

# Racionalan dizajn niskotemperaturnih eutektskih otapala za lipazom kataliziranu kinetičku rezoluciju (R,S)-1-feniletanola

---

Galović, Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:302093>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Patricia Galović

**RACIONALAN DIZAJN  
NISKOTEMPERATURNIH  
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA  
LIPAZOM KATALIZIRANU  
KINETIČKU REZOLUCIJU  
(*R,S*)-1-FENILETANOLA**

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 prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković te uz pomoć dr. sc. Manuele Panić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (br. 7712) pod nazivom „Racionalan dizajn prirodnih eutektskih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na svim pruženim prilikama i mentorstvu tijekom preddiplomskog i diplomskog studija.*

*Veliko hvala i dr. sc. Manueli Panić na nesebičnoj pomoći i vodstvu u laboratoriju, susretljivosti, strpljenju i razumijevanju te korisnim savjetima i prenesenom znanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Od srca zahvaljujem obitelji i prijateljima – mojoj podršci u svako doba dana i noći. Hvala što ste bili moja motivacija i 'vjetar u leđa'. Slušali ste (neki i sudjelovali) u svim mojim zgodama i nezgodama tijekom ovih studentskih dana, bez vas i vašeg smijeha ovo nezaboravno iskustvo ne bi bilo isto.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

RACIONALAN DIZAJN NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA LIPAZOM  
KATALIZIRANU KINETIČKU REZOLUCIJU (*R,S*)-1-FENILETANOLA

*Patricia Galović*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058206333

### Sažetak:

Niskotemperaturna eutektička otapala (DES-ovi), kao zelena alternativa organskim otapalima iz neobnovljivih izvora, istraživanjima i implementacijom u enzimski kataliziranim reakcijama pokazuju svoj potencijal buduće primjene u industriji te potencijal zelene kemije kao takve. U ovom je radu primjenom računalnog programa COSMOtherm proveden probir eutektičkih otapala za kinetičku rezoluciju temeljem procjene topljivosti supstrata vinil acetata i (*R,S*)-1-feniletanola. U odabranim eutektičkim otapalima provedena je kinetička rezolucija te je praćena uspješnost reakcije u hidrofobnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu (Ty:C<sub>10</sub>) u odnosu na hidrofilno niskotemperaturno eutektičko otapalo (ChCl:U10%) te organsko otapalo etil-acetat (klasično korišteno). Vrijednosti konverzije i enantiomernog viška su se koristile za procjenu uspješnosti reakcije. Timol:dekanska kiselina (Ty:C<sub>10</sub>) dokazano je najbolje otapalo od ispitanih otapala za provedbu reakcije esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola, s najvećim udjelom konverzije od 53,04 %. Enantiomerni višak je zadovoljavajuć i veći od 97 % za sva tri korištena otapala. Također, enantiomerni višak (*ee*) je najviši za otapalo Ty:C<sub>10</sub> i iznosi 98,80 %.

**Glavne riječi:** zelena kemija, hidrofobna eutektička otapala, lipaza, biokataliza

**Rad sadrži:** 41 stranica, 12 slika, 4 tablica, 31 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

**Pomoć pri izradi:** Manuela Panić, dr. sc.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (mentor)
3. doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (član)
4. doc. dr. sc. Antonija Trontel (zamjenski član)

**Datum obrane:** prosinac, 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

RATIONAL DESIGN OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR LIPASE CATALYZED KINETIC  
RESOLUTION (*R,S*)-1-PHENYLETHANOL

*Patricia Galović*, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058206333

### Abstract:

Deep eutectic solvents (DESs), as a green alternative to organic solvents from non-renewable sources, show their potential for future industrial applications and the potential of green chemistry through research and implementation in enzyme-catalyzed reactions. In this paper, eutectic solvents were investigated for kinetic resolution using the software program COSMO $therm$  based on the evaluation of the solubility of the substrates vinyl acetate and (*R,S*)-1-phenylethanol. Kinetic resolution was carried out in selected eutectic solvents and the success of the reaction was monitored in the hydrophobic deep eutectic solvent (Ty:C<sub>10</sub>) and compared to both hydrophilic deep eutectic solvent (ChCl:U10%) and the organic solvent ethyl acetate (classically used). Conversion and enantiomeric excess values were used to evaluate the success of the reaction. Thymol:decanoic acid (Ty:C<sub>10</sub>) proved to be the best solvent among the tested solvents for carrying out the esterification reaction of (*R,S*)-1-phenylethanol with the highest conversion rate of 53.04 %. The enantiomeric excess is satisfactory and is more than 97 % for all three solvents used. Moreover, the enantiomeric excess (*ee*) is highest for our most successful solvent Ty:C<sub>10</sub> and its value is 98.80 %.

**Keywords:** *green chemistry, hydrophobic deep eutectic solvents, lipase, biokatalysis*

**Thesis contains:** 41 pages, 12 figures, 4 tables, 31 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Ivana, Radojčić Redovniković, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** *Manuela, Panić, PhD*

### Reviewers:

1. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Assistant professor
2. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor
3. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Assistant professor
4. Antonija Trontel, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** December, 2021.



# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. ZELENA KEMIJA .....	2
2.2. ZELENA OTAPALA .....	5
2.3. EUTEKTIČKA OTAPALA .....	5
2.3.1. Prirodna eutektička otapala .....	7
2.3.2. Sinteza eutektičkih otapala .....	8
2.3.3. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova važna za industrijsku primjenu.....	9
2.3.3.1. Polarnost .....	9
2.3.3.2. pH-vrijednost.....	11
2.3.3.3. Viskoznost.....	11
2.4. BIOTRANSFORMACIJE USPOSTAVLJENE U EUTEKTIČKIM OTAPALIMA: VRSTE REAKCIJA I KATALIZATORI .....	12
2.4.1. Eutektičko otapalo kao kombinirani supstrat i otapalo .....	13
2.5. DIZAJN BOKATALITIČKOG SUSTAVA U EUTEKTIČKOM OTAPALU .....	13
2.5.1. SWOT (snage, slabosti, prilike, prijetnje) analiza biokatalize uz pomoć DES-ova	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
3.1. MATERIJALI I METODE .....	18
3.1.1. Kemikalije .....	18
3.1.2. Enzimi .....	19
3.1.3. Niskotemperaturna eutektička otapala .....	19
3.1.4. Otopine.....	19
3.1.5. Oprema i uređaji .....	20
3.2. METODE RADA .....	20
3.2.1. Procjena topljivosti ( <i>R,S</i> )-1-feniletanola i vinil acetata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima korištenjem softvera COSMOtherm.....	20
3.2.2. Sinteza niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	21
3.2.3. Eksperimentalna provjera topljivosti ( <i>R,S</i> )-1-feniletanola i vinil acetata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i u heptanu .....	22
3.2.4. Eksperimentalna provjera topljivosti hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (DES-ova) u organskim otapalima .....	22
3.2.5. Kinetička rezolucija ( <i>R,S</i> )-1-feniletanola.....	22
3.2.6. Određivanje koncentracije ( <i>R,S</i> )-1-feniletanola.....	23
3.2.6.1. Izrada baždarnog dijagrama.....	24

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>27</b>
4.1. RAČUNALNO (SOFTVERSKO) PREDVIĐANJE TOPLJIVOSTI.....	27
4.2. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI .....	32
4.3. KINETIČKA REZOLUCIJA ( <i>R,S</i> )-1-FENILETANOLA .....	34
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>39</b>

# 1. UVOD

Zelena kemija je ključna za postizanje alternativne kemije, industrije i akademskih istraživanja kako bi se postigla ekonomska i ekološka svijest u svijetu gdje prevladavaju pretežito kemijski proizvodi i procesi iz neobnovljivih sirovina. Glavni cilj zelene kemije je postizanje sigurnijih, čistih i energetski učinkovitih kemijskih procesa. Otapala kao medij za sintezu, izdvajanje i pročišćavanje su važna komponenta u svijetu kemije, pa tako i u svijetu zelene kemije. Kako bi se otapala klasificirala kao zeleni medij moraju biti netoksična, biorazgradiva, dostupna i ekonomski isplativa. U posljednja dva desetljeća, superkritične tekućine, ionske kapljevine i eutektička otapala postali su najaktivnije istraživana otapala kao potencijalna zelena otapala za primjenu u industriji.

Niskotemperaturna eutektička otapala (DES-ovi) se istražuju za buduću primjenu u područjima kao što su organska sinteza, obrada biomase, biokataliza i reakcije katalizirane enzimima. Glavni fokus istraživanja u području eutektičkih otapala su reakcije katalizirane lipazom, posebno reakcije sinteze estera i reakcije transesterifikacije u kojima se primjenjuje DES kao otapalo ili ko-otapalo. Također se istražuje i mogućnost primjene komponente DES-a kao supstrata za biotransformacije.

Cilj ovog rada je utvrditi uspješnost upotrebe računalnog programa COSMO $therm$  za procjenu topljivosti supstrata ((*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata) u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima te odabir optimalnog otapala za ispitivane supstrate i željenu reakciju. Također, cilj je bio eksperimentalno potvrditi točnost računalne procjene i dizajnirati eutektičko otapalo za reakciju kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola potpomognutu imobiliziranom lipazom B izoliranom iz kvasca *Candida antarctica*.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ZELENA KEMIJA

Početak područja zelene kemije u nastajanju smatra se ključem za postizanjem ekonomske i ekološke svijesti u industrijskim i akademskim istraživanjima (Tundo i sur., 2000). Pojam zelena kemija definiran je kao “izum, dizajn i primjena kemijskih proizvoda i procesa za smanjenje ili uklanjanje upotrebe i stvaranja opasnih tvari”. Glavni cilj zelene kemije je postizanje sigurnijih, čistih i energetski učinkovitih kemijskih procesa i, u tu svrhu, formulirano je dvanaest principa (Mulvihill i sur., 2011; Pena-Pereira i Namiešnik, 2014). Načela su skup metodologija za postizanje ciljeva zelenog dizajna i održivosti.

Dvanaest principa, odnosno načela zelene kemije su:

1. Prevenirica: Bolje je spriječiti otpad nego tretirati ili čistiti otpad nakon što je nastao.
2. Ekonomičnost atoma: Sintetičke metode trebaju biti osmišljene tako da se maksimalno poveća ugradnja svih materijala koji se koriste u procesu u konačni proizvod.
3. Manje opasne kemijske sinteze: Gdje god je to izvedivo, sintetske metode trebale bi biti osmišljene tako da koriste i stvaraju tvari koje imaju malu ili nikakvu toksičnost za ljudsko zdravlje i okoliš.
4. Dizajniranje sigurnijih kemikalija: Kemijski proizvodi trebaju biti dizajnirani tako da utječu na njihovu željenu funkciju uz minimalizaciju njihove toksičnosti.
5. Sigurnija otapala i pomoćna sredstva: Upotreba pomoćnih tvari (npr. otapala, sredstva za odvajanje, itd.) bi treba biti nepotrebna gdje god je to moguće i bezopasna kada se pomoćne tvari koriste.
6. Dizajn za energetska učinkovitost: Energetski zahtjevi kemijskih procesa trebaju biti prepoznati po njihovim ekološkim i gospodarskim utjecajima i treba ih svesti na minimum. Ako je moguće, sintetičke metode treba provoditi na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku.
7. Korištenje obnovljivih sirovina: Sirovine bi trebale biti obnovljive umjesto da se iscrpljuju kad god je to tehnički i ekonomski izvedivo.
8. Smanjenje derivata: Nepotrebnu derivatizaciju (korištenje funkcionalnih skupina, privremena modifikacija fizikalnih/kemijskih procesa) treba minimizirati ili izbjevati ako je moguće, jer takvi koraci zahtijevaju dodatne reagense i mogu stvoriti otpad.

9. Kataliza: Katalitički reagensi (što je moguće selektivniji) superiorniji su od stehiometrijskih reagensa.
10. Dizajn za razgradnju: Kemijski proizvodi trebaju biti dizajnirani tako da se na kraju svoje funkcije raspadnu u bezopasne produkte razgradnje i da ne ostanu u okolišu.
11. Analiza u stvarnom vremenu za sprječavanje onečišćenja: Potrebno je dalje razvijati analitičku metodologiju kako bi se omogućilo praćenje i kontrola u stvarnom vremenu, prije nastanka opasnih tvari.
12. Inherentno sigurnija kemija za prevenciju nesreća: Tvari i oblik tvari koje se koriste u kemijskom procesu treba odabrati kako bi se smanjila mogućnost kemijskih nesreća, uključujući ispuštanje, eksplozije i požare (Mulvihill i sur., 2011).

Drugi aspekt definicije zelene kemije nalazi se u izrazu “upotreba i stvaranje”. Umjesto da se usredotočuje samo na one nepoželjne tvari koje bi se mogle nehotice proizvesti u procesu, zelena kemija također uključuje sve tvari koje su dio procesa. Stoga je zelena kemija alat ne samo za minimiziranje negativnog utjecaja onih postupaka usmjerenih na optimizaciju učinkovitosti, nego zelena kemija također prepoznaje da postoje značajne posljedice za korištenje opasnih tvari, u rasponu od propisa, rukovanja i transporta, te pitanja odgovornosti. Ograničiti definiciju samo na otpad, značilo bi pozabaviti se samo dijelom problema, no zelena kemija je primjenjiva na sve aspekte životnog ciklusa proizvoda. Važno je napomenuti da je zelena kemija način rješavanja smanjenja rizika i prevencije onečišćenja rješavanjem intrinzičnih opasnosti tvari, a ne onih okolnosti i uvjeta njihove uporabe koji bi mogli povećati njihov rizik (Tundo i sur., 2000).

Područja za razvoj zelene kemije identificirana su kako slijedi:

1. Korištenje alternativnih sirovina: Korištenje sirovina koje su obnovljive i manje toksične za ljudsko zdravlje i okoliš, te nisu iscrpljujuće.
2. Upotreba neškodljivih reagensa: Korištenje reagensa koji su inherentno manje opasni i katalitički su kad god je to moguće.
3. Korištenje prirodnih procesa: Upotreba biosinteze, biokatalize i kemijskih transformacija temeljenih na biotehnologiji za učinkovitost i selektivnost.
4. Korištenje alternativnih otapala: Dizajn i korištenje otapala koja imaju smanjen potencijal štete za okoliš i služe kao alternative trenutno korištenim hlapljivim organskim otapalima, kloriranim otapalima i otapalima koja oštećuju prirodni okoliš.

5. Dizajn sigurnijih kemikalija: Upotreba dizajna molekularne strukture i razmatranje principa toksičnosti i mehanizma djelovanja kako bi se minimizirala intrinzična toksičnost proizvoda uz zadržavanje njegove učinkovitosti i funkcije.
6. Razvijanje alternativnih reakcijskih uvjeta: Dizajn reakcijskih uvjeta koji povećavaju selektivnost proizvoda i omogućuju dematerijalizaciju procesa odvajanja proizvoda.
7. Minimiziranje potrošnje energije: Dizajn kemijskih transformacija koje smanjuju potrebni unos energije u smislu mehaničkih i toplinskih unosa i povezanih utjecaja prekomjerne upotrebe energije na okoliš (Tundo i sur., 2000).

S druge strane, izraz zeleni inženjering odnosi se na razvoj proizvoda, procesa i sustava uzimajući u obzir okolišne, društvene i ekonomske čimbenike (Anastas i Zimmerman, 2003). I zelena kemija i zeleni inženjering uključuju potragu za maksimalnom učinkovitošću i sigurnošću uz minimalne opasnosti po zdravlje i okoliš u svim fazama životnog ciklusa kemikalije (Mulvihill i sur., 2011).

Dvanaest načela zelenog inženjeringa su:

1. Svi materijalni i energetske ulazi i izlazi moraju biti dizajnirani i izvedeni sa što je moguće manje opasnosti.
2. Bolje je spriječiti nastanak otpada nego tretirati ili čistiti otpad nakon što je nastao.
3. Operacije odvajanja i pročišćavanja trebale bi biti osmišljene tako da minimiziraju potrošnju energije i korištenje materijala.
4. Proizvodi, procesi i sustavi trebaju biti dizajnirani tako da maksimiziraju učinkovitost mase, energije, prostora i vremena.
5. Proizvodi, procesi i sustavi trebali bi biti dizajnirani tako da je bilanca mase i energije pozitivna, a ne negativna.
6. Ugrađena entropija i složenost moraju se promatrati kao ulaganje pri odabiru dizajna za recikliranje, ponovnu upotrebu ili korisno raspolaganje.
7. Cilj dizajna bi trebala biti trajnost.
8. Rješenje dizajna za nepotrebne kapacitete ili mogućnosti (npr. "jedna veličina odgovara svima") treba smatrati nedostatkom i manom dizajna.
9. Raznolikost materijala u višekomponentnim proizvodima treba biti minimizirana kako bi se promicalo dekonstruiranje i zadržavanje vrijednosti.

10. Dizajn proizvoda, procesa i sustava mora uključivati integraciju i međusobnu povezanost s dostupnim tokovima energije i materijala.
11. Proizvodi, procesi i sustavi trebaju biti dizajnirani za izvedbu u komercijalnoj upotrebi.
12. Unosi materijala i energije trebaju biti obnovljivi (Anastas i Zimmerman, 2003).

## 2.2. ZELENA OTAPALA

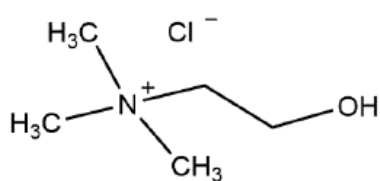
Otapala zauzimaju strateško mjesto u svijetu zelene kemije. Otapalo mora ispunjavati stroge zahtjeve u pogledu njihove netoksičnosti, biorazgradivosti, recikliranja, održivosti, dostupnosti i niske cijene da bi se kvalificiralo kao zeleni medij (Abbott i sur., 2004; Vanda i sur., 2018). Otapala su glavna karika prehrambenih, farmaceutskih, kozmetičkih, agrokemijskih, kemijskih i biotehnoških procesnih tehnologija. U posljednja dva desetljeća, superkritične tekućine, ionske kapljevine i eutektička otapala postali su najaktivnije istraživani kao potencijalna zelena otapala s primjenom u industriji (Choi i Verpoorte, 2019).

## 2.3. EUTEKTIČKA OTAPALA

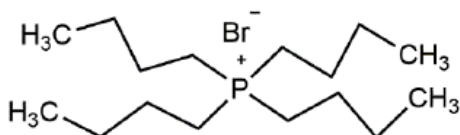
Eutektička otapala (DES, *eng.* Deep Eutectic Solvents) predstavljaju novu klasu nekonvencionalnih otapala. Eutektička otapala su smjese amonijevih soli i donora vodikovih veza, poput kolin-klorida i uree, te su alternativa ionskim kapljevinama (IL, *eng.* Ionic Liquids). Poput ionskih kapljevine, eutektička otapala imaju tališta ispod sobne temperature, nisku isparljivost i visoku toplinsku stabilnost; ali za razliku od ionskih otapala, oni uključuju nenabijene komponente (Gorke i sur., 2008). Većina DES-ova je također biorazgradiva, s vodom tvori vodikove veze, ali za razliku od većine IL-ova, ova otapala obično imaju prihvatljive profile toksičnosti. Osim toga, iako je priprema većine IL-ova složena jer uključuje složene sintetske spojeve, dok DES-ovi obično sadrže komponente koje su primarni metaboliti (Abbott i sur., 2004; Zhang i sur., 2012; Vanda i sur., 2018). U osnovi, DES-ovi imaju slične primjene kao IL-ovi, ali njihovi jeftiniji i sigurniji sastojci omogućili su im upotrebu u hrani i farmaceutskim proizvodima. Trenutno se DES-ovi istražuju za primjenu u različitim područjima, kao što su polimerizacija, obrada biomase, priprema materijala, sinteza biodizela, reakcije katalizirane enzimima, biokataliza, adsorpcija ugljičnog dioksida, elektrokemija, ekstrakcija, nanotehnologija i organska sinteza, dok se već upotrebljavaju u kozmetičkoj industriji (Vanda i sur., 2018).

Eutektička otapala (DES) se obično pripremaju miješanjem akceptora vodikove veze (HBA, *eng.* hydrogen bond acceptor) i donora vodikove veze (HBD, *eng.* hydrogen bond donor); (slika 1) uz istovremeno zagrijavanje i miješanje dok se ne stvori homogena smjesa (Liu i sur., 2015; Pätzold i sur., 2019). Kod priprave ovih otapala ne dolazi do kemijske reakcije već se komponente povezuju vodikovim vezama tvoreći eutektičko otapalo (Bubalo i sur., 2016). Definirani su kao kombinacije dvije ili tri netoksične i jeftine komponente koje se mogu povezati interakcijama vodikovih veza tvoreći eutektičku smjesu. Eutektička otapala su smjese na temperaturi nižoj od 100 °C, s talištem nižim od tališta svake pojedine komponente. Njihovim miješanjem dolazi do poremećaja u kristalnoj strukturi kvarterne amonijeve soli, izazivajući pad temperature tališta i stvarajući tako tekućine na sobnoj temperaturi (Liu i sur., 2015). DES ostaje tekućina na sobnoj temperaturi zbog stvaranja međumolekulskih vodikovih veza, što dovodi do smanjenja točke smrzavanja (Pena-Pereira i Namiešnik, 2014).

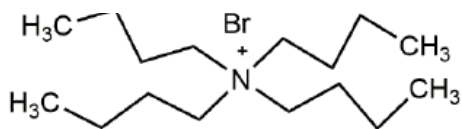
#### Akceptori vodikove veze (HBA)



Kolin-klorid

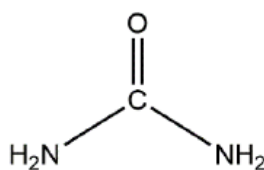


Tetrabutilfosfonijev bromid

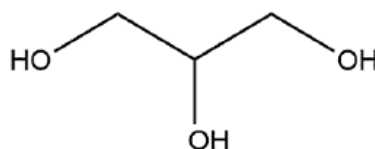


Tetrabutilamonijev bromid

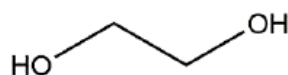
#### Donori vodikove veze (HBD)



Urea



Glicerol



Etilen glikol

**Slika 1.** Reprezentativne strukture najčešćih halogenidnih soli i donora vodikovih veza koje se koriste za sintezu DES-a (*prema* El Achkar i sur., 2019).



Za tehničke primjene DES-ovi se mogu proizvesti, na primjer, korištenjem jeftinih kvaternarnih amonijevih soli poput kolin-klorida (ChCl, koji se naziva i vitamin B4), koje se proizvode u razmjerima od milijun tona godišnje, u kombinaciji s donorima vodikove veze (HBD-ovima) iz obnovljivih izvora poput šećera, organskih kiselina i aminokiselina, alkohola ili procesnog otpada poput glicerola (Pätzold i sur., 2019). Sa spektra zelene kemije važno je spomenuti da je priprava ovih otapala održivi proces koji se ostvaruje sa 100 %-tnom atomskom učinkovitošću (svi atomi supstrata se ugrađuju u produkt) pri čemu se ne stvara otpad (Bubalo i sur., 2016).

### 2.3.1. Prirodna eutektička otapala

DES-ovi sastavljeni od prirodno prisutnih komponenti ponekad se nazivaju prirodnim eutektičkim otapalima (Pätzold i sur., 2019). Prirodna eutektička otapala (NADES, *eng.* natural deep eutectic solvents) bi mogli biti treća tekuća faza (osim vode i lipida) u stanicama, igrajući važnu fiziološku i kemijsku ulogu. Navedene uloge mogu uključivati njihovo sudjelovanje u enzimskim procesima (Dai i sur., 2013; Vanda i sur., 2018). Općenito, NADES-i se mogu klasificirati u pet skupina: ionske tekućine, napravljene od kiseline i baze; neutralni, samo od šećera ili šećera i drugih polialkohola; neutralni s kiselinama, napravljeni od šećera/polialkohola i organskih kiselina; neutralni s bazama, izrađeni od šećera/polialkohola i organskih baza; i aminokiseline koje sadrže NADES napravljene od aminokiselina s organskim kiselinama/šećerima (Choi i Verpoorte, 2019).

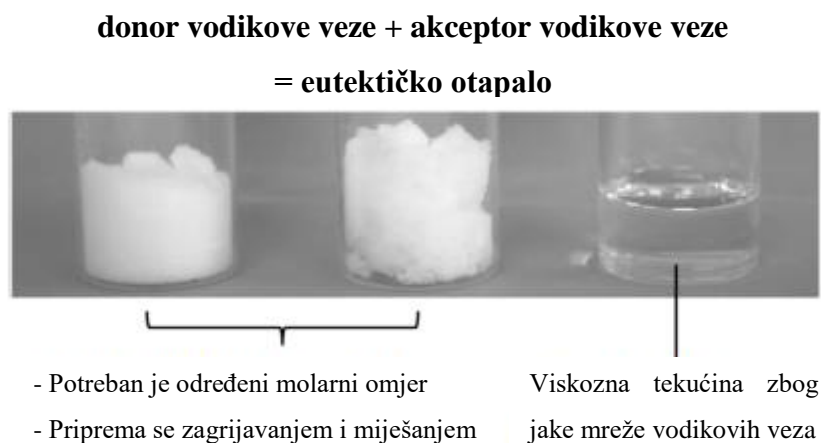
Neke primjene NADES-a u enzimskim procesima iskoristile su njihovu sposobnost povećanja topljivosti supstrata. Jedan primjer toga je katalizirana oksidacija anorganskih i aromatskih spojeva, posebno fenola s lakazama, proteina s više bakra (Khodaverdian i sur., 2018). Kolin-klorid, betain, šećerni alkohol i šećeri su NADES komponente koje se obično koriste u enzimskim reakcijama jer povećavaju prinos i stabilnost enzima u usporedbi s drugim komponentama kao što su organske kiseline (Yang i sur., 2017). Međutim, kao i u prethodnom primjeru, bolji rezultati su postignuti s betainom nego s NADES-ima na bazi kolin-klorida (Khodaverdian i sur., 2018; Vanda i sur., 2018).

Primjena NADES-a nije ograničena na njihovu upotrebu kao otapala za ekstrakciju. Također je proučavana izvedivost njihove ugradnje u formulacije kao medija za otapanje prirodnih spojeva koji nisu topljivi u vodi. Kao što je gore spomenuto, činjenica da su NADES komponente sigurne, netoksične, pa čak i jestive, omogućuje razmatranje NADES-a za farmaceutske,

kozmetičke i prehrambene primjene, jer NADES lako mogu udovoljiti strogim zahtjevima za korištenje u navedenim aplikacijama (Vanda i sur., 2018).

### 2.3.2. Sinteza eutektičkih otapala

Kao što je i ranije spomenuto, eutektička otapala se pripremaju miješanjem dva ili više metabolita koji mogu formirati eutektičku smjesu (slika 2), u odgovarajućem molarnom omjeru (El Achkar i sur., 2019). Postoji nekoliko metoda pripreme DES-ova: (i) metoda mljevenja, (ii) metoda zagrijavanja i miješanja (obično 50-80 °C) tijekom nekoliko sati, (iii) metoda isparavanja, (iv) metoda sušenja zamrzavanjem i (v) korištenje alternativnih izvora energije, kao što su mikrovalovi ili ultrazvuk (Florindo i sur., 2014; Bubalo i sur., 2016). Općenito, za pripremu DES-a najčešće se koriste metoda zagrijavanja i metoda mljevenja (El Achkar i sur., 2019).



**Slika 2.** Prikaz nastajanja viskoznog eutektičkog otapala povezivanjem donora i akceptora vodikove veze, u određenim molarnim omjerima, vodikovim vezama (prema Pätzold i sur., 2019).

Prvi korak u svim ovim metodama je miješanje HBA i HBD (voda je izborna) u određenim molarnim omjerima. Nakon toga se nekoliko sati primjenjuje mehanički, toplinski ili netoplinski izvor energije dok se ne formira tekućina (Panić i sur., 2021). Tipična priprema za sve navedene metode se odvija na sljedeći način. Prvo, higroskopne komponente za pripravak DES-a potrebno je osušiti u vakuumu prije upotrebe. To je osobito važno jer voda u komponentama izravno utječe na njihovu težinu i, posljedično, na konačni molarni omjer komponenti u smjesi. Dodatno, zaostala voda se ne može u potpunosti ukloniti nakon formiranja DES-a, budući da molekule vode također stvaraju jake vodikove veze s

komponentama DES, stvarajući čvrsto vezane molekule vode koje je gotovo nemoguće ukloniti. Ako je voda neophodna za daljnju primjenu DES-a, može se dodati izravno s HBD i HBA tijekom pripreme ili se može dodati nakon pripreme (Florindo i sur., 2014; Bubalo i sur., 2016).

Način zagrijavanja se najčešće koristi kao metoda sinteze eutektičkih otapala; sastoji se od miješanja i zagrijavanja spojeva na približno 100 °C uz stalno miješanje dok ne nastane homogena tekućina. Metoda mljevenja temelji se na miješanju spojeva na sobnoj temperaturi i njihovom mljevenju u tarioniku, sve dok se ne stvori bistra tekućina (Florindo i sur., 2014).

Metodu za pripremu eutektičkih otapala koju su prvi objavili Gutierrez i sur. (2009) temelji se na liofilizaciji (sušenju smrzavanjem) vodenih otopina pojedinih komponenti eutektičkih otapala. Na primjeru kolin-klorid:uree, odvojene vodene otopine kolin-klorida i uree spajaju se zajedno kako bi nastale vodene otopine 1:2 kolin klorid:urea s 5 % otopljene tvari. Ove otopine su bistre viskozne tekućine (Gutiérrez i sur., 2009). Međutim, u liofiliziranoj smjesi je otkriven udio vode jer voda nastoji stupiti u interakciju s komponentama eutektičkih otapala i na kraju biti dio mreže eutektičkih otapala. Budući da je vezana za komponente DES-a, voda se u ovom slučaju ne može ukloniti. Stoga različite metode pripreme mogu dovesti do različitih DES-ova (El Achkar i sur., 2019).

Primjena alternativnih izvora zagrijavanja reakcijske smjese djelovanjem mikrovalnog zračenja odnosno ultrazvuka, već je dugo u fokusu znanstvenih istraživanja. Iako se u ovim postupcima koriste različiti mehanizmi prijenosa energije, ovi postupci omogućuju kraće vrijeme pripreve uz smanjenje energetske troškova. Cvjetko Bubalo i sur. (2016) su pokazali da se priprema eutektičkih otapala u ultrazvučno-mikrovalnom reaktoru uz istovremenu upotrebu ultrazvuka i mikrovalova može značajno ubrzati (više od 7x) te se preporučuje kao alternativna metoda pripreme ovih otapala (Bubalo i sur., 2016).

### 2.3.3. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova važna za industrijsku primjenu

#### 2.3.3.1. Polarnost

Većina DES-ova predstavljenih u literaturi su hidrofilne prirode jer su sastavljeni od tipično hidrofилnih materijala iz obnovljivih izvora kao što su šećeri, alkoholi, kiseline i neke organske soli (Marrucho i sur., 2019). Ovisno o komponentama, uspostavom HBD-HBD vodikovih veza

stvaraju se složene strukturne mreže. Ove snažne interakcije dovode do otapala s hidrofilnim karakterom jer većina DES-ova sadrži ionsku komponentu (Santana-Mayor i sur., 2021).

Hidrofobni DES-ovi (HDES, *eng.* hydrophobic deep eutectic solvents), se smatraju obećavajućom podklasom tradicionalnih hidrofilnih DES-ova za rješavanje pitanja nestabilnosti njihovog kontakta s vodom. HDES-ovi su opsežno proučavani za izolaciju i ekstrakciju hlapljivih masnih kiselina, teških metala i bioaktivnih spojeva iz vodenih otopina. Hidrofilni DES-ovi se u osnovi sastoje od hidrofilnih spojeva iz obnovljivih izvora, odnosno alkohola, kiselina, organskih soli i šećera. Za razliku od hidrofilnih DES-a, oskudan broj sintetiziranih hidrofobnih DES-a u osnovi je posljedica ograničenog broja jeftinih, dostupnih hidrofobnih soli i drugih komponenti koje tvore eutektička otapala pri sobnoj temperaturi. Hidrofobnost DES-a povezana je s hidrofobnošću njihovih početnih materijala (Zainal-Abidin i sur., 2021).

Kao i hidrofilni DES-ovi, hidrofobni DES-ovi su također specifično dizajnirana otapala ovisno o primjeni i ostalim metabolitima u reakciji, što znači da se različita termofizička svojstva mogu dobiti različitim kombinacijama pojedinačnih komponenti. Zbog nedostatka međukomponentnih vodikovih veza, očekuje se da su hidrofobna eutektička otapala toplinski manje stabilna od hidrofilnih DES-ova. Iako je kod hidrofobnih DES-ova topljivost u vodi mala, na viskoznost manje utječe ova mala prisutnost vode, zato što mreža vodikove veze ovdje nije toliko važna kao za hidrofilne DES-ove. U slučaju ionskih hidrofobnih DES-ova, njihova visoka topljivost u vodi formiranjem intermolekularnih umreženih struktura, obično uključujući sudjelovanje molekula vode, značajno utječe na povećanje viskoznost, što ponekad uzrokuje stvaranje hidrogelova. Za razliku od hidrofilnih DES-ova, hidrofobni DES-ovi pokazuju sličnu i nižu gustoću od vode (Marrucho i sur., 2019).

Hidrofobni DES-ovi koji se najčešće prijavljuju uglavnom se sastoje od kvaternarnih amonijevih soli s dugim alkilnim lancima ili hidrofobnih prirodnih spojeva kao HBA-ova, u kombinaciji s nekoliko hidrofobnih HBD-ova kao karboksilnih kiselina ili alkohola s dugim alkil lančanim kiselinama, za razliku od hidrofilnih DES-ova, gdje kombinacije soli kolinijevog klorida i s malim alkilnim lancima, kao što su kiseline, amini, alkoholi, aminokiseline, među ostalima, najviše proučavani (Marrucho i sur., 2019). Na primjer, prvi ikad prijavljeni HDES sastoji se od dekanske kiseline s dugim alkilnim lancima amonijevih soli (npr. tetraoktilamonijev klorid). Druga vrsta je mješavina dvaju neutralnih spojeva, odnosno

hidrofobnih prirodnih spojeva koji djeluju kao HBA s nekim hidrofobnim HBD-ovima, kao što su karboksilne kiseline ili alkoholi s kiselinama dugog alkilnog lanca. Primjeri HDES-a na neutralnoj bazi su terpenoidi:karboksilna kiselina, L-mentol:karboksilna kiselina i timol:karboksilna kiselina (Zainal-Abidin i sur., 2021).

### 2.3.3.2. pH-vrijednost

Osim polariteta, viskoznosti i gustoće, važno svojstvo za aktivnost enzima je pH vrijednost. Priroda HBA-a i HBD-a određuje kiselost i bazičnost DES-a (npr. DES s organskom kiselinom kao HBD su kiseli s  $\text{pH} < 3$ ). Također je utvrđeno da su povećane pH vrijednosti s povećanjem sadržaja vode vidljive u eutektičkim smjesama s izrazito niskim pH vrijednostima, dok su pH vrijednosti eutektičkih smjesa s pH u gornjem dijelu kiselosti opadale s povećanjem sadržaja vode (Radojčić Redovniković i sur., 2019). DES-ovi na bazi organskih kiselina su po svojoj prirodi kiseli ( $\text{pH} < 3$ ), što ih čini nepoželjnim medijem, dok ostali spomenuti DES-ovi spadaju u skupinu slabo kiselih do neutralnih otapala s  $\text{pH} > 4$ , što je pogodnije za biokatalizu (Paiva i sur., 2018; Panić i sur., 2021). pH vrijednost utječe na ionsko stanje supstrata i enzima, što dovodi do promjena u aktivnosti enzima i enantioselektivnosti. Ovo je posebno važno kada se supstrat može transformirati s nekoliko izoenzima s različitom enantioselektivnošću pri različitim pH vrijednostima. Okolina s neutralnim pH obično je optimalna za većinu biokatalitičkih reakcija; stoga se očekuje da bi pH neutralni DES bio najbolja opcija za izvođenje transformacija (pH vodene otopine koja sadrži DES određen je komponentama koje ga tvore, kao što je već raspravljano). Doista, slabo kisele vodene otopine DES-ova (sa šećerima i polialkoholima kao HBD-om,  $\text{pH} \approx 4,5$ ) su najprikladniji reakcijski medij, dok su jako kisele (s organskim kiselinama kao HBD-om,  $\text{pH} < 3$ ) i bazične (s ureom kao HBD-om,  $\text{pH} > 8$ ) otopine ne pružaju odgovarajući okoliš (Panić i sur., 2021).

### 2.3.3.3. Viskoznost

Viskoznost ( $\eta$ ) većine eutektičkih smjesa značajno se mijenja kao funkcija temperature. Poput IL-a, profili viskoznost-temperatura slijede Arrheniusovo ponašanje. Kako temperatura raste, viskoznost se smanjuje. Većina DES-ova pokazuje relativno visoku viskoznost ( $> 100$  cP) na sobnoj temperaturi. Visoka viskoznost DES-ova često se pripisuje prisutnosti opsežne mreže vodikovih veza između svake komponente, što rezultira manjom pokretljivošću slobodnih molekula unutar DES-a. Velika veličina iona i vrlo mali volumen praznina većine DES-ova, ali i druge sile kao što su elektrostatičke ili van der Waalove interakcije mogu doprinijeti visokoj

viskoznosti DES-a. Zbog njihove potencijalne primjene kao zelenih medija, razvoj DES-ova niskog viskoziteta vrlo je poželjan (Zhang i sur., 2012). Općenito, na viskoznost eutektičkih smjesa uglavnom utječe kemijska priroda komponenti DES-ova (vrsta amonijevih soli i HBD-a), molarni omjer HBA/HBD, temperatura i sadržaj vode (Abbott i sur., 2004; Dai i sur., 2013; Florindo i sur., 2014). Nadalje, viskoznost se značajno smanjuje kada se u sustav doda voda i to 10-30 puta ovisno o HBD-u (Florindo i sur., 2014; El Achkar i sur., 2019).

#### 2.4. BIOTRANSFORMACIJE USPOSTAVLJENE U EUTEKTIČKIM OTAPALIMA: VRSTE REAKCIJA I KATALIZATORI

Širok raspon enzima, pa čak i živih mikrobnih stanica, uspješno se koristi za biotransformacije u DES-u. Glavni fokus je na reakcijama kataliziranim lipazom sa slobodnim i imobiliziranim enzimima, posebno za sintezu estera i reakcije transesterifikacije koristeći DES ili kao otapalo, odnosno ko-otapalo ili čak kao supstrat za biotransformacije jedan od komponenata DES-a. Druge vrste reakcija uključuju dehalogenaciju, hidrolizu epoksidnih veza, sintezu peptida, oksidaciju, peroksidaciju i stvaranje ugljik-ugljik (C-C) veza (Pätzold i sur., 2019).

Enzimi mogu biti aktivni i u nevodenim uvjetima, kao što je u organskim otapalima. To se posebno odnosi na lipaze, koje su općenito poznate kao robusni biokatalizatori koji su aktivni čak i pod teškim reakcijskim uvjetima (npr. organska otapala, visoke temperature, nizak sadržaj vode); (Pätzold i sur., 2019). Međutim, pojavili su se neki izazovi s korištenjem eutektičkih otapala kao medija. Na primjer, reakcije (trans-) esterifikacije provedene su u DES-ovima na bazi kiseline ili alkohola koji se natječu s ciljanim supstratima u željenoj reakciji esterifikacije. Iako se stvaranje nusproizvoda ne može u potpunosti eliminirati u ovim reakcijskim sustavima, ono se obično minimizira, budući da je reaktivnost sastavnih komponenata DES-a smanjena zbog jakih interakcija vodikove veze unutar DES-a (Gorke i sur., 2008). Ne samo da su DES-ovi snažno koordinirani, nego supstrat od interesa može također s DES-om stvoriti vodikove veze (Bubalo i sur., 2016).

Važno je razumjeti interakcije koje se događaju u DES-u kako bi se što učinkovitije dizajnirale reakcije katalizirane lipazom. Općenito, odabir odgovarajućeg DES reakcijskog medija nije jednostavan zadatak. Moguće nuspojave sa sastojcima DES-a moraju se uzeti u obzir i stoga treba izbjegavati DES-ove koji sadrže spojeve koji su kemijski slični ciljanim supstratima. Štoviše, aktivnosti enzima i/ili stabilnosti u DES-u ne mogu se predvidjeti, a eksperimentalni pokušaji i pogreške s različitim tipovima DES-a su neizbježni. Iako se upotreba određenog

DES-a za određenu vrstu reakcije može pokazati ograničenom na nekoliko enzima i uski raspon supstrata, DES-ovi imaju jasne prednosti u nekim primjenama. DES-ovi na bazi glicerola predstavljaju prikladan reakcijski medij za pripravak biodizela kataliziranog lipazom, budući da se nusprodukt glicerol može lako ekstrahirati iz DES fazi (Pätzold i sur., 2019).

Drugi obećavajući primjer za pametnu primjenu DES reakcijskih medija je sinteza glikolipida katalizirana lipazom, koji se mogu koristiti kao deterdženti i biosurfaktanti. Biotransformacije katalizirane lipazom nisu ograničene na reakcije (trans-) esterifikacije ili hidrolize, neke druge vrste reakcija mogu se katalizirati zbog slobodnog djelovanja nekih lipaza (Pätzold i sur., 2019).

#### 2.4.1. Eutektičko otapalo kao kombinirani supstrat i otapalo

Biotransformacija hidrofobnih supstrata je veliki izazov u smislu ugrožavanja aktivnosti enzima i/ili stabilnosti s visokim opterećenjem supstrata. Transformacija teško topivih supstrata obično zahtijeva enzimski kompatibilan reakcijski medij, koji pokazuje prihvatljiv kapacitet otapanja za supstrate. DES-ovi imaju potencijal biti dizajnirani tako da je supstrat jedna komponenta (tj. HBD ili HBA spoj) DES-a, ili bi idealno, svi uključeni supstrati tvorili DES. Ovaj pristup znači da konvencionalna otapala nisu potrebna jer se supstrati mogu isporučiti u eutektičkoj matrici. Funkcionirajući kao skup otapala i supstrata u isto vrijeme, DES-ovi omogućuju enzimске reakcije u uvjetima bez otapala (Pätzold i sur., 2019).

### 2.5. DIZAJN BOKATALITIČKOG SUSTAVA U EUTEKTIČKOM OTAPALU

Sinergijsko korištenje DES-a i biokatalize kao biotehnološkog pristupa moglo bi pridonijeti učinkovitoj i održivoj proizvodnji različitih komercijalno značajnih proizvoda. Naime, biokataliza bi mogla osigurati kataliziranje inače teških transformacija na visok regio-, kemo- i enantioselektivni način u blagim i isplativim uvjetima, dok bi DES mogao poslužiti kao jaka zelena potpora za moduliranje/usmjeravanje reakcijskog puta kako bi se dobio željeni proizvod. Kako je broj strukturnih kombinacija obuhvaćenih DES-ovima iznimno velik, moguće je dizajnirati optimalni DES za svaki specifični enzimski reakcijski sustav. Ova važna značajka DES-a omogućuje im da: (i) poboljšaju aktivnost i stabilnost enzima, (ii) poboljšaju prinos reakcije, (iii) poboljšaju/modificiraju stereopreference biokatalizatora i (iv) doprinos u ukupnoj zelenosti procesa (uključujući recikliranje i ponovna upotreba); (Pätzold i sur., 2019). U (bio)katalitičkim procesima, DES može poslužiti kao otapalo/ko-otapalo, ekstrakcijski reagens za enzimski proizvod i otapalo za predtretman enzimске biomase. U ovom trenutku, hidrolaze

su najviše proučavani enzimi u DES-ovima, što nije iznenađujuće s obzirom na to da su lipaze najvažniji industrijski enzimi (Panić i sur., 2021).

Prilikom dizajniranja biokatalitičkog procesa, čistoća i prinos proizvoda su glavna briga, što znači da je ključno odabrati povoljan put reakcije, biokatalizator i reakcijski medij te prilagoditi parametre i uvjete za dani sustav (slika 3). Međutim, potrebno je ispuniti i ciljeve učinkovitosti resursa i održivosti, kao što su smanjenje pomoćnih reagensa i otapala za svaku reakciju i korak pročišćavanja kako bi se smanjila količina otpada po jedinici proizvedenog proizvoda, te odabir pomoćnih reagensa i otapala koja nemaju nepovoljne utjecaj na okoliš. Prilikom dizajniranja učinkovitog biokatalitičkog procesa koji uključuje DES, neovisno o vrsti reakcije i korištenom enzimu, trebali bi biti uključeni sljedeći koraci: (i) priprema i karakterizacija DES-a, (ii) probir DES-a za optimalnu učinkovitost enzima, (iii) razvoj biokatalitičkog procesa i (iv) downstream dizajn procesa s mogućim povećanjem (Panić i sur., 2021).



### Priprema i karakterizacija DES-a

- Projektiranje DES-a s optimalnim fizikalno-kemijskim svojstvima
- Odabir jeftinog DES-a
- Odabir DES-a s malim utjecajem na okoliš

### Odabir DES-a za optimalnu učinkovitost enzima

- Odabir DES-a s blagotvornim utjecajem na aktivnost enzima, stabilnost i stereoselektivnost
- Optimizacija sadržaja vode u DES (utjecaj na viskoznost DES, aktivnost i stereoselektivnost enzima, prinos reakcije)

### Optimizacija biokatalitičkog procesa unutar DES-a

- Optimizacija pH medija i temperature reakcije
- Implementacija specifičnih tehnika (npr. imobilizacija, dvofazni sustavi, kaskadne reakcije)
- Optimizacija molarnog omjera enzim/supstrat

### Projektiranje downstream procesa i scale up

- Razvoj sustava za reciklažu biokatalizatora/otapala
- Implementacija najprikladnije tehnike (ekstrakcija tekućina-tečnost, ekstrakcija kruto-tekuće, apsorpcija proizvoda na smoli makroporusa, dodavanje antiotapala, destilacija)

**Slika 3.** Dizajn biokatalitičkog procesa koji uključuje korištenje eutektičkih otapala (*prema Panić i sur., 2021*)

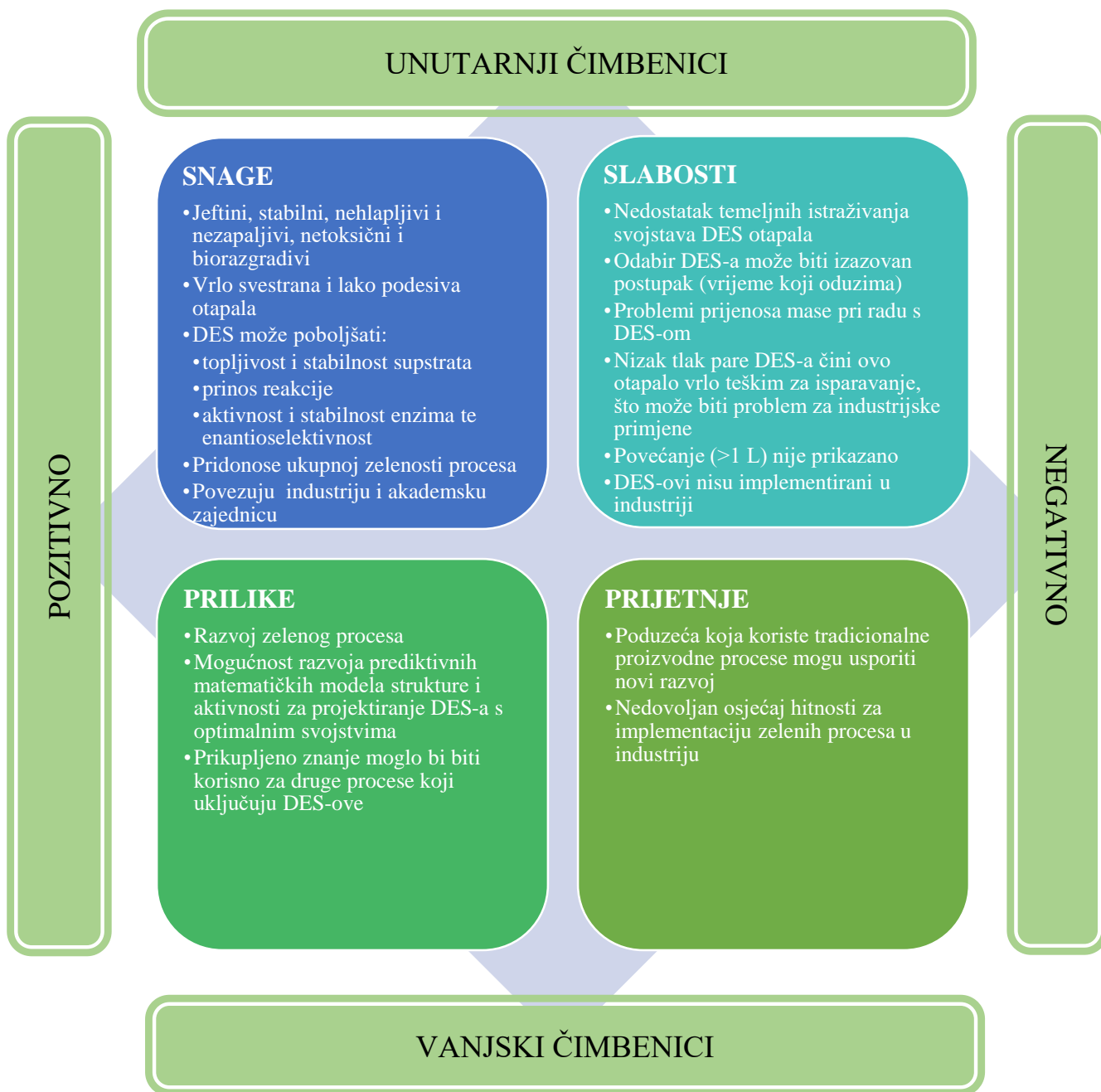
#### 2.5.1. SWOT (snage, slabosti, prilike, prijetnje) analiza biokatalize uz pomoć DES-ova

Eutektička otapala su nova zelena otapala koja su nedavno privukla značajan interes znanstvene zajednice u različitim sektorima. Smatraju se biokompatibilnim, kemijski stabilnim, biorazgradivim, nisko hlapljivim, a i nezapaljivim. Fizikalno-kemijska svojstva DES-a su vrlo prilagodljiva i mogu se prilagoditi kako bi zadovoljila potrebe određene misije (Zainal-Abidin i sur., 2021). Ako uzmemo u obzir sve druge prednosti za okoliš primjene DES-a u ulozi otapala, kao što su nizak tlak pare (smanjeno onečišćenje zraka), nezapaljivost (sigurnost procesa) i netoksičnost, DES-ovi predstavljaju izvrsne kandidate za korištenje u ekološki prihvatljivoj biokatalizi (Panić i sur., 2021). Čini se da su DES-ovi obećavajući kandidati za održive materijale u pokušaju smanjenja ili eliminacije konvencionalnih otapala, pa čak i drugih

poznatih zelenih alternativa kao što su ionske kapljevine (IL). Općenito, najčešće korišteni DES-ovi se smatraju zelenim otapalima zbog njihove visoke biokompatibilnosti i biorazgradivosti, jednostavne sinteze, kao i niske cijene i visoke dostupnosti sirovina, što dovodi do više od milijun mogućih kombinacija (Santana-Mayor i sur., 2021).

U industriji vrijednost proizvoda ne ovisi samo o samim troškovima proizvodnje nego i o načinu proizvodnje. Sigurnost procesa, izbjegavanje uporabe kemikalija potencijalno opasnih za zdravlje ljudi i ekološki prihvatljivo zbrinjavanje otpadnih proizvoda danas su važni aspekti koje također treba uzeti u obzir pri izračunu stvarnih troškova proizvodnje. U tom kontekstu zelena tehnologija postaje bitan dio prerade. Zelena tehnologija definirana je kao način poboljšanja proizvodnih procesa koji se tiču dugotrajnog i kratkoročnog utjecaja na ekosustav (Choi i Verpoorte, 2019). Među jeftinim komponentama, razlike u cijeni bi mogle biti značajne, što bi u industrijskim razmjerima moglo dovesti do značajnog povećanja cijene proizvoda na kraju (npr. DES koji sadrži prolin je 30 % skuplji od onoga koji sadrži kolin). Također, potrebno je uzeti u obzir izolaciju produkta i/ili mogućnost recikliranja DES-ova, posebno zato što DES-ovi posjeduju nulti tlak pare, a to bi mogao biti problem, osobito u industrijskom mjerilu (Panić i sur., 2021).

Kod biokatalitičkih procesa potpomognutih DES-om, niska cijena DES-a i jednostavna priprema čine ih vrlo održivom alternativom tradicionalnim otapalima. Međutim, visoka gustoća i viskoznost mogu biti ograničavajući čimbenici zbog problema osiguravanja homogene otopine (miješanje) i količine energije potrebne za miješanje i pumpanje. Do sada, scale-up biokatalize potpomognute DES-om proveden je samo na preparativnoj skali (do 500 mL); (Panić, Cvjetko Bubalo and Radojčić Redovniković, 2021). Prvotna očekivanja DES-ova kao univerzalnih otapala nisu se ispunila; u stvari, pokazalo se da su vrlo selektivna otapala. To znači da za svaku primjenu treba razviti najprikladniji DES potrebama određenog procesa (Choi i Verpoorte, 2019). Konačno, da sumiramo gore navedeno, naglašena su glavna uska grla biokatalize potpomognute DES-om, a buduće perspektive su dodatno pojašnjene SWOT (snage, slabosti, prilike i prijetnje) analizom prikazanom na slici 4.



**Slika 4.** SWOT (snage, slabosti, prilike, prijetnje) analiza biokatalize uz pomoć DES-ova  
(prema Panić i sur., 2021)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI I METODE

##### 3.1.1. Kemikalije

- (*R,S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Dekanska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda
- Dietil-eter, Lach-ner, Neratovice, Češka
- Diklormetan, Honeywell, Charlotte, SAD
- Dimetil sulfoksid, Fisher Scientific, Hampton, SAD
- Etil-acetat, Honeywell, Charlotte, SAD
- *n*-heptan (99 %), CARLO ERBA Reagents S.A.S., Val de Reuil Cedex, Francuska
- *n*-heksan, Honeywell, Charlotte, SAD
- Izopropanol, Honeywell, Charlotte, SAD
- Klorovodična kiselina (HCl), 12M
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- L-mentol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Metanol (MeOH)
- Natrijev hidroksid (NaOH)
- Oktanska kiselina
- Petrolej eter, Lach-ner, Neratovice, Češka
- Timol
- Urea
- Vinil acetat

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

### 3.1.2. Enzimi

- imobilizirana lipaza (imLip)

Novozyme 435, lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* ( $\geq 5000 \text{ U g}^{-1}$ , rekombinantna, eksprimirana u *Aspergillus niger*), imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama s udjelom vode 1-2 (w/w %). Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

### 3.1.3. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala korištena u ovom radu sintetizirana su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu te su popisana u Tablici 1.

**Tablica 1.** Niskotemperaturna eutektička otapala korištena u radu

<b>Niskotemperaturno eutektičko otapalo (DES)</b>	<b>Kratica</b>	<b>Molarni omjer komponenata</b>
timol:oktanska kiselina	Ty:C <sub>8</sub>	1:3
timol:dekanska kiselina	Ty:C <sub>10</sub>	1:1
L-mentol:oktanska kiselina	Me:C <sub>8</sub>	1:1
kolin-klorid:urea (w(H <sub>2</sub> O)) = 10 %	ChCl:U10%	1:2

### 3.1.4. Otopine

- 1 M otopina HCl-a u metanolu (MeOH) pripremljena u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.
  - HCl 8,3 mL
  - MeOH 100 mL
- 0,5 M otopina NaOH u metanolu (MeOH) pripremljena u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.
  - NaOH 2 g
  - MeOH 100 mL

### 3.1.5. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Elektromagnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Hladnjak (4 °C), Gorenje, Slovenija
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure, mikropipete, nastavci za mikropipete)
- Plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan
- Računalni program BOVIA COSMOtherm 2020, Verzija 20.0.0 (Revision 5273M), Dassault Systems
- Računalni program TmoleX, Verzija 4.5, COSMOlogic GmbH & Co
- Homogenizator-IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, ST. Louis, SAD

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Procjena topljivosti (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima korištenjem softvera COSMOtherm

Teorijski računski modeli mogu biti vrijedni alati za procjenu termodinamičkih svojstava otopina i smjesa, čime se smanjuju vrijeme, resursi i ukupni troškovi probira velikog broja otapala. Točan opis ovisnosti o sastavu, temperaturi i tlaku u višekomponentnim sustavima zahtijeva pouzdane termodinamičke modele (Eckert i Klamt, 2002). Trenutačno se COSMO-RS (*eng.* Conductor-like Screening Model for Real Solvents) smatra jednom od najtočnijih računalnih metoda dostupnih za rangiranje otapala. COSMO-RS je kombinacija modela screeninga (COSMO, *eng.* Conductor-like Screening Model) i statističke termodinamičke obrade površina u interakciji (Palmelund i sur., 2019). COSMO-RS je opća i brza metodologija za primarno predviđanje termofizičkih podataka tekućina. Temelji se na jednostavnim jednomolekularnim kvantnim kemijskim izračunima koji, u kombinaciji s točnom statističkom termodinamikom, daju informacije potrebne za procjenu molekularnih interakcija u tekućinama (Eckert i Klamt, 2002). COSMO-RS razmatra disperzivne, neusklađene veze, kao i vodikove veze međudjelovanja između otopljene tvari i molekula otapala za izračun kemijskog potencijala i stoga se može koristiti za procjenu topljivosti otopljene tvari u otapalu, ali i drugih termodinamičkih svojstava (Palmelund i sur., 2019).

Programski paket COSMO $therm$  je korišten kako bi pomoću brzog i računski jednostavnog termodinamičkog proračuna izračunali logaritamski koeficijenti aktivnosti,  $\ln(\gamma)$ . Vrijednost  $\ln(\gamma)$  prikazuje topljivost ispitivanog supstrata u različitim ispitivanim otapalima. U ovom slučaju, ispitivani supstrati su bili (*R,S*)-1-feniletanol i vinil acetat. Za računalno predviđanje topljivosti ispitivanih spojeva u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (DES-ovima), u COSMO $therm$  softveru unesene su postojeće COSMO datoteke za spoj čiju topljivost ispitujemo, akceptora vodikove veze i donora vodikove veze te vode (ukoliko je voda potrebna) prema prethodno zadanim udjelima čija suma mora biti jednaka 1.

Što je koeficijent aktivnosti viši i pozitivniji od 1 znači da spoj posjeduje manju topljivost u promatranom otapalu. Također, što je  $\ln(\gamma)$  negativnija, molekula je topljivija (Klamt i sur., 1998).

### 3.2.2. Sinteza niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Četiri niskotemperaturna eutektička otapala su pripremljena eksperimentalno u ovom radu. Kao ishodne sirovine za sintezu hidrofobnih DES-ova su korišteni timol, L-mentol te oktanska i dekanska kiselina. Ishodne sirovine za sintezu hidrofilnog DES-a su kolin-klorid, urea i destilirana voda. Način pripreme za svako otapalo je isti, količina komponenata je prethodno izračunata prema zadanim molarnim omjerima prikazanim u tablici 1 (poglavlje 3.1.3.).

U staklenim tikvicama s čepom pomiješaju se prethodno izračunate mase donora i akceptora vodikove veze prema zadanom molarnom omjeru. U hidrofilnu smjesu se doda određena količina vode, kako bi se u konačnici dobilo niskotemperaturno eutektičko otapalo s 10 % vode (w/w). Reakcijska smjesa se zatim miješa i grije na elektromagnetskoj miješalici s grijanjem pri temperaturi od 50 °C tijekom 2 sata, sve dok ne nastane homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Ovako pripremljena niskotemperaturna eutektička otapala čuvaju se na sobnoj temperaturi i dnevnom svjetlu do daljnje primjene.

Niskotemperaturna eutektička otapala pripremljena prema tablici 1 korištena su za eksperimentalno određivanje topljivosti (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata u navedenim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, odnosno u timol:oktanska, timol:dekanska, L-mentol:oktanska te u kolin-klorid:urei s 10 % vode.

### 3.2.3. Eksperimentalna provjera topljivosti (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i u heptanu

Postupak eksperimentalnog određivanja topljivosti vrši se postupnim dodavanjem i otapanjem navedenih supstrata ((*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata) u odgovarajućim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (Ty:C<sub>8</sub>, Ty:C<sub>10</sub>, Me:C<sub>8</sub>, ChCl:U10%) te u heptanu kao kontrolnom organskom otapalu. Nakon dodatka 5 μL navedenog supstrata u 0,5 mL eutektičkog otapala i heptana, suspenzija se homogenizira na homogenizatoru-IKA Vortex do potpunog otapanja. Kod određivanja topljivosti u kolin-klorid:urei dodaje se po 1 μL navedenog spoja u 0,5 mL eutektičkog otapala. Postupak dodavanja ispitivanih topljivih tvari u otapalo se uzastopno ponavlja do pojave odvajanja dviju faza u uzorku. Analiza uzoraka provodi se vizualnom metodom.

### 3.2.4. Eksperimentalna provjera topljivosti hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (DES-ova) u organskim otapalima

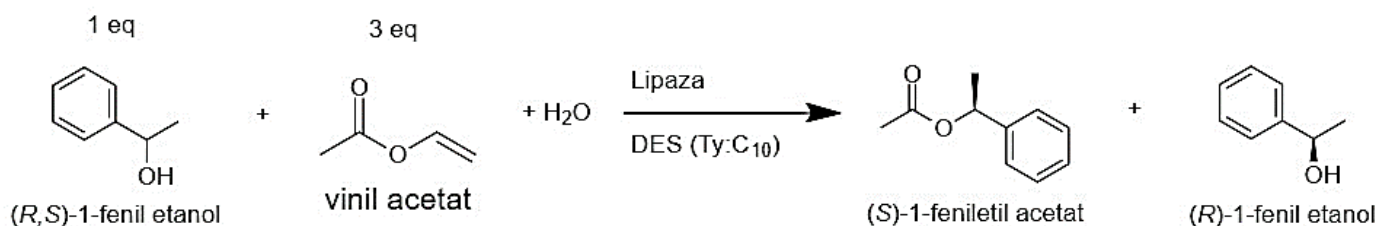
Hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala pripremljena prema protokolu iz poglavlja 3.2.2. korištena su kako bi se eksperimentalno utvrdila njihova topljivost u odabranim organskim otapalima koja se uobičajeno koriste u laboratorijima i kemijskoj industriji. Organska otapala korištena za provjeru topljivosti DES-a su: heksan, dimetil sulfoksid, etil-acetat, dietil-eter, diklormetan, heptan, petrolej eter, izopropanol i metanol. Kod određivanja topljivosti u 0,5 mL eutektičkog otapala dodalo se 0,5 mL organskog otapala i vizualnom metodom analize se utvrđivala pojava ili nepojava sloja raslojavanja dva otapala.

### 3.2.5. Kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola

Enantioselektivna kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola s vinil acetatom (slika 5) katalizirana imobiliziranim lipazom B izoliranim iz kvasca *Candida antarctica* provodi se u prethodno pripremljenom DES-u timol:dekanska (Ty:C<sub>10</sub>) i ChCl:U s 10 % vode, a kao referentno otapalo koristi se etil-acetat. Reakcija enantioselektivne, lipazom katalizirane esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola provedena je prema radu Stradomska i sur. (2021), a opisana u nastavku. U reakcijsku smjesu je dodano 1000 μL otapala (etil-acetat, timol:dekanska (Ty:C<sub>10</sub>) ili kolin-klorid:urea s masenim udjelom vode od 10 % (ChCl:U10%)), 6 μL supstrata (*R,S*)-1-feniletanola, 13,91 μL supstrata vinil acetata i 5 mg pripravka Novozym 435 (lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica*) te 10 μL vode. Uzorkovanje se vrši nakon 2 h. Uzorak za analizu iz eutektičkog otapala Ty:C<sub>10</sub> se pripremi tako da se 30 mg uzorka i 3 mL 0,5M



NaOH u metanolu zagrijava 10 minuta na 75 °C. Zatim se doda 1 mL 1M HCl u metanolu, te se smjesa ponovno zagrijava 10 minuta na 75 °C. Nakon zagrijavanja se dodaje 3 mL vode i 4 mL heksana kako bi se provela ekstrakcija nastalih produkata s organskom fazom. Iz otapala ChCl:U10% se ekstrakcija provodila s etil-acetatom u omjeru 1:1, dok se uzorak iz etil-acetata direktno analizirao. U organsku fazu se doda Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, potom se filtrira i organska faza se analizira pomoću plinske kromatografije .



**Slika 5.** Enantioselektivna kinetička rezolucija *(R,S)*-1-feniletanola

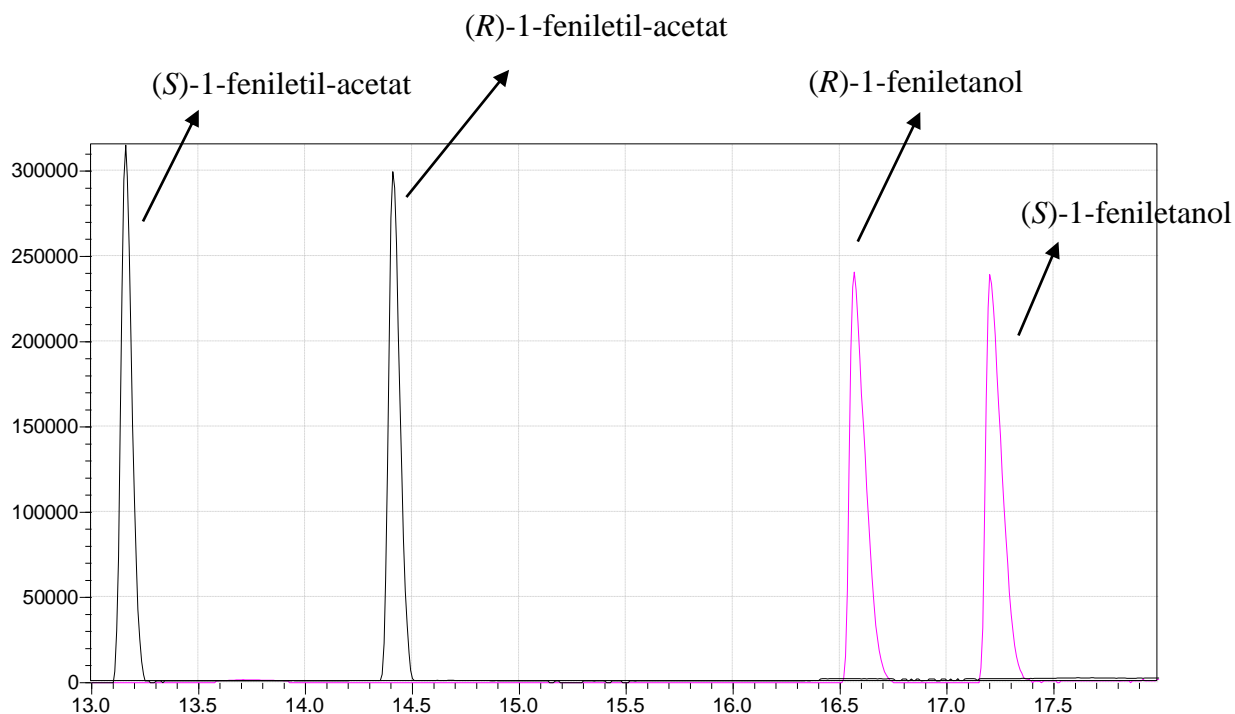
### 3.2.6. Određivanje koncentracije *(R,S)*-1-feniletil-acetata

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

Kromatografski uvjeti za određivanje:

- Kromatografska kolona: Varian CHIRASIL-DEX CB (25 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
- Pokretna faza: He
- Protok: 56,3 mL min<sup>-1</sup>
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone: T<sub>1</sub>=80 °C (2 min), T<sub>2</sub>=140 °C (Δt=5 °C min<sup>-1</sup>)
- Vrijeme trajanja analize: 21 min

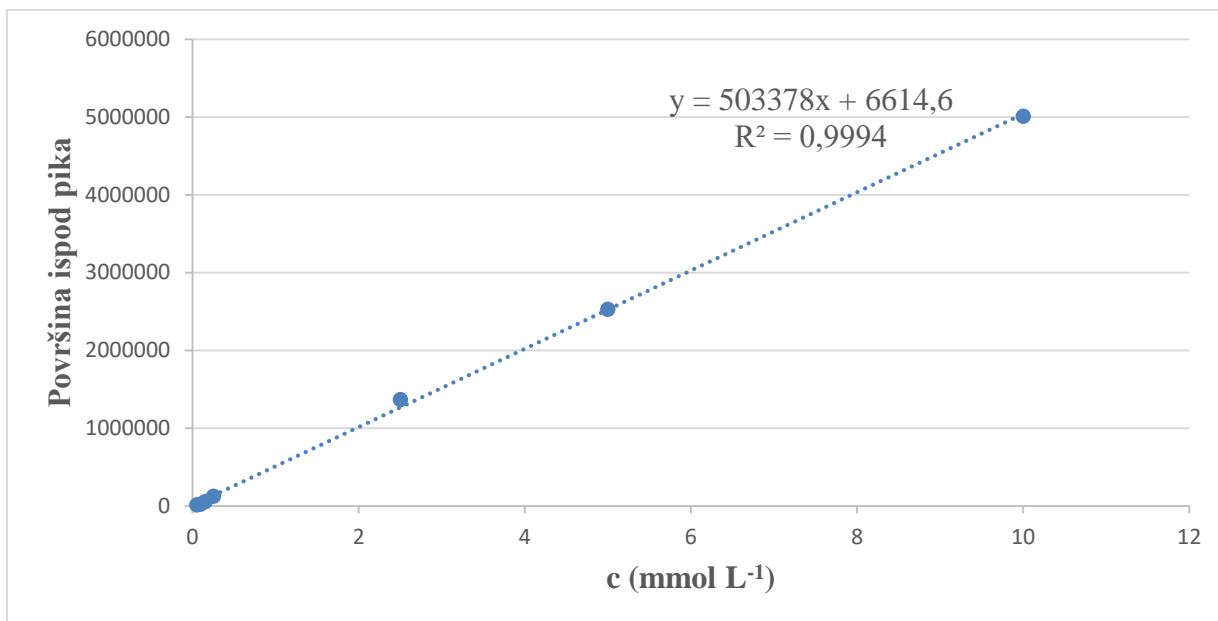
Retencijsko vrijeme ( $R_t$ ) za ( $S$ )-1-feniletil-acetat iznosi 13,2 min, ( $R_t$ ) za ( $R$ )-1-feniletil-acetat iznosi 14,4 min, ( $R_t$ ) za ( $R$ )-1-feniletanol iznosi 16,7 min, ( $R_t$ ) za ( $S$ )-1-feniletanol iznosi 17,3 min (Slika 6).



**Slika 6.** Prikaz tipičnog plinskog kromatograma enantioselektivne esterifikacije ( $R,S$ )-1-feniletanola katalizirane lipazom B

### 3.2.6.1. Izrada baždarnog dijagrama

Pripremi se otopina ( $S$ )-1-feniletil-acetata u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,05; 0,09; 0,15; 0,25; 2,5; 5 i 10 mmol L<sup>-1</sup>. Nakon toga se na ordinatu nanose izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika, dok se na apscisu nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Zatim se pomoću računala nacrtaju dijagram ovisnosti množinske koncentracije ( $S$ )-1-feniletil-acetata o površini ispod pika (Slika 7) te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunaju nepoznate koncentracije ( $S$ )-1-feniletil-acetata u uzorcima.



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

Kako bi se međusobno usporedila uspješnost esterifikacije u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se konverzija procesa esterifikacije, volumetrijska i specifična produktivnost esterifikacije te enantiomerni višak.

**Konverzija procesa esterifikacije  $\eta$  (%)** izračuna se prema jednadžbi:

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

gdje  $c_A$  predstavlja izmjerenu koncentraciju estera (mol L<sup>-1</sup>), a  $c_{AT}$  teoretski moguću koncentraciju estera (mol L<sup>-1</sup>).

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

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

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

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

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

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

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

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

gdje  $n_{P1}$  predstavlja početnu množinu estera ( $\mu\text{mol}$ ),  $n_{P2}$  množinu estera na kraju procesa ( $\mu\text{mol}$ ),  $m_E$  masu pripravka Novozym 435 (mg), a  $t$  vrijeme trajanja procesa (min).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Niskotemperaturna eutektička otapala jedna su od najzanimljivijih klasa alternativnih otapala, uglavnom zbog kombinacije njihove jednostavne i isplative pripreme i specifičnog dizajna kako bi se zadovoljile potrebe specifičnog procesa. Mogućnost korištenja svih prirodnih komponenti otvorila je nove uzbudljive perspektive za dizajn uistinu zelenih spojeva, neophodnih u modernoj, zelenoj i održivoj kemiji. DES-ovi imaju bezbroj različitih primjena, kao što su otapala, reakcijski mediji, katalizatori, aditivi, maziva, materijali itd.. Hidrofobni DES-ovi su nova podklasa DES-ova, koja je uvelike osnažila upotrebu ovih spojeva u aplikacijama koje ne zahtijevaju izravan kontakt s vodom. Korištenje svih prirodnih spojeva omogućilo je neviđeno krojenje novih cjenovno niskih hidrofobnih smjesa, koje se mogu koristiti kao zamjene za hlapljive organske spojeve iz neobnovljivih izvora, što je jedan od glavnih ciljeva zelene kemije (Marrucho i sur., 2019). Cilj ovog diplomskog rada bio je dizajnirati optimalni DES za kinetičku rezoluciju (*R,S*)-1-feniletanola primjenom softvera COSMO $_{therm}$ , te eksperimentalno ispitati točnost računalno dobivenih rezultata. Također, cilj je bio i provesti reakciju kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola.

### 4.1. RAČUNALNO (SOFTVERSKO) PREDVIĐANJE TOPLJIVOSTI

Otapala igraju primarnu ulogu u kemijskoj industriji, sa sve većim regulatornim pritiskom koji potiče pronalaženje manje opasnih i zelenijih zamjena za konvencionalna otapala. Učinkovite metode za racionalno ispitivanje zelenih otapala korištenjem računalno potpomognutih metoda, s obzirom na široku paletu zelenih alternativa konvencionalnim otapalima, ključne su za promicanje održivih procesa (González-Miquel i Díaz, 2021).

Eksperimentalna mjerenja topljivosti zahtijevaju mnogo vremena i truda. Računalne metode su stoga vrlo vrijedne za identifikaciju DES-ova koji najviše odgovaraju ispitivanom supstratu. Računalni pristup temeljen na COSMO-RS predviđanjima apsolutne topljivosti prikazuje potencijal ove metode za grubi odabir obećavajućih kombinacija supstrat-DES. COSMO-RS je koristan alat za procjenu rangiranja otapala za određeni supstrat i koristi se za odabir kombinacija supstrat-DES kako bi se potencijalno olakšao dugotrajni eksperimentalni proces identifikacije obećavajućih kombinacija supstrat-DES povezan s određivanjem topljivosti. COSMO-RS razmatra interakcije vodikovih veza između molekula otopljene tvari i otapala radi izračunavanja kemijskog potencijala, ali i procjenu topljivosti otopljene tvari u otapalu. Također,

ovaj se računalni programski paket može primjenjivati za predviđanje termodinamičkih svojstava otapala, eutektičke točke te drugih fizikalno-kemijskih svojstava otapala i otopljene tvari. Dok računski predviđanja mogu smanjiti eksperimentalno opterećenje za odabir najboljih otapala među skupom ispitivanih i/ili zadanih otapala, računski predviđanja ne mogu zamijeniti eksperimentalna mjerenja apsolutne topljivosti u tim otapalima (Palmelund i sur., 2019).

Strategije za učinkovit odabir otapala ključne su za smanjenje ekonomskih i ekoloških utjecaja u razvoju sigurnijih i održivijih industrijskih procesa. Općenito, kriteriji odabira otapala moraju uzeti u obzir učinak otapala u procesu reakcije ili izdvajanja, odnosno pročišćavanja, zajedno s aspektima zaštite okoliša, zdravlja i sigurnosti te ekonomskim kriterijima kao pokretačima za scale-up i industrijsku implementaciju. Učinak otapala uvelike se oslanja na fizikalno-kemijska i termodinamička svojstva, koja se mogu predvidjeti metodama računalne procjene (González-Miquel i Díaz, 2021). Prethodna istraživanja su nedvojbeno pokazala da se odabirom odgovarajućeg DES-a s optimalnim kemijskim svojstvima (sastav DES-a s različitim solima i HBD-om, te molarnim omjerima između njih) i sadržajem vode, enzim može izrazito stabilizirati i aktivirati. Sastav DES-a također je izravno povezan s topljivosti drugih sudionika reakcije (supstrati i produkti) te je stoga u izravnoj korelaciji s aktivnosti enzima te složenosti izolacije, pročišćavanja i dobivanja proizvoda. Stoga, za svaki sustav enzim/supstrat treba primijeniti sveobuhvatan proces odabira DES-a (Panić i sur., 2021).

Pregled literature pokazao je da su najčešće korišteni DES-ovi u biokatalizi oni na bazi kolin-klorida i s malim alkilnim lancima, koji kao donor vodikove veze (HBD) sadrže šećer, alkohol, amide, amine ili aminokiseline (Pätzold i sur., 2019). Hidrofobni DES-ovi koji se najčešće pojavljuju u istraživanjima uglavnom se sastoje od kvaternarnih amonijevih soli s dugim alkilnim lancima ili hidrofobnih prirodnih spojeva kao akceptorima vodikove veze (HBA), u kombinaciji s nekoliko hidrofobnih donora vodikove veze (HBD) kao što su karboksilne kiseline ili alkoholi s dugim alkil lančanim kiselinama (Marrucho i sur., 2019). Sukladno literaturi odabran je popis DES-ova u kojima ćemo računalno (softverski) i eksperimentalno ispitati topljivost željenih supstrata.

Prije eksperimentalnog rada u laboratoriju, prema navedenom protokolu u poglavlju 3.2.1., u računalnom programu COSMOtherm, ispitana je topljivost supstrata (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata u odabranim DES otapalima. S obzirom na definirani sastav otapala, odnosno udio akceptora vodikove veze (HBA), donora vodikove veze (HBD) te udio vode (0 % i 10 %)

dobiveni su logaritmi koeficijenta aktivnosti ( $\ln(\gamma)$ ) kao rezultati računalnog (softverskog) predviđanja topljivosti supstrata u ispitivanim otapalima (Slika 8, Slika 9 i Slika 10). Prema istraživanju koje su proveli Klamt i sur. (1998) vrijednost koeficijenta aktivnosti ( $\ln(\gamma)$ ) veća od 1 za navedeni supstrat znači njegovu slabu topljivost u promatranom otapalu, dok vrijednost koeficijenta aktivnosti manja od 0 za navedeni supstrat znači njegovu izrazitu topljivost u promatranom otapalu i označava željeno otapalo za eksperimentalno ispitivanje topljivosti supstrata.

		hidrofilni DES; w(H <sub>2</sub> O)=10%									
		<i>(R,S)</i> -1-feniletanol									
		HBA = B	HBA: HBD	HBA = ChCl	HBD: HBA	HBA = CA	HBA: HBD	HBA = EG	HBA: HBD	HBA = Ma	HBA: HBD
HBD	CA		1:1		2:1						
	Glc		5:2		1:1		1:1		2:1		1:1
	Gly		1:2		1:2						
	Ma		1:1		1:1						
	Suc		4:1				1:1		2:1		2:1
	EG				1:2						
	Fru				1:1		1:1		2:1		1:1
	OxA				1:1						
	Sol				1:1						
	Sor				1:1						
	U				1:2						
	Xyl				2:1						
	Xyol				5:2						
	Pro										1:1

Legenda [ $\ln(\gamma)$ ]:



**Slika 8.** Topljivost *(R,S)*-1-feniletanola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Ispitani različiti molarni omjeri i vrste donora (HBD) i akceptora vodikove veze (HBA) uz maseni udio vode (w(H<sub>2</sub>O)=10 %) prema COSMOthermX softveru.

\*HBD: limunska kiselina (CA), glukoza (Glc), glicerol (Gly), malična kiselina (MA), saharoza (Suc), etilen glikol (EG), fruktoza (Fru), oksalna kiselina (OxA), sorbitol (Sol), sorboza (Sor), urea (U), ksiloza (Xyl), ksilitol (Xyol), prolin (Pro)

\*HBA: betain (B), kolin klorid (ChCl), limunska kiselina (CA), etilen glikol (EG), malična kiselina (Ma)



		hidrofilni DES; w(H <sub>2</sub> O)=10%									
		vinil acetat									
		HBA = B	HBA: HBD	HBA = ChCl	HBD: HBA	HBA = CA	HBA: HBD	HBA = EG	HBA: HBD	HBA = Ma	HBA: HBD
HBD	CA		1:1		2:1						
	Glc		5:2		1:1		1:1		2:1		1:1
	Gly		1:2		1:2						
	Ma		1:1		1:1						
	Suc		4:1				1:1		2:1		2:1
	EG				1:2						
	Fru				1:1		1:1		2:1		1:1
	OxA				1:1						
	Sol				1:1						
	Sor				1:1						
	U				1:2						
	Xyl				2:1						
	Xyol				5:2						
	Pro										1:1

Legenda [ln (γ)]:



**Slika 9.** Topljivost vinil acetata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Ispitani različiti molarni omjeri i vrste donora (HBD) i akceptora vodikove veze (HBA) uz maseni udio vode (w(H<sub>2</sub>O)=10 %) prema COSMOthermX softveru.

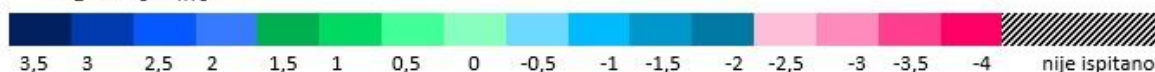
\*HBD: limunska kiselina (CA), glukoza (Glc), glicerol (Gly), malična kiselina (MA), saharoza (Suc), etilen glikol (EG), fruktoza (Fru), oksalna kiselina (OxA), sorbitol (Sol), sorboza (Sor), urea (U), ksiloza (Xyl), ksilitol (Xyol), prolin (Pro)

\*HBA: betain (B), kolin klorid (ChCl), limunska kiselina (CA), etilen glikol (EG), malična kiselina (Ma)



		hidrofobni DES; w(H <sub>2</sub> O)=0%					
		( <i>R,S</i> )-1-feniletanol	vinil acetat	HBA:HBD	( <i>R,S</i> )-1-feniletanol	vinil acetat	HBA:HBD
		HBA = Me			HBA = Ty		
HBD	Cam			1:1			
	SA			4:1			
	C8			1:1			1:3
	C10			1:1			1:1
	C18:2			1:1			
	Ty			3:2 (3C)			
	Cou						3:2 (23.6C)

Legenda [ $\ln(\gamma)$ ]:



**Slika 10.** Topljivost (*R,S*)-1-feniletanola i *S*-vinil acetata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Ispitani različiti molarni omjeri i vrste donora (HBD) i akceptora vodikove veze (HBA) bez vode (w(H<sub>2</sub>O)=0 %) prema COSMOthermX softveru.

\*HBD: D,L-camphor (Cam), salicilna kiselina (SA), oktanska kiselina (C8), dekanska kiselina (C10), linolna kiselina (C18:2), timol (Ty), coumarin (Cou)

\*HBA: L-mentol (Me), timol (Ty)

Prema prikazanim rezultatima na slici 8 je moguće zaključiti kako ispitana hidrofilna otapala s udjelom vode od 10 % slabo do umjereno otapaju supstrat (*R,S*)-1-feniletanol, dok je po rezultatima na slici 9 moguće zaključiti da ista hidrofilna otapala slabo otapaju supstrat vinil acetat. Kod hidrofilnih i hidrofobnih otapala nije uočen značajan utjecaj donora i akceptora vodikovih veza na topljivost supstrata. Prema prikazanim rezultatima na slici 10 vidljivo je da hidrofobnost otapala pokazuje značajan utjecaj na topljivost oba supstrata. Kod hidrofobnih otapala i akceptora vodikove veze L-mentola (Me) topljivost (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata je umjerena u ispitivanim otapalima. Dobra topljivost oba supstrata je vidljiva na slici 10 kada je kao akceptor vodikove veze korišten timol (Ty). Ukupno najveću topljivost prema računalnom programu COSMOtherm pokazuje vinil acetat u hidrofobnom DES-u timol:oktanska kiselina (Ty:C<sub>8</sub>) uz maseni udio vode od 0 %, gdje je donor vodikove veze oktanska kiselina, a akceptor vodikove veze je timol. Za vinil acetat kao supstrat najveću topljivost pokazuje timol:coumarin hidrofobno DES otapalo s masenim udjelom vode od 0 %.

## 4.2. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI

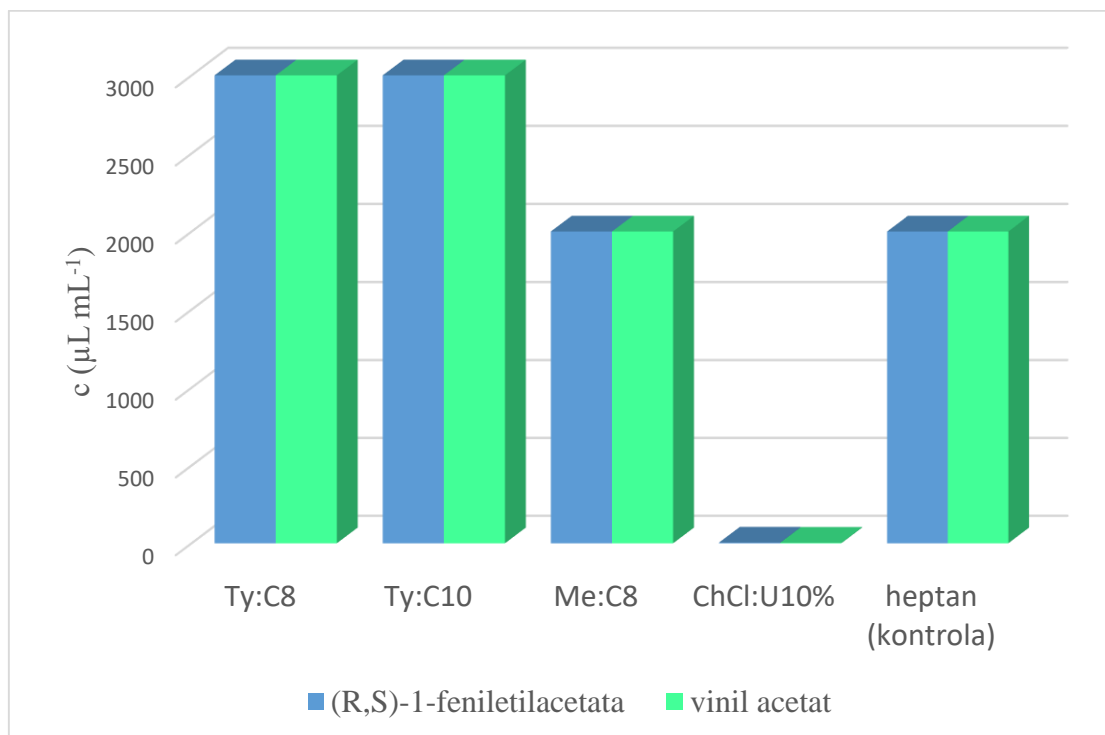
Računalno (softversko) predviđanje topljivosti pomoću računalnog programa COSMO $therm$  se potvrđuje eksperimentalnim određivanjem topljivosti u laboratoriju kako bi se potvrdila točnost dobivenih podataka i samog rada računalnog programa. Eksperimentalno je ispitivana topljivost (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata u odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (Ty:C<sub>8</sub>, Ty:C<sub>10</sub>, Me:C<sub>8</sub>, ChCl:U10%) te u heptanu kao kontrolnom organskom otapalu, dobiveni rezultati su prikazani u tablici 2. Eksperimentalno ispitivanje topljivosti provođeno je prema uputama iz poglavlja 3.2.3. gdje se postepeno dodavalo otopljenu tvar u otapalo u pravilnim volumnim obrocima uz homogeniziranje smjese na homogenizatoru-IKA Vortex do potpunog otapanja. U 0,5 mL otapala Ty:C<sub>8</sub> otopljeno je 3000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  i (*R,S*)-1-feniletacetata i vinil acetata, u otapalu Ty:C<sub>10</sub> također je otopljeno 3000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  oba otapana supstrata. U otapalu Me:C<sub>8</sub> otopljeno je 2000  $\mu\text{L mL}^{-1}$  oba otapana supstrata, dok je ista koncentracija otopljena i u heptanu kao kontrolnom otapalu. Najmanje je otopljene tvari otopljeno u hidrofilnom otapalu ChCl:U10%, gdje je otopljeno 4  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (*R,S*)-1-feniletacetata i 3  $\mu\text{L mL}^{-1}$  vinil acetata.

**Tablica 2.** Koncentracije topljivosti (*R,S*)-1-feniletanola i vinil acetata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i u heptanu

DES-ovi	( <i>R,S</i> )-1-feniletacetata	vinil acetat
	c ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )	
Ty:C <sub>8</sub>	3000	3000
Ty:C <sub>10</sub>	3000	3000
Me:C <sub>8</sub>	2000	2000
ChCl:U10%	4	3
heptan (kontrola)	2000	2000

Topljivost (*R,S*)-1-feniletacetata i vinil acetata najbolja je u niskotemperaturnim hidrofobnim eutektičkim otapalima timol:oktanska kiselina (Ty:C<sub>8</sub>) i timol:dekanska kiselina (Ty:C<sub>10</sub>), dok je najmanja u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu kolin-klorid:urea uz 10 %-tni maseni udio vode (ChCl:U10%), kao što je vidljivo po rezultatima na slici 11. Računalno predviđanje topljivosti (*R,S*)-1-feniletacetata i vinil acetata u programu COSMO $therm$  potvrđeno je i eksperimentalno. Od otapala ispitivanih i računski i eksperimentalno, za otapala Ty:C<sub>8</sub> i Ty:C<sub>10</sub> izračunati su najmanji koeficijenti aktivnosti ( $\ln(\gamma)$ ) što znači bolju topljivost supstrata, dok je za otapalo ChCl:U10% najveći  $\ln(\gamma)$  što znači njegovu manju topljivost. Iz navedenog, softver COSMO $therm$  pokazao se

dobrim računalnim alatom za predviđanje topljivosti ispitivanog topljivih tvari u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, i svi eksperimentalno dobiveni rezultati su dobiveni sukladno očekivanjima i računalnoj procjeni prema softveru COSMO $therm$ . Timol:dekanska kiselina (Ty:C<sub>10</sub>) je izabrano optimalno otapalo za provođenje željene kemijske reakcije kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola uz vinil acetat. Izabrano otapalo je hidrofobno po svom sastavu, a optimalno je za oba ispitivana supstrata. U navedenom DES-u akceptor vodikove veze je timol, a donor je dekanska kiselina.



**Slika 11.** Topljivost (*R,S*)-1-feniletacetata i (*R,S*)-1-feniletanola u različitim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.

\*Kratice: timol:oktanska kiselina (Ty:C<sub>8</sub>), timol:dekanska kiselina (Ty:C<sub>10</sub>), kolin-klorid:urea 10 % (ChCl:U10%)

Uz topljivost supstrata u odabranim DES otapalima, eksperimentalno se ispitivala i topljivost odabranih hidrofobnih DES-ova (Ty:C<sub>8</sub>, Ty:C<sub>10</sub> i Me:C<sub>8</sub>) u klasično korištenim organskim otapalima (heksan, dimetil sulfoksid, etil-acetat, dietil-eter, diklormetan, heptan, petrolej eter, izopropanol, metanol) prema poglavlju 3.2.4. Vizualnom metodom analize se utvrđivala pojava ili nepojava sloja raslojavanja dva otapala, čiji su rezultati prikazani u tablici 3. Iz rezultata je vidljivo da su svi ispitani hidrofobni DES-ovi u odabranim organskim otapalima u potpunosti

otopljeni, organsko i eutektičko otapalo su uspješno homogenizirani i nema pojave vidljivog raslojavanja dva otapala.

**Tablica 3.** Prikaz uspješnosti topljivosti hidrofobnih eutektičkih otapala u odabranim organskim otapalima

Organska otapala	DES (V = 0,5 mL)		
	Ty:C <sub>8</sub>	Ty:C <sub>10</sub>	Me:C <sub>8</sub>
heksan	✓	✓	✓
dimetil sulfoksid	✓	✓	✓
etil-acetat	✓	✓	✓
dietil-eter	✓	✓	✓
diklormetan	✓	✓	✓
heptan	✓	✓	✓
petrolej eter	✓	✓	✓
izopropanol	✓	✓	✓
metanol	✓	✓	✓

\*Legenda:

✓ organsko i eutektičko otapalo su uspješno homogenizirani, otapala su međusobno u potpunosti otopljena, nema pojave raslojavanja dva otapala

#### 4.3. KINETIČKA REZOLUCIJA (*R,S*)-1-FENILETANOLA

Povećana svijest o važnosti kiralnosti i njezinoj snažnoj povezanosti s biološkom aktivnošću, kritičnom posebno za farmaceutsku, prehrambenu i poljoprivrednu industriju, stvorila je ogromnu potrebu za razvojem enantiomerno čistih spojeva uz smanjenu cijenu (Ahmed i sur., 2012). Jedna od važnih skupina spojeva su kiralni sekundarni alkoholi, a posebno kiralni (*R,S*)-1-feniletanol, koji se koristi kao konzervans, boja, inhibitor apsorpcije kolesterola, kao blagi cvjetni miris i kao prekursor za sintezu enantiomerno čistih aktivnih farmaceutskih sastojaka (Stradomska i sur., 2021). Slijedom toga, razvijene su različite metode za njegovu pripremu. Među nekoliko proizvodnih putova, kinetička rezolucija, a u novije vrijeme, i dinamička kinetička rezolucija čine se najučinkovitijim i stoga široko proučavanim metodama (De Almeida i sur., 2020).

U području primjene biokatalize, otkriveno je da, iako enzimi zahtijevaju vodu za katalizu, njihova aktivnost u nevodnim medijima je vrlo učinkovita, posebno u primjenama koje uključuju nevodeno okruženje. Također, utvrđeno je da su hidrofobni DES-ovi iz nekoliko kombinacija mentola i masnih kiselina (tj. dodekanska kiselina, dekanoična kiselina i oktanska

kiselina) učinkoviti kao reakcijski medij za lipazu u procesu esterifikacije. Zbog činjenice da dodavanje vode u DES reakcijski medij može aktivirati površinsku površinu enzima, što dovodi do povećanja produkta reakcije, samo mala količina vode (do 10 %) korištena za povećanje prinosa reakcije (Zainal-Abidin i sur., 2021).

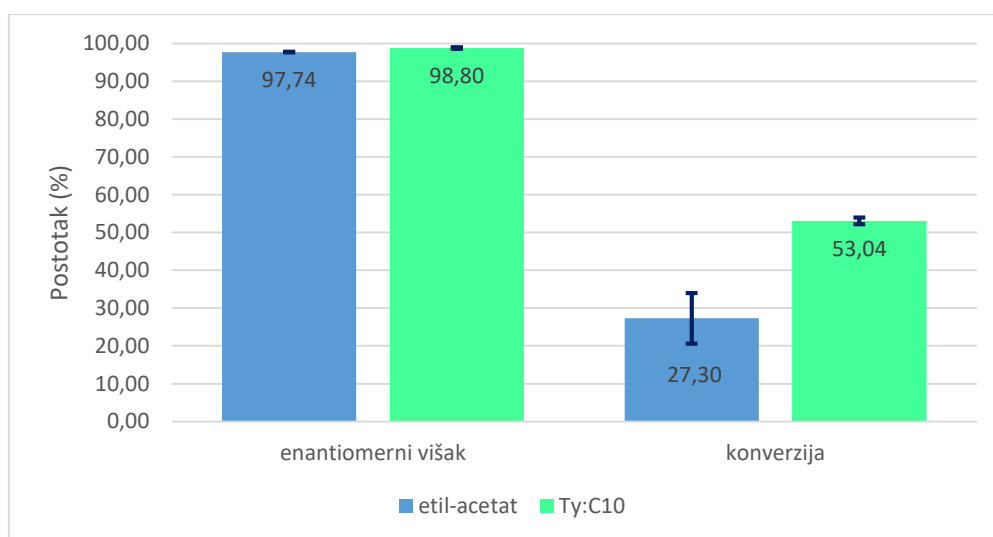
S obzirom na navedeno, u ovom radu je ispitana mogućnost primjene hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala u kinetičkoj rezoluciji (*R,S*)-1-feniletanola pri čemu je kao biokatalizator korištena imobilizirana lipaza izolirana iz kvasca *Candida antarctica* te je u hidrofobnu reakcijsku smjesu dodano 1 % vode. Reakcija esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola provedena je u jednom hidrofobnom DES-u na bazi timola i dekanske kiseline kao optimalnom za topljivost supstrata te u jednom hidrofilnom DES-u na bazi kolin-klorida i uree, kako bi se ispitaio učinak polarnosti otapala na tijek reakcije. U svrhu provjere uspješnosti esterifikacije, reakcija je također provedena i u organskom otapalu etil-acetatu. Nastali produkti reakcije su praćeni izdvajanjem uzorka (poglavlje 3.2.5.) i analizom pomoću plinske kromatografije (poglavlje 3.2.6.). Prethodno je izrađen baždarni dijagram (*S*)-1-feniletacetata prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta (Slika 7). Nakon provedene kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola te analize na plinskom kromatografu spregnutom s masenim detektorom, izračunate su vrijednosti konverzije procesa redukcije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak reakcije ( $ee$ ) prema formulama [1] i [2], te su izračunate volumetrijska produktivnost esterifikacije ( $V_p$ ) i specifična produktivnost enzima ( $V_E$ ) prema formulama [3] i [4]. U tablici 4 su prikazani svi rezultati izračunatih vrijednosti za otapala Ty:C<sub>10</sub>, etil-acetat i ChCl:U10%.

**Tablica 4.** Prikaz rezultata kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola

otapalo	$ee$ (%)	$\eta$ (%)	$V_p$ (mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$V_E$ ( $\mu$ mol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Ty:C <sub>10</sub>	98,79999	53,03815	0,01326	0,0442
etil-acetat	97,74133	27,29852	0,006825	0,02275
ChCl:U10%	>98	24,7643	0,006191	0,02063

\*Kratice: timol:dekanska kiselina (Ty:C<sub>10</sub>), kolin-klorid:urea, w (H<sub>2</sub>O)=10 % (ChCl:U10%), enantiomerni višak ( $ee$ ), konverzija procesa esterifikacije ( $\eta$ ), volumetrijska produktivnost esterifikacije ( $V_p$ ), specifična produktivnost enzima ( $V_E$ )

Dobivene vrijednosti koristile su za procjenu uspješnosti reakcije u etil-acetatu i niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (Ty:C<sub>10</sub> i ChCl:U10%). Kao otapalo s najvećim udjelom konverzije od 53,04 %, timol:dekanska (Ty:C<sub>10</sub>) dokazano je najbolje otapalo od ispitanih otapala za provedbu reakcije esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola te nadmašuje uspješnost konverzije u odnosu na etil-acetat i kolin-klorid:ureu s masenim udjelom vode od 10 % (ChCl:U10%). Enantiomerni višak je zadovoljavajuć i veći od 97 % za sva tri korištena otapala. Također, enantiomerni višak (*ee*) najmanji je za etil-acetat, a najviši je za naše najuspješnije otapalo Ty:C<sub>10</sub> i iznosi 98,80 %. Na Slici 12 grafički su prikazani konverzija procesa ( $\eta$ ) i enantiomerni višak reakcije (*ee*) kinetičke rezolucije i esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola u odabranom hidrofobnom zelenom otapalu (Ty:C<sub>10</sub>) i etil-acetatu.



**Slika 12.** Grafički prikaz rezultata konverzije i enantiomernog viška za niskotemperaturno eutektičko otapalo Ty:C<sub>10</sub> i za organsko otapalo etil-acetat

Stadomska i sur. (2021) su proveli eksperimente za dvije vrste estera: alkil (etil i izopropil) i enol (vinil i izopropenil) acetate, a kao katalizatore reakcije su koristili komercijalni Novozym 435 i CALB imobiliziran na silicij dioksidu modificiranom metilnim skupinama (MCF-3.0Me), te je reakcija provedena u organskom otapalu toluenu. Iz njihovih se rezultata može zaključiti da su i za CALB-MCF-3.0Me i za Novozym 435, enol acetati bili najučinkovitija acilirajuća sredstva. Za vinil acetat je uočena učinkovitost konverzije od 20 % nakon 5 sati za katalizator CALB-MCF-3.0Me, dok je značajna učinkovitost konverzije od 48 % nakon 5 sati dobivena za katalizator Novozym 435 koji je korišten i u ovom radu. Stoga, konverzija od 53,04 % dobivena u hidrofobnom DES otapalu (Ty:C<sub>10</sub>) je izniman rezultat, s obzirom da u literaturi nije nikada

provedena reakcija esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu. Lipaze, formalno triacilglicerol hidrolaze (EC 3.1.1.3), pripadaju najsvestranijim biokatalizatorima koji se primjenjuju u organskoj sintezi, bilo u reakcijama hidrolize ili sintezi estera (acilacijske reakcije), u kojoj obično pokazuju visoku enantioselektivnost i u organskim otapalima, no nisu specifični enzimi za esterifikaciju (*R*)-1-feniletanola (Stadomska i sur., 2021), te je dobivena konverzija od 53,04 % i teoretski maksimalna moguća jer lipaza kao enzim nije specifična za provedenu esterifikaciju (*R,S*)-1-feniletanola. Sljedeći korak u istraživanju bi bilo pomicanje racemizacije s (*R*) u (*S*) primjenom metalnog katalizatora, odnosno dinamička kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola.

Uspješno je dizajnirano za kinetičku rezoluciju (*R,S*)-1-feniletanola koje je po svojim karakteristikama hidrofobno niskotemperaturno eutektičko otapalo (Ty:C<sub>10</sub>), a izabrano je na temelju optimalne topljivosti supstrata kinetičke rezolucije, vinil acetata i (*R,S*)-1-feniletanola u odabranom otapalu. Po prvi puta je uspješno provedena reakcija kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola u hidrofobnom DES-u i dobiven je pomak (sa 27,30 % na 53,04 %) s obzirom na korišteno referentno organsko otapalo etil-acetat.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Računalni program COSMO*therm* uspješan je alat za računalno predviđanje topljivosti supstrata u ispitivanim otapalima kako bi se umanjili eksperimentalni postupci eksperimentalnog ispitivanja topljivosti te se tako smanjila potrošnja kemikalija.
2. Računalno dobivena topljivost je potvrđena eksperimentalnom provjerom topljivosti supstrata u otapalima koja su se pokazala najuspješnija, te u jednom neuspješnom otapalu.
3. Najmanji koeficijent aktivnosti ( $\ln(\gamma)$ ) u softveru COSMO*therm* izračunat je za otapalo Ty:C<sub>10</sub>, također eksperimentalno potvrđeno kao otapalo koje najbolje otapa ispitivane supstrate vinil acetata i (*R,S*)-1-feniletanol.
4. Uspoređujući enantiomerni višak i konverzija reakcije u odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (Ty:C<sub>10</sub> i ChCl:U10%) i etil-acetatu, esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola u (*S*)-1-feniletil acetat pomoću imobilizirane lipaze izolirane iz kvasca *Candida antarctica*, najuspješnija je u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:C<sub>10</sub> u kojem je ostvarena konverzija od 53,04 % te enantiomerni višak u korist (*S*)-enantiomera od 98,80 %.
5. Uspješnost provedbe reakcije esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola u (*S*)-1-feniletil acetat pomoću imobilizirane lipaze izolirane iz kvasca *Candida antarctica*, potvrđena je ostvarenom konverzijom supstrata u produkt od 53,04 % u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:C<sub>10</sub>, stoga možemo zaključiti da je enzim lipaze aktivan u ispitanom hidrofobnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu.



## 6. LITERATURA

Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK (2004) Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (29), 9142-9147.

Ahmed M, Kelly T, Ghanem A (2012) Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation, *Tetrahedron Lett.*, **68** (34), 6781-6802.

Anastas PT, Zimmerman JB (2003) Peer Reviewed: Design Through the 12 Principles of Green Engineering, *Environ. Sci. Technol.*, **37** (5), 94A-101A.

Cvjetko-Bubalo M, Panić M, Radošević K, Radojčić Redovniković I (2016) Methods for Deep Eutectics Solvents Preparation. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **11** (3-4), 164-168.

Choi YH, Verpoorte R (2019) Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents, *Curr. Opin. Food Sci.*, **26**, 87-93.

Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal. Chim. Acta*, **766**, 61-68.

De Almeida LA, Marcondes T, Milagre C, Milagre H (2020) Lipase-oxovanadium heterogeneous catalysis system: a robust protocol for the dynamic kinetic resolution of *sec*-alcohols, *ChemCatChem*, **12** (10), 2849-2858.

Eckert F, Klamt A (2002) Fast solvent screening via quantum chemistry: COSMO-RS approach, *AIChE J.*, **48** (2), 369-385.

El Achkar T, Fourmentin S, Greige-Gerges H (2019) Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds, *J. Mol. Liq.*, **288**, 111028. doi:10.1016/j.molliq.2019.111028.

Florindo C, Oliveira FS, Rebelo LPN, Fernandes AM, Marrucho IM (2014) Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2** (10), 2416-2425.

González-Miquel M, Díaz I (2021) Green solvent screening using modeling and simulation, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **29**, 100469. doi:10.1016/j.cogsc.2021.100469.

Gorke JT, Srienc F, Kazlauskas RJ (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents, *ChemComm*, **10**, 1235-1237.

Gutiérrez MC, Ferrer ML, Mateo CR, del Monte F (2009) Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures, *Langmuir*, **25** (10), 5509-5515.

- Khodaverdian S, Dabirmanesh B, Heydari A, Dashtban-moghadam E, Khajeh K, Ghazi F, (2018) Activity, stability and structure of laccase in betaine based natural deep eutectic solvents, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 2574-2579.
- Klamt A, Jonas V, Burger T, Lohrenz JCW (1998) Refinement and Parametrization of COSMO-RS, *J. Phys. Chem. A*, **102** (26), 5074-5085.
- Liu P, Hao J, Mo L, Zhang Z (2015) Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions, *RSC Adv.*, **5** (60), 48675-48704.
- Marrucho IM, Florindo C, Branco LC (2019) Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents, *ChemSusChem*, **12** (8), 1549-1559.
- Mulvihill MJ, Beach ES, Zimmerman JB, Anastas PT (2011) Green Chemistry and Green Engineering: A Framework for Sustainable Technology Development, *Annu Rev Environ Resour*, **36** (1), 271-293.
- Paiva A, Matias AA, Duarte ARC (2018) How do we drive deep eutectic systems towards an industrial reality?, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **11**, 81-85.
- Palmelund H, Andersson MP, Asgreen CJ, Boyd BJ, Rantanen J, Lobmann K (2019) ‘Tailor-made solvents for pharmaceutical use? Experimental and computational approach for determining solubility in deep eutectic solvents (DES)’, *Int. J. Pharm.*, **1**, 1567-2590.
- Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **96** (1), 14-30.
- Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syldatk C, Holtmann D (2019) Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis, *Trends Biotechnol.*, **37** (9), 943-959.
- Pena-Pereira F, Namieśnik J (2014) Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: Sustainable Solvents for Extraction Processes, *ChemSusChem*, **7** (7), 1784-1800.
- Radojčić Redovniković I, Mitar A, Panić M, Prlić Kardum J, Halambek J, Sander A, i sur. (2019) Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid, *Chem Biochem Eng Q*, **33** (1), 1-18.
- Santana-Mayor Á, Rodríguez-Ramos R, Herrera-Herrera AV, Socas-Rodríguez B, Rodríguez-Delgado MA (2021) Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry, *TrAC Trends Analyt Chem*, doi:10.1016/j.trac.2020.116108.
- Stradomska D, Heba M, Czernek A, Kuźnik N, Gillner D, Maresz K, i sur. (2021) Lipase Immobilized on MCFs as Biocatalysts for Kinetic and Dynamic Kinetic Resolution of sec-Alcohols’, *Catalysts*, **11** (4), 518. <https://doi.org/10.3390/catal11040518>
- Tundo P, Anastas PT, Black D, Breen J, Collins T, Memoli S, i sur. (2000) Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview, *Pure Appl. Chem*, **72** (7), 1207-1228.
- Vanda H, Dai Y, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH (2018) Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents, *C R Chim*, **21** (6), 628-638.

Yang T-X, Zhao L-Q, Wang J, Song G-L, Liu H-M, Cheng H, Yang Z (2017) Improving whole-cell biocatalysis by addition of deep eutectic solvents and natural deep eutectic solvents, *ACS ACS Sustain. Chem. Eng.*, DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b00285.

Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Wong WF (2021) Hydrophobic deep eutectic solvents: Current progress and future directions, *J Ind Eng Chem*, **97**, 142-162.

Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jerome F (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem Soc Rev*, **41 (21)**, 7108-7146.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

*Izjavljujem pod moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Galović Patricia*

Patricia Galović