Stabilnost imobilizirane lipaze u kolinijevom eutektičnom otapalu

Šarac, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:218873

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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
Preddiplomski studij – Biotehnologija

Andrea Šarac
6456/BT

STABILNOST IMOBILIZIRANE LIPAZE U KOLINIJEVOM EUTEKTIČNOM OTAPALU

Modul: Biotransformacije
Mentorica: izv.prof. dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

STABILNOST IMOBILIZIRANE LIPAZE U KOLINIJEVOM EUTEKTIČNOM OTAPALU

Andrea Šarac, 6456/BT

Sažetak: Obzirom da je primjena otapala u proizvodnji industrijski važnih kemikalija neizbježna, u posljednjih desetak godina intenzivno se istražuju nova, ekološki prihvatljiva otapala. Eutektična otapala pripadaju novoj generaciji nehlapljivih i stabilnih otapala te se intenzivno proučavaju kao zamjena za organska otapala u kemijskoj i biotehnološkoj industriji. U cilju prikupljanja znanja o ponašanju lipaza, enzima od industrijskog značaja,u ovim novim otapalima, u ovom radu ispitana je stabilnost lipaze u kolinijevom eutektičnom otapalu.

Ključneriječi: butil-acetat, eutektična otapala, lipaza, stabilnost enzima
Rad sadrži: 26 stranica, 6 slika, 6 tablica, 31 literaturni navod
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format)pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
Pomoć pri izradi: dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo, viši asistent
Rad predan:

DOCUMENTATION CARD

Final work

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

STABILITY OF IMOBILIZATED LIPASE IN CHOLINIUM-BASED DEEP EUTENTIC SOLVENT

Andrea Šarac, 6456/BT

Abstract: Since the application of solvents in producing industrial important chemichals is unavoidable, in the last decade new and environmentally friendly solvents are intensively explored. Deep eutectic solvents belong to the new generation of non-volatile and stabile solvents, and are intensively studied as a replacement for organic solvents in chemical and biotechnological industry. In order to gather knowledge about lipase behaviour in these new solvents, within this work the stability of lipase in cholinium-based deep eutectic solvents was studied.

Keywords: butyl-acetate , deep eutectic solvents, enzyme stability, lipase
Thesis contains: 26 pages, 6 figures, 6 tables, 31 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: Assoc. prof. Ivana Radojčić Redovniković
Tehnical support snd assistance: Ph.D. Marina Cvjetko Bubalo,ScientificAssistant
Thesis delivered:

1. UVOD **1**

2. TEORIJSKI DIO **2**

2.1.ZELENA OTAPALA ZA ZELENE TEHNOLOGIJE **2**

2.1.1. Ionske kapljevine **2**

2.1.2. Superkritični i subkritični fluidi **4**

2.1.2.1. Superkritični CO_2 ..... **4**

2.1.2.2.Voda- superkritično i subkritično stanje **5**

2.1.3. Eutektična otapala **6**

2.2. MIKROBNE LIPAZE: SVOJSTVA I INDUSTRIJSKA PRIMJENA **7**

2.2.1. Svojstva lipaza **7**

2.2.2. Primjene lipaza **8**

2.2.2.1. Proizvodnja novih biopolimernih materijala **9**

2.2.2.2. Proizvodnja biodizela **10**

2.2.2.3. Sinteza finih kemikalija **10**

2.2.2.4. Lipaze u dijagnostici i medicini **10**

3. EKSPERIMENTALNI DIO **12**

3.1.MATERIJALI **12**

3.1.1. Enzimski preparat **12**

3.1.2. Kemikalije **12**

3.1.3. Oprema **12**

3.2. METODE RADA **13**

3.2.1. Sinteza tercijarnih eutektičnih smjesa ChCl:EG:H_2O **13**

3.2.2. Sinteza butil-acetata katalizirana lipazom **14**

3.2.2.1. Određivanje koncentracije butil-acetata **14**

3.2.2.2.Određivanje stabilnosti lipaze u tercijarnim eutektičnim smjesama i *n*-heptanu **15**

4. REZULTATI I RASPRAVA **17**

4.1. Priprava tercijarnih eutektičnih smjesa **17**

4.2. Stabilnost lipaze u tercijarnoj smjesi ChCl:EG:H_2O **17**

5. ZAKLJUČCI **22**

6. LITERATURA 23

1.UVOD

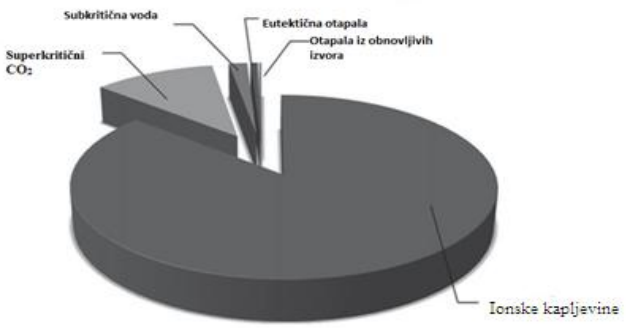
Danas se mnoga hlapljiva i zapaljiva organska otapala koriste u većini industrijskih procesa te je procjenjeno da gotovo 60% svih industrijskih emisija i oko 30% emisija koje se odnose na hlapljive organske komponente potječe od primjene istih (Anastas i Eghbali,2010). Stoga se u posljednjem desetljeću razvija potreba za smanjenjem primjene štetnih organskih otapala kroz program nazvan *zelena kemija*. Cilj tog programa je pronaći kompromis između ekoloških, ekonomskih i socijalnih zahtjeva, a jedan od prioriteta je i pronalazak novih ekološki i ekonomski prihvatljivih otapala. *Zelena* otapala trebala bi biti netoksična, imati nisku hlapljivost, biti kemijski i fizički stabilna, imati mogućnost višekratne uporabe te biti jednostavna za rukovanje. Otapala koja su se najviše približila ovim zahtjevima su superkritični i subkritični fluidi, ionske kapljevine, eutektična otapala i otapala iz prirodnih/obnovljivih sirovina. Zahvaljujući njihovim osnovnim karakteristikama kao što su neznatna hlapljivost, nezapaljivost, velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost, mogućnosti reciklacije te veliki brojmogućih struktura ovih otapala koji u konačnici rezultiraju različitim fizikalno-kemijskim svojstavima, ionske kapljevine i eutektična otapala pokazala su se prikladnima za raznovrsnu upotrebu u organskoj kemiji, (bio)katalitičkim procesima te procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenti.

U cilju prikupljanja znanja o ponašanju lipaza u eutektičnim otapalima, u ovom radu je ispitana stabilnost imobilizirane lipaze u kolinijevom eutektičnom otapalu.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA OTAPALA ZA ZELENE TEHNOLOGIJE

U posljednjem desetljeću razvija se potreba za smanjenjem primjene štetnih organskih otapala kroz program nazvan *zelena kemija*. Jedan od prioriteta ovog programa je i pronalazak novih ekološki i ekonomski prihvatljivih otapala. Otapala koja su se najviše približila ovim zahtjevima su superkritični i subkritični fluidi, ionske kapljevine, eutektična otapala i otapala iz prirodnih/obnovljivih sirovina (slika 1).



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

2.1.1. Ionske kapljevine

Tijekom posljednih 15 godina ionske kapljevine (*eng*. Ionic Liquids, ILs), organske soli čija su tališta ispod 100 °C, poprimaju sve veću pozornost u znanstvenim i industrijskim krugovima. Značajke koje ih čine atraktivnima, kako s tehnološkog tako i ekološkog gledišta, zanemariva su hlapljivost, nezapaljivost i stabilnost (toplinska, kemijska i elektrokemijska). Sastavljene su u potpunosti od ionskih vrsta (najčešće veliki organski kation te organski ili anorganski anion) kojeimaju mogućnost strukturne nadogradnje pa je stoga moguće

dizajnirati otapalo za posebnu namjenu (Earle i Seddon, 2010; Van Rantwijk i Sheldon, 2007).Kationi u ILs obično su različito supstituirane razgranate molekule niske simetrije koje sadrže pozitivno nabijeni dušikov, fosforov ili sumporov atom u paru s organskim ili anorganskim anionompoput halogenida (npr. [Br], [Cl]), tetrafluorborata [BF_4], heksafluorfosfata [PF_6], bis[(trifluormetil)sulfonil]imida [$(CF_3SO_3)_2N$] ili [Tf_2N], acetata [CH_3CO_2] i dicijanamida [$N(CN)_2$]. Nedavno su opisane i ILs iz prirodnih izvora (npr. organske soli, aminokiseline, šećeri i kolin) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Obzirom da je broj mogućih kemijskih struktura ILs ogroman, njihova fizikalno-kemijska svojstva su različita pa ih je teško generalno karakterizirati.Međutim, nisko talište je najistaknutije svojstvo ovih otapala pa je tako raspon temperatura u kojem su ILs bazirane na imidazolu u tekućem stanju procjenjen između -20 i 700 °C. Budući da su komponente ILs (ioni) povezani jakim Coulombovim silama, tlak pare iznad njihove površine je beznačajan. Općenito, ove soli su viskoznije od većine organskih otapala te im je gustoća veća od gustoće vode.Površinska napetost ILs niža je od površinske napetosti vode, a viša od površinske napetosti *n*-alkana (Zhang i sur., 2006). Ova fizikalna svojstva ILs (gustoća, viskoznost i površinska napetost) su od izrazite važnosti za njihovu primjenu u industrijskom mjerilu budući da određujuvažne parametre procesa poput brzine odvajanja tekuće faze, prijenosa mase te snage miješanja i crpljenja (Niedermeyer i sur., 2012).

Zahvaljujući njihovoj dobroj električnoj vodljivosti i činjenici da su elektrokemijski inertne u širokom rasponu potencijala, ILs su uglavnom ispitivane kao otapala u elektrokemiji. Međutim, razvojem raznih strukturno različitih ILs, interes istraživanja proširio se i na druga polja primjene u kemijskoj industriji i biotehnologiji, procesnoj tehnologiji i analitici teu razvoju farmaceutika i funkcionalnih tekućina (tablica 1) (Plechova i Seddon, 2008; Patel i Lee, 2012)**.** Također, potrebno je spomenuti da zahvaljujući njihovom niskom tlaku para i termalnoj stabilnosti, ILs se mogu relativno lako reciklirati i ponovo upotrijebiti nakon procesa, što je iznimno važno s ekološke i ekonomske točke gledišta, a i u skladu je s propisima o gospodarenju otpadom propisanih direktivom Europske unije 2008/98/EC54. ILs još uvijek nisu u širokoj komercijalnoj upotrebi, međutim, neke tvrtkerazvile su industrijske procese koje ih uključuju (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Tablica 1. Primjena ionskih kapljevina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015)

Primjene ionskih kapljevina	

Procesna tehnologija	Ekstrakcija tekuće- tekuće, ekstrakcija čvrsto- tekuće, plinska kromatografija
Sinteza i kataliza	Otapala za organske reakcije, agensi za imobiliziraciju
Biotehnologija	Procesiranje biomase, otapala za enzimske reakcije
Farmaceutici	Aktivni farmaceutski sastojci

2.1.2. Superkritični i subkritični fluidi

Flud zagrijavan do temperature iznad kritične i komprimiran iznad kritičnog tlaka poznat je kao superkritični fluid. Superkritični fluidi imaju fizikalna svojstva između svojstava plinova i tekućina (Brunner, 2005). U teoriji bilo koje otapalo se može upotrijebiti kao superkritični fluid; međutim, tehnička održivost (kritična svojstva), toksičnost, cijena i moć otapanja određenih komponenti određuju učinkovitost i isplativost istog (Pereira, Angela i Meirles, 2010). Za sada je nekoliko spojeva ispitano u superkritičnom stanju (npr. etan, propan, heksan, pentan, etilen, dimetil eter butan, dušikov oksid) no dva superkritična fluida od posebnog su interesa: ugljikov dioksid (CO_2) i voda.

2.1.2.1. Superkritični CO_2

Konačan izbor superkritičnog fluida ovisit će o specifičnosti primjene i dodatnim faktorima kao što su sigurnost, zapaljivost, topljivost pri određenim uvjetima i cijena samog fluida. Sposobnost superkritičnog CO_2za otapanje određenih komponenata može se sažeti u nekoliko jednostavnih pravila (Brunner, 2005):

- Otapa nepolarne ili blago polarne spojeve;
- Moć otapanja za nisko molekulske spojeve je velika i smanjuje se s porastom molekulske mase;
- Superkritični CO_2 ima visok afinitet prema organskim spojevima s kisikom srednje molekulske mase;

- Proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne tvari su netopljivi u superkritičnom CO_2:
- Superkritični CO_2 povećanjem tlaka ima sposobnost razdvajanja spojeva koji su manje hlapivi, imaju veću molekulsku masu i/ ili su polarniji.

CO_2 je općenito priznato kao sigurno (GRAS) otapalo tako da su proizvodi ekstrahirani s CO_2 sigurni za ljudsko zdravlje (Rutkowska i Stolyhwo, 2009).Neka područja primjene superkritičnog CO_2 prikazana su u tablici 2 (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Tablica 2. Primjene superkritičnog CO_2 (Cvjetko Bubalo i sur., 2015)

Primjene superkritičnog CO_2	
Prehrambena industrija	Kava, čaj, hmelj, bilje i začini, arome
Nutraceutici i farmaceutici	Karotenoidi, likopen, astaksantin
Kozmetički pripravci	Mirisi, aktivni sastojci za kozmetičke pripravke
Kemijske reakcije	Polimerizacija, hidrogenacija

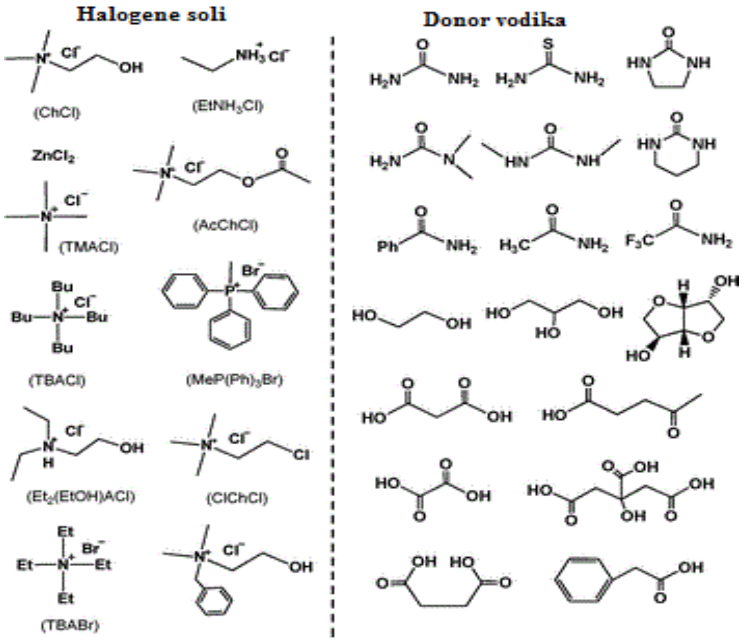
2.1.2.2. Voda- superkritično i subkritično stanje

Voda je najvažnije otapalo u prirodi te u superkritičnom stanju ima zanimljiva svojstva kao reakcijski medij. Obzirom da je ekstremno polarno otapalo, voda se uglavnom koristiti za ekstrakciju visoko polarnih spojeva te se kao takva ne može primjeniti za ekstrakciju manje polarnih ili nepolarnih spojeva. Međutim, ostala svojstva koja posjeduje (nezapaljivost, netoksičnost, dostupnost i niska cijena) pridonose proizvodnji sigurnih ekstrakta (bez tragova otrovnih otapala). Osnovni nedostaci vode kao otapala za ekstrakciju (visoka polarnost i niska selektivnost za nisko polarne i nepolarne spojeve) mogu se prevladati povećanjem tlaka i temperature vode. Kritična točka vode definirana je kritičnim tlakom od 22,1 MPa i kritičnom temperaturom od 374,2 °C. Iznad kritičnog tlaka i temperature voda je u superkritičnom stanju, i naziva se superkritičnom vodom. Iznad temperature vrenja (100 °C), ali ispod kritične temperature (374,2 °C) i pri tlaku dovoljno visokom da ostane u tekućem stanju smatra se da je voda u subkritičnom stanju, i naziva se subkritičnom vodom (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Ekstrakcija subkritičnom vodom ubraja se u grupu učinkovitih „zelenih“ tehnika

jer je jeftina, učinkovita i potrošački prihvatljiva tehnika za ekstrakciju vrijednih nutrijenata (aromatski spojevi, fenoli, antocijanini, itd.). Također je smanjeno vrijeme ekstrakcije u odnosu na ostale tehnike ekstrakcije (Kubatova i sur., 2001). Alternativnim pristupom (primjenom subkritične i/ili superkritične vode) omogućava se visoka ekstrakcijska selektivnost bez upotrebe toksičnih organskih otapala što nije slučaj kod klasičnih ekstrakcijskih tehnika gdje se koriste razna organska otapala (heksan, metilen klorid,metanol, itd.) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.1.3. Eutektična otapala

Eutektična otapala (*eng.* Deep Eutentic Solvents, DES) predstavljaju novu generaciju tekućih soli baziranih na ILs. Takva otapala su smjese akceptora vodika poput kvaternih amonijevih soli (npr. kolin-klorid) i prirodno izvedenog, nenabijenog donora vodika (npr. amini, šećeri, alkoholi i karboksilne kiseline) u određenom molarnom omjeru (slika 2). Glavna karakteristika ovih otapala je da nastala smjesa ima nižu točku tališta od točke tališta svake pojedine komponente (Paiva i sur., 2014). Iako DES nisu u potpunosti sastavljena od ionskih vrsta, često se nazivaju četvrtom generacijom ionskih tekućina. Razlog tome su slična svojstva ILs-a i DES-a (nehlapljivost, nezapaljivost, visoka viskoznost, slične sirovine za njihovu pripravu). DES su ujedno i „dizajnirana otapala“ zbog brojnih strukturnih mogućnosti kao i dizajniranja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava za određene namjene. Također, niska cijena komponentni, jednostavna priprema, niska ili zanemariva toksičnost te održivost s obzirom na okoliš i ekonomsku korist čine DES poželjnim otapalima (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Danas se koriste kao otapala u organskoj sintezi i (bio)katalizi, proizvodnji polimera, elektrokemiji, nanomaterijalima, procesima razdvajanja i analizi, biomedicini i ekstrakciji biološki aktivnih komponenti iz biljnih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).



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

2.2. MIKROBNE LIPAZE: SVOJSTVA I INDUSTRIJSKA PRIMJENA

2.2.1. Svojstva lipaza

„ Istinske“ lipaze definirane su kao karboksilesteraze koje kataliziraju hidrolizu i sintezu dugolančanih acil-glicerola koristeći trigliceride kao standardni supstrat. Lipaze su atraktivne jer pokazuju izuzetnu kemoselektivnost, regioselektivnost i stereoselektivnost, ali i mnoge od njih mogu se proizvesti u velikim količinama u mikrobnim organizmima kao što su bakterije i gljive (Eggert i Jaeger, 2002). Od 80-tih godina prošlog stoljeća raste broj dostupnih lipaza te se zahvaljujući svojstvima kao što su biorazgradivost, visoka specifičnost i visoka katalitička učinkovitost koriste kao industrijski biokatalizatori. Najpoželjnije karakteristike lipaza su njihova sposobnost da koriste mono-, di-, i trigliceride kao i slobodne masne kiseline u transesterifikaciji, niska inhibicija produktom, visoka aktivnost/prinos u nevodenom mediju, nisko reakcijsko vrijeme, otpornost na promjene temperature, pH i višekratna upotreba imobiliziranih lipaza (Kumar i sur., 2012). Također, jedan od razloga njihove

biotehnološke primjene je stabilnost u organskim otapalima te aktivnost bez dodatka kofaktora (Jaeger i Reetz, 1998). Međutim, metalni ioni mogu stimulirati ili inhibirati mikrobnu proizvodnju enzima pa tako ioni soli kao što su Ca2+, Cd2+ i Fe2+ poboljšavaju aktivnost imobiliziranih biokatalizatora dok neki iona kao Co2+, Zn2+, Mg2+, Mn2+, Al3+ i Na+ imaju blagi inhibitorni učinak. Iako su pronađene lipaze s optimumom pri nižim i višim rasponima pH i temperature, ovisno o mikrooganizmu iz kojeg potječu, poznato je da većina bakterijskih lipaza ima neutralni ili lužnati optimalni pH. Općenito, bakterijske lipaze imaju optimalnu temperaturu u rasponu 30 - 60 °C (Verma i sur., 2012).

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

2.2.2. Primjena lipaza

Lipaze se primjenjuju u različitim područjima industrije od hrane, mlječnih proizvoda, farmaceutskih proizvoda, agrokemikalija i deterdženata do oleo-kemikalija, industrije čajeva, kozmetike, kože i nekihprocesa bioremedijaciji (tablica3). Upravo zato noviji mikroorganizmi namjenjeni su za proizvodnju lipaza željenih svojstava. Razumijevanje odnosa između funkcije i strukture omogućit će istraživačima da prilagode nove lipaze za biotehnološku primjenu(Verma i sur., 2012).

Tablica 3. Industrijske primjene lipaza (Verma i sur., 2012).

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

2.2.2.1. Proizvodnja novih biopolimernihmaterijala

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

2.2.2.2. Proizvodnja biodizela

Biodizel je smjesa alkilnih monoestera i dobiva se transesterifikacijom biljnih ulja (uljane repice, soje, suncokreta) metanolom, etanolom ili drugim alkoholom. Te reakcije transesterifikacijemogu biti katalizirane lipazama u organskim otapalima. Međutim, visoka cijena odgovarajućeg biokatalizatora predstavlja problem prilikom proizvodnje u industrijskom mjerilu. Nedavno su predstavljene dvije strategije za rješenje ovog problema: imobilizacijom lipaze iz *Pseudomonas fluorscens* povećana je stabilnost čak i nakon ponovnog korištenja; i citoplazmatska prekomjerna ekspresija lipaze iz *Rhizopusoryzae* u *Saccharomyces cerevisiae* uz naknadno zamrzavanje-odmrzavanje i sušenje zrakom rezultiralo je u stanični biokatalizator koji katalizira metanolizu u reakcijskom sustavu bez otapala (Iso i sur, 2001).

2.2.2.3. Sinteza finih kemikalija

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

2.2.2.4. Primjena lipaza u dijagnostici i medicini

Obećavajuće novo područje u dijagnostici je upotreba mikrobnih lipaza kao biosenzora. Generiranje glicerola iz triacilglicerola i kvantificiranje oslobođenog glicerola ili alternativno neesterificirane masne kiseline kemijskim i enzimskim metodama omogućava lječnicima preciznu dijagnozu pacijentima s kardiovaskularnim problemima. Koriste se u enzimskoj determinaciji seruma triglicerida kako bi generirali glicerol koji se zatim određuje kolorimetrijskim reakcijama vezanim enzimom. Nespecifične lipaze, posebno lipaza iz *C. rugosa* s visokom specifičnom aktivnošću izabrana je kako bi se omogućilo brzo oslobađanje glicerola. Biosenzor lipaze iz *Candida rugosa* razvijen je kao sonda koja se optički konjugira u bio-prepoznavajuću grupu u DNA (Pandey, 2009). Također, njihov povećani nivo može

indicirati određenu infekciju ili bolest pa se tako detekcija stanja kao što su akutni pankreatitis i ozljede gušterače određuje mjerenjem razine lipaze u serumu (Lott i Lu, 1991).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Enzimski preparat

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

3.1.2. Kemikalije

- Anhidrid octene kiseline, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Butil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *n*-Butanol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- *n*-Heptan, C_7H_{16}, p.a., Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD
- Etilen-glikol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

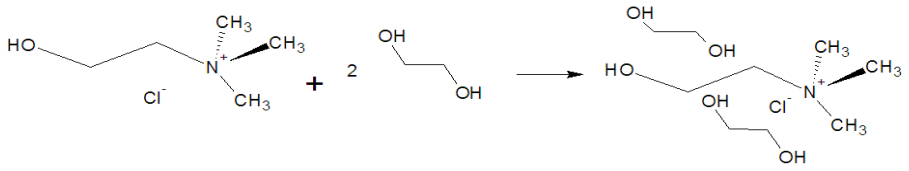
Sve kemikalije upotrebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a voda korištena u sintezi ionskih tekućina i pripravi otopina bila je destilirana ili demineralizirana voda.

3.1.3. Oprema

- Homogenizator, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan

3.2. METODE RADA

3.2.1. Sinteza tercijarnih eutektičnih smjesa ChCl:EG:H_2O



Slika 3. Sinteza eutektičnog otapala kolin-klorid:etilen glikol =1:2 (n) (ChCl:EG).

U tikvici s okruglim dnom kolin-klorid (ChCl) (2,78 g) se pomiješa s etilen-glikolom (EG) (2,48 g) i određenom količinom vode (0,18 - 0,72 g; 0,5 - 2 mol) (tablica 4) te se reakcijska smjesa zagrije do 80 °C pomoću vodene kupelji uz neprestano miješanje tijekom 3 sata (slika 3).Dobivenesutercijarne eutektične smjese ChCl:EG:H_2O u obliku prozirne kapljevine (η = 100%). Prije daljnje primjene, eutektično otapalo se čuva u eksikatoru napunjenom silikagelom.

Tablica 4. Sintetizirane tercijarne smjese ChCl:EG:H_2O

Tercijarna smjesa	Molarni omjer komponenti	Kratica
Kolin klorid:etilen glikol:voda	1:2:0,5	ChCl:EG:0,5mol H2O
	1:2:1	ChCl:EG:1mol H_2O
	1:2:1,5	ChCl: EG:1,5mol H_2O
	1:2:2	ChCl: EG:2mol H_2O

3.2.2. Sinteza butil-acetata katalizirana lipazom

3.2.2.1. Određivanje koncentracije butil-acetata

Kvalitativna i kvantitativna analiza sinteze butil-acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

Kromatografski uvjeti

Kromatografska kolona: Rxi_5Si/MS: 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 mm
Pokretna faza: He
Protok: 109,6 mL min^{-1}
Detektor: maseni spektrometar s elektrosprej ionizacijom (temperatura izvora iona 200 °C; temperatura sučelja 150 °C).
Temperatura kolone: 55 °C
Injektor i detektor: 250 °C
Vrijeme trajanja analize: 3 minute
Vrijeme izlaženja butil-acetata iznosi 2,7 minute.

Izrada baždarnog dijagrama

Prirede se otopine butil-acetata u *n*-heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,0005; 0,001; 0,003; 0,005; 0,008 i 0,01 mol L^{-1}. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanesu se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrta dijagram ovisnosti množinske koncentracije butil-acetata o površini ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije butil-acetata u uzorcima.

Koncentracija butil-acetata tijekom sinteze u organskom otapalu *n*-heptanu računa se izravno prema jednadžbi pravca dobivenoj iz baždarnog dijagrama, dok se koncentracija butil-acetata c_P (mol L^{-1}) tijekom sinteze u eutektičnom otapalu računa prema jednadžbi:

$$c_P = c_{n-hep\tan} \cdot \left(1 + \frac{1}{K_P}\right) \qquad [1]$$

gdje je $c_{n\text{-}heptan}$ ravnotežna koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu (mol L^{-1}), a K_P koeficijent razdjeljenja butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala.

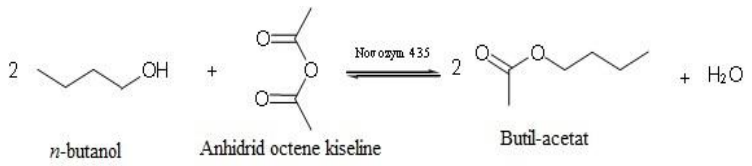
Koeficijent razdjeljenja butil-acetata (K_P) *n*-heptan/eutektično otapalo određuje se prema sljedećem protokolu:

U staklenu kivetu doda se 100 µL eutektičnog otapala, 100 µL *n*-heptana i 6,6 µL (0,05 mmol) butil-acetata. Uzorak se miješa na vorteksu (2.000 okretaj min^{-1}) tijekom 3 min pri temperaturi 25 °C. Koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu određuje se plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja K_P izračunava se kao omjer ravnotežne koncentracije butil-acetata u *n*-heptanu i eutektičnom otapalu prema jednadžbi:

$$K_P = \frac{c_{n-hep\,\tan}}{c_{DES}} \quad [2]$$

gdje je $c_{n\text{-}heptan}$ koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu (mol L^{-1}), a c_{DES} koncentracija butil-acetata u eutektičnom otapalu (mol L^{-1}).

3.2.2.2. Određivanje stabilnosti lipaze u tercijarnim eutektičnim smjesama i *n*-heptanu



Slika 4. Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata aciliranjem *n*-butanola s anhidridom octene kiseline.

Novozym 435 (2,5 mg) inkubiran je u tercijarnoj smjesi ChCl:EG:H_2O (986 µl) i *n*-heptanu pri 25 °C. Enzim je inkubiran tijekom 15 dana, a enzimske reakcije započete su dodatkom anhidrida octene kiseline (4,72µl) i 1-butanola (9,15 µl) u tercijarnu smjesu ili *n*-heptan tako da konačna koncentracija bude 0.05 mol L^{-1} i 0.1 mol L^{-1} (slika 4). Kod

provođenja reakcije u *n*-heptanu u odabranim vremenskim intervalima uzima se 50 μL reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom. Kod provođenja reakcije u eutektičnom otapalu u odabranim vremenskim intervalima izuzima se 100 μL reakcijske smjese iz koje se butil-acetat ekstrahira s 100 μL *n*-heptana, uz snažno miješanje na vorteksu (2.000 okretaj min^{-1}) kroz 2 min, a heptanski ekstrakt se analizira plinskom kromatografijom.

Specifična početna brzina reakcije v_0 (mmol min^{-1} g^{-1}) izračuna se iz nagiba pravca u linearnom području krivulje ovisnosti množine butil-acetata o vremenu reakcije, prema jednadžbi:

$$v_0 = \frac{a_P}{m_E} \qquad [3]$$

gdje je a_P nagib pravca (mmol min^{-1}), a $m_E$masa pripravka Novozym 435.

Relativna aktivnost lipaze A (%) računa se prema jednadžbi:

$$A = \frac{v_{0(inkubacija)}}{v_0} \cdot 100 \qquad [4]$$

gdje je $v_{0(inkubacija)}$ specifična početna brzina esterifikacije izmjerena nakon inkubacije enzima u *n*-heptanu i tercijarnoj eutektičnoj smjesi (mmol min^{-1} g^{-1}), a v_0 specifična početna brzina esterifikacije bez prethodnog izlaganja *n*-heptanu i tercijarnoj eutektičnoj smjesi (mmol min^{-1} g^{-1}).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zahvaljujući sjajnim karakteristikama koje posjeduju, poput biorazgradivosti, visoke specifičnosti i visoke katalitičke učinkovitosti, prihvaćanja neprirodnih supstrata te zadržavanja aktivnosti u nekonvencionalnim otapalima, lipaze se koriste kao industrijski biokatalizatori (Verma i sur., 2012). Obzirom da je primjena otapala u lipazama kataliziranim reakcijama neizbježna (osim vrlo rijetkih primjera gdje se reakcija odvija bez prisustva otapala tj. u suvišku supstrata koji je u tekućem stanju), u posljednjih desetak godina intenzivno se istražuju eutektična otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Ta otapala pripadaju novoj generaciji nehlapljivih i stabilnih otapala te se smatraju *zelenijom* inačicom ionskih kapljevina. Osim što ih je relativno jednostavno pripraviti, sirovine za njihovu primjenu su lako dostupne, jeftine, a pripravljena otapala su biorazgradiva i netoksična (Radošević i sur. 2015),

Cilj ovog rada je ispitati stabilnost imobilizirane lipaze B izolirane iz mikroorganizma *Candida antarctica* (pripravak Novozym 435) u kolinijevom eutektičnom otapalu s etilen-glikolom kao donorom vodika s različitim udjelima vode.

4.1. Priprava tercijarnih eutektičnih smjesa

U svrhu rada pripravljene su tercijarne eutektične smjese ChCl:EG:H_2O (molarni omjer komponenti = 1:2:0,5-2 mol) klasičnim postupcima organske sinteze (tablica 4). Priprava tercijarnih eutektičnih smjesa provodila se jednostavnim postupkom u kojem se polazne sirovine kolin-klorid, etilen glikol i voda pomiješaju u određenom molarnom omjeru te se lagano zagrijavaju uz miješanje dok se ne dobije homogena viskozna kapljevina (η = 100 %).

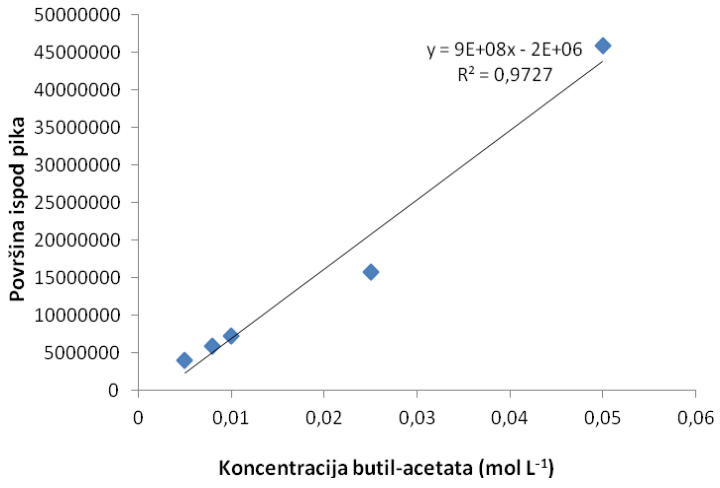
4.2. Stabilnost lipaze u tercijarnoj smjesi ChCl:EG:H_2O

Procjena stabilnosti enzimskog pripravka Novozyme 435 provedena je kako bi se prikazala prikladnost tercijarne smjese ChCl:EG:H2O za lipazom katalizirane reakcije. Kao referentno otapalo korišten je n-heptan u kojem je također ispitana stabilnost enzima. Naime,

u raznim istraživanjima o stabilnosti slobodne i imobilizirane lipaze u hidrofobnim otapalima, kao što je n-heptan, uočeno je da takva otapala zaštićuju sloj esencijalne vode koja okružuje enzim, a koja je nužna za njegovu aktivnost (Romero i sur, 2005; Cvjetko i sur., 2012). U sklopu istraživanja, lipaza je inkubirana u pripravljenim eutektičnim otapalima (uz dodatak određene količine vode) i organskom otapalu tijekom 15 dana pri 25 °C te je u određenim vremenskim intervalima mjerena specifična početna brzina reakcije acilacije 1-butanola anhidridom octene kiseline.

Za potrebe određivanja specifične početne brzine reakcije u eutektičnim otapalimai *n*-heptanu, eutektičnom otapalu (1972,26 µL) dodano je 5 mg pripravka Novozym 435. U određenim vremenskim intervalima dodan je anhidrid octene kiseline (0,05 mol L^{-1}) i *n*-butanol (0,1 mol L^{-1}), areakcijska smjesa intenzivno miješana na vorteksu pri temperaturi 25 °C. Tijek reakcije praćen je izdvajanjem uzorka i analizom uz pomoć plinske kromatografije.

Baždarni dijagram butil-acetata prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta prikazan je na slici 5. Kako bi se izračunala koncentracija butil-acetata u eutektičnom otapalu, prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.1. određen je koeficijent razdjeljenja (K_P) butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala, a vrijednosti su prikazane u tablici 5.



Slika 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije butil-acetata.

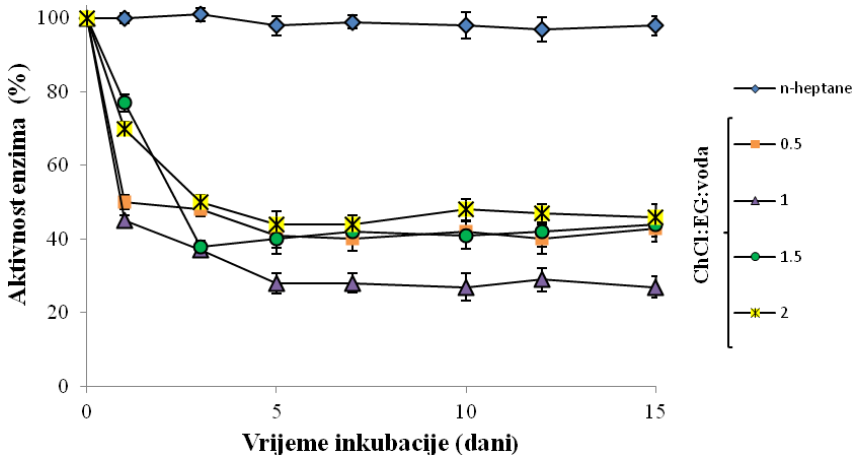
Tablica 5. Koeficijent razdjeljenja butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala (K_P).

Eutektična smjesa	Kratica	K_P
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:0,5)	ChCl:EG:0,5mol H2O	1,29
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:1)	ChCl:EG:1mol H2O	1,22
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:1,5)	ChCl: EG:1,5mol H2O	1,23
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda (molarni omjer 1:2:2)	ChCl: EG:2mol H2O	1,20

U tablici 6 prikazane su vrijednosti specifičnih početnih brzina mjerene u određenim omjer specifične početne brzine zabilježene u određenom vremenskom intervalu i specifične početne brzine bez prethodne inkubacije u otapalu (t = 0 min) (slika 6).

Tablica 6. Specifične početne brzine v_0 sinteze butil-acetata u različitim tercijarnim eutektičnim smjesamaChCl:EG:H_2O (molarni omjer komponenti 1:2:0,5-2 mol) i *n*-heptanu. Reakcijski uvjeti: 0,025 mol L^{-1} anhidrid octene kiseline; 0,05 mol L^{-1} *n*-butanol; 2,5 mg Novozym 435; 25 °C. Inicijalne brzine izračunate su iz linearnog područja krivulja i izražene prema masi enzimskog pripravka Novozym 435.

Inkubacija enzima (dan)	**Specifična početna brzina v_0 (mmol min^{-1} g^{-1})**				
	***n*-heptan**	**ChCl:EG :0,5 mol H_2O**	**ChCl:EG:1 mol H_2O**	**ChCl:EG:1,5 mol H_2O**	**ChCl:EG:2 mol H_2O**
0	1,20	0,12	0,23	0,24	0,59
1	1,20	0,06	0,10	0,19	0,41
3	1,21	0,06	0,09	0,09	0,29
5	1,18	0,05	0,06	0,10	0,26
7	1,19	0,05	0,06	0,10	0,26
10	1,18	0,05	0,06	0,10	0,28
12	1,16	0,05	0,06	0,10	0,28
15	1,18	0,05	0,06	0,11	0,27



Slika 6. Relativna aktivnost *A* lipaze B u pripravku Novozym 435 poslije inkubacije u *n*-heptanu i tercijarnim eutektičnim smjesama ChCl:EG:H_2O (molarni omjer komponenti 1:2:0,5-2 mol). Relativna aktivnost (%) izražena je kao postotak specifične početne brzine izmjerene nakon inkubacije enzima u odnosu na specifičnu početnu brzinu bez prethodnog izlaganja*n*-heptanu i eutektičnim smjesama. Reakcijski uvjeti: 0,025 mol L^{-1} anhidrid octene kiseline; 0,05 mol L^{-1}*n*-butanol; 2,5 mg Novozym 435; 25 °C.

Kao što je očekivano, Novozym 435 je pokazao izvrsnu stabilnost u referentnom otapalu *n*-heptanu tijekom svih 15 dana inkubacije (nije uočen gubitak aktivnosti u usporedbi s aktivnošću izmjerenom bez prethodne inkubacije enzima u ovom otapalu). U svim ispitanim tercijarnim eutektičnim smjesama smanjenje od oko 50 % aktivnosti je izmjereno nakon 3 dana inkubacije, iako produženje vremena inkubacije na 15 dana nije rezultiralo značajnim gubitkom enzimske aktivnosti.

Sličan trend su primijetili Durand i sur. (2012) u kolinijevom eutektičnom otapalu s glicerolom kao donorom vodika. Naime, uočeno je da u prva 24 h dolazi dosmanjenja enzimske aktivnosti za oko 30 % početne aktivnosti inkubacije te nakon toga ne dolazi više do značajne promjene aktivnosti enzima tijekom inkubacije od 30 dana. Taj efekt autori su objasnili da je enzimu potrebno određeno vrijeme da usvojiti konačnu tercijarnu strukturu u eutektičnom otapalu. U ovom radu, nakon razdoblja od 15 dana, preostala aktivnost u za sve ispitivane tercijarne eutektične smjese bila je u rasponu 27 - 46 %. Najbolja stabilnost enzima

opažena je za ChCl:EG:1molH_2O, međutim, nije uočenjasan trend između sadržaja vode u eutektičnom otapalu i preostale enzimske aktivnosti.

Na temelju dobivenih rezultata u ovom radu pokazano je da imobilizirana lipaza B izolirana iz mikroorganizma *Candida antarctica* pokazuje zadovoljavajuću stabilnost u pripremljenim eutektičnim smjesama (tablica 4), pogotovo u ChCl:EG:1molH_2O, no ipak nešto slabiju i odnosu na za referentno otapalo (*n*-heptan). Obzirom na preostalu aktivnost enzima u eutektičnim smjesama nakon 15 dana inkubacije (27 - 46%) može se zaključiti da se ispitivana eutektična otapala mogu primjenjivati u dugim i složenim reakcijama, pa čak i u kontinuirano vođenim procesima. Također, ovo istraživanje predstavlja doprinos u razumijevanju ponašanja lipaza, enzima od industrijskog značaja, u ovim novim zelenim otapalima.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je stabilnost imobilizirane lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antartica* (Novozym 435) tijekom 15 dana inkubacije u kolinijevom eutektičnom otapalu s etilen-glikolom kao donorom vodika s različitim udjelima vode. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Tercijarne eutektične smjese ChCl:EG:H_2O (molarni omjer komponenti 1:2:0,5-2) pripravljene su zagrijavanjem i miješanjem kolin klorida (ChCl), etilen glikola (EG) i vode (H_2O) u zadanim molarnim omjerima.
2. U svim ispitanim tercijarnim eutektičnim smjesama smanjenje od oko 50 % enzimske aktivnosti je izmjereno nakon 3 dana inkubacije, iako produženje vremena inkubacije na 15 dana nije rezultiralo značajnim gubitkom enzimske aktivnosti
3. Najbolja stabilnost enzima opažena je za ChCl:EG:1molH_2O, međutim, nije otkriven jasan trend između sadržaja vode u eutektičnom otapalu i preostale enzimske aktivnosti.
4. Usporedbom stabilnosti lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antartica* u *n*-heptanu s tercijarnim eutektičnim smjesama uočeno je da je stabilnost bolja u *n*-heptanu te da u tom otapalu nije uočen pad aktivnosti lipaze tijekom čitavog perioda inkubacije.
5. U eutektičnim otapalima moguće obavljanje dugih i složenih reakcija, pa čak i koristiti ih u kontinuirano reguliranim procesima.
6. Racionalnim odabirom eutektičnih otapala, ovisno o sadržaju vode, moguće je utjecati na aktivnost i stabilnost enzima.
7. Rezultati prikazani u ovom istraživanju doprinos su razvoju učinkovitih, ekonomičnih i održivih procesa za sintezu industrijski važnih spojeva primjenom ekološki i ekonomski prihvatljivijih otapala

6.LITERATURA

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green chemistry: principles and practice. *Chem.Soc. Rev.* **39**, 301–312.

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

Brunner, G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J. Food Eng*. **67**, 21–33.

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

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J.Chem.Technol. Biotechnol*. doi: 10.1002/jctb.4668.

Cvjetko, M., Vorkapić-Furač, J., Žnidaršič-Plazl, P. (2012) Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. *Process. Biochem*. **47**, 44-50.

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., Villeneuve, P. (2012) Evaluation of deepeutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase - catalyzed reactions. *Process. Biochem*. **47**, 81-89.

Earle, M.J., Seddon, K.R. (2000) Ionic liquids: Green solvents for the future. *Pure. Appl. Chem.***72**, 1391–1398.

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

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

Comment [M1]: Mozes ovo ovako ostaviti, radu jos nije dodjeljeno broj stranice i volumen

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

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

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

Kubatova, A., Miller, D.J., Hawthorne, B.S. (2001) Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root. *J. Chromatogr. A.***923**, 187–194.

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

Comment [I2]: provjeri

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

Niedermeyer, N., Hallett, J.P., Villar-Garcia, I.J., Hunt, P.A., Welton, T. (2012) Mixtures of ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7780–7802.

Paiva, P., Craveiro, R.,Aroso, I.,Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014) Natural deep eutectic solvents−solvents for the 21st century. *ACS. Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.

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

Patel, D.D., Lee, J.M. (2012) Applications of ionic liquids. *Chem. Rec.* **12**, 329–355.

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

Pereira, C.G., Angela, M., Meirles, A. (2010) Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technol.* **3**, 340–372.

Plechova, N.V., Seddon K.R (2008) Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 123–150.

Radošević, K, Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.***112**, 46-53.

Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A., Ghaziaskar, H.S. (2005) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane. *Enzyme. Microb. Technol*. **37**, 42–48.

Rutkowska, J., Stolyhwo, A. (2009) Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO2) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. *Food Chem.* **115**, 745–752.

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

Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.(2007) Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.* **107**, 2757–2785.

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

Zhang, S., Sun, N., He, X., Lu, X. and Zhang, X. (2006) Physical properties of ionic liquids: database and evaluation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. **35**, 1475–1517.

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