

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij - Biotehnologija

Valentina Fičko

6880/BT

**HIDROLIZA (*R,S*)-1-FENILETIL ACETATA U
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA PRIMJENOM KORIJENA
MRKVE I LIPAZE KAO BIOKATALIZATORA
ZAVRŠNI RAD**

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

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Zagreb, 2017.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na razumijevanju i pomoći tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala i Manuli Panić, mag. ing. koja mi je svojim stručnim znanjem i brojnim savjetima pomogla pri pisanju i izradi ovog rada. I posljednju, ali ne manje važnu zahvalu iskazujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i potpori.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

HIDROLIZA (*R,S*)-1-FENILETIL ACETATA U EUTEKTIČKIM OTAPALIMA PRIMJENOM KORIJENA MRKVE I LIPAZE KAO BIODOKATALIZATORA

Valentina Fičko, 0058204414

Sažetak: Primjena *zelene* kemije u proizvodnji komercijalno zanimljivih organskih spojeva sve više raste, zbog štetnih utjecaja industrijske proizvodnje na okoliš i ljude primjenom konvencionalnih metoda. Stoga, prirodna eutektička otapala i provođenje reakcija upotrebom biokatalizatora postaju zanimljiva alternativa za do sada korištena hlapiva organska otapala i klasične kemijske sinteze. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene dva biokatalizatora (lipaza B i korijen mrkve) za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida. Uspješno je provedena hidroliza u prirodnim eutektičkim otapalima koja su se pokazala boljima s obzirom na konvencionalna organska otapala, prema svim ispitanim parametrima (η , ee , V_p i V_E). Zaključuje se da su prirodna eutektička otapala moguća zamjena za organska otapala u ispitanim reakcijskim uvjetima.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 19 slika, 3 tablica, 33 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag. ing.

Datum obrane: 17. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

HYDROLYSIS OF (*R,S*)-1-PHENYLETHYL ACETATE IN EUTECTIC SOLVENTS WITH APPLICATION OF CARROT ROOT AND LIPASE AS BIOCATALYSTS

Valentina Fičko, 0058204414

Abstract: The application of green chemistry in the production of commercially interesting organic compounds is growing, due to the adverse effects of industrial production on the environment and people by using conventional methods. Therefore, natural deep eutectic solvents and performing reactions by biocatalyst are becoming an interesting alternative to volatile organic solvents and classical chemical synthesis. In this study, the application of two biocatalysts (lipase B and carrot root) for enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-1-phenylethyl acetate within cholinum-based natural deep eutectic solvents was performed. All enantioselective reactions in natural deep eutectic solvents were successfully conducted, and those solvents were superior to organic solvents, according to all tested parameters (η , ee , V_p and V_E). Based on results, we can conclude that NADES are excellent candidates for replacement of common organic solvents in tested reaction conditions.

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

Thesis contains: 35 pages, 19 figures, 3 tables, 33 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor

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

Defence date: July 17th 2017

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Teorijski dio	2
2.1.	<i>Zelena</i> kemija	2
2.2.	Pravci <i>zelene</i> kemije	4
2.2.1.	Biotransformacije u pripravi komercijalno zanimljivih organskih spojeva	4
2.2.2.	Primjena ekološki prihvatljivih otapala u pripravi komercijalno zanimljivih organskih spojeva	7
2.2.2.1.	Ionske kapljevine	7
2.2.2.2.	Prirodna eutektička otapala	9
3.	Ekperimentalni dio	11
3.1.	Materijali i metode	11
3.1.1.	Kemikalije	11
3.1.2.	Oprema i uređaji	11
3.1.3.	Sinteza prirodnih eutektičkih otapala	12
3.1.4.	Enantioselektivna hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata	13
3.1.4.1.	Lipazom katalizirana enantioselektivna hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata	15
3.1.4.2.	Enzimski katalizirana enantioselektivna hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata pomoću korijena mrkve (<i>Daucus carota</i> L.)	16
4.	Rezultati i rasprava	18
4.1.	Sinteza prirodnih eutektičkih otapala	18
4.2.	Enantioselektivna hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata	19
4.2.1.	Lipazom katalizirana enantioselektivna hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata	20
4.2.2.	Enzimski katalizirana enantioselektivna hidroliza (<i>R,S</i>)-1-feniletil acetata pomoću korijena mrkve (<i>Daucus carota</i> L.)	25
5.	Zaključci	31
6.	Literatura	32

1. Uvod

Napredak ljudskog razvoja očituje se i u razumnom raspolaganju prirodnim resursima Zemlje pri čemu se podrazumijevaju neobnovljivi izvori kao što je nafta, ali i čista voda, zrak i dr. Tako je sve više istraživanja usmjereno na pronalazak novih rješenja usmjerenih na upotrebu alternativnih izvora energije i zamjenu hlapivih organskih otapala *zelenim* otapalima. *Zelena* kemija ima sve veći značaj za održivi razvoj s ciljem smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanih tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje (Kudlak i sur., 2015). Zbog štetnih utjecaja kemijske sinteze i organskih otapala na okoliš i zdravlje ljudi nastoji se takva sinteza zamijeniti biokatalizom, a organska otapala s alternativnim *zelenim* otapalima kao što su eutektička otapala. Prema načelima *zelene* kemije idealno otapalo je netoksično, kemijski i fizički stabilno, ima nisku hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe te je jednostavno za rukovanje. Osnovne karakteristike prirodnih eutektičkih otapala su laka priprema, biorazgradivost, neznatna hlapljivost, nezapaljivost te velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost, a poželjna su zbog jeftine cijene. Njihova primjena je široka zbog velikog broja struktura koje se mogu dobiti, a time i različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Koriste se u organskim sintezama, (bio)katalitičkim procesima, procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenata, u elektropoliranju i proizvodnji biodizela. Također, biotransformacijski postupci dobivanja važnih organskih spojeva uz katalizator biološkog podrijetla su u skladu sa zahtjevima *zelene* kemije. Oni se najčešće koriste za specifične modifikacije struktura, dobivanje željenih metabolita pomoću kontroliranih mikrobnih reakcija te za proširenje strukture pomoću biosintetskih reakcija.

Cilj ovog rada bio je ispitati primjenu *zelenih* otapala – prirodnih eutektičkih otapala za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata u (*R,S*)-1-feniletanol pomoću lipaze B izolirane iz *Candida antarctica* i korijena mrkve *Daucus carota* L. kao biokatalizatora.

2. Teorijski dio

2.1. Zelena kemija

Zelena kemija je relativno novo područje kemije koje se pojavilo zbog potrebe smanjenja opasnih učinaka kemikalija na ljudsko zdravlje i okoliš. Ovaj pokret za implementaciju održivog razvoja u kemijske tehnologije utemeljen je 1990-ih od strane Američke agencije za zaštitu okoliša (engl. *United States Environmental Protection Agency*, US EPA) s ciljem da se dizajniranjem kemijskih proizvoda i procesa smanji ili potpuno ukloni primjena škodljivih i opasnih tvari (Cvjetko, 2012). Pokret *zelene* kemije temelji se na dvanaest načela (tablica 1) iz kojih se može vidjeti da je bit *zelene* kemije proizvesti maksimalnu količinu korisnog produkta (atomska ekonomija) te svesti količinu otpada na minimum. Proces pritom mora biti siguran za radnike i okoliš, energetski učinkovit, moraju se koristiti neopasne i obnovljive sirovine gdje god je to moguće te proizvesti netoksični produkti uz što manju količinu nusproizvoda (Lancaster, 2002). U provođenju procesa prema načelima *zelene* kemije nemoguće je udovoljiti zahtjevima svih 12 načela (tablica 1), ali se u svim stupnjevima sinteze nastoji primijeniti što veći broj načela (Grogan, 2009; Jukić i sur., 2004).

Hlapljiva organska otapala čine gotovo 2/3 svih industrijskih emisija širom svijeta uzrokujući brojne negativne učinke na okoliš (promjena klime na globalnoj razini, zagađenje zraka, narušavanje ozonskog omotača). Njihova primjena nužna je i u procesima kao što su ekstrakcije, biotransformacije, razdvajanje, pročišćavanje i sušenje produkta, ali i kod analitičkih metoda. Kao nova *zelena* otapala podrazumijevaju se voda, superkritične tekućine, ionske tekućine, eutektička otapala, ali i reakcijski sustavi bez prisustva otapala (Cvjetko, 2012). Osim korištenja alternativnih *zelenih* otapala, neke od metoda *zelene* kemije koje se danas intenzivno proučavaju su i korištenje netoksičnih materijala, alternativnih izvora energije (kao što su mikrovalno i ultrazvučno zračenje), te provođenje reakcije uz pomoć biokatalizatora. U tako vođenim procesima smanjuje se utrošak energije i otpada, a time i cijena cijelog procesa. Primjena *zelene* kemije je ekonomski isplativa, ekološki, ali i socijalno prihvatljiva (Tao i Kazlauskas, 2013).

Kao što je već spomenuto, *zelena* kemija temelji se na 12 načela (tablica 1) koja su osmislili Paul Anastas i John Warner 1998. godine. Načela govore o smanjenju ili uklanjanju opasnih štetnih tvari iz sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih produkata te povećanju sigurnosti kemijskih procesa (Grogan, 2009; Jukić i sur., 2004).

Tablica 1. Načela zelene kemije (Jukić i sur., 2004)

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

2.2. Pravci *zelene* kemije

Zeleni, čisti pristupi kemijskim procesima provode se kroz nekoliko pravaca koji otvaraju put ekološki i ekonomski prihvatljivom razvoju procesa, poput katalitičkih i biokatalitičkih reakcija (biotransformacije), reakcija u *zelenim* alternativnim medijima (voda, superkritične i ionske kapljevine) i reakcijskih uvjeta (mikrovalne i fotokatalitičke reakcije).

2.2.1. Biotransformacije u pripravi komercijalno zanimljivih organskih spojeva

Za proizvodnju kemikalija, lijekova ili različitih materijala u velikom mjerilu mogu se koristiti 3 vrste procesa: a) čisti kemijski procesi, b) kombinacija kemijskih i biokatalitičkih procesa (koriste se za glavne reakcije koje zahtijevaju visoku selektivnost, specifičnost ili se koriste kao zamjena za ekološki problematične reakcijske korake) ili c) biotransformacije u više koraka (Ghisalba i sur., 2010). Zbog negativnog učinka kemijske sinteze na okoliš u današnje vrijeme primjena biotransformacija sve više raste. Biotransformacije podrazumijevaju pretvorbu određenog supstrata u određeni produkt uz pomoć katalizatora biološkog podrijetla. Biotransformacije se u današnje vrijeme koriste za specifične modifikacije strukture supstrata preko selektivnih transformacijskih reakcija, djelomičnu razgradnju supstrata u željeni metabolit pomoću kontroliranih mikrobnih reakcija ili reakcijskih puteva te za proširenje strukture supstrata pomoću biosintetskih reakcija u umjetne strukture (Bommarius i Riebel, 2004). Biokatalizator može biti čista kultura mikroorganizama, biljne i životinjske stanice te sirovi ili pročišćeni enzimi. Njihova je prednost što se mogu dobiti iz obnovljivih izvora, biorazgradivi su te se mogu koristiti u vodenom mediju (Grogan, 2009). Korištenje biokatalizatora u procesima ekološki je prihvatljivo zbog blagih uvjeta reakcija (prihvatljiv raspon pH od 4 do 9, temperatura od 10 °C do 50 °C i normalan tlak) koje bi inače zahtijevale izrazito kisele ili lužnate uvjete (Holland, 2002). Također, važna prednost enzima je njihova kemo-, regio- i enantiomerna selektivnost, što omogućava lakše odvajanje produkata, minimalno odvijanje sporednih reakcija bez potrebe za primjenom protekcijskih skupina (Bommarius i Riebel, 2004). Ta specifična svojstva biokatalizatora posebno se primjenjuju u području biotransformacija. Od enzima najveću primjenu imaju hidrolaze (lipaze, esteraze, proteaze) i oksidoreduktaze (Ghisalba i sur., 2010; Bommarius i Riebel, 2004).

Biokataliza omogućava proizvodnju organskih spojeva koja je ekonomski i ekološki prihvatljiva, primjenu obnovljivih sirovina i obuhvaća načela *zelene* kemije. Primjenom biokatalize skraćuje se vrijeme procesa, povećava se selektivnost i prinos, potrošnja energije je

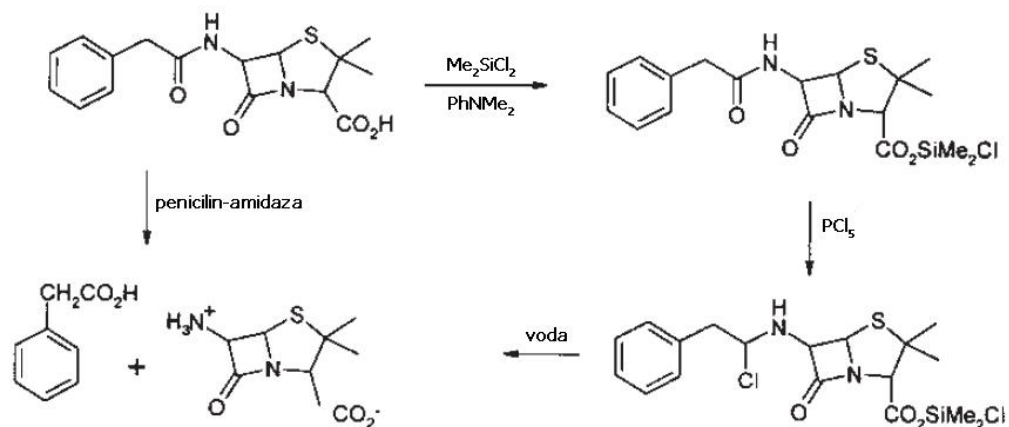
puno manja zbog smanjene temperature te se ne koristi visoki tlak. Smanjuje se potrošnja metala i organskih otapala što smanjuje nastanak otpada po jedinici produkta (Bommarius i Riebel, 2004). Biokataliza se u velikom mjerilu koristi za dobivanje uobičajenih spojeva pa sve do finih kemikalija i skupih farmaceutika. Neki od takvih biotransformacijskih proizvoda koji se proizvode u velikom mjerilu su akrilamid, aspartam, nikotinamid, vitamin C, visoko fruktozni kukuruzni sirup, mlijeko bez laktoze, D-pantotenska kiselina, 6-aminopenicilanska kiselina, L-aspartat, L-alanin, (*S*)-klorpropionska kiselina i L-karnitin (Bommarius i Riebel, 2004; Ghisalba i sur., 2010).

Biotransformacijski postupak koji se najviše primjenjuje u industrijskom mjerilu je konverzija glukoze u fruktozu pomoću enzima glukoza-izomeraze (slika 1) i služi za proizvodnju 10 milijuna tona visoko fruktoznog sirupa godišnje (Sime, 1999).



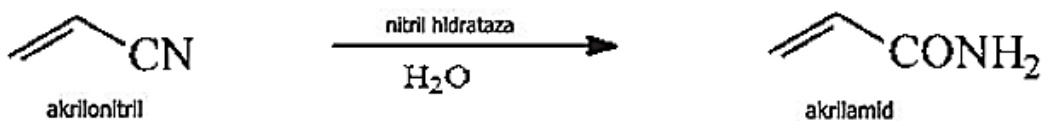
Slika 1. Konverzija glukoze u fruktozu pomoću glukoza-izomeraze (Holland, 2002)

U farmaceutskoj industriji najveća primjena biokatalitičkog procesa je konverzija penicilina G u 6-aminopenicilansku kiselinu pomoću enzima penicilin-amidaze (slika 2). Primjena ovog enzimskog postupka omogućuje skraćivanje kemijski kataliziranog procesa sa tri stupnja na samo jedan. Enzim izravno deacilira penicilin G i takva reakcija zahtjeva blage uvjete za razliku od kemijskog procesa koji zahtjeva dodatnu protekciju karboksilne skupine u penicilinu G i primjenu dimetil anilina za uklanjanje klorovodične kiseline koja pri tome nastaje. Također temperatura procesa smanjena je s 50 °C na 30 °C i kao otapalo koristi se voda umjesto diklormetana što je još dodatna prednost ovog procesa (Lancaster, 2002).



Slika 2. Dobivanje 6-aminopenicilanske kiseline (Lancaster, 2002)

Također, jedna od većih i komercijalno značajnih biotransformacija je hidroliza akrilonitrila u akrilamid pomoću nitrilne-hidrataze, tj. primjenom biokatalizatora *Rhodococcus rhodochrous* J1 (slika 3). Mitsubishi Rayon Co., Ltd (Tokio, Japan) je najveći proizvođač akrilamida s proizvodnjom oko 20 000 tona godišnje. Proizvodnja se provodi kontinuirano iz akrilonitrila pri 10 °C primjenom imobiliziranih J1 stanica na poliakrilamidu uz prinos $\approx 99,9\%$, a produktivnost katalizatora iznosi >7000 grama akrilamida po gramu suhe tvari. Za razliku od klasičnog kemijskog procesa s bakrom kao katalizatorom ovaj bioprocen ne zahtijeva visoku temperaturu ili tlak, ne primjenjuje teške metale i smanjena je proizvodnja otpadnih voda. Također, proizvod dobiven ovim postupkom je više čistoće što olakšava i proizvodnju poliakrilamida više molekulske mase (Thomas i sur., 2002).



Slika 3. Hidroliza akrilonitrila u akrilamid pomoću nitrilne-hidrataze (Holland, 2002)

Imobilizirane stanice *Rhodococcus rhodochrous* J1 također se koriste u jednom koraku proizvodnje nikotinamida. Nikotinonitril se hidrolizira pomoću nitril-hidrataze u nikotinamid (slika 4) uz selektivnost od $>99,3\%$ (konverzija 100%), a kod kemijske hidrolize dobiva se 3 – 5% nikotinske kiseline kao nusprodukt. Ovakav bioprocen zahtjeva manje energije i nastaje manja količina otpadnih voda (Thomas i sur., 2002; Bommarius i Riebel, 2004).



Slika 4. Hidroliza nikotinonitrila u nikotinamid pomoću imobiliziranih stanica *Rhodococcus rhodochrous* J1 (Ghisalba i sur., 2010)

2.2.2. Primjena ekološki prihvatljivih otapala u pripravi komercijalno zanimljivih organskih spojeva

Za katalitičke reakcije se kao medij najčešće koristi voda. Glavni razlozi su njena niska cijena, lako zbrinjavanje nakon procesa, netoksičnost, nezapaljivost i široka dostupnost. Budući da je voda nepovoljno otapalo u gotovo svim industrijski važnim biotransformacijama (organski spojevi od komercijalnog interesa slabo su topljivi u vodi; procesi uklanjanja vode iz reakcijske smjese vrlo su skupi; u vodi se često odvijaju nepoželjne sporedne reakcije kao što su hidroliza, racemizacija i polimerizacija), lipazama katalizirane reakcije u bezvodnim uvjetima, prvenstveno organskim otapalima, proučavaju se već više od dva desetljeća. Upotreba organskih otapala kao reakcijskih medija ima znatne prednosti kao što su bolje iskorištenje reakcija, lakše uklanjanje otapala zbog niže točke vrelišta, deaktivacija i/ili inhibicija supstrata/produkta je manja, nusreakcije poput hidrolize su suprimirane te je manja mogućnost denaturacije enzima (Ghanem, 2007).

Zbog već gore navedenih štetnih utjecaja organskih otapala, u posljednje vrijeme upotreba lipaza u bezvodnom mediju proširena je na alternativna otapala poput ionskih kapljevina i eutektičkih otapala. U biotransformacijama, ionske kapljevine i eutektička otapala mogu se koristiti kao čista otapala, kao kootapala u vodenom mediju i kao dio dvofaznog sustava (Cvjetko Bubalo, 2015a).

2.2.2.1. Ionske kapljevine

Ionske kapljevine su organske soli koje su pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, sastavljene su od kationa koji mogu biti različito supstituirane organske molekule koje sadrže pozitivno nabijen dušikov, sumporov ili fosforov atom i anorganskog ili organskog aniona (npr. tetrafluorborat, heksafluorofosfat, nitrat, sulfat, bis[(trifluormetil)sulfonil]imid, acetat, alkil sulfat i alkil sulfonat). Pri sintezi ionskih kapljevina moguće su mnoge kombinacije kationa i aniona (10^{18}

različitih) što osigurava veliki broj ionskih kapljevine različitih fizikalno-kemijskih svojstva, koja mogu biti odabrana prema željenoj primjeni. Zbog pozitivnih svojstva kao što su neznatna hlapljivost, nezapaljivost te velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost, ionske kapljevine se posljednja dva desetljeća intenzivno proučavaju kao *zelena* zamjena za tradicionalna i škodljiva organska otapala (Olivier-Bourbigou i Magna, 2002).

Ionske kapljevine najprije su se počele primjenjivati u elektrokemiji zbog dobre električne vodljivosti i elektrokemijske inertnosti, ali otkrivanjem strukturno različitih ionskih kapljevine primjena se proširila na kemijsku tehnologiju, biotehnologiju, analitiku i na razvoj farmaceutika. Prednost primjene ionskih kapljevine je mogućnost regeneracije zbog njihovog niskog tlaka para i toplinske stabilnosti, što je pozitivno s ekonomskog i ekološkog stajališta. Nedostatak primjene je slaba biokompatibilnost, problem razgradnje i odlaganja ionskih kapljevine nakon provođenja procesa, njihova toksičnost te cijena sinteze otapala (koja je 5 do 20 puta veća od sinteze organskih otapala). Navedeni nedostaci u načelu se odnose na imidazolijeve i piridinijeve ionske kapljevine. Iako ionske kapljevine nisu prisutne u širokoj komercijalnoj primjeni kao neka druga otapala, Francuski naftni institut je 1998. odobrio njihovu komercijalnu primjenu za dobivanje butenskih dimera koji su važni za proizvodnju plastičnih, gumenih i sličnih materijala. Također BASF kompanija je 2003. primijenila ionske kapljevine u BASIL procesu (engl. *Biphasic Acid Scavenging utilizing Ionic Liquids*) za uklanjanje kiselina iz određenih procesa *in situ* dodavanjem N-alkilimidazola koji s kiselinom tvori ionsku kapljevinu koja se može lako ukloniti iz reakcijske smjese. Time se prinos ove metode povećao s 50 % na 98 % i produktivnost s 8 na 690 000 $\text{kgm}^{-3}\text{h}^{-1}$ u usporedbi s uobičajenim postupkom uklanjanja kiseline iz reakcije smjese te je danas ova metoda u širokoj primjeni. Ionske kapljevine također se mogu koristiti u proizvodnji farmaceutskih međuprodukata, kao što je sinteza pravadolina u tetraalkilfosfonij ionskoj kapljevine s triflatnim anionom u kojoj se ostvaruje veći prinos u usporedbi sa sintezom u organskom otapalu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b). Ionske kapljevine utječu pozitivno i na enzimsku stabilnost u biokatalitičkim reakcijama kao što je sinteza *Z*-aspartama pomoću termolizina kao biokatalizatora u 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu [BMIM][PF₆] (Bommarius i Riebel, 2004).

2.2.2.2. Prirodna eutektička otapala

Prirodna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) nastaju miješanjem nabijenog akceptora vodika (najčešće kvaterne amonijeve soli) s donorom vodika, gdje se navedene komponente povezuju jakim vodikovim vezama. Eutektička otapala pripremaju se od jeftinih, lako dostupnih, netoksičnih tvari i miješaju se u različitim molarnim omjerima. Za pripremu se najčešće koriste organska sol kolin-klorid, a kao donor vodika šećeri, amini, amidi, alkoholi, vitamini i organske kiseline. Fizikalno-kemijska svojstva ovise o strukturi otapala, a broj mogućih kemijskih struktura koje proizlaze iz različitih kombinacija akceptora i donora vodika je velik. Njihove pozitivne karakteristike su niža točka taljenja od pojedine komponente, lakša priprema za razliku od ionskih kapljevina i biorazgradivost. Zbog njihove sličnosti (nehlapljivost, nezapaljivost, velika viskoznost) s prirodnim ionskim kapljevinama smatraju se četvrtom generacijom ionskih kapljevina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b).

Prirodni primarni metaboliti najčešće su komponente eutektičkih otapala zbog čega se smatra da ta otapala ne bi trebala imati toksičan efekt, ali neka istraživanja su pokazala drugačije rezultate. Hayyan i sur. (2013a) i Hayyan i sur. (2013b) zaključili su da toksičnost otapala na bazi fosfonijeve soli ispitivane na račićima i dva soja bakterija ovisi o sastavu otapala, viskoznosti i koncentraciji. Također, otapala koja se sastoje od dvije komponente pokazuju veću toksičnost. Paiva i sur. (2014) ispitali su toksičnost različitih prirodnih eutektičkih otapala i zaključili da prisutnost vinske kiseline ima štetan utjecaj na vijabilnost stanica sličnih fibroblastu, ali rezultati nisu pokazali jasan trend iz kojeg bi se zaključilo kakav utjecaj imaju komponente otapala na toksičnost. Druga istraživanja su pokazala da su otapala na bazi kolina netoksična, ali da vijabilnost zapravo ovisi o koncentraciji otapala (Frade i sur., 2013).

Prva primjena eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida bila je za elektropoliranje metala, elektrotaloženje i procesiranje metala, a danas se koriste u organskoj sintezi, (bio)katalizi, ekstrakciji, proizvodnji polimera, nanomaterijala, elektrokemiji i procesima separacije (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b). Također, eutektička otapala mogu se primijeniti u ekstrakciji glicerola iz biodizela (Durand i sur., 2013). Primjer primjene različitih eutektičkih otapala u biokatalizi je reakcija transesterifikacije etil-sorbata s 1-propanolom pomoću imobilizirane *Candida antarctica* lipaze B (CALB). Kod provođenja te reakcije otapala kolin-acetat:glicerol (1:1,5) i kolin klorid:urea (1:2) pokazala su najbolje rezultate u usporedbi s *t*-butanolom (Zhao i sur., 2011). Drugi primjer je istraživanje primjene eutektičkih otapala u transesterifikaciji etil valerata s

butanolom, kataliziranoj lipazama pokazalo je da su enzimi aktivni u eutektskim otapalima, a najbolje rezultate je pokazala *Candida antarctica* lipaza B. Otapala kolin-klorid:urea i kolin-klorid:glicerol pokazala su se jednako dobrim kao i toluen u ovoj transesterifikaciji (Gorke, 2008; Gorke, 2010). Ispitan je i utjecaj eutektskih otapala na aktivnost biokatalizatora. Zhao i sur. (2011) i Zhao i sur. (2013) pokazali su da smanjenjem udjela glicerola u eutektskom otapalu lipaze imaju bolju aktivnost i selektivnost zbog manje destabilizacije enzima. Također, Durand i sur. (2012) istražili su aktivnost *Candida antarctica* lipaze B u dva eutektska otapala i toluenu tijekom pet dana na 50 °C. U toluenu aktivnost enzima smanjila se za samo 15 %, dok se aktivnost u otapalu kolin-klorid:glicerol smanjila za 70 % (65 % nakon prvog dana). Razlog je vjerojatno negativan utjecaj glicerola na difuziju hidrofobnog supstrata prema aktivnom mjestu lipaze. U otapalu kolin-klorid:urea aktivnost se smanjila za 5 % nakon prvog dana, a nakon petog za <40 %. Poboljšanje aktivnosti termostabilnih lipaza može se postići povećanjem temperature pri čemu se u ovom slučaju aktivnost povećava za 1,5 od inicijalne specifične aktivnosti (Durand i sur., 2013).

Navedena istraživanja pokazuju da eutektska otapala imaju veliki potencijal za primjenu u pripravi komercijalno zanimljivih spojeva, a dosadašnje nedostatke treba dodatno istražiti da bi se njihova primjena proširila.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Kemikalije

- Destilirana voda
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij-fosfatni pufer, pripravljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF (KH_2PO_4 , Fisher Chemical, UK)
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Mrkva *Daucus carota* L.
- 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
- Otapala heptan, heksan, toluen
- (*R,S*)-1-feniletil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

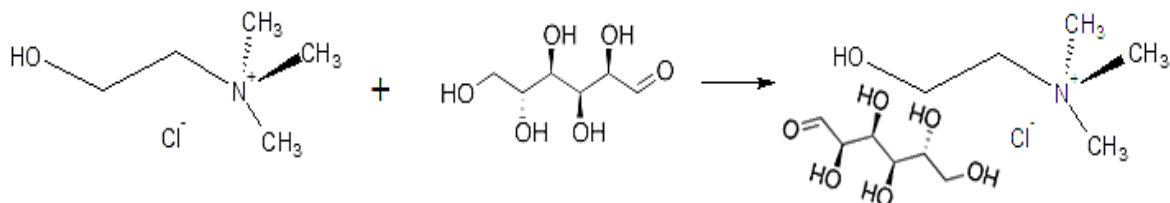
Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.2. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Savant SPD131DDA SpeedVac koncentrator, Thermo scientific, SAD
- Tikvice s okruglim dnom

3.1.3. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

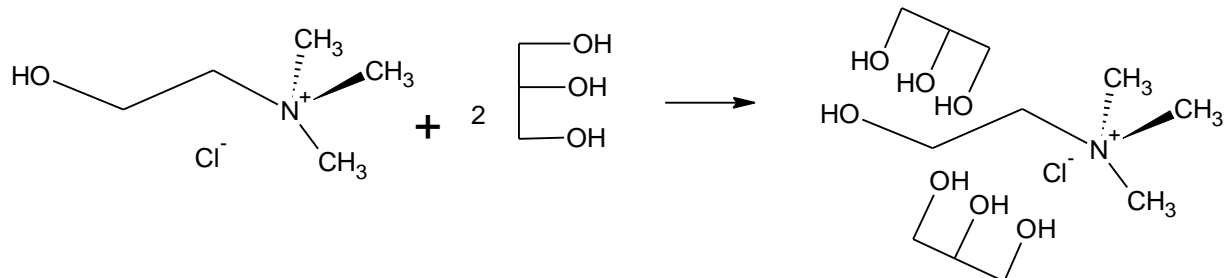
A) Sinteza prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza (ChGlc)



Slika 5. Sinteza prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza = 1:1 (n) (ChGlc)

U tikvicu s okruglim dnom pomiješaju se kolin-klorid (6,98 g; 0,05 mol) i glukoza (9,01 g; 0,05 mol) u molarnom omjeru 1:1. Sinteza se odvija uz zagrijavanje pomoću magnetske miješalice s grijanjem na 50 °C kroz 2 sata (slika 5). Dobiveno prirodno eutektičko otapalo (15,99 g; 100 %) je u obliku prozirne tekućine iz kojeg se razrjeđivanjem pripreme otapala s 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) (tablica 2).

B) Sinteza prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol (ChGly)



Slika 6. Sinteza prirodnog eutektičkog otapala kolin-klorid:glicerol = 1:2 (n) (ChGly)

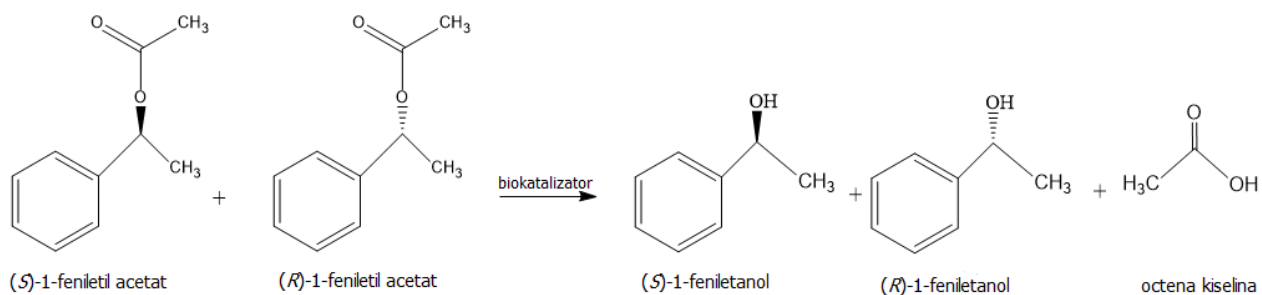
U tikvici s okruglim dnom, kolin-klorid (6,98 g; 0,05 mol) se pomiješa s glicerolom (9,21 g; 0,10 mol) i reakcijska smjesa se zagrijava na 50 °C pomoću magnetske miješalice s grijanjem 2 sata (slika 6). Dobiveno prirodno eutektičko otapalo je u obliku prozirne tekućine (16,2 g; 100 %). Razrjeđivanjem se pripreme otapala s 30 %, 50 % i 80 % vode (w/w) (tablica 2).

Tablica 2. Molarni omjeri i udjeli vode prirodnih eutektičkih otapala korištenih za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata

	Eutektičko otapalo	Molarni omjer	Udio vode (% w/w)	Oznaka
1.	kolin klorid:glukoza	1:1	30	ChGlc 30 %
2.	kolin klorid:glukoza	1:1	50	ChGlc 50 %
3.	kolin klorid:glukoza	1:1	80	ChGlc 80 %
4.	kolin klorid:glicerol	1:2	30	ChGly 30 %
5.	kolin klorid:glicerol	1:2	50	ChGly 50 %
6.	kolin klorid:glicerol	1:2	80	ChGly 80 %

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

Enantioselektivna hidroliza provedena je pomoću 2 biokatalizatora: lipaze i korijena mrkve (slika 7). Pomoću lipaze provedena je u organskim otapalima: heksan, heptan i toluen te u prirodnim eutektičkim otapalima ChGlc 30 %, ChGlc 50 %, ChGlc 80 %, ChGly 30 %, ChGly 50 % i ChGly 80 % i kalij-fosfatnom puferu (0,025 M). Također enantioselektivna hidroliza provedena je pomoću korijena mrkve u heptanu, kalij-fosfatnom puferu te u gore navedenim prirodnim eutektičkim otapalima (tablica 2).



Slika 7. Hidroliza (*R,S*)-1-feniletilacetata

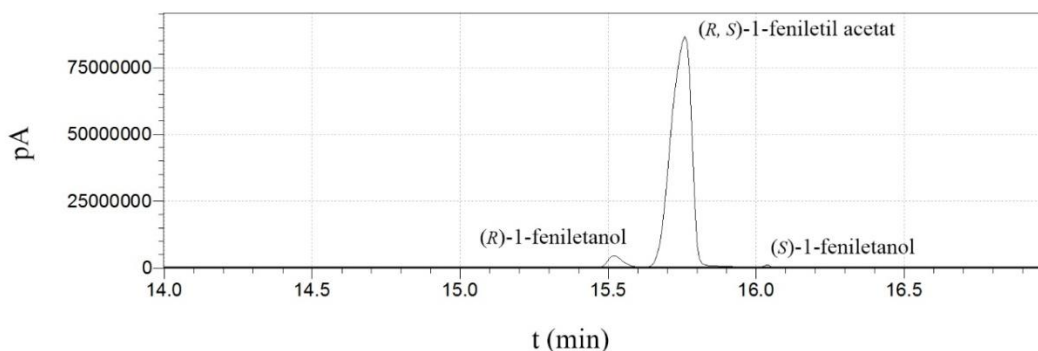
Kvalitativna i kvantitativna analiza hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

Kromatografski uvjeti za određivanje supstrata:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30m x 0,25mm x 0,25μm)
- Pokretna faza: He
- Protok: 56,3 mL min⁻¹

- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone: $T_1=80\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), $T_2=140\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta t=5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$)
- Vrijeme trajanja analize: 21 min

Retencijsko vrijeme (R_t) za (*R,S*)-1-feniletil acetat iznosi 15,72 min, R_t za (*R*)-1-feniletanol 15,54 min, a R_t za (*S*)-1-feniletanol 16,06 min (slika 8).



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

Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije (*R,S*)-1-feniletil acetata

Molarna koncentracija supstrata računa se izravno prema jednadžbi pravca dobivene iz baždarnog dijagrama. Pripreme se otopine (*R,S*)-1-feniletil acetata u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 i 0,05 mol L⁻¹. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanese se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrtava dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R,S*)-1-feniletil acetata o površini ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije (*R,S*)-1-feniletil acetata u uzorcima.

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

$$c_E = \frac{c_{E\text{heptan}}}{K_P} \quad [1]$$

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

Koeficijent razdjeljenja (*R,S*)-1-feniletil acetata (K_p) heptan/prirodno eutektičko otapalo određuje se prema sljedećem protokolu:

U staklenu kivetu doda se 498 μL prirodnog eutektičkog otapala, 2 μL ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$) (*R,S*)-1-feniletil acetata i 500 μL heptana. Uzorak se miješa na vorteksu ($2000 \text{ okretaj min}^{-1}$) tijekom 3 min pri temperaturi $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Koncentracija (*R,S*)-1-feniletil acetata u heptanu određuje se plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja K_p izračunava se kao omjer ravnotežne koncentracije (*R,S*)-1-feniletil acetata u heptanu i prirodnom eutektičkom otapalu prema jednadžbi:

$$K_p = \frac{c_{\text{heptan}}}{c_D} \quad [2]$$

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

3.1.4.1. Lipazom katalizirana enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata

U epruvetu se doda 2976 μL otapala (heptan, heksan, toluen, kalij-fosfatni pufer ili prirodno eutektičko otapalo) i 24 μL (*R,S*)-1-feniletil acetata ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Reakcija započinje dodavanjem 5 mg pripravka Novozym 435. Kod provođenja reakcije u organskim otapalima, u odabranim vremenskim intervalima uzima se 50 μL reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom. Kod provođenja reakcije u prirodnim eutektičkim otapalima i kalij-fosfatnom puferu, u odabranim vremenskim intervalima izuzima se 200 μL reakcijske smjese iz koje se produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju s 200 μL heptana, uz snažno miješanje na vorteksu ($2000 \text{ okretaj min}^{-1}$) kroz 3 min te se zatim heptanski ekstrakt analizira plinskom kromatografijom.

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

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

$$\eta = \frac{c_A}{c_{AT}} \cdot 100 \quad [3]$$

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

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

$$V_P = \frac{c_A - c_{A1}}{t} \quad [4]$$

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

Enantiomerni višak ee (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(R_{1-feniletanol} - S_{1-feniletanol})}{(R_{1-feniletanol} + S_{1-feniletanol})} * 100 \quad [5]$$

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

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

$$V_E = \frac{n_{P2} - n_{P1}}{m_E \cdot t} \quad [6]$$

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

3.1.4.2. Enzimski katalizirana enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata pomoću korijena mrkve (*Daucus carota* L.)

U epruvetu se doda 5 g mrkve (*Daucus carota* L.) prethodno isprane u deterdžentu i zatim narezane na komadiće približne veličine 5 mm x 5 mm x 2mm, 15 mL otapala (prirodno eutektičko otapalo ChGlc 30 %, ChGlc 50 %, ChGlc 80 %, ChGly 30 %, ChGly 50 %, ChGly 80 %, kalij-fosfatni pufer i heptan). Zatim se doda 10 μL (*R,S*)-1-feniletil acetata ($0,004 \text{ mol L}^{-1}$) i ostavi miješati 2 dana. Nakon 2 dana izuzima se 500 μL reakcijske smjese iz koje se produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju s 4500 μL heptana, uz snažno miješanje na vorteksu ($2000 \text{ okretaj min}^{-1}$) kroz 5 min. Heptanski ekstrakt se upari do suha i čuva na $-4 \text{ }^\circ\text{C}$. Za analizu plinskom kromatografijom, uzorak se resuspendira u 100 μL heptana te se analizira plinskom

kromatografijom. Kod provođenja reakcije u heptanu, u odabranim vremenskim intervalima uzima se 50 μL reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom.

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

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

$$\eta = \frac{c_A}{c_{AT}} \cdot 100 \quad [7]$$

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

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

$$V_P = \frac{c_A - c_{A1}}{t} \quad [8]$$

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

Enantiomerni višak ee (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(R_{1-feniletanol} - S_{1-feniletanol})}{(R_{1-feniletanol} + S_{1-feniletanol})} * 100 \quad [9]$$

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

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

$$V_E = \frac{n_{P2} - n_{P1}}{m_E \cdot t} \quad [10]$$

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

4. Rezultati i rasprava

Primjena *zelenih* otapala sve se više istražuje u pripravi komercijalno zanimljivih organskih spojeva poput kiralnih alkohola, a koji su važni međuprodukti za sintezu mnogih kiralnih lijekova, pesticida, aroma, mirisa, tekućih kristala i kiralnih pomoćnih sredstava (Yadav i sur., 2001). Izazov u njihovoj pripremi vezan je uz činjenicu da postoje dva enantiomerna oblika ovih alkohola, *R* i *S*, koji imaju različite strukturne karakteristike te zbog toga mogu imati različite biološke aktivnosti (Liang i sur., 2015). Primjerice, (*R*)-1-feniletanol koristi se kao kiralni građevni blok i kao sintetski intermedijer za fine kemikalije u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji (Suan i Sarmidi, 2004), dok se oba enantiomerna oblika koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerske čistoće i asimetrično otvaranje cikličnih anhidrida i epoksida (Frings i sur., 1999). Takvi optički čisti spojevi mogu se dobiti kemijskom sintezom ili primjenom enzima kao biokatalizatora (Habulin i Knez, 2009) koji imaju značajne prednosti zbog efikasnosti, enantio- i regioselektivnosti te ekološke prihvatljivosti (Cheng i sur., 1996).

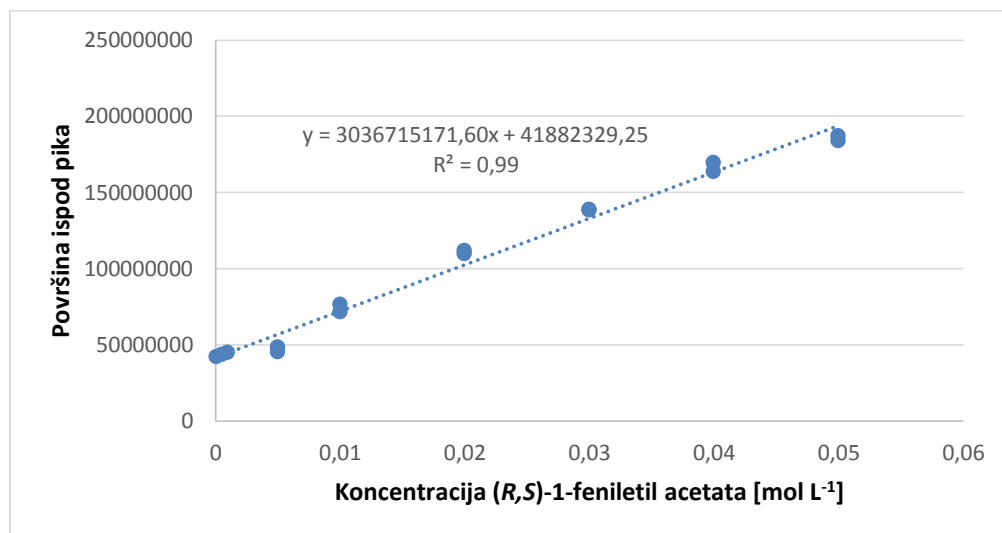
Stoga, u cilju pronalaska pogodnog biokatalizatora i *zelenog* otapala za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata u (*R,S*)-1-feniletanol, u ovom radu su kao biokatalizatori ispitani lipaza i korijen mrkve, dok su kao otapala ispitana prirodna eutektička otapala kolin-klorid:glicerol i kolin-klorid:glukoza s različitim udjelima vode. Kako bi se uspješnost enantioselektivne hidrolize u prirodnim eutektičkim otapalima usporedila s konvencionalnim otapalima, reakcija je provedena i u organskim otapalima (heptan, heksan, toluen) u reakciji u kojoj je kao biokatalizator korišten pripravak imobilizirane lipaze (Novozym 435), te heptanu u reakciji u kojoj je kao biokatalizator korišten korijen mrkve. Također, radi usporedbe reakcije su provedene u 0,025 M kalij-fosfatnom puferu.

4.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

Priprema prirodnih eutektičkih otapala provodila se je jednostavnim postupkom u kojem se polazne komponente kolin-klorid i glicerol odnosno glukoza pomiješaju u molarnom omjeru 1:2 za glicerol te 1:1 za glukozu. Zatim se lagano zagrijavaju uz miješanje dok se ne dobije homogena viskozna kapljevina. Iskorištenje reakcije je 100 %, što je značajna prednost kod sinteze prirodnih eutektičkih otapala.

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

Svi uzorci analizirani su pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom, a dobiveni baždarni dijagram za određivanje koncentracije supstrata prikazan je na slici 9. Kako bi se odredila koncentracija (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima i puferu potrebno je poznavanje koeficijenta razdjeljenja (*R,S*)-1-feniletil acetata između heptana i prirodnih eutektičkih otapala čije vrijednosti su prikazane u tablici 3.



Slika 9. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R,S*)-1-feniletil acetata

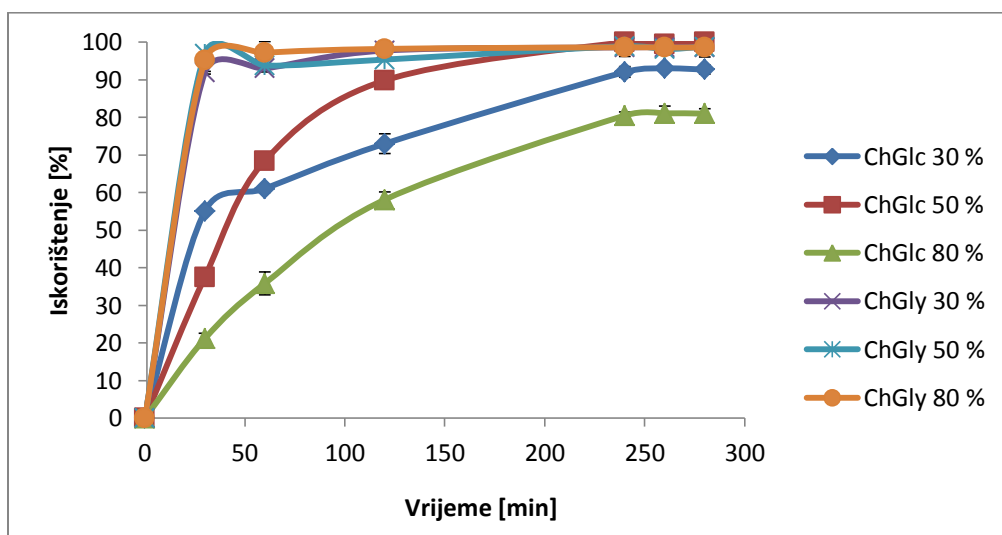
Tablica 3. Koeficijent razdjeljenja (K_p)

Puni naziv otapala	Oznaka otapala	Udio vode (% w/w)	Kratica	K_p
Kolin klorid:glukoza	ChGlc	30	ChGlc 30 %	0,95
		50	ChGlc 50 %	0,95
		80	ChGlc 80 %	0,86
Kolin klorid:glicerol	ChGly	30	ChGly 30 %	0,95
		50	ChGly 50 %	0,94
		80	ChGly 80 %	1,00
Kalij-fosfatni pufer	pufer			0,94

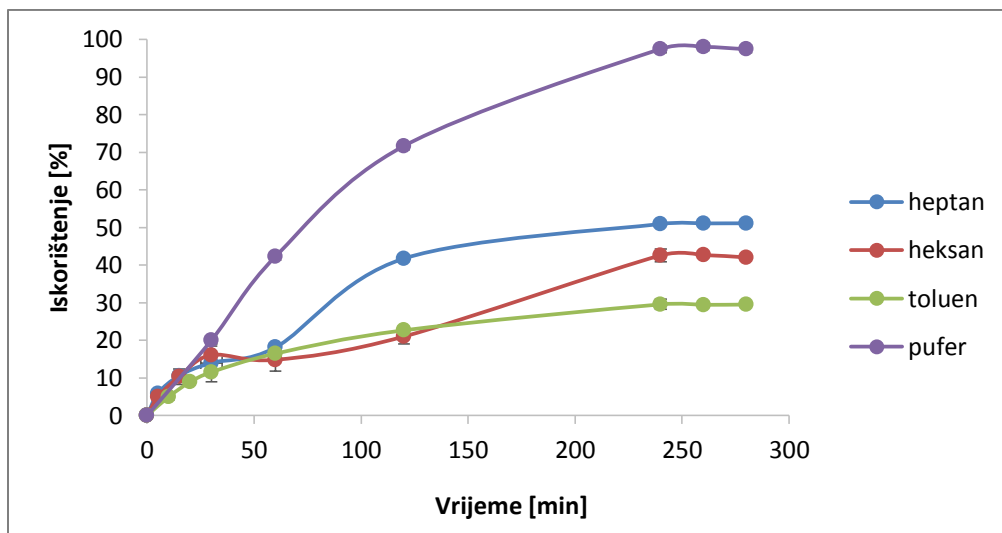
4.2.1. Lipazom katalizirana enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata

Reakcijska smjesa za lipazom kataliziranu enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata pripremljena je na sljedeći način: u prirodna eutektička otapala (ChGlc 30 %, ChGlc 50 %, ChGlc 80 %, ChGly 30 %, ChGly 50 %, ChGly 80 %), pufer, heptan, heksan i toluen dodano je 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata i 5 mg pripravka Novozym 435. Reakcija u prirodnim eutektičkim otapalima i kalij-fosfatnom puferu praćena je izuzimanjem određenog volumena reakcijske smjese iz kojeg je ekstrahiran zaostali supstrat i produkt u heptanu uz miješanje na vorteksu. Heptanski ekstrakt analiziran je plinskom kromatografijom. Reakcijska smjesa iz organskih otapala direktno je analizirana plinskom kromatografijom.

Tijek hidrolize katalizirane u prirodnim eutektičkim otapalima (ChGlc i ChGly) prikazan je na slici 10, a u organskim otapalima (heptan, heksan i toluen) te kalij-fosfatnom puferu na slici 11.



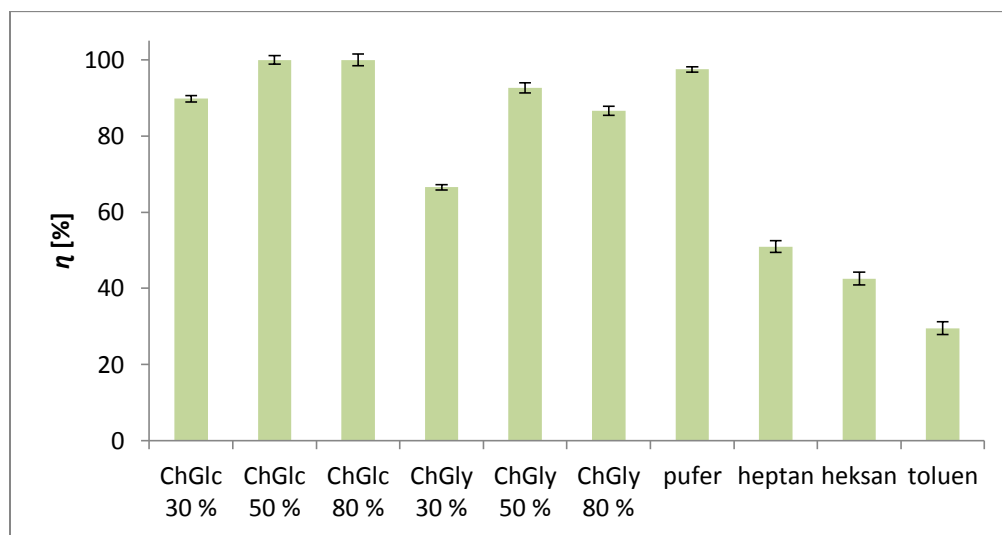
Slika 10. Tijek hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom u prirodnim eutektičkim otapalima (ChGlc i ChGly) s različitim udjelima vode. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min



Slika 11. Tijek hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom u organskim otapalima (heptan, heksan i toluen) te kalij-fosfatnom puferu. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min

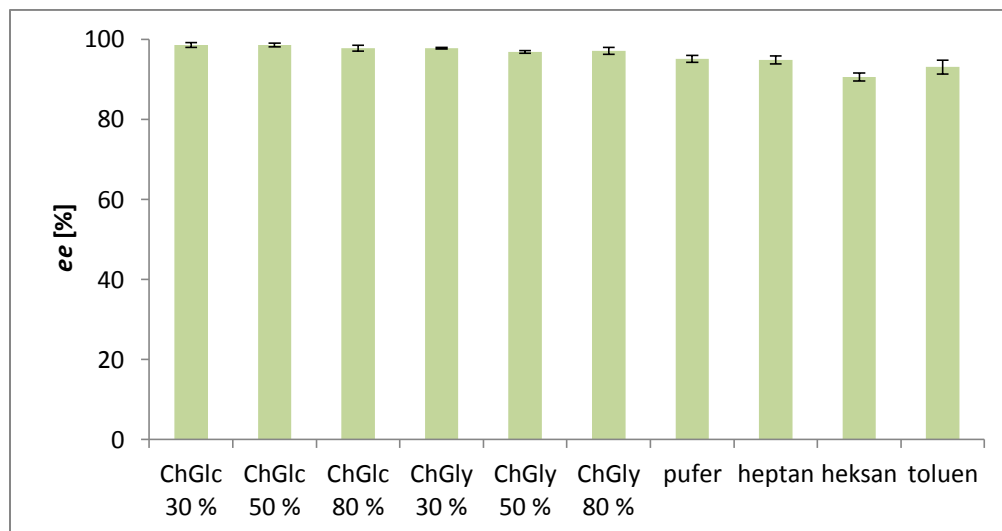
Iz grafičkog prikaza tijeka hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata na slici 10 može se primijetiti da je hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnom eutektičkom otapalu ChGly najbrža, a od referentnih otapala u kalij-fosfatnom puferu. Između dva ispitana prirodna eutektička otapala puno bolji rezultati su ostvareni u otapalu ChGly, u kojem se u hidrolizi u prvih 30 min postigne iskorištenje reakcije više od 90 %. Iskorištenje reakcije u otapalu ChGlc 50 % (99,9 %) je nakon 280 min slično onom u ChGly 30 % (98,6 %), ChGly 50 % (98,8 %), ChGly 80 % (98,6 %), ali reakcija u ChGly se odvija puno brže. Dodatak vode u prirodno eutektičko otapalo ChGlc povoljno djeluje na tijek cjelokupne hidrolize jer se pokazalo da nakon 60 min hidrolize bolje rezultate daje otapalo s 50 % vode u usporedbi s otapalom s 30 % vode. Unatoč tome, povećanje udjela vode u eutektičkom otapalu ChGlc na 80 % nije povoljno djelovalo jer je iskorištenje na kraju reakcije za 20 % manje od iskorištenja u ChGlc 50 %. Takav trend smanjenja aktivnosti lipaze dodatkom određenog udjela vode u eutektičko otapalo primijetili su također Yongxian i sur. (2011) te Durand i sur. (2013). Među organskim otapalima najboljim se pokazao heptan koji je standardno otapalo za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata (Yongxian i sur., 2011), ali u usporedbi sasvim ispitanim prirodnim eutektičkim otapalima i kalij-fosfatnim puferom pokazuje manje iskorištenje reakcije.

Iz prikaza tijeka hidrolize u pojedinim otapalima vidljivo je da odabir otapala značajno utječe na tijek reakcije, pa zbog bolje interpretacije rezultata prema jednadžbama [3], [4], [5] i [6] izračunata su iskorištenja lipazom katalizirane hidrolize, volumetrijska produktivnost, enantiomerni višak te specifična produktivnost enzima, a rezultati su prikazani na slikama 12, 13, 14 i 15.



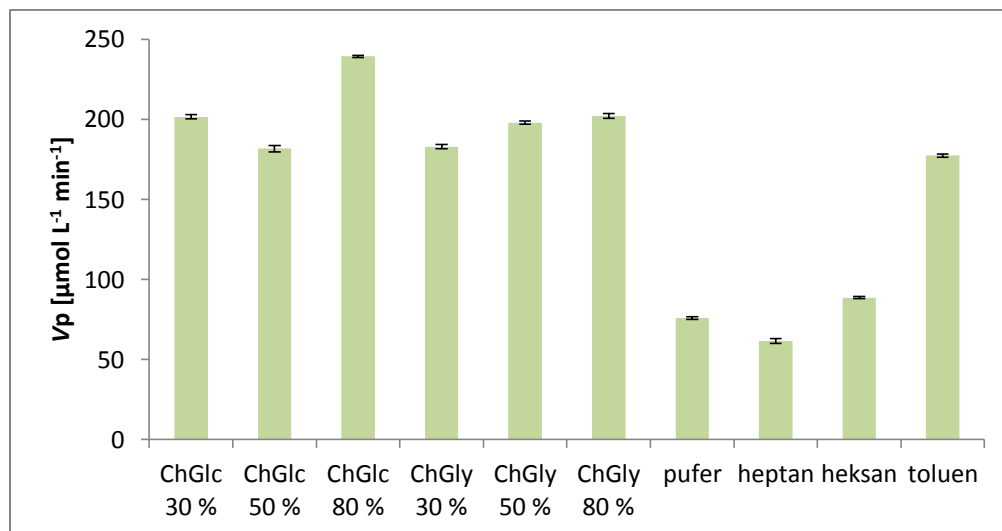
Slika 12. Iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min

Iskorištenja hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom u prirodnim eutektičkim otapalima iznose od 66,5 % za ChGly 30 % do 99,9 % za ChGlc 80 % te većina daje slično iskorištenje kao i puferu (97,5 %), dok su iskorištenja u organskim otapalima nešto manja, od 29,6 % za toluen do 50,9 % za heptan. Najbolje iskorištenje postignuto je u prirodnom eutektičkom otapalu ChGlc 50 % 99,9 %.



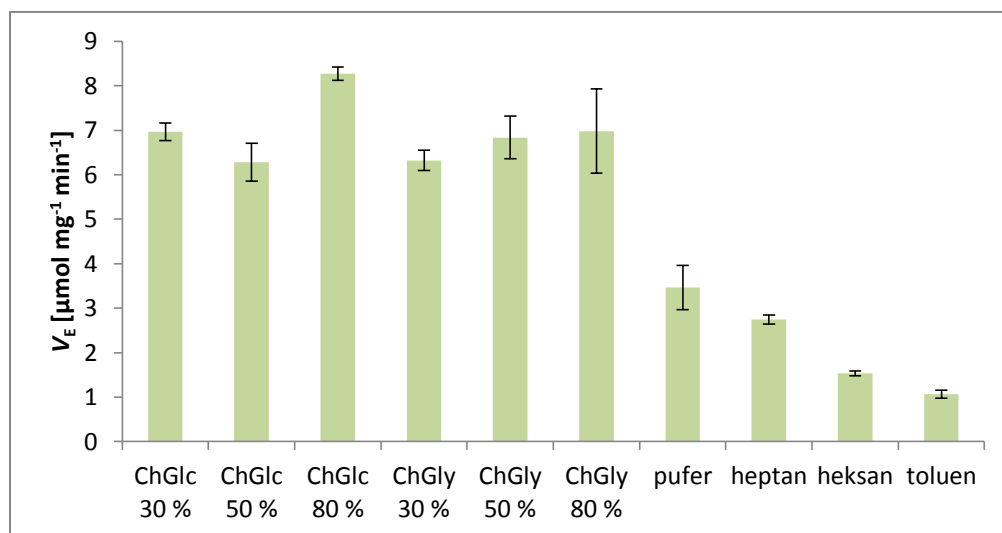
Slika 13. Enantiomerni višak hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min

Enantiomerni višak hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom u prirodnim eutektičkim otapalima iznosi od 96,9 % za ChGly 50 % do 98,6 % za ChGlc 30 % te je visok kao i u referentnim otapalima (pufer 95,1 %, heptan 94,8 %, heksan 90,6 %, toluen 93,1 %) što znači da je korištena lipaza stereospecifična za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata, pri čemu značajniji utjecaj otapala na stereospecifičnost lipaze nije uočen.



Slika 14. Volumetrijska produktivnost hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom provedene u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min

Volumetrijska produktivnost hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom za ChGlc 50 % iznosi 181,8 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, a za ChGlc 80 % 239,3 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$. Za pufer, heptan i heksan vrijednosti su nešto niže dok je volumetrijska produktivnost u toluenu slična kao u prirodnim eutektičkim otapalima.



Slika 15. Specifična produktivnost enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom provedene u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min

Specifična produktivnost enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane lipazom za referentna otapala je niža od one u svim ispitanim prirodnim eutektičkim otapalima.

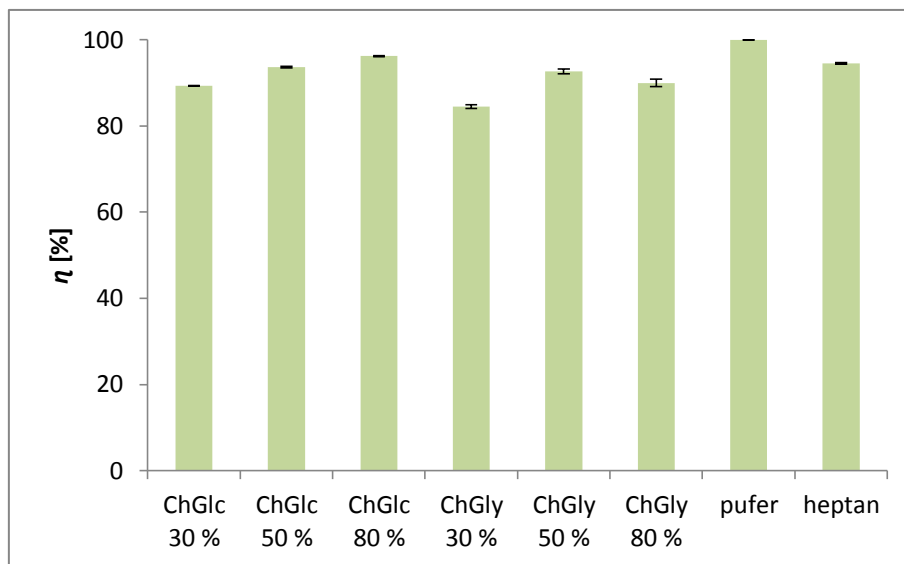
Uspoređujući iskorištenje, enantiomerni višak hidrolize, volumetrijsku produktivnost hidrolize te specifičnu produktivnost enzima u prirodnim eutektičkim otapalima, puferu i organskim otapalima vidljivo je da su se prirodna eutektička otapala pokazala učinkovitijima za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata, što su zaključili i Liang i sur. (2015). Kao najpovoljnije otapalo se istaknulo ChGlc s 50 % vode s vrijednostima $\eta = 99,9 \%$, $ee = 98,6 \%$, $V_p = 181,8 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ i $V_E = 6,3 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$.

4.2.2. Enzimski katalizirana enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata pomoću korijena mrkve (*Daucus carota* L.)

Za provedbu hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodna eutektička otapala (ChGlc 30 %, ChGlc 50 %, ChGlc 80 %, ChGly 30 %, ChGly 50 %, ChGly 80 %), pufer i heptan dodano je 0,004 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata i 5 g mrkve *Daucus carota* L. Uspješnost reakcije u prirodnim eutektičkim otapalima i kalij-fosfatnom puferu određena je nakon 2 dana izuzimanjem određenog volumena reakcijske smjese iz kojeg je ekstrahiran zaostali supstrat i produkt u heptanu uz miješanje na vorteksu. Heptanski ekstrakt analiziran je plinskom kromatografijom.

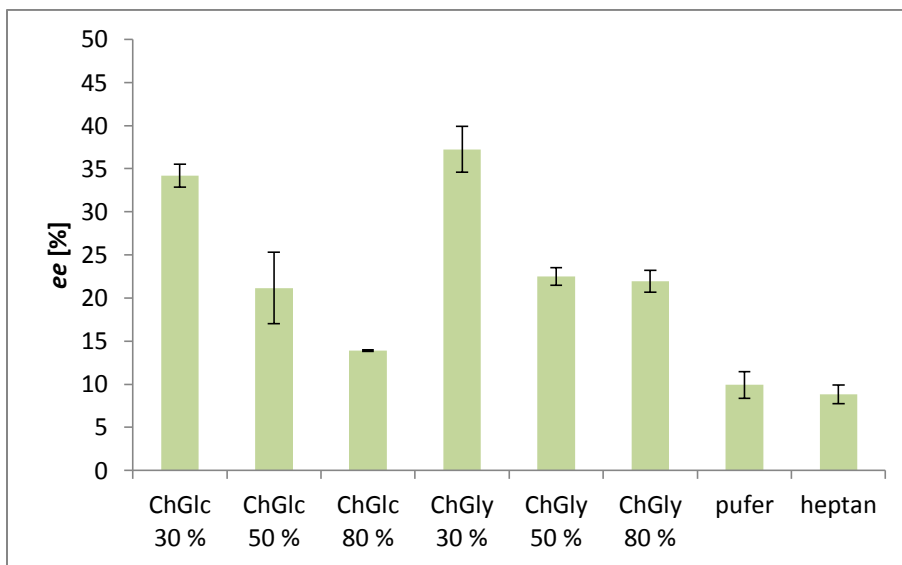
Reakcijska smjesa iz organskih otapala izravno je analizirana plinskom kromatografijom nakon 2 dana.

Zbog bolje interpretacije rezultata hidrolize katalizirane enzimima korijena mrkve prema jednadžbama [7], [8], [9] i [10] izračunata su iskorištenja hidrolize, volumetrijska produktivnost, enantiomerni višak te specifična produktivnost enzima, a rezultati su prikazani na slikama 16, 17, 18 i 19.



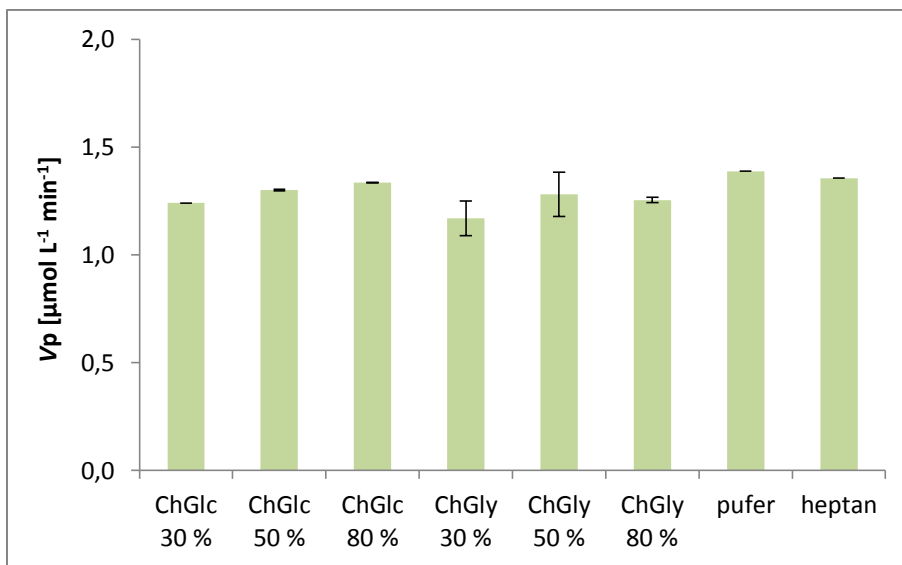
Slika 16. Iskorištenje hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,004 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 g mrkve *Daucus carota* L.; 25 °C; 48 h

U svim ispitanim otapalima uočena su visoka iskorištenja hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata (od 84,5 % za ChGly 30 % do 96,2 % za ChGlc 80 %), pri čemu je najveće iskorištenje uočeno u puferu (99,9 %). Također, iz rezultata je vidljivo da iskorištenje hidrolize raste s povećanjem udjela vode u prirodnom eutektičkom otapalu ChGlc, dok je iskorištenje u otapalu ChGly najveće pri udjelu vode 50 %, a nakon toga pada. Takav trend uočili su i Cvjetko Bubalo i sur. (2015a).



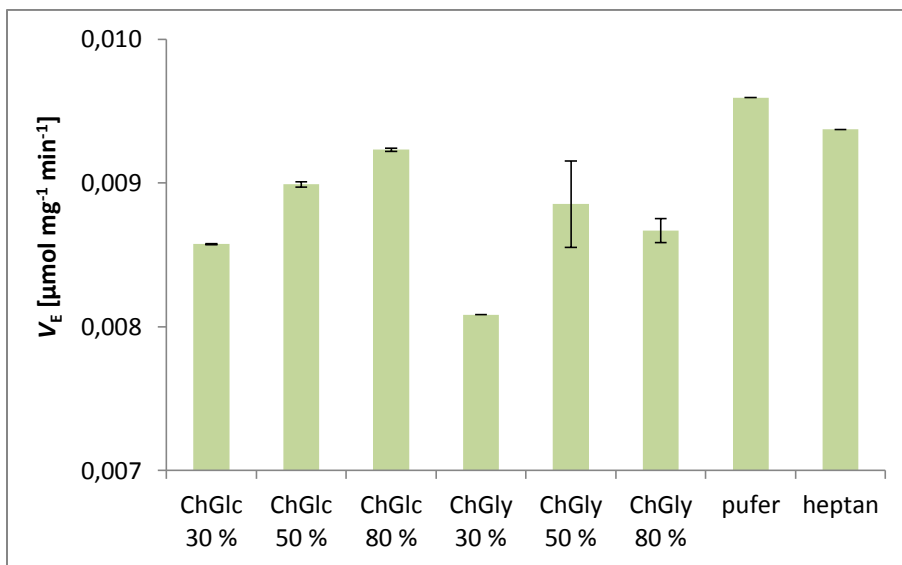
Slika 17. Enantiomerni višak hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,004 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 g mrkve *Daucus carota* L.; 25 °C; 48 h

Enantiomerni višak hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima mrkve iznosi najviše 37,2 % za ChGly 30 %. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem udjela vode enantiomerni višak smanjuje. Takav trend uočili su i Cvjetko Bubalo i sur. (2015a). Najmanja vrijednost enantiomernog viška dobivena je u prirodnom eutektičkom otapalu ChGlc 80 % (13,9 %), a još manje vrijednosti dobivene su u puferu (9,9 %) i heptanu (8,8 %). Pošto je enatiomerni višak nizak i ni *R*- ni *S*- alkohol ne nastaju u suvišku, enzimi korijena mrkve nisu stereospecifični za (*R,S*)-1-feniletil acetat nego mogu hidrolizirati i *R*- i *S*- enantiomer. Takav zaključak donijeli su i Vandenberghe i sur. (2013).



Slika 18. Volumetrijska produktivnost hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: $0,004 \text{ mol L}^{-1}$ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 g mrkve *Daucus carota* L.; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 48 h

Volumetrijska produktivnost hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve je neznatno veća u puferu i heptanu ($\approx 1,4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) u usporedbi s prirodnim eutektskim otapalima, ali općenito vrijednosti u prirodnim eutektskim otapalima kreću se od $1,2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ za ChGly 30 % do $1,3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ za ChGlc 80 %.



Slika 19. Specifična produktivnost enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,004 mol L⁻¹ (*R,S*)-1-feniletil acetata; 5 g korijena mrkve *Daucus carota* L.; 25 °C; 48 h

Najmanja vrijednost specifične produktivnosti enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve iznosi 0,008 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ za ChGly 30 %, a najveća za ChGlc 80 % 0,009 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Neznatno bolji rezultat specifične produktivnosti enzima dobiven je u puferu i heptanu što je vidljivo na slici 19.

Prirodno eutektičko otapalo ChGlc prema iskorištenju enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve je najpovoljnije otapalo. Udio vode u navedenom otapalu utjecao je na iskorištenje i enantiomerni višak dok su vrijednosti V_p i V_E približno jednake.

U zaključku, ako se usporedi hidroliza (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirana lipazom s hidrolizom provedenom s enzimima korijena mrkve kao biokatalizatorom, vrijednosti enantiomernog viška kod hidrolize katalizirane enzimima korijena mrkve su puno manje u odnosu na hidrolizu provedenu s izoliranom lipazom što daje veliku prednost korištenju izolirane lipaze iako je mnogo skuplja od lako dostupne mrkve. Također, volumetrijska produktivnost hidrolize i specifična produktivnost enzima znatno su manje kod hidrolize katalizirane enzimima korijena mrkve. Iako su se navedeni rezultati pokazali boljima za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata kataliziranu lipazom, rezultati iskorištenja hidrolize katalizirane enzimima korijena mrkve su se pokazali dobrima te bi se i korijen mrkve mogao koristiti kao biokatalizator u hidrolizi

(*R,S*)-1-feniletil acetata, uz optimiranje procesnih parametara, zbog niske cijene, blagih reakcijskih uvjeta i stvaranja manje količine otpada (Vandenberghe i sur., 2013) što je u skladu s načelima *zelene* kemije kojem bi se trebalo težiti.

5. Zaključci

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene *zelenih* otapala u hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil acetata kataliziranoj lipazom i enzimima korijena mrkve za dobivanje komercijalno zanimljivog organskog spoja, (*R*)-1-feniletanola. U tu svrhu pripravljena su prirodna eutektička otapala. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Prirodna eutektička otapala na bazi kolin-klorida pripravljena su zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida i glukoze, odnosno glicerola u odgovarajućem omjeru uz 100 % iskorištenje reakcije. Također, razrjeđivanjem su pripravljena otapala s različitim udjelom vode.
2. Dodatak određenog udjela vode u prirodna eutektička otapala kolin-klorid:glukoza i kolin-klorid:glicerol pozitivno utječe na tijek hidrolize katalizirane lipazom i po završetku reakcije dobivena su visoka iskorištenja hidrolize (>81 %), koja su u usporedbi s reakcijama provedenima u organskim otapalima viša (<51,1 %).
3. Iskorištenja enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata u prirodnim eutektičkim otapalima uz korijen mrkve kao biokatalizator su niža od referentnih otapala za razliku od enantiomernog viška. Obje vrijednosti su ovisne o dodanom udjelu vode u prirodna eutektička otapala.
4. Iskorištenja hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata katalizirane enzimima korijena mrkve su manja u usporedbi s lipazom B izoliranom iz *Candida antarctica*, no primjenom enzima korijena mrkve uz optimiranje procesnih parametara mogu se ostvariti dobri rezultate, što je vrijedan rezultat jer je prema principima *zelene* kemije korijen mrkve u prednosti nad izoliranim enzimom.
5. Uspoređujući iskorištenje i enantiomerni višak hidrolize katalizirane lipazom B izoliranom iz *Candida antarctica* i enzimima korijena mrkve *Daucus carota* L., učinkovitijim biokatalizatorom za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil acetata pokazala se izolirana lipaza, a kao najbolje otapalo kolin-klorid:glukoza s 50 % vode.
6. Odabirom biokatalizatora i otapala može se utjecati na uspješnost hidrolize (*R,S*)-1-feniletil acetata.

6. Literatura

Bommarius A.S., Riebel B.R. (2004) Biocatalysis. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. str. 2; 30-34; 159-162; 188-189; 334.

Cheng C., Ma J.H. (1996) Enantioselective synthesis of *S*(-)-1-phenylethanol in *Candida utilis* semi fed-batch cultures. *Process Biochemistry* **31**: 119-124.

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

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

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

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

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

Frade R.F.M., Simeonov S., Rosatella A.A., Siopa F., Afonso C.A.M. (2013) Toxicological evaluation of magnetic ionic liquids in human cell lines. *Chemosphere* **92**: 100-105.

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

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

Ghisalba O., Meyer H.P., Wohlgemuth R. (2010) Industrial biotransformation. U: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, Flickinger M.C., John Wiley & Sons, str. 1-18.

Gorke J.T., Srienc F., Kazlauskas R.J. (2010) Deep eutectic solvents for *Candida antarctica* lipase B-catalyzed reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1038**: 169-180.

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

Grogan G. (2009) Practical Biotransformations: A Beginner's Guide, John Wiley & Sons., str 4-6.

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

Hayyan M., Hashim M.A., Al-Saadi M.A., Hayyan A., AlNashef I.M., Mirghani M.E.S. (2013a) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**: 455-459.

Hayyan M., Hashim M.A., Hayyan A., Al-Saadi M.A., AlNashef I.M., Mirghani M.E.S., Saheed O.K. (2013b) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**: 2193-2195.

Holland H.L. (2002) Biocatalysis. U: Handbook of Green Chemistry and Technology, Clark J., Macquarrie D., Blackwell Science Ltd., str. 188-203.

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

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

Lancaster M. (2002) Principles of Sustainable and Green Chemistry. U: Handbook of Green Chemistry and Technology, Clark J., Macquarrie D., Blackwell Science Ltd., str. 10-26.

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

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

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

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

Suan C.L., Sarmidi M.R. (2004) Immobilised lipase-catalysed resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **28**: 111.

Tao J.A., Kazlauskas R. (2013) Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development, Wiley, str.1-67.

Thomas S.M., DiCosimo R., Nagarajan V. (2002) Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnology* **20**: 238-242.

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

Yadav J.S., Thirupathi Reddy P., Nanda S., Bhaskar Rao A. (2001) Stereoselective synthesis of (*R*)-(-)-denopamine, (*R*)-(-)-tembamide and (*R*)-(-)-aegeline via asymmetric reduction of azidoketones by *Daucus carota* in aqueous medium. *Tetrahedron: Asymmetry* **12**: 3381-3385.

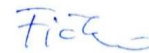
Yongxian F., Zhangming X., Huawei Z., Junqing Q. (2011) Kinetic Resolution of Both 1-Phenylethanol Enantiomers Produced by Hydrolysis of 1-Phenylethyl Acetate with *Candida antarctica* Lipase B in Different Solvent Systems. *Kinetics and Catalysis* **52**: 686-690.

Zhao H., Baker G. A., Holmes S. (2011) New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Organic & Biomolecular Chemistry* **9**: 1908-1916.

Zhao H., Zhang C., Crittle T.D. (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **85**: 243-247.

Izjava o izvornosti

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



Valentina Fičko