrat, a za funkcioniranje im nisu potrebni kofaktori te su lako dostupne (Doble i sur., 2004). Kataliziraju hidrolizu estera, amida, glikozidnih veza, fosfat estera, laktona i nitrila. Hidrolaze su najveću primjenu pronašle u organskim sintezama: cijepanje racemičnih estera kako bi se dobile optički aktivne kiseline, reakcije transesterifikacije i regiospecifične acilacije te u sintezi optički aktivnih alkohola. Primjena hidrolaza se još više proširila i postala zanimljiva spoznajom da u povoljnim uvjetima kao što je mala količina vode u otapalima mogu katalizirati prirodne reakcije u suprotnim smjerovima (Grogan, 2009).

2.2.2. Tipovi hidrolaza

Hidrolaze čine slijedeće grupe enzima: esteraze, lipaze, peptidaze/amidaze, glukozidaze, fosfataze, pirofosfataze. Esteraze kataliziraju hidrolizu estera i laktona, peptidaze su proteolitički enzimi bitni u metaboličkim reakcijama jer cijepaju specifične veze unutar lanca peptida (endopeptidaze) ili cijepaju peptidnu vezu na terminalnom kraju lanca (egzopeptidaze). Peptidaze mogu biti serinske, tiolne ili kisele, ovisno o aminokiselinskom ili metalnom ostatku u aktivnom mjestu. Glukozidaze cijepaju glikozidnu vezu, a fosfataze se dijele na fosfat esterase i fosfodiesteraze (cijepaju fosfodiestersku vezu u polinukleotidima). Lipaze su hidroličitki enzimi koji imaju najširu komercijalnu primjenu kao enzimski katalizatori, a definiraju se kao karboksilesteraze koje kataliziraju hidrolizu triacilglicerola. Kataliziraju hidrolizu širokog spektra prirodnih i neprirodnih estera zadržavajući visoku enantio- i regioselektivnost, što ih čini idealnim katalizatorima za reakcije organske sinteze (Bornscheuer i Kaslauskas, 2006). Ostale pogodne karakteristike lipaza su sposobnost korištenja mono-, di-, triglicerida i slobodnih masnih kiselina u reakcijama transesterifikacije, niska inhibicija produktom, visoka aktivnost u nevodenim medijima, kratko reakcijsko vrijeme, otpornost na promjene temperature i pH vrijednosti te mogućnost upotrebe imobiliziranih lipaza tj njihova višekratna upotreba (Kumar i sur., 2012). Lipazom katalizirane biotransformacije koriste se u priravi čistih enantiomernih farmaceustkih i sintetičkih priravaka, za zaštitu ili otkrivanje reakcijskih intermedijera, ali i za specijaliziranije upotrebe (Bornscheuer i Kaslauskas, 2006). Primjerice, u mliječnoj industriji, dodatakom lipaze u kravlje mlijeko postiže se okus kozjeg ili

ovčjeg mlijeka, dok mikrobi koji se koriste pri zrenju sireva luče lipaze. Također, dodatak lipase u detergente pomaže u otklanjanju mrlja s odjeće (npr. lipaza iz *Humicola lanuginosa*). Dvije vrste lipaza su proizvedene posebno za korištenje u procesima biotransformacija; lipaza iz *Rhizomucor miehei* koja se koristi u lipidnoj modifikaciji, te lipaza B iz *Candida antarctica* koja se koristi u organskim sintezama (Bornscheuer i Kaslauskas, 2006). Lipaza B je posebna lipaza koja dijeli svojstva i esterase i lipase, sposobna je katalizirati različite vrste reakcija; esterifikacije, transesterifikacije, epoksidacije, amidacije i aldolne adicije (Gaber, 2012).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Enzimski preparat

Novozym 435 (lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama, sadržaj 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
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kolin klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Heptan, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R, S*)-1-feniletil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrebljene kemikalije i otapala bili su analitčike 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
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Ultrazvučna kupelj GRANT XUB5, Grant Instruments, Engleska, Ujedinjeno kraljevstvo
- Tikvice s okruglim dnom

3.2. Metode

3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala (NADES-a)

U tikvicu s okruglim dnom se pomiješaju izračunate količine komponenti prema Tablicama 2-4 u određenom molarnom odnosu te s određenim postotkom vode; 30, 50 i 80 % (v/v). Reakcijska smjesa se zagrije na 50 ºC na magnetskoj miješalici kroz 2 sata kako bi se dobila homogena, bezbojna i prozirna tekućina. Nakon sinteze, prirodna eutektička otapala se čuvaju pokrivena parafilmom na tamnom mjestu.

Tablica 2. Mase dodanih komponenti za sintezu prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza=1:1 (kratica: ChGlc)

Postotak vode (v/v)	Masa kolin-klorida (g)	Masa glukoze (g)	Masa/volumen vode (g)
$ChGlc_{30\%}$	3	3,9	2,9
$ChGlc_{50\%}$	2,3	2,9	5,3
$ChGlc_{80\%}$	1,2	1,5	11

Tablica 3. Mase dodanih komponenti za sintezu prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol=1:2 (kratica: ChGly)

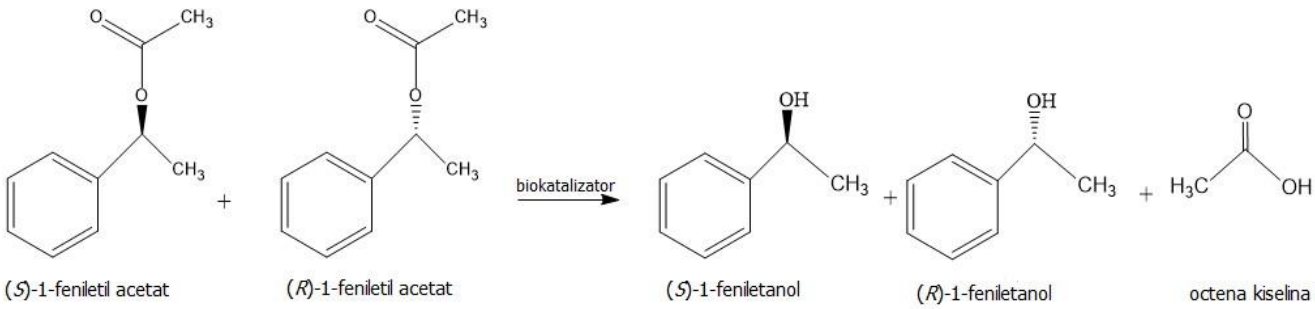
Postotak vode (v/v)	Masa kolin-klorida (g)	Masa glicerola (g)	Masa/volumen vode (g)
$ChGly_{30\%}$	5	6,6	4,9
$ChGly_{50\%}$	5	6,6	11,5
$ChGly_{80\%}$	5	6,6	46,4

Tablica 4. Mase dodanih komponenti za sintezu prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen glikol=1:2 (kratica ChEG)

Postotak vode (v/v)	Masa kolin-klorida (g)	Masa etilen glikola (g)	Masa/volumen vode (g)
$ChEG_{30\%}$	5	4,4	4
$ChEG_{50\%}$	3	2,7	5,7
$ChEG_{80\%}$	1	0,9	7,6

3.2.2. Enantioselektivna hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata

Hidroliza supstrata (*R, S*)-1-feniletil-acetata katalizirana lipazom B provodi se tako da se u epruvetu doda 2820 µL otapala (sintetizirana prirodna eutektička otapala: $ChGlc_{30\%}$, $ChGlc_{50\%}$, $ChGlc_{80\%}$, $ChGly_{30\%}$, $ChGly_{50\%}$, $ChGly_{80\%}$, $ChEG_{30\%}$, $ChEG_{50\%}$, $ChEG_{80\%}$ ili kalij-fosfatni pufer), 6mM (*R, S*)-1-feniletil-acetata, te 2,5 mg imobiliziranog pripravka lipaze Novozym 435. Reakcija se provodi u homogenizatoru s regulacijom temperature (25 ºC), a u vremenskim intervalima (15, 30, 60, 120, 240, 360 min) se uzima uzorak iz reakcijske smjese od 200 µL, ekstrahira se s 200 µL heptana uz snažno miješanje na na vrtložnoj miješalici kroz 3 min. U organsku fazu dodaje se natrijev sulfat te se 1 µL heptanskog sloja uzima za analizu na plinskom kromatografu.



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

Kako bi se usporedile uspješnosti reakcija hidrolize u pojedinim prirodnom eutektičkim otapalima, izračunava se iskorištenje i enantiomerni višak.

I. Iskorištenje procesa hidrolize označava se s η (%), a izračunava se prema jednadžbi:

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

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

II. Enantiomerni višak (*ee*, %) izračunava se prema jednadžbi:

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

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

3.2.2.1. Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata u ultrazvučnoj kupelji

Nakon odabira najboljeg prirodnog eutektičnog otapala, provodi se reakcija u ultrazvučnoj kupelji pri 25ºC. Reakcije su započete dodatkom 2,5 mg imobiliziranog pripravka lipaze, 180 µL supstrata i 2820 µL najboljeg eutektičkog otapala. Reakcije se prate uzimanjem uzorka u određenim vremenskim razmacima (15, 30, 60, 120, 240, 360 min), ekstrahiranjem u heptanu i homogenizacijom nakon čega se uzorci stavljaju na analizu na plinsku kromatografiju.

Kako bi se usporedila uspješnosti reakcija hidrolize u ultrazvučnoj kupelji i homogenizatoru, izračunava se produktivnost (Pr).

$$Pr = \frac{n}{t \times V}$$

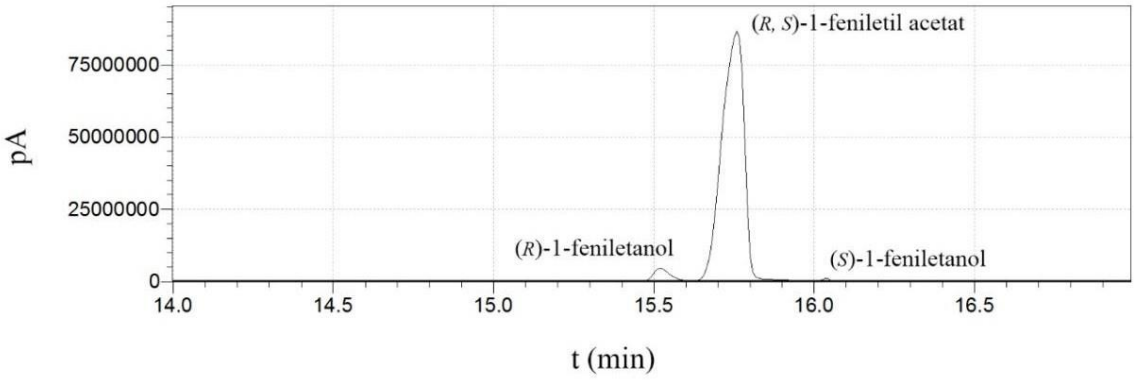
Gdje je n-množina (*R*)-1-feniletanola (mol), t vrijeme reakcije (min), a V volumen reakcijske smjese (L).

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

Kvalitativna i kvantitativna analiza supstrata provedena je pomoću plinskog kromatografa s masenom spektroskopijom.

Kromatografski uvjeti prilikom određivanja:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225
- Mobila faza: helij
- Protok kroz kolonu: 56,3 mL/min
- Detektor: maseni spektrometar
- Temperature kolone: T_1= 80ºC (2 min), T_2=140ºC, Δt=5ºC/min)
- Vrijeme trajanja analize: 21 min



Slika 6. Prikaz tipičnog plinskog kromatograma enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom B

3.2.3.1. Izrada baždarnog dijagrama

Otopine supstrata (*R, S*)-1-feniletil-acetata se prirede tako koncentracije u heptanu iznose 0,05; 0,09; 0,15; 0,25; 2,5; 5 i 10 mol L^{-1}. Izradi se dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata o površini ispod pika te se dobije jednadžba pravca koja će služiti kako bi se izračunale nepoznate koncentracije (*R, S*)-1-feniletil-acetata u uzorcima.

Koncentracija *(R, S*)-1-feniletil-acetata tijekom hidrolize se izračunava prema jednadžbi:

$$C_E = \frac{C_E heptan}{Kp}$$

gdje $C_E heptan$ predstavlja ravnotežnu koncentraciju (*R, S*)-1-feniletil-acetata u heptanu(mol L^{-1}), a *Kp* je koeficijent razdjeljenja (*R, S*)-1-feniletil-acetata između heptana i eutektičkog otapala.

Koeficijent razdjeljenja (*R, S*)-1-feniletil-acetata (*Kp*) između heptana i eutektičkog otapala se određuje tako da se u staklenu kivetu doda prirodno eutektičko otapalo, heptan i (*R, S*)-1-feniletil-acetat. Uzorak se miješa na vrtložnoj miješalici pri 25ºC. Koncentracija (*R,*

S)-1-feniletil-acetata u heptanu se određuje plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja K_p se izračunava na sljedeći način:

$$K_p = \frac{c_{heptan}}{c_D}$$

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}).

3.2.4. Statistička obrada dobivenih rezultata

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

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} x_i$$

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, biokataliza kao jedno od najbitnijih alata zelene kemije, bezopasna je po okoliš, a zbog mogućnosti katalize složenih transformacija, može smanjiti korake kemijske sinteze te time umanjiti otpad i povećati prinos biokatalitičke reakcije (Tao i Kazlauskas, 2011). Enzimske reakcije očituju se visokom regio- i enantioselektivnošću i tako imaju prednost pred reakcijama kemijske sinteze. Posebice se primjenjuju reakcije enzimske hidrolize kao tipične reakcije lipaza radi dobivanja optički čistih pripravaka, koji se koriste u farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Hidrolitiče reakcije, kao prirodne reakcije lipaza, vrlo su korisne u rezoluciji racemičnih smjesa i prokiralnih komponenata (Poliana i MacCabe, 2007), a proizvodnja enantiomerno čistih kemikalija je postala vrlo razvijena zbog potrebe takvih kemikalija u kemijskoj industriji te optički čistih intermedijera u farmaceutskoj industriji (Liang i sur., 2015). Razlog velike važnosti enantiomerno čistih kemikalija jest spoznaja da se dva enantiomera mogu značajno razlikovati u svojoj aktivnosti, što može prouzročiti ozbiljne zdravstvene problem (Liang i sur., 2015). Sekundarni alkoholi imaju veliku ulogu u proizvodnji finih lijekova i kemikalija, a najznačajniji je 1-feniletanol. Njegov R-enantiomer koristi se u liječenju povišene razine kolesterola u krvi te u kozmetičkoj industriji zbog mirisa. U ovom radu je ispitana mogućnost sinteze (*R*)-1-feniletanola hidrolizom (*R, S*)-1-feniletil-acetata, koristeći lipazu kao katalizator u prirodnim eutektičkim otapalima. Korištena je lipaza B iz kvasca *Candida antarctica* koja je imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama (Novozym 435), koja je pokazala dobru katalitičku sposobnost u raznim organskim sintezama, od kojih su neke provedene i u komercijalnu upotrebu (Kirk i Christensen, 2002). Hidroliza je provedena i u puferu (radi usporedbe uspješnosti), a također je praćena uspješnost hidrolize primjenom alternativnih izvora energije – ultrazvuka.

4.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

Prirodna eutektička otapala pripremaju se miješanjem komponenti; kolin-klorid s glukozom, glicerolom i etilen-glikolom u određenim molarnim omjerima, te najčešće uz dodatak određenog postotka vode. Komponente se zagrijavaju na magnetskoj miješalici dok se ne dobije homogena smjesa (η = 100 %). Pripravljene su vodene otopine prirodnih eutektičkih otapala s udjelima vode od 30, 50 i 80 % (v/v) (tablica 5).

Tablica 5. Prirodna eutektička otapala s pripadajućim pH-vrijednostima i cijenama

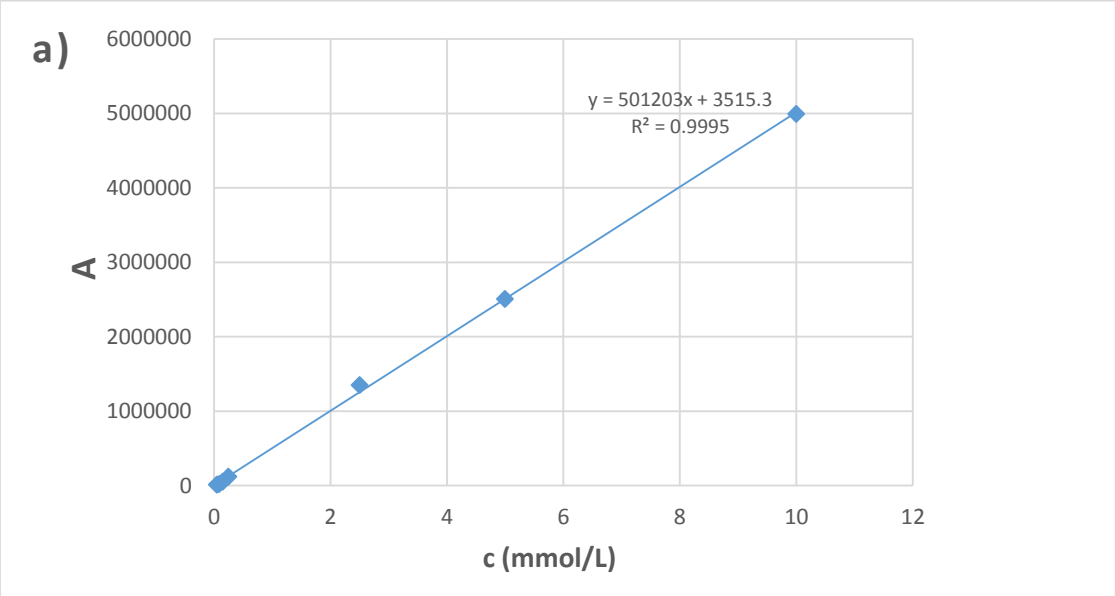
Prirodno eutektičko otapalo	**Molarni omjer**	**Udio vode (%, v/v)**	**Oznaka**	**Cijena ($ kg^{-1})**	**pH-vrijednosti (Panić i sur., 2018)**
Kolin-klorid: glukoza	1:1	30	ChGlc30	54	5,2
		50	ChGlc50		4,0
		80	ChGlc80		4,1
Kolin-klorid: glicerol	1:2	30	ChGly30	48	3,3
		50	ChGly50		3,5
		80	ChGly80		3,9
Kolin-klorid: etilen-glikol	1:2	30	ChEG30	43	7,1
		50	ChEG50		6,0
		80	ChEG80		5,2

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

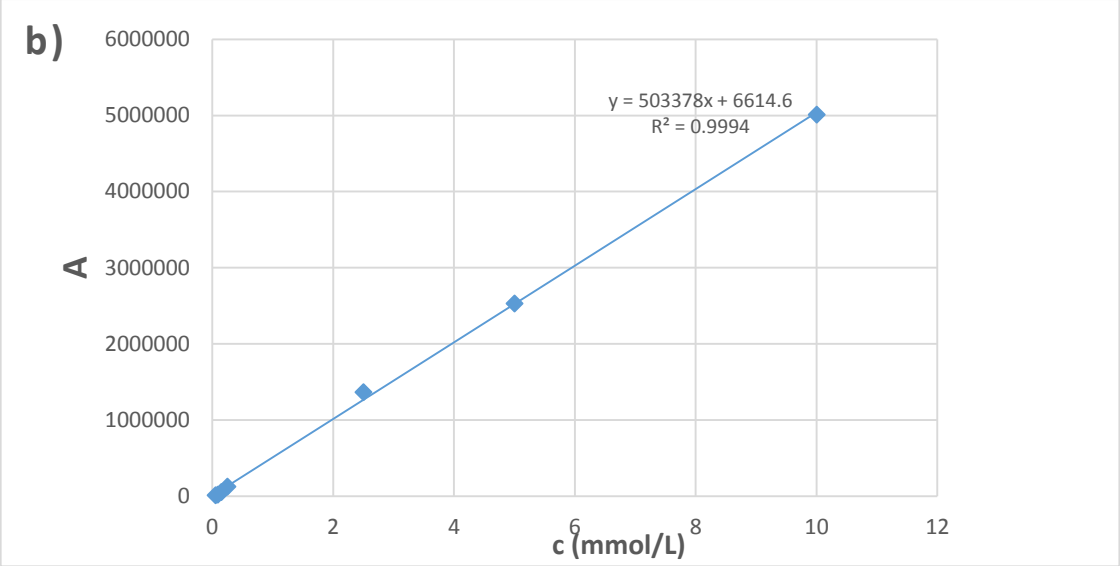
Usporedbom pH-vrijednosti pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala uočavamo da sva otapala imaju blago kisela svojstva s pH-vrijednostima u rasponu od 3,3 za $ChGly_{30\%}$ do 6,0 za $ChEG_{50\%}$, osim $ChEG_{30\%}$ koji je neutralan. Cijene prirodnih eutektičkih otapala otprilike su u rangu s cijenama organskih otapala, iako postoje odstupanja u cijeni poput relativno jeftinog 99 %-tnog heptana (81,53 $ kg^{-1}).

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

Hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata provedena je u kalij-fosfatnom puferu i prirodnim eutektičkim otapalima, uz lipazu B (pripravak Novozym 435) kao katalizator. Reakcija se provodila pri 25 ºC na homogenizatoru, a reakcija je praćena uzimanjem uzoraka iz reacijske smjese, u određenim vremenskim intervalima, koji su analizirani plinskom kromatografijom. Prethodno je izrađen baždarni dijagram za kvantifikaciju (*R*)-1-feniletil-acetata i (*S*)-1-feniletil-acetata (slika 7 i 8).



Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R*)-1-feniletil-acetata.



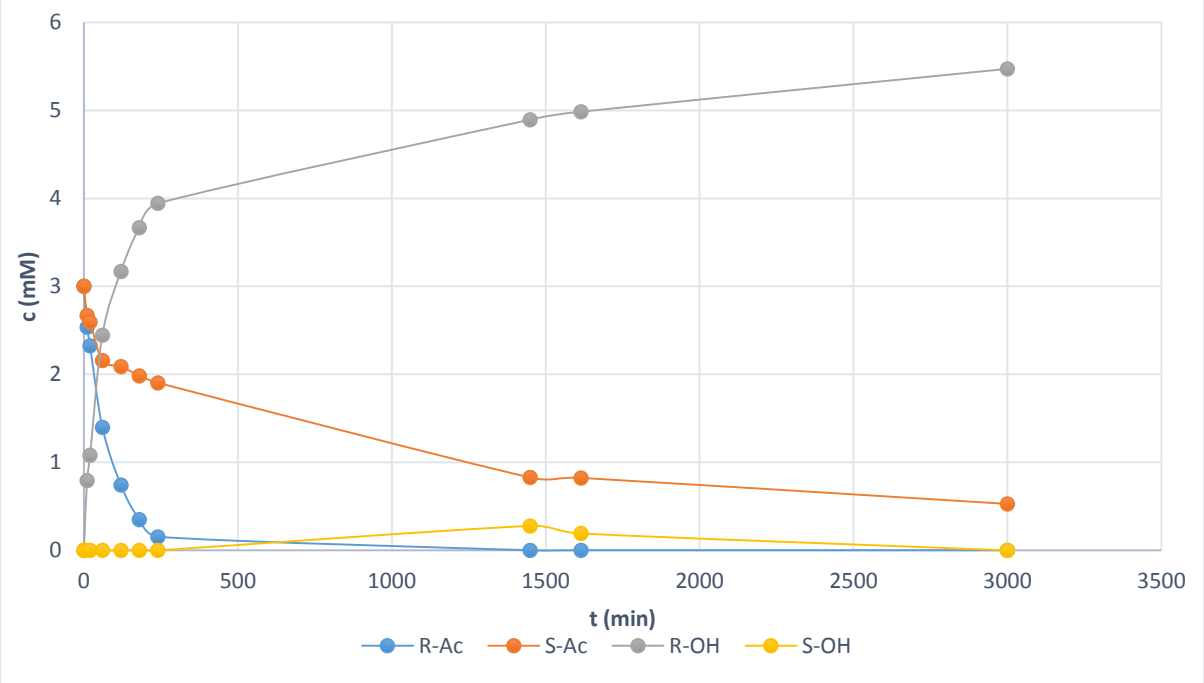
Slika 8. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*S*)-1-feniletil-acetata.

Kako bi se izračunala koncentracija (*R, S*)-1-feniletil-acetata u prirodnih eutektičkih otapalima, određen je koeficijent razdjeljenja K_P čije su vrijednosti prikazane u tablici 6.

Tablica 6. Koeficijent razdjeljenja između heptana i prirodnih eutektičkih otapala

OTAPALO	**UDIO VODE (%, v/v)**	K_P
ChGlc	30	0,95
	50	0,95
	80	0,86
ChGly	30	0,95
	50	0,94
	80	1,0
ChEG	30	0,82
	50	0,94
	80	0,86
Kalij-fosfatni pufer (KH_2PO_4)		0,94

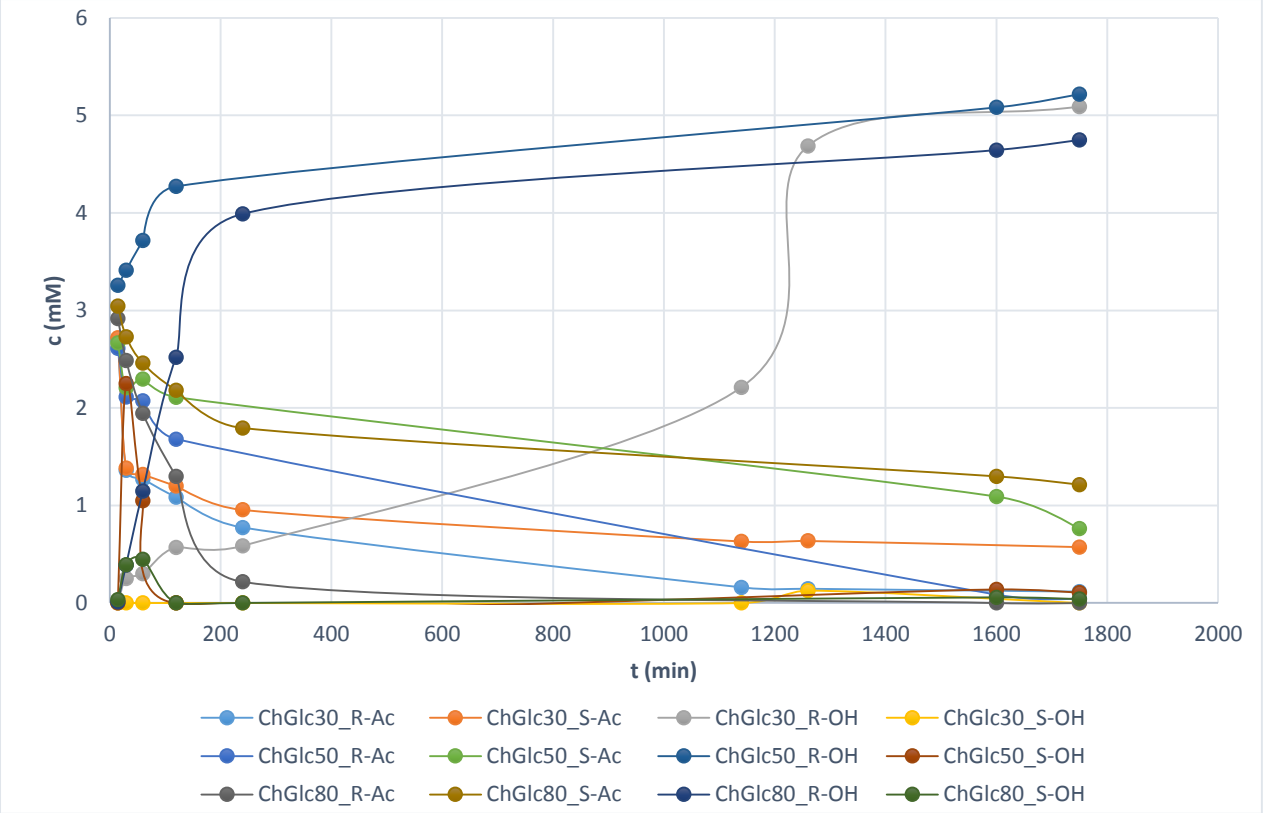
Tijek hidrolize u puferu prikazan je na slici 9, dok je tijek hidrolize u prirodnim eutektičkim otapalima prikazan na slici 10-12.



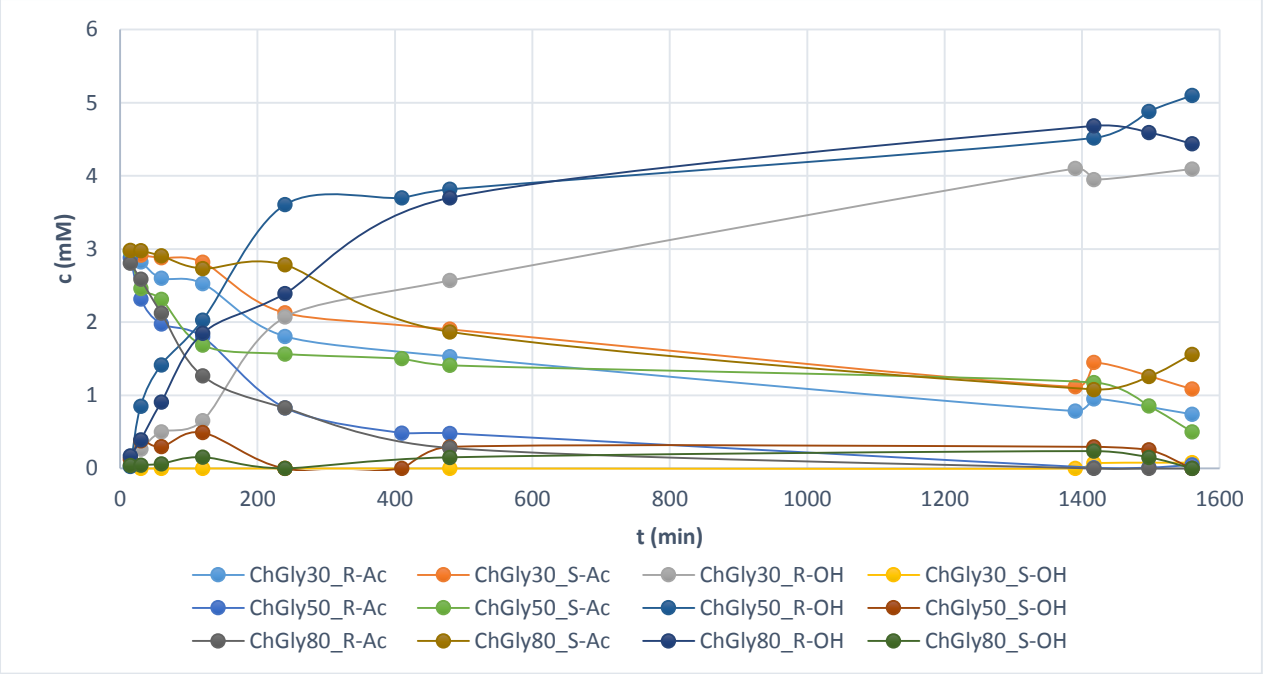
Slika 9. Tijek lipazom katalizirane hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u puferu, R-Ac: (*R*)-1-feniletil-acetat; S-Ac: (*S*)-1-feniletil-acetat; R-OH: (*R*)-1-feniletanol; S-OH: (*S*)-1-feniletanol. Reakcijski uvjeti: 25ºC; 6mmol/L (*R, S*)-1-feniletil-acetata; 2,5 mg Novozym 435

Kao što je vidljivo na slici 9, jedan od enantiomera ((*R*)-1-feniletil-acetat) hidroliziran je puno brže nego drugi ((*S*)-1-feniletil-acetat). Mehanizam kojim se odvija reakcija hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata je dinamička kinetička rezolucija (Bandeira i sur.. 2017; Lau i sur., 2010), a prikazan je na slici 5. Također, kako je racemizacija *S*- u *R*- acetat brža od hidrolize *R*-acetata, navedenom enantioselektivnom hidrolizom, moguća je 100%-tna konverzija racemata (*R, S*)-1-feniletil-acetata u (*R*)-1-feniletanol. Dinamička kinetička rezolucija se pimjenjuje u asimetričnim transformacijama gdje je cilj postići smjesu sa gotovo 100%-tnim udjelom jednog enantiomera. U takvim reakcijama koriste se enantioselektivni katalizatori koji selektivno smanjuju aktivacijsku energiju jednog enantiomera, čime se postiže veliki prinos pojedinog enantiomera. Komercijalno dostupna lipaza B iz *Candida antarctica* pokazala se dobrim kiralnim biokatalizatorom za stereoselektivnu acilaciju racemičnih alkohola zbog velike selektivnosti i rezolucije (*R*)-enantiomera, a podnosi oscilacije uvjeta prilikom reakcije (Habulin i Knez, 2009).

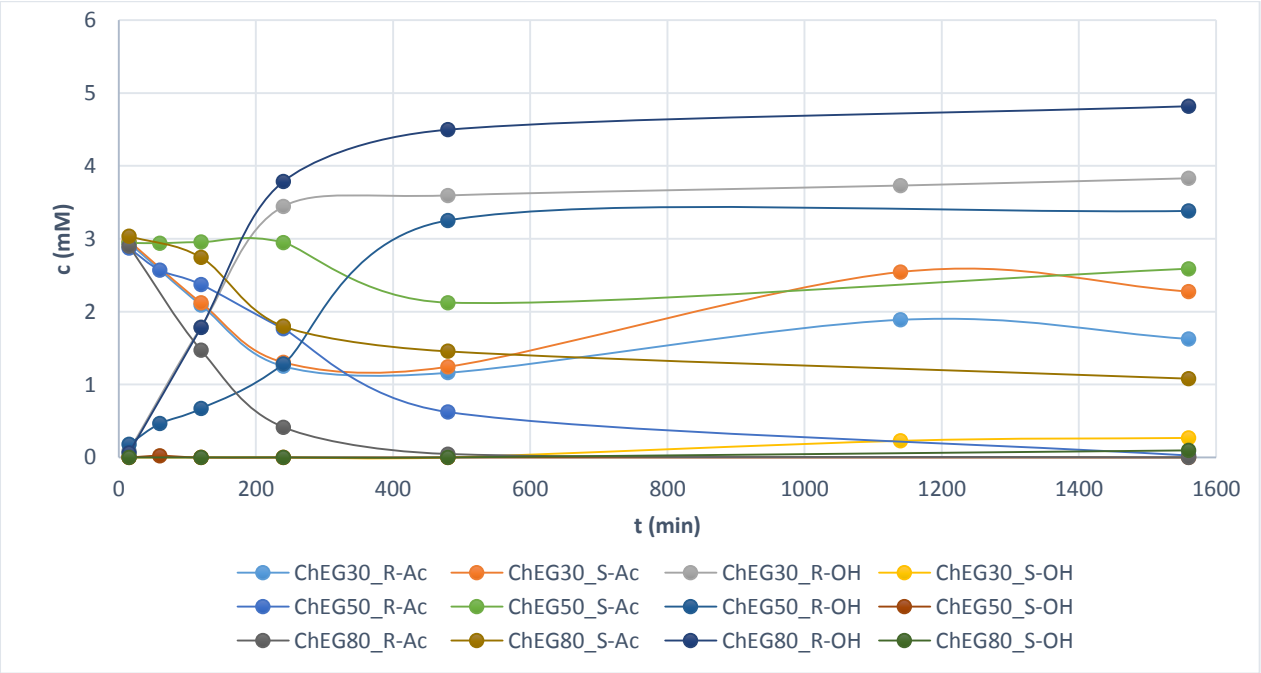
Tijek hidrolize u prirodnim eutektičkim otapalima prikazan je na slikama 10-12.



Slika 10. Tijek hidrolize katalizirane lipazom u prirodnom eutektičkom otapalu (koncentracije supstrata i produkata) ChGlc s različitim udjelima vode, R-Ac: (*R*)-1-feniletil-acetat; S-Ac: (*S*)-1-feniletil-acetat; R-OH: (*R*)-1-feniletanol; S-OH: (*S*)-1-feniletanol. Reakcijski uvjeti: 25ºC, 6mmol/L (*R, S*)-1-feniletil-acetata, 2,5 mg Novozym 435



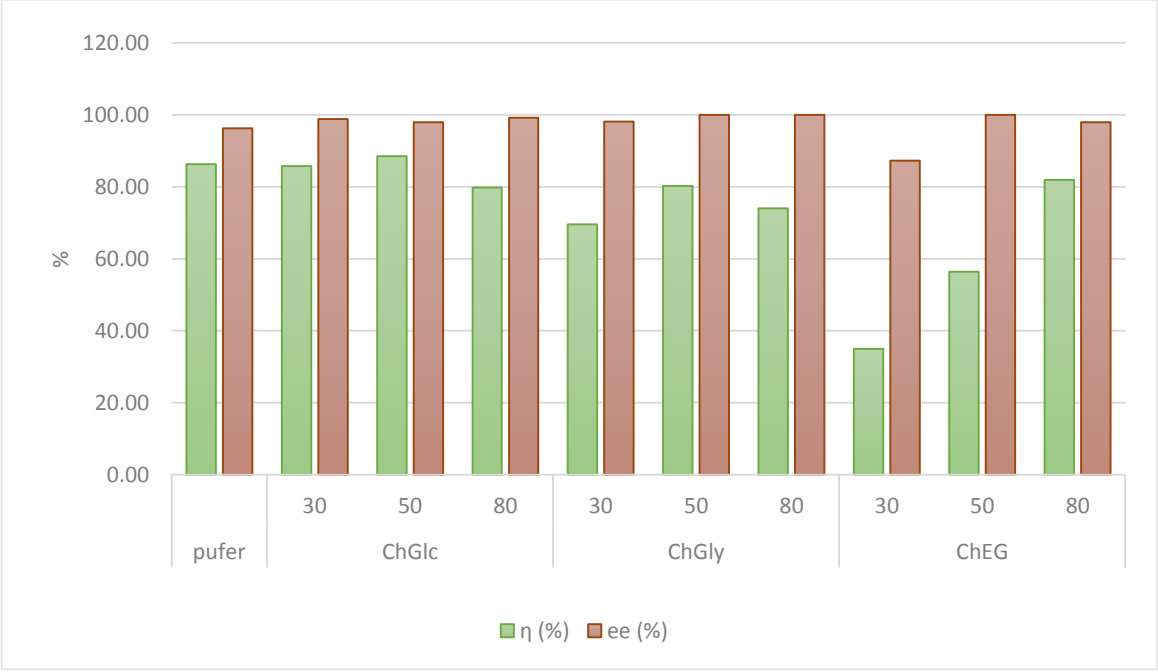
Slika 11. Tijek hidrolize katalizirane lipazom u prirodnom eutektičkom otapalu (koncentracije supstrata i produkata) ChGly s različitim udjelima vode, R-Ac: (*R*)-1-feniletil-acetat; S-Ac: (*S*)-1-feniletil-acetat; R-OH: (*R*)-1-feniletanol; S-OH: (*S*)-1-feniletanol. Reakcijski uvjeti: 25ºC, 6mmol/L (*R, S*)-1-feniletil-acetata, 2,5 mg Novozym 435



Slika 12. Tijek hidrolize katalizirane lipazom u prirodnom eutektičkom otapalu (koncentracije supstrata i produkata) ChEG s različitim udjelima vode, R-Ac: (*R*)-1-feniletil-acetat; S-Ac: *(S)*-1-feniletil-acetat; R-OH: (*R*)-1-feniletanol; S-OH: (*S*)-1-feniletanol. Reakcijski uvjeti: 25 ºC, 6 mmol L^{-1} (*R, S*)-1-feniletil-acetata, 2,5 mg Novozym 435

Iz slike 10 vidljivo je da je najbolje prirodno eutektičko otapalo za hidrolizu (*R, S*)-1-feniletil-acetata ChGlc sa udjelom vode od 50 % (v/v); gdje se postiže najveća koncentracija produkta (*R*)-1-feniletanola, a iskorištenje ove reakcije iznosi 88,6 %. Također je vidljivo da udio vode bitno utječe na tijek hidrolize i iskorištenje reakcije. Visok udio prirodnog eutektičkog otapala može ometati prijenos mase (zbog velike vizkoznosti NADES-a) i smanjiti raspoloživost supstrata zbog stvaranja vodikovih veza sa otapalom (Panić i sur., 2018). 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 rezultira nižim prinosima same reakcije koja se prati (Huang i sur., 2014). Koncentracija nastalog (*R*)-1-feniletanola u puferu je manja nego kod prirodnog eutektičkog otapala ChGlc sa 50%tnim udjelom vode te je iskorištenje također manje, ali približno jednako rezultatima NADES-a.

Iz rezultata je vidljivo da odabir otapala značajno utječe na tijek hidrolize, pa su radi bolje interpretacije rezultata izračunati iskorištenje i enantiomerni višak te prikazani na slici 13.



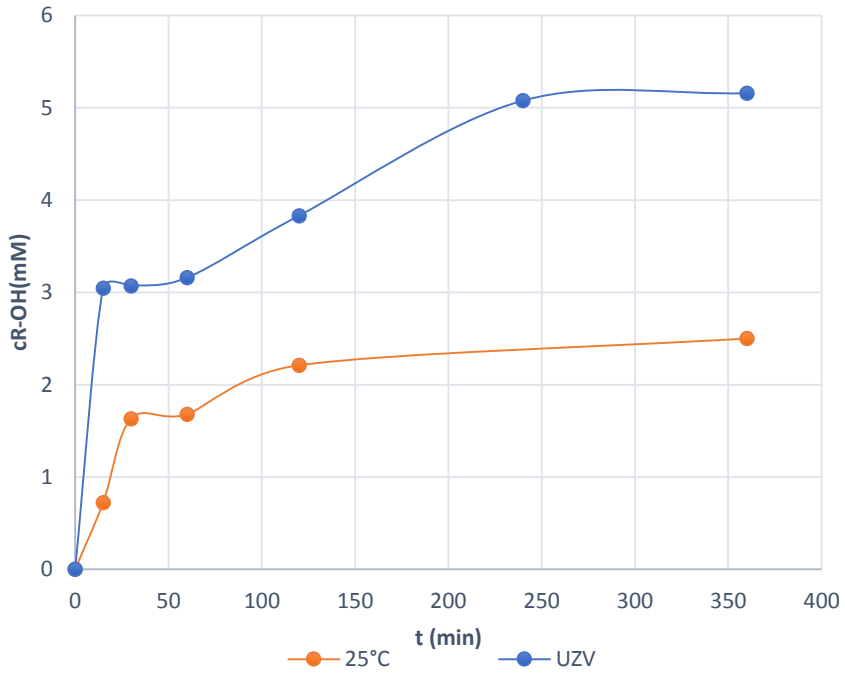
Slika 13. Iskorištenje (*η*) i enantiomerni višak (*ee*) lipazom katalizirane hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u puferu i prirodnim eutektičkim otapalima. Reakcijski uvjeti: 1560 min, 25ºC, 6mmol/L (*R, S*)-1-feniletil-acetata, 2,5 mg Novozym 435

Kao što je spomenuto, u prirodnom eutektičkom otapaluChGlc$_{50\%}$ postignuto je najveće iskorištenje, što je vidljivo i u praćenju tijeka hidrolize na slikama 10-12 kao i na slici 13. Prilično nisko iskorištenje može se primjetiti kod prirodnog eutektičkog otapala ChEG$_{30\%}$. Što se tiče vrijednosti enantiomernog viška, vidljiva je približna vrijednost kod svih otapala (96-100 %), osim kod prirodnog eutektičkog otapala ChEG$_{30\%}$ gdje ona iznosi 87,3%. Vidljivo je također da se, povećanjem udjela vode u eutektičkim otapalima, povećava i enantiomerni višak. Vrijednosti enantiomernih viškova su prilično visoke, što znači da utjecaj otapala na stereospecifičnost korištene lipaze nije uočen, posebice kod ChGly$_{50\%}$, ChGly$_{80\%}$ i ChEG$_{50\%}$. Kod NADES-a ChEG$_{30\%}$ može se uočiti utjecaj otapala na stereospecifičnost lipaze zbog ranije spomenutih nižih vrijednosti enantiomernog viška.

4.3. Utjecaj ultrazvuka na tijek lipazom katalizirane hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata

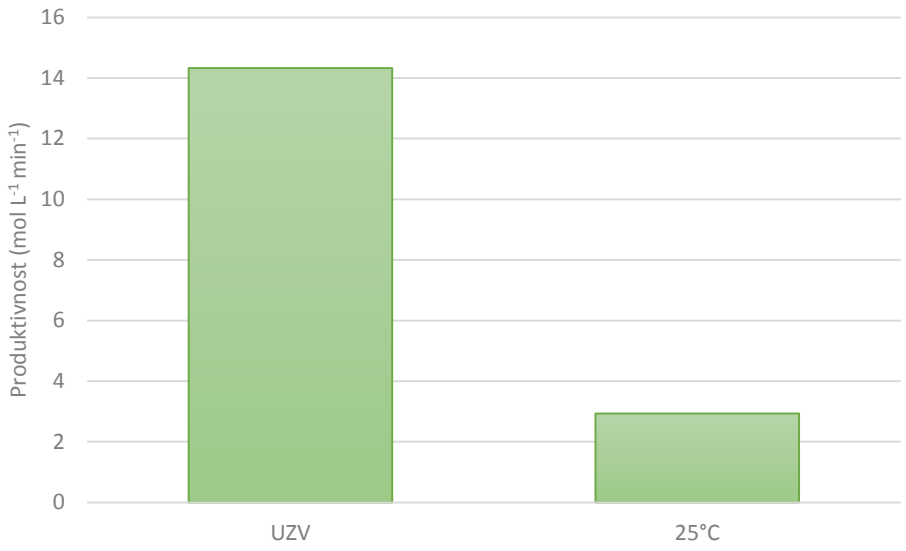
Ultrazvuk se smatra zelenom tehnologijom zbog visoke učinkovitosti, malog broja potrebnih instrumenata te znatnog smanjenja reakcijskog vremena u odnosu na ostale tehnologije (Lerin i sur., 2014), te se zato istražuje sve više u enzimskim procesima, posebice radi dobivanja produkata za farmaceutsku i kozmetičku industriju. 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 (Holmes i sur., 2014). Prednosti ultrazvuka u enzimski kataliziranim reakcijama uključuju smanjenje količine reagensa, povećanje prinosa te poboljšana kemo-, stereo- i enantioselektivnost reakcije (Lerin i sur., 2014).

Kako bi se usporedila uspješnost enantioselektivne hidrolize tj. koncentracija nastalog (*R*)-1-feniletanola, reakcija se provodila s ultrazvukom kao alternativnih izvorom energije, u prirodnom eutektičkom otapalu ChGlc$_{50\%}$ pri 25 °C. Utjecaj ultrazvuka na tijek reakcije prikazan je na slici 14.



Slika 14. Usporedba tijeka lipazom katalizirane hidrolize pri temperature od 25ºC sa i bez ultrazvuka kao alternativnog izvora energije. Reakcijski uvjeti za ultrazvuk: 25ºC, $ChGlc_{50\%}$, 6mmol/L (*R, S*)-1-feniletil-acetata, 2,5 mg Novozym 435, 360 min

Dobiveni rezultati ukazuju na to da ultrazvuk može uvelike poboljšati tijek enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$. Ultrazvuk utječe i na brzinu reakcije. Vrijeme reakcije je smanjeno s 1750 min na 360 min. Također su i Mills i Holland (1995) ustanovili da je djelovanjem ultrazvuka povećana lipazna aktivnost te su to objasnili velikom kontaktnom površinom enzima i supstrata na čije stvaranje utječe energija aktivacije ultrazvukom.



Slika 15. Produktivnost enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata primjenom lipaze u prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$ te potpomognute ultrazvukom

Uspoređena je i produktivnost enantioselektivne redukcije s i bez djelovanja ultrazvuka te je vidljivo da je produktivnost reakcije potpomognute ultrazvukom značajno veća s obzirom na reakciju koja nije potpomognuta ultrazvukom (slika 15).

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da su iskorištenja reakcije enantioselektivne hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata u gotovo svim prirodnim eutektičkim otapalima viša nego ona kada je reakcija provođena u puferu. Kao najpogodnije prirodno eutektičko otapalo, s obzirom na iskorištenje i enantioselektivnost hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata, se pokazalo $ChGlc_{50\%}$. Također, primjenom ultrazvuka u enantioselektivnoj hidrolizi (*R, S*)-1-feniletil-acetata u najboljem prirodnom eutektičkom otapalu $ChGlc_{50\%}$, primjećeno je da je produktivnost veća.

5. Zaključak

Nakon provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1) Iskorištenja enantioselektivnih hidroliza (*R, S*)-1-feniletil-acetata u svim pripremljenim prirodnim eutektičnim otapalima, uz primjenu lipaze B kao katalizatora, bila su u rasponu od 34,9-88,6%, dok je iskorištenje reakcije vođene u puferu iznosilo 86,3%.

2) Najveće iskorištenje reakcije postignuto je kod prirodnog eutektičkog otapala $ChGlc_{50\%}$ (88,6%), dok je enzim selektivan u svim korištenim prirodnim eutektičkim otapalima i puferu (ee ~ 99%).

3) Uočen je utjecaj donora vodika i volumnih udjela vode u prirodnim eutektičkim otapalima, čime se znatno može utjecati na tijek i iskorištenje reakcije.

4) Produktivnost hidrolize (*R, S*)-1-feniletil-acetata je veći kod ultrazvukom potpomognute enantioselektivne hidrolize te je vrijeme reakcije skraćeno s 1750 min na 360 min.

6. Literatura

Ai Nguyen L. A., He H., Pham-Huy C. (2006) Chiral Drugs: An Overview, *Int J Biomed Sci*, **2**, 2, 85–100.

Anastas P. T., Kirchhoff M. M., Williamson T. C. (2001) Catalysis as a foundation pillar of green chemistry. *Applied Catalysis A:General* , **221**, 3-13.

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

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: Principles and Practice, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1, 301-312.

Bandeira P. T., Thomas J. C., R. M. de Oliveira A., Piovan L. (2017) Lipase-Mediated Kinetic Resolution: An Introductory Approach to Practical Biocatalysis, *J. Chem. Educ.*, **94**, 6, 800–805.

Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J. (2006) Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations, 2. izd. , Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.Wiley-Blackwell.

Clark J. H. (2006) Green chemistry: today (and tomorrow), . *Green Chem.*, **8**, 17–21.

Clarke C. J., Tu W. C., Levers O., Bröhl A., Hallet J. P. (2018) Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes, *Chem. Rev.*, **118**, 747−800.

Cvjetko Bubalo M., Ćurko N., Tomašević M., Kovačević Ganić K., Radojčić Redovniković I. (2016) Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents, *Food Chemistry*, **200**, 159-166.

Cvjetko Bubalo M., Jurinjak Tušek A., Vinković M., Radošević K., Gaurina Srček V., Radojčić Redovniković I. (2015b) Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **122**, 188–198.

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

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

Doble M., Kurnar Kruthiventi A., Gajanan Gaikar V. (2004) Biotransforrnations and Bioprocesses, Marcel Dekker , Inc., New York.

Durand E., Villeneuve P. (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application and focus on lipase-catalyzed reactions, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **115**, 4, 379–385.

Gaber Y. (2012). Hydrolases as Catalysts for Green Chemistry and Industrial Applications - Esterase, Lipase and Phytase, Lund University, Biotechnology Department.

Grogan, G. (2009) Practical Biotransformations, A Beginner's Guide, John Wiley and Sons, Ltd.

Habulin M., Knez Ž. (2009) Optimization of (*R, S*)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **58**, 24-28.

Hjeresen D. L., Kirchhoff M. M., Lankey R. L. (2002) Green Chemistry: Environment, Economics, and Competitiveness, *Corporate Environmental Strategy*, **3**, 1066-7938.

Holland, H. L. (2002) Biocatalysis. Handbook of Green Chemistry and Technology, Blackwell Science Ltd., 188–205.

Holmes M. J., Southworth T., Watson N. G., Povey M. J. W. (2014) Enzyme activity determination using ultrasound, *Journal of Physics: Conference Series*, **489**.

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.

Jiayuan 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,* **178**, 3, 558-575.*.*

Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2004) Green Chemistry Opens the Way for Clean*, Ecologically Acceptable Chemical Processes, Kem. Ind.*, **53**, 217–224.

Juneidi I., Hayyan M., Ali O. M. (2016) Toxicity profile of choline chloride-based deep eutectic solvents for fungi and Cyprinus carpio fish, *Environmental Science and Poluttion Research*, **23**, 8, 7648-7659.

Kirk O., Christensen M. W. (2002) Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Org. Proc. Res. Dev.*, **6**, 446–451.

Kumar R., Kumar A., Sharma A., Singh D. (2012) Lipase from Bacillus pumilus RK31: Production, Purification and Some Properties, *World Applied Sciences Journal,* **16**, 7.

Lancaster, M. (2002) Principles of Sustainable and Green Chemistry. Handbook of Green Chemistry and Technology, Blackwell Science Ltd., 10–27.

Lau Sie Yon J., Uzir M. H., Bhatia S. (2010) Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of racemic ibuprofen ester via hollow fiber membrane reactor: Modeling and simulation, *Journal of Membrane Science*, **357**, 1-2, 109-121.

Lerin L. A., Loss R. A., Remonatto D., Zenevicz M. C., Netto V. O., Ninow J. L., Trentin C. M., Oliviera J. V., de Oliviera D. (2014) A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **37**, 12, 2381–2394.

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, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2**, 1, 33-38.

Panić M., Elenkov M. M., Roje M., Cvjetko Bubalo M., Radojčić Redovniković I. (2018) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents, *Process Biochemistry*, **66**, 133–139. *Elsevier Ltd.*, 1359-5113.

Poliana J., McCabe A. P. (2007) Industrial enzyme: Structure, Function and Applications, Springer.

Sime J.T. (1999) Applications of Biocatalysis to Industrial Processes. Chemical Education **76**: 1658.

Sperry J., Garcia-Alvarez J. (2016) Special Issue: "Organic Reactions in Green Solvents", *Molecules*, **21,** 1527.

Tao J. A., Kazlauskas R. J. (2011) Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development, 1. izd., John Wiley & Sons, Ltd.

Wen, Q., Chen, J. X., Tang, Y. L., Wang, J., Yang, Z. (2015) Assessing the Toxicity and Biodegradability of Deep Eutectic Solvents. Chemosphere, **132**, 63−69.

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Marina Štokić

M. Štokić