



POLİTEKNİK DERGİSİ

*JOURNAL of POLYTECHNIC*

ISSN: 1302-0900 (PRINT), ISSN: 2147-9429 (ONLINE)

URL: <http://dergipark.org.tr/politeknik>



# Yeşil çözücü ortamında enzimatik kinetik rezolüsyon yöntemi ile enantiyomerik saflıkta 1-feniletanol üretimi

## *The production of enantiomerically pure 1-phenylethanol in green solvent media via enzymatic kinetic resolution method*

Yazar(lar) (Author(s)): Ayşe BOZAN<sup>1</sup>, Rahime SONGÜR<sup>2</sup>, Ülkü MEHMETOĞLU<sup>3</sup>

ORCID<sup>1</sup>: 0000-0003-1201-9991

ORCID<sup>2</sup>: 0000-0002-1511-951X

ORCID<sup>3</sup>: 0000-0003-4293-2204

**To cite to this article:** Bozan A., Songür R. ve Mehmetoğlu Ü., “Yeşil çözücü ortamında enzimatik kinetik rezolüsyon yöntemi ile enantiyomerik saflıkta 1-feniletanol üretimi”, *Journal of Polytechnic*, 27(4): 1213-1222, (2024).

**Bu makaleye şu şekilde atıfta bulunabilirsiniz:** Bozan A., Songür R. ve Mehmetoğlu Ü., “Yeşil çözücü ortamında enzimatik kinetik rezolüsyon yöntemi ile enantiyomerik saflıkta 1-feniletanol üretimi”, *Politeknik Dergisi*, 27(4): 1213-1222, (2024).

Erişim linki (To link to this article): <http://dergipark.org.tr/politeknik/archive>

DOI: 10.2339/politeknik.740893

# Yeşil Çözücü Ortamında Enzimatik Kinetik Rezolüsyon Yöntemi ile Enantiyomerik Saflıkta 1-Feniletanol Üretimi

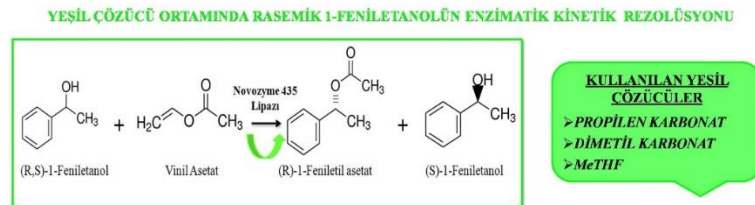
## The Production of Enantiomerically Pure 1-Phenylethanol in Green Solvent Media via Enzymatic Kinetic Resolution Method

### Önemli noktalar (Highlights)

- ❖ Yeşil Çözücü Ortamında Kinetik Rezolüsyon / Kinetic Resolution in Green Solvent Media
- ❖ Yeşil Çözücü Olarak Dimetil Karbonat / Dimethyl Carbonate as a Green Solvent
- ❖ Enantiyomerik Saflıkta 1-Feniletanol / Enantiomerically Pure 1-Phenylethanol
- ❖ Novozyme 435 Katalizörlüğünde Reaksiyon / Reaction Catalyzed by Novozyme 435

### Grafik Özet (Graphical Abstract)

Bu çalışmada rasemik 1-feniletanolün yeşil çözücü ortamında, Novozyme 435 lipazı varlığında kinetik rezolüsyonu gerçekleştirilmiştir. Yeşil çözücü olarak propilen karbonat (PK), dimetil karbonat (DMK) ve 2-metiltetrahidrofuran (MeTHF) kullanılmış, en uygun sonuçlar DMK ortamında sağlanmıştır. / In this work, the kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol was performed in green solvent media by using Novozyme 435 lipase. Propylene carbonate (PC), dimethyl carbonate (DMC) and 2-methyltetrahydrofuran (MeTHF) were used as green solvents and best results were obtained with DMC.



**Şekil.** Yeşil çözücü ortamında enantiyomerik saflıkta 1-feniletanol üretimi /**Figure.** Production of enantiomerically pure 1-phenylethanol in green solvent media

### Amaç (Aim)

Bu çalışmada, rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonunun farklı yeşil çözücü ortamlarında gerçekleştirilmesi ve bu reaksiyonda geleneksel çözücülerin yerini alabilecek bir yeşil çözücü tespit edilmesi amaçlanmıştır. / In this work, it was aimed to perform the enzymatic kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol in different green solvents and to determine a green solvent in order to replace with the traditional solvents.

### Tasarım ve Yöntem (Design & Methodology)

Reaksiyon cam biyoreaktörde, orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiş olup numuneler HPLC ile analizlenmiştir. / Reactions were performed in a glass bioreactor, inside an orbital shaker. Samples were analyzed with HPLC.

### Özgünlük (Originality)

Bu çalışmada, “en yeşil çözücülerden biri” olarak nitelendirilen DMK rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonunda ilk kez çözücü ortamı olarak kullanılmıştır. / In this work, DMC, which is defined as “among the greenest solvents” was used as a solvent media for the first time in the enzymatic kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol.

### Bulgular (Findings)

Kullanılan yeşil çözücüler arasında en iyi sonuçlar DMK ile sağlanmıştır. / Among the green solvents, best results were obtained with DMC.

### Sonuç (Conclusion)

DMK'nın yeşil çözücü özelliklerinin yanı sıra yüksek enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm sağlaması neticesinde geleneksel çözücülerin yerine geçebileceği anlaşılmıştır. / It was understood that DMC can be replaced with the traditional solvents considering high enantiomeric excess and conversion values obtained besides its green solvent properties.

### Etik Standartların Beyanı (Declaration of Ethical Standards)

Bu makalenin yazar(lar)ı çalışmalarında kullandıkları materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve/veya yasal-özel bir izin gerektirmediğini beyan ederler. / The author(s) of this article declare that the materials and methods used in this study do not require ethical committee permission and/or legal-special permission.

# Yeşil Çözücü Ortamında Enzimatik Kinetik Rezolüsyon Yöntemi ile Enantiyomerik Saflıkta 1-Feniletanol Üretimi

*Araştırma Makalesi / Research Article*

**Ayşe BOZAN, Rahime SONGÜR, Ülkü MEHMETOĞLU\***

Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara Üniversitesi, Türkiye

(Geliş/Received : 23.05.2020 ; Kabul/Accepted : 16.09.2020 ; Erken Görünüm/Early View : 25.09.2020)

## ÖZ

Çözücüler kimyasal proseslerdeki en kritik bileşenlerdendir. Bu yüzden çözücünün yapısı, maliyeti ve ulaşılabilir olması gibi önemli özelliklerinin yanı sıra güvenilir ve çevre dostu olması da gerekmektedir. Bu nedenle, son zamanlarda geleneksel çözücülerin yerini alabilecek yeşil çözücü arayışları hız kazanmıştır. Bu çalışmada değerli kimyasalların üretiminde önemli kiral yapı bloklarından olan 1-feniletanolün "yeşil çözücü ortamında" enantiyomerik saflıkta elde edilmesi amaçlanmış ve bu doğrultuda propilen karbonat (PK), dimetil karbonat (DMK) ve 2-metiltetrahidrofuran (MeTHF) kullanılmıştır. En iyi sonuçlar DMK kullanıldığında sağlanmış olup 240 mM substrat ve 20 mg/mL lipaz derişimlerinde, 40°C ve 250 rpm'de gerçekleştirilen 3 saat reaksiyon sonunda substrat için %100 enantiyomerik aşırılık (ee<sub>s</sub>) ile %50 dönüşüme ulaşılmıştır. Bu çalışma ile "en yeşil çözücülerden biri" olarak nitelendirilen DMK ilk kez rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonunda çözücü ortamı olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, literatürde hem geleneksel hem de diğer yeşil çözücülerle gerçekleştirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında DMK'nın düşük eko-toksikliği, biyo-bozunurluğu, düşük maliyetli olması gibi avantajlı özelliklerinin yanı sıra yüksek ee<sub>s</sub> ve dönüşüm de sağlaması neticesinde bu çözücülerin yerine geçebileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yeşil çözücü, dimetil karbonat, 1-feniletanol, kinetik rezolüsyon, Novozyme 435.

## The Production of Enantiomerically Pure 1-Phenylethanol in Green Solvent Media via Enzymatic Kinetic Resolution Method

### ABSTRACT

Solvents are among the most critical components in chemical processes. For this reason, in addition to its important properties such as structure, cost and availability, a solvent must be also safe and environmentally friendly. Therefore, the research on the use of green solvents to replace the traditional ones have gained wide interest. 1-phenylethanol is one of the important chiral building blocks which are used for producing fine chemicals in several industries. In this work, it was aimed to produce enantiomerically pure 1-phenylethanol in the green solvent media. Accordingly, propylene carbonate (PC), dimethyl carbonate (DMC) and 2-methyltetrahydrofuran (MeTHF) were used. Best results were obtained by using DMC. 100% enantiomeric excess for the substrate (ee<sub>s</sub>) and 50% conversion were reached with 240 mM substrate concentration, 20 mg/mL lipase concentration and 3 hours reaction time at 40°C and 250 rpm. In this work; DMC, which is characterized as "one of the greenest solvents", was used as the reaction solvent for the first time in the enzymatic kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol. When compared with the literature, in which both traditional and other green solvents were used, it was observed that DMC can replace these solvents, considering its advantageous properties such as low eco-toxicity, high biodegradability and low cost, together with its high ee<sub>s</sub> and conversion values.

**Keywords:** Green solvent, dimethyl carbonate, 1-phenylethanol, kinetic resolution, Novozyme 435.

### 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Geçtiğimiz yıllarda, ilaç endüstrisinde kiralitenin etkilerinin bilinmemesinden ötürü yaşanan olumsuzluklar günümüzde kiralitenin önemi ve biyolojik aktiviteyle güçlü ilişkisine yönelik farkındalık oluşturmuş ve böylelikle enantiyomerik saflıkta bileşiklerin daha düşük maliyetle geliştirilmesine yönelik

büyük bir ihtiyaç yaratmıştır [1-4]. Bu zamana kadar anestezi, antibiyotik, anti-kanser, kardiyovasküler vb. çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan 2500'den fazla kiral ilaç geliştirilmiş olup günümüzde ticari olarak kullanılmaktadır [5].

Enantiyomerik saflıkta bileşiklerin kullanılması sadece ilaç endüstrisinde değil aynı zamanda kozmetik, tarım, gıda, tekstil ve kimya sektörlerinde de büyük önem taşımakta ve bu nedenle de hem ticari hem de akademik alanda araştırmacıların ilgisini çekmektedir [1, 6, 7].

\*Sorumlu Yazar (Corresponding Author)  
e-posta : mehmet@eng.ankara.edu.tr

Sekonder alkoller, lipaz katalizörü varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda en sık kullanılan substratlardır [8]. 1-feniletanol; kiral türevleri farmasötik, zirai, aromatik endüstrilerinde ve değerli kimyasalların üretiminde kullanılan ve bu nedenle ilgi çeken bir sekonder alkoldür [6, 9, 10]. R-1-feniletanol kolesterolün emilimini inhibe ederek kolesterol seviyesini düşürür, kozmetik endüstrisinde koku bileşeni, farmasötik endüstrisinde optalmik koruyucu, kimya endüstrisinde boyar madde olarak kullanılır [9]. 1-feniletanolün ester türevleri temizlik ve kozmetik endüstrilerinde koku bileşeni olarak kullanılır [10].

Kiral alkollerin enantiyomerik saflıkta elde edilmesi amacıyla kullanılan en yaygın yöntem kinetik rezolüsyondur. Bu yöntem, rasemik karışımın her iki enantiyomerinin kiral bir girdiyle farklı hızlarda reaksiyona girmesi sonucu enantiyomerlerin ayrılması yoluyla gerçekleştirilir, yüksek substrat derişiminde ve ılımlı işletim koşullarında çalışmaya olanak tanınması açısından asimetrik sentezden daha ekonomiktir [1, 8, 11-13]. Yalnızca bir enantiyomer reaksiyona girdiğinden teorik olarak en fazla %50 dönüşüm sağlanır.

Lipazlar serin hidrolaz ailesine mensup enzimler olup hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda, bakterilerde bulunur ve organik sentezlerde katalizör olarak yaygın şekilde kullanılırlar [3, 8, 14-16]. Novozyme 435, *Candida Antarctica* Lipase B'nin akrilik polimer reçineye tutuklanması yoluyla elde edilen ve sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonunda sıklıkla tercih edilen bir lipazdır [17, 18].

Çözücüler, kimyasal proseslerde ısı ve kütle transferini sağlayacak, moleküller arası kuvvetler ile reaktantlar arasındaki etkileşimleri kontrol edecek ortamı oluşturmak açısından anahtar bileşenler olup bir proseste kullanılan kimyasalların yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır [19-22]. Bu nedenle bir kimyasal reaksiyon için seçilecek çözücünün ulaşılabilir ve düşük maliyetli olmasının yanı sıra güvenli, çevre-dostu ve canlı sağlığına zarar vermeyen nitelikte de olması gerekmektedir. Geleneksel organik çözücüler reaksiyona yönelik olumlu etkilerine rağmen uçucu/yanıcı/patlayıcı olup çevreye ve canlı sağlığına zararlıdır. Biyobozunur olmayışları ve toksik etkileri akut ve kronik düzeyde olumsuz sonuçlar oluşturmaktadır [23]. Bu nedenle, son yıllarda "yeşil kimya" kapsamında alternatif çözücü arayışları önem ve hız kazanmıştır.

Yeşil kimyanın on iki prensibinden esinlenerek, yeşil çözücülerin sahip olması beklenen 12 kriter şu şekilde sıralanmıştır : erişilebilirlik, fiyat, geri kazanım, saflık düzeyi, sentez sırasındaki enerji sarfiyatının düşük olması, düşük toksiklik, biyo-bozunabilirlik, yüksek performans, dayanıklılık, yanıcı olmama, kolay depolanma, yenilenebilir kaynaklardan elde edilme. Bu kriterlerin tamamını sağlayan bir çözücü bulunmamaktadır. Öte yandan son on yılda, bu özelliklerin büyük çoğunluğunu sağlayan bazı çözücüler geliştirilmiştir [19].

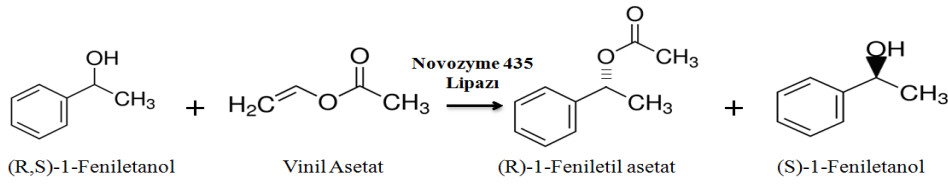
Son yıllarda, yeşil çözücülere yönelik yapılan çalışmalarda iyonik sıvılar, derin ötektik çözücüler, organik karbonatlar ve biyokütleden elde edilen çözücülerin kullanımı incelenmektedir [20, 22-32].

Kiral 1-feniletanol türevlerinin pek çok alandaki önemi dikkate alınarak, rasemik 1-feniletanolün lipaz katalizörlüğünde kinetik rezolüsyonuna yönelik literatürde çeşitli çalışmalar yer almakta olup ayrıca reaksiyonun "yeşil çözücü ortamında" gerçekleştirilmesine yönelik de bazı çalışmalar yapılmıştır [6, 7, 22, 25, 26, 30, 33]. Bu çalışmalarda, yeşil çözücü olarak çoğunlukla iyonik sıvılar tercih edilmiştir. Fakat iyonik sıvılar sentezlerinin çok basamaklı olması, toksik girdiler içermesi, yüksek maliyetleri ve suda çözünürlüklerinden ötürü canlı sağlığını olumsuz etkilemeleri gibi bazı olumsuz özelliklere sahiptir [29, 30, 34]. Rasemik 1-feniletanolün lipaz katalizörlüğünde, yeşil çözücü ortamında kinetik rezolüsyonuna yönelik olarak literatürde incelenen diğer bazı çözücüler organik karbonatlardan biri olan propilen karbonat (PK) ve biyokütleden üretilen 2-metiltetrahidrofuran (MeTHF) (CO<sub>2</sub> ile genleşmiş) olarak örneklendirilebilir [22, 25, 26].

Organik karbonatlar, 1950'li yıllardan itibaren bilinen organik çözücülerin ilgi çekici bir sınıfı olup ortalama çevre koşullarında stabil olmaları, düşük fiyatlara yüksek miktarlarda tedarik edilebilmeleri, düşük eko-toksiklik sergilemeleri ve tamamen biyo-bozunabilir olmaları, yüksek seçicilik ve hız sağlamaları nedenleriyle biyokimyasal reaksiyonlar için uygun çözücülerdir. Organik karbonatların düşük fiyatlara yüksek miktarlarda tedarik edilebilmeleri onların (diğer yeşil çözücülerin büyük kısmından farklı olarak) ticari ölçekli sentezlerde de kullanılmasına imkan tanımaktadır. Organik karbonatlar içerisinde özellikle PK, dimetil karbonat (DMK), dietilkarbonat, etilen karbonat, bütülen karbonat ve gliserol karbonat reaksiyonlarda çözücü olarak kullanılacak organik karbonatlar olarak önerilmektedir [20].

Rasemik 1-feniletanolün lipaz katalizörlüğünde "organik karbonat çözücü ortamında" kinetik rezolüsyonuna yönelik literatürde yalnızca PK çözücü ortamında çalışma yapılmış olup aynı çalışma grubu tarafından yayımlanan iki makale neticesinde substratın enantiyomerik aşırılığının (ee<sub>s</sub>), ürünün enantiyomerik aşırılığının (ee<sub>p</sub>), dönüşüm ve enantiyomerik oranın (E) sırasıyla %93, %99, %48 ve >684 olarak sağlandığı belirtilmiştir [25, 26].

Organik karbonatlar sınıfına mensup DMK, yeşil çözücü olarak dikkat çekici bir çözücü olup güvenlik, sağlık, çevresel kriterler göz önüne alınarak düzenlenen çözücü seçim kılavuzuna göre en yeşil ve bu nedenle en fazla önerilen çözücüler sınıfında yer almaktadır [27]. Öte yandan, rasemik 1-feniletanolün DMK çözücü ortamında



**Şekil 1.** Rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonu (Enzymatic kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol)

kinetik rezolüsyonuna yönelik literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

MeTHF; tamamen yenilenebilir biyokütleden üretilen (mısır koçanı, şeker kamışı küspesi ve yulaf kavuzu) biyo-bozunabilir bir çözücü olup artan bir şekilde THF yerine kullanılmaya başlanmıştır ve biyokatalitik reaksiyonlar için umut vaat edici bir ortam olarak önerilmektedir. MeTHF biyo-kütleden üretilmesi, toksikoloji çalışmalarına göre farmasötik ve kimyasal alanlarda kullanıma elverişli olması ve proses sonrası gün ışığında ve hava varlığında degrades olması (oksidasyon ve halka açılması ile) gibi nedenlerle kullanımı artan bir yeşil çözücü haline gelmiştir [19, 22, 24, 31, 35]. Rasemik 1-feniletanolün lipaz katalizörlüğünde "MeTHF çözücü ortamında" kinetik rezolüsyonuna yönelik literatürde yalnızca bir çalışma yapılmış olup çalışmada dönüşüm %23, ee<sub>p</sub> >%99 ve E>200 olarak sağlanmıştır [22].

Bu çalışmada, ilaçların ve değerli kimyasalların üretilmesi için önemli kiral yapı bloklarından olan 1-feniletanolün "yeşil çözücü ortamında" enzimatik kinetik rezolüsyon yöntemiyle enantiyomerik saflıkta elde edilmesi amaçlanmıştır ve bu doğrultuda biyo-bozunurluk, düşük eko-toksiklik, yüksek seçicilik, düşük maliyet gibi özellikleri göz önüne alınarak geleneksel çözücülerin yerine geçebileceği değerlendirilen PK, DMK ve MeTHF çözücü ortamı olarak incelenmiştir. Bu çalışma ile "en yeşil çözücülerden biri" olarak nitelendirilen DMK ilk kez "rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonunda" çözücü ortamı olarak kullanılmış, dönüşüm ve ee<sub>s</sub> açısından olumlu sonuçlar alındığından, bu çözücü kullanılarak molar açıl verici : substrat oranı, karıştırma hızı, lipaz derişimi, sıcaklık ve substrat derişimi gibi parametrelerin reaksiyona etkileri incelenmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOD (MATERIAL AND METHOD)

### 2.1. Materyal (Material)

(R,S)-1-feniletanol (%98), (R)- ve (S)-1-feniletanol (%97), 1-feniletıl asetat (≥%98), PK (%99.7), DMK (≥%99), MeTHF (≥%99.5) ve vinil asetat (≥%99), hekzan (≥%97), 2-propanol (≥%99,9) Sigma, Aldrich, Merck ve Fluka firmalarından tedarik edilmiştir. Novozyme 435 (>5,000 propil laurat ünitesi (PLU)/g) lipazı Novozymes firması tarafından hediye edilmiştir.

### 2.2. Yöntem (Method)

#### 2.2.1. Rasemik 1-feniletanolün yeşil çözücü ortamında kinetik rezolüsyonu (Kinetic resolution of racemic-1-phenylethanol in green solvent media)

Rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonu 25 mL hacimli cam biyoreaktörde, 3 mL çalışma hacminde, sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollü orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

240-1000 mM rasemik 1-feniletanol yeşil çözücü ortamında çözüldükten sonra ortama istenilen molar açıl verici : substrat oranını sağlayacak miktarda vinil asetat ve 3-20 mg/mL lipaz eklenerek reaksiyon başlatılmıştır.

Reaksiyonlar 3-5 saat süresince, 24-56°C'de, 75-300 rpm karıştırma hızlarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra lipaz süzülüp yeşil çözücü ise döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmış, numuneler hekzanda çözülerek Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizlenmiştir. Çözücü ortamı olarak PK kullanılması durumunda yeşil çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmamış, 2-propanol ile yarı yarıya seyreltilerek HPLC'de analizlenmiştir. Deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup verilen sonuçlar aritmetik ortalama alınarak hesaplanmıştır.

#### 2.2.2. HPLC analizi (HPLC analysis)

Reaksiyon sonunda numuneler HPLC (Thermo Finnigan Spectra System) ile Chiralcel OD kolonda (4,6 x 250 mm) (Daicel Chemical), taşıyıcı faz olarak hekzan/2-propanol (97:3) kullanılarak (1,1 mL/dk akış hızında), UV dedektörde (254 nm dalga boyunda) analizlenmiş olup HPLC'deki pik alanları kullanılarak, Eşitlik 1-3'te belirtilen şekilde ee<sub>s</sub>, ee<sub>p</sub> ve dönüşüm hesaplanmıştır [6, 33].

$$\%ee_s = [(S - R) \div (R + S)] \times 100 \quad (1)$$

$$\%ee_p = [(R - S) \div (R + S)] \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Dönüşüm} = [(ee_s) \div (ee_s + ee_p)] \times 100 \quad (3)$$

## 3. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME (RESULTS AND DISCUSSION)

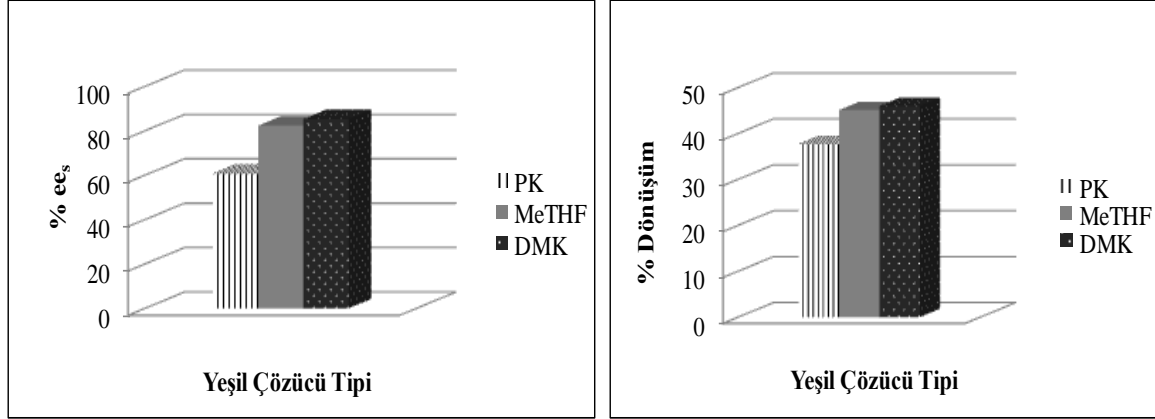
### 3.1. Yeşil Çözücü Seçimi (The Selection of the Green Solvent)

Rasemik 1-feniletanolün Novozyme 435 lipazı katalizörlüğünde, yeşil çözücü ortamında kinetik rezolüsyonuna yönelik reaksiyon Şekil 1'de yer almakta

olup incelenen tüm şartlarda rasemik 1-feniletanolün yalnızca R-enantiyomeri seçicilik göstermiş, reaksiyon sonucu R-1-feniletanolden R-1-feniletasetat elde edilmiş ve S-1-feniletanol değişmeden kalmıştır.

Yeşil çözücü ortamında gerçekleşecek reaksiyon için başlangıç reaksiyon koşulları ön-çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir.

dönüşüm %5,7,  $ee_p > \%99$  olarak sağlanmıştır [22]. Bu çalışmada ise, 240 mM substrat derişiminde, 4 saat reaksiyon sonucunda %82,3  $ee_s$ , %100  $ee_p$  ve %45,1 dönüşüm sağlanmıştır.



**Şekil 2.** Yeşil çözücü tipinin  $ee_s$  ve dönüşüme etkisi (Substrat derişimi = 240 mM, molar açıl verici : substrat oranı = 3 : 1, lipaz derişimi = 11 mg/mL, sıcaklık = 40°C, karıştırma hızı = 250 rpm, reaksiyon süresi = 4 saat) (The effect of green solvent type on  $ee_s$  and conversion (Substrate concentration = 240 mM, molar ratio of acyl donor : substrate = 3 : 1, lipase concentration = 11 mg/mL, temperature = 40°C, stirring rate = 250 rpm, reaction time = 4 hours))

Yeşil çözücü tipinin  $ee_s$  ve dönüşüme etkisi Şekil 2’de verilmiştir. Yalnızca R-1-feniletanol reaktif olduğundan tüm çalışmalarda  $ee_p$  değeri %100 olarak hesaplanmıştır.

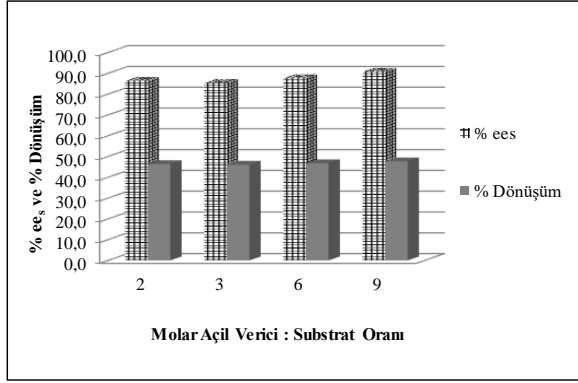
Şekil 2’de görüldüğü gibi en yüksek  $ee_s$  ve dönüşüm değerleri DMK çözücü ortamında elde edilmiş, bu nedenle sonraki çalışmalarda yeşil çözücü olarak DMK kullanılmıştır. Bu çalışma, DMK’ın bu reaksiyonda çözücü olarak kullanıldığı ilk çalışma olduğundan literatürle karşılaştırma yapılamamıştır. Öte yandan, hem MeTHF hem de PK çözücü ortamlarında elde edilen sonuçların literatürde, aynı çözücü ortamlarında ve aynı lipaz katalizörü varlığında, elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında umut vaat edici olduğu ve ayrı bir çalışma kapsamında bu çözücü ortamlarında gerçekleştirilen reaksiyon koşullarının optimize edilebileceği değerlendirilmiştir. Örneğin, Wu vd. (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, çözücü olarak PK kullanılmış; 83 mM substrat derişiminde (substrat molünün 1/10’u oranında kullanılan katkı maddesi trietilamin ilavesi ile), 24 saat sonunda  $ee_s$ ,  $ee_p$ , dönüşüm ve E sırasıyla %93, %99, %48 ve >684 olarak sağlanmıştır. Katkı maddesi ilave edilmediğinde ise  $ee_s$  %47, E 321 olarak bulunmuştur [26]. Bu çalışmada ise 240 mM substrat derişiminde, 4 saat reaksiyon sonunda  $ee_s$  %60,7,  $ee_p$  %100 ve dönüşüm %37,7 olarak sağlanmıştır. Ayrıca, Hoang vd. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 40 mM substrat derişiminde, 1 saat reaksiyon sonunda, çözücü olarak “CO<sub>2</sub> ile genişmiş MeTHF” kullanıldığında dönüşüm %23,  $ee_p > \%99$  ve E>200 olarak, yalnızca MeTHF kullanıldığında

### 3.2. Reaksiyona Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi (Investigation of the Parameters Effecting the Reaction)

#### 3.2.1. Molar açıl verici : substrat oranının etkisi (The effect of the molar ratio of acyl donor to substrate)

Reaksiyon için uygun yeşil çözücü seçimi yapıldıktan sonra, öncelikle açıl verici etkisi incelenmiştir. Açıl vericinin yapısı ve zincir uzunluğunun lipazın aktivitesi ve seçiciliği üzerinde etkin bir rolü olması nedeniyle kullanılacak açıl verici oldukça önemlidir [36]. Bu çalışmada, açıl verici olarak vinil asetat kullanılmıştır. Çünkü vinil asetat kullanılması durumunda reaksiyon esnasında oluşan kararsız yan ürün, vinil alkol, keto-enol totomerizasyonu ile hızla asetaldehite dönüştüğünden reaksiyon tersinmez hale gelir [8, 14, 37]. Çalışmada molar açıl verici : substrat oranının  $ee_s$  ve dönüşüme etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3’te verilmiştir.

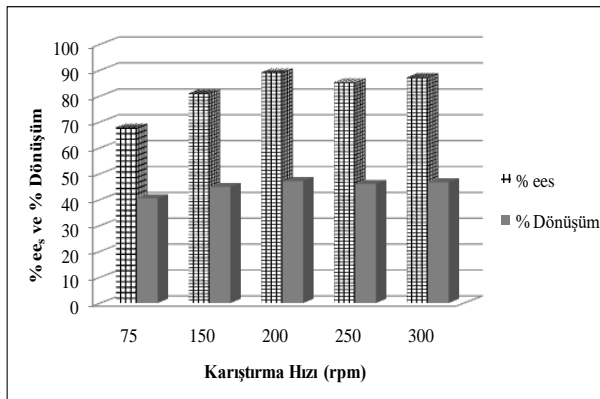
Şekil 3’te de görüldüğü gibi artan açıl verici : substrat oranına bağlı olarak  $ee_s$  ve dönüşümde belirgin bir değişim gözlenmemiş, açıl verici inhibisyonu meydana gelmemiştir. Sonraki çalışmalarda literatürle de uyumlu şekilde 3:1 molar açıl verici : substrat oranı kullanılarak devam edilmiştir [10].



**Şekil 3.** Molar açıl verici : substrat oranının ee<sub>s</sub> ve dönüşüme etkisi (Substrat derişimi = 240 mM, lipaz derişimi = 11 mg/mL, sıcaklık = 40°C, karıştırma hızı = 250 rpm, reaksiyon süresi = 4 saat) (The effect of molar ratio of acyl donor to substrate on ee<sub>s</sub> and conversion (Substrate concentration = 240 mM, lipase concentration = 11 mg/mL, temperature = 40°C, stirring rate = 250 rpm, reaction time = 4 hours))

### 3.2.2. Karıştırma hızının etkisi (The effect of stirring rate)

En uygun karıştırma hızının belirlenmesi için, 75-300 rpm aralığında beş farklı karıştırma hızında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4'te yer almakta olup sonuçlara göre 150 rpm üzerinde çalışılmasının uygun olduğu gözlenmiş, 200 rpm üzerinde ise ee<sub>s</sub> ve dönüşüm değerlerinde belirgin bir değişim bulunmadığı değerlendirilmiştir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda kullanılacak karıştırma hızı, uygun çalışma aralığı içerisinde 250 rpm olarak belirlenmiştir.

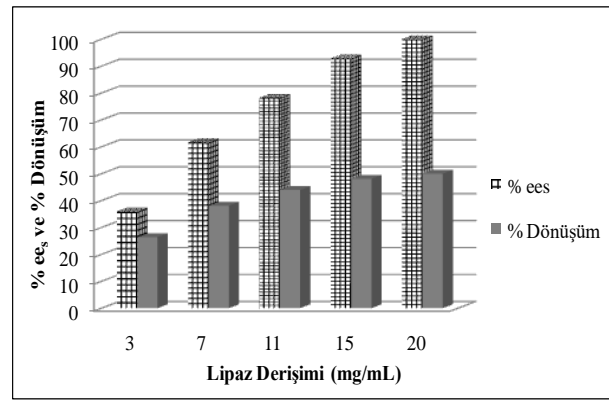


**Şekil 4.** Karıştırma hızının ee<sub>s</sub> ve dönüşüme etkisi (Substrat derişimi = 240 mM, molar açıl verici substrat oranı = 3 : 1, lipaz derişimi = 11 mg/mL, sıcaklık = 40°C, reaksiyon süresi = 4 saat) (The effect of stirring rate on ee<sub>s</sub> and conversion (Substrate concentration = 240 mM, molar ratio of acyl donor : substrate = 3 : 1, lipase concentration = 11 mg/mL, temperature = 40°C, reaction time = 4 hours))

### 3.2.3. Lipaz derişiminin etkisi (The effect of lipase concentration)

Lipaz katalizörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyonlarda incelenmesi gereken en önemli parametrelerden biri de lipazın derişimidir. Lipaz derişiminin artırılması sonucu artan enzim aktif bölgeleri sayesinde reaktantlarla etkileşim, böylelikle de reaksiyon hızı artar [10]. Öte yandan, lipaz derişiminin artırılması reaksiyonun maliyetini de yükselteceğinden reaksiyonun hem hızı hem de maliyeti göz önüne alınarak optimum derişimin belirlenmesi önemlidir.

Lipaz derişiminin reaksiyona etkisinin incelenmesi amacıyla 3-20 mg/mL aralığında beş farklı lipaz derişiminde, 3 saat boyunca gerçekleştirilen reaksiyon sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 5'te yer almaktadır.

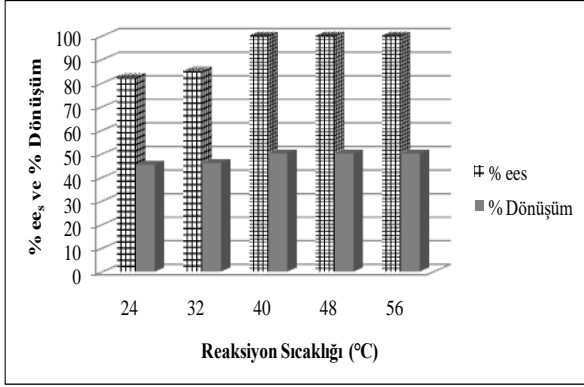


**Şekil 5.** Lipaz derişiminin ee<sub>s</sub> ve dönüşüme etkisi (Substrat derişimi = 240 mM, molar açıl verici substrat oranı = 3 : 1, sıcaklık = 40°C, karıştırma hızı = 250 rpm, reaksiyon süresi = 3 saat) (The effect of lipase concentration on ee<sub>s</sub> and conversion (Substrate concentration = 240 mM, molar ratio of acyl donor : substrate = 3 : 1, temperature = 40°C, stirring rate = 250 rpm, reaction time = 3 hours))

Şekil 5'te lipaz derişiminde artışa bağlı olarak ee<sub>s</sub> ve dönüşüm değerlerinde de artış gözlemlendiği tespit edilmiş, sonraki çalışmalarda kullanılacak lipaz derişimi 20 mg/mL olarak belirlenmiştir.

### 3.2.4. Sıcaklığın etkisi (The effect of temperature)

Enzimatik reaksiyonların sıcaklıkla ilişkisi oldukça karmaşıktır. Sıcaklık artışına bağlı olarak enzim yapısında deformasyon olmazsa, hız çoğunlukla Arrhenius sıcaklık denkleminin uyar. Öte yandan, sıcaklık artışına bağlı olarak enzim deforme olabilir ve katalitik aktivitesini kaybedebilir [38]. Tutuklanmış lipazlar ise enzimin çevresel koşullara dayanımını artırarak daha yüksek sıcaklıklarda çalışılmasına olanak tanır. Novozyme 435 lipazı için optimum çalışma sıcaklığı aralığının 30-60°C olduğu bilinmektedir. Sıcaklığın reaksiyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 24-56°C aralığında beş farklı reaksiyon sıcaklığında çalışılmış olup elde edilen sonuçlar Şekil 6'da yer almaktadır.



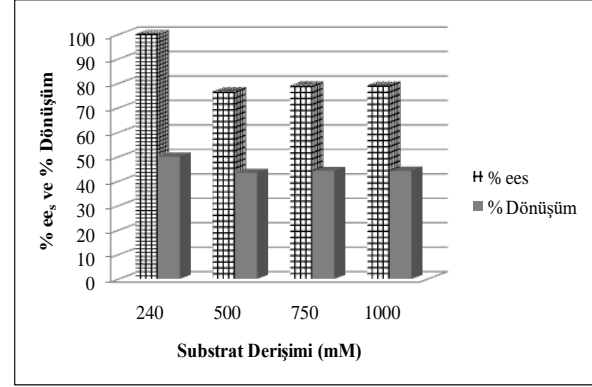
**Şekil 6.** Reaksiyon sıcaklığının ee<sub>s</sub> ve dönüşüme etkisi (Substrat derişimi = 240 mM, molar açıl verici substrat oranı = 3 : 1, lipaz derişimi = 20 mg/mL, karıştırma hızı = 250 rpm, reaksiyon süresi = 3 saat) (The effect of reaction temperature on ee<sub>s</sub> and conversion (Substrate concentration = 240 mM, molar ratio of acyl donor : substrate = 3 : 1, lipase concentration = 20 mg/mL, stirring rate = 250 rpm, reaction time = 3 hours))

Şekil 6'da, Novozyme 435 lipazının 24-56°C çalışma aralığında aktivitesini kaybetmediği gözlenmiştir. 40°C ve üzerindeki sıcaklıklarda 3 saat reaksiyon sonunda %100 ee<sub>s</sub> ve %50 dönüşüm sağlanmıştır. 40°C üzerinde, sıcaklık artışına bağlı olarak ee<sub>s</sub> ve dönüşüm değerlerinde belirgin bir değişiklik gözlenmediğinden sonraki çalışmalarda reaksiyon sıcaklığı 40°C olarak kullanılmıştır.

### 3.2.5. Substrat derişiminin etkisi (The effect of substrate concentration)

Reaksiyonun ekonomik açıdan da tercih edilebilir olmasının koşullarından biri de reaksiyonun yüksek substrat derişiminde gerçekleştirilebilmesidir. Bu nedenle, yukarıda belirlenen reaksiyon koşullarında yüksek substrat derişiminin reaksiyona etkisi incelenmiş olup artan substrat derişiminin ee<sub>s</sub> ve dönüşüme etkisi Şekil 7'de yer almaktadır.

Şekil 7'de 240 mM substrat derişiminde, üç saat reaksiyon sonucunda %100 ee<sub>s</sub> ve %50 dönüşüme ulaşıldığı, ayrıca 1 M substrat derişiminde 3 saat reaksiyon sonunda % 79,1 ee<sub>s</sub> ve %44,2 dönüşüm sağlandığı görülmektedir. Ayrıca, Şekil 7'de yer almakla birlikte, 1 M substrat derişiminde reaksiyon süresinin artırılması neticesinde (5 saat sonunda) %94,4 ee<sub>s</sub>, %100 ee<sub>p</sub> ve %48,6 dönüşüme ulaşılmıştır.



**Şekil 7.** Substrat derişiminin ee<sub>s</sub> ve dönüşüme etkisi (Molar açıl verici substrat oranı = 3 : 1, lipaz derişimi = 20 mg/mL, sıcaklık = 40°C, karıştırma hızı = 250 rpm, reaksiyon süresi = 3 saat) (The effect of substrate concentration on ee<sub>s</sub> and conversion (Molar ratio of acyl donor : substrate = 3 : 1, lipase concentration = 20 mg/mL, temperature = 40°C, stirring rate = 250 rpm, reaction time = 3 hours))

### 3.2.6. Sonuçların özetlenmesi (The summary of the results)

Çizelge 1'de; bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile literatürde aynı lipaz (Novozyme 435), aynı açıl verici (vinil asetat) ve aynı çözücü ortamı (MeTHF ve PK) kullanılarak gerçekleştirilen diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmaktadır. Literatürde, DMK çözücü ortamında başka bir çalışma bulunmadığından DMK çözücü ortamında elde edilen sonuçlar aynı lipaz ve açıl verici kullanılarak, farklı çözücülerde gerçekleştirilen diğer çalışmalara karşılaştırılmıştır.

DMK çözücü ortamında elde edilen sonuçlar hem geleneksel hem de diğer yeşil çözücülerle gerçekleştirilen diğer çalışmalara (aynı lipaz ve açıl verici kullanılan) karşılaştırıldığında DMK'nın düşük eko-toksikliği, biyo-bozunurluğu, düşük maliyetli olması gibi avantajlı özelliklerinin yanı sıra yüksek ee<sub>s</sub> ve dönüşüm de sağlama neticesinde bu çözücülerin yerine geçebileceğini göstermiştir [6, 37, 39, 40].

Bu çalışmada en uygun çözücü DMK olarak seçilse de, Çizelge 1'den hem MeTHF hem de PK çözücü ortamlarında elde edilen sonuçların literatürde elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında umut vaat edici ve geliştirilebilir olduğu görülmektedir.



**Çizelge 1.** Çalışmada elde edilen sonuçlarla literatürde elde edilen sonuçların karşılaştırılması (Comparison of the results obtained in the study and the results obtained in the literature)

|                                | Çözücü                                     | Reaksiyon Koşulları  | Sonuçlar  |
|--------------------------------|--|--|---|
| Bu çalışma                     | MeTHF                                      | Substrat derişimi : 240 mM,<br>Lipaz derişimi : 11 mg/mL,<br>Sıcaklık : 40°C,<br>Karıştırma hızı : 250 rpm,<br>Süre : 4 saat                         | ee <sub>s</sub> : % 82,3<br>ee <sub>p</sub> : % 100<br>Dönüşüm : %45,1          |
| Hoang vd. (2017) [22]          | MeTHF / CO <sub>2</sub> ile genişmiş MeTHF | Substrat derişimi : 40 mM,<br>Lipaz derişimi : 1 mg/mL,<br>Sıcaklık : 20°C,<br>Süre : 1 saat   | ee <sub>p</sub> : >%99<br>Dönüşüm : %5,7 / %23*                                 |
| Bu çalışma                     | PK   | Substrat derişimi : 240 mM,<br>Lipaz derişimi : 11 mg/mL,<br>Sıcaklık : 40°C,<br>Karıştırma hızı : 250 rpm,<br>Süre : 4 saat                         | ee <sub>s</sub> : % 60,7<br>ee <sub>p</sub> : % 100<br>Dönüşüm : %37,7          |
| Wu vd. (2009) [26]             | PK   | Substrat derişimi : 83 mM,<br>Lipaz derişimi : 1,8 mg/mL,<br>Sıcaklık : 25°C,<br>Süre : 24 saat  | ee <sub>s</sub> : %47 / %93**<br>ee <sub>p</sub> : %99 / %99**<br>Dönüşüm : %48 |
| Bu çalışma                     | DMK  | Substrat derişimi : 240 mM,<br>Lipaz derişimi : 20 mg/mL,<br>Sıcaklık : 40°C,<br>Karıştırma hızı : 250 rpm,<br>Süre : 3 saat                         | ee <sub>s</sub> : % 100<br>ee <sub>p</sub> : % 100<br>Dönüşüm : %50             |
| Habulin ve Knez (2009) [6]     | [bmim] [PF <sub>6</sub> ]                  | [bmim] [PF <sub>6</sub> ] derişimi : 9.520 M<br>Lipaz derişimi : %6,6 (ağırlıkça)<br>Sıcaklık : 40°C,<br>Karıştırma hızı : 500 rpm,<br>Süre : 3 saat | ee <sub>s</sub> : > %99<br>Dönüşüm : %50  |
| Goswami ve Goswami (2005) [39] | THF (hacimce %5 DMSO)                      | Substrat derişimi : 372 mM,<br>Lipaz derişimi : 63,6 mg/mL,<br>Sıcaklık : 25°C,<br>Süre : 7 saat   | ee : %100<br>Verim : %51  |
| Kirilin vd. (2010) [37]        | Toluen                                     | Substrat derişimi : 20 mM,<br>Sıcaklık : 70°C,<br>Süre : 5 saat,<br>Karıştırma hızı : 1000 rpm,<br>Atmosfer : Argon                                  | Dönüşüm : %48,5<br>(reaktif enantiyomerin %97'si dönüşmüştür)                   |
| Zhou vd. (2011) [40]           | MEF-ILs (monoeter fonksiyonlu iyonik sıvı) | Substrat derişimi : 280 mM,<br>Lipaz derişimi : 15 mg/mL,<br>Sıcaklık : 40°C,<br>Süre : 4 saat   | ee : >%99<br>Dönüşüm : %50  |

\*Çözücü olarak "CO<sub>2</sub> ile genişmiş MeTHF (hacimce %10 MeTHF, 6 MPa)" kullanılması durumunda elde edilen dönüşüm değeri

\*\*Ortama substrat molünün 1/10'u oranında katkı maddesi (trietilamin) eklenmesi durumunda elde edilen sonuçlar

#### 4. SONUÇLAR (CONCLUSION)

Bu çalışmada, enantiyomerleri farklı özelliklere sahip olan ve değerli kimyasalların eldesi ile kozmetik, ziraat, farmasötik endüstrilerinde kullanılan kiral alkollerden 1-feniletanolün “yeşil çözücü” ortamında enzimatik kinetik rezolüsyon yöntemi ile enantiyomerik saflıkta üretimi gerçekleştirilmiştir.

Literatürde rasemik 1-feniletanolün yeşil çözücü ortamında lipaz katalizöründe kinetik rezolüsyonuna yönelik bazı çalışmalar yer alsa da söz konusu çalışmalarda çoğunlukla yeşil çözücü olarak iyonik sıvılar kullanılmıştır [6, 30, 33]. Öte yandan iyonik sıvıların sentezlerinin çok basamaklı olması, toksik girdiler içermesi, yüksek maliyetleri ve canlı sağlığına olumsuz etkileri gibi dezavantajları mevcuttur.

Bu çalışmada yeşil çözücü sınıfından PK, DMK ve MeTHF çözücülerinin düşük eko-toksiklik sergilemeleri, tamamen biyo-bozunabilir olmaları, korozif olmamaları nedenleriyle çevre dostu özellik taşımaları ve ayrıca düşük fiyatlara yüksek miktarda tedarik edilebilmeleri nedenleriyle rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonunda geleneksel çözücüler ve iyonik sıvıların yerine kullanılmak üzere incelenmelerine karar verilmiştir.

En yüksek  $ee_s$  ve dönüşüm değerleri DMK çözücü ortamında elde edilmiş, bu nedenle sonraki çalışmalarda yeşil çözücü olarak DMK kullanılmıştır. Öte yandan, hem MeTHF hem de PK çözücü ortamlarında elde edilen sonuçların, literatürde aynı çözücü ortamlarında ve aynı lipaz katalizörü varlığında elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında umut vaat edici olduğu görüldüğünden ayrı bir çalışma kapsamında bu çözücü ortamlarında gerçekleştirilen reaksiyon koşullarının optimize edilebileceği değerlendirilmiştir.

DMK çözücü ortamında molar açıl verici : substrat oranı, karıştırma hızı, lipaz derişimi ve sıcaklık gibi parametrelerin reaksiyona etkileri incelenmiş, 240 mM substrat derişiminde, 3 :1 molar açıl verici substrat oranında, 20 mg/mL lipaz derişiminde, 40°C ve 250 rpm’de gerçekleştirilen 3 saat reaksiyon sonunda %100  $ee_s$  ve  $ee_p$  ile %50 dönüşüme ulaşılmıştır. Ayrıca reaksiyonun ekonomik açıdan da verimli olmasını sağlamak adına yüksek substrat derişimlerinde çalışıldığında 1 M substrat derişiminde 5 saat reaksiyon sonunda %94,4  $ee_s$ , %100  $ee_p$  ve %48,6 dönüşüm sağlandığı görülmüştür. Çalışmanın sonraki bölümünde yüksek substrat derişiminde, Cevap-Yüzey Yöntemiyle reaksiyon koşullarının optimize edilebileceği değerlendirilmektedir.

Bu çalışma kapsamında, yeşil çözücülerden biri olan DMK ilk kez rasemik 1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonunda çözücü ortamı olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, literatürde aynı lipaz (Novozyme 435) kullanılarak hem geleneksel hem de diğer yeşil çözücülerle gerçekleştirilen çalışmalarla karşılaştırıldığında DMK’nın düşük eko-toksikliği, biyo-bozunurluğu, düşük maliyetli olması gibi avantajlı özelliklerinin yanı sıra yüksek  $ee_s$  ve dönüşüm de

sağlaması neticesinde bu çözücülerin yerine geçebileceğini göstermiştir.

#### KISALTMALAR (ABBREVIATIONS)

|        |   |
|--------|---|
| DMK    | : Dimetil Karbonat                        |
| E      | : Enantiyomerik Oran                      |
| MeTHF  | : 2-Metiltetrahidrofur                    |
| PK     | : Propilen Karbonat                       |
| $ee_s$ | : Substratın Enantiyomerik Aşırılığı      |
| $ee_p$ | : Ürünün Enantiyomerik Aşırılığı          |
| HPLC   | : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |

#### TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGMENT)

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18H0443002 nolu proje ile desteklenmiştir.

#### ETİK STANDARTLARIN BEYANI (DECLARATION OF ETHICAL STANDARDS)

Bu makalenin yazar(lar)ı çalışmalarında kullandıkları materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve/veya yasal-özel bir izin gerektirmediğini beyan ederler.

#### KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Seddigi Z.S., Malik M.S., Ahmed S.A., Babalghith A.O. and Kamal A., “Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase-metal combinations for dynamic processes”, *Coordination Chemistry Reviews*, 348: 54-70, (2017).
- [2] Srinivas N.R., Barbhैया R.H. and Midha K.K., “Enantiomeric Drug Development: Issues, Considerations and Regulatory Requirements”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(9): 1205-1215, (2001).
- [3] Ahmed M., Kelly T. and Ghanem A., “Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation”, *Tetrahedron*, 68: 6781-6802, (2012). doi:10.1016/j.tet.2012.05.049.
- [4] Graber M., Rouillard H., Delatouche R., Fniter N., Belkhiria B., Bonnet A., Domon L. and Thiéry V., “Improved racemate resolution of pentan-2-ol and trans-(Z)-cyclooct-5-ene-1,2-diol by lipase catalysis”, *Journal of Biotechnology*, 238: 60-68, (2016).
- [5] Lang J.C. and Armstrong D.W., “Chiral surfaces : The many faces of chiral recognition”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 32: 94-107, (2017).
- [6] Habulin M. and Knez Z., “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, (2009). doi:10.1016/j.molcatb.2008.10.007.
- [7] Singh M., Singh R.S. and Banerjee U.C., “Enantioselective transesterification of racemic phenyl ethanol and its derivatives in organic solvent and ionic liquid using *Pseudomonas aeruginosa* lipase”, *Process Biochemistry*, 45: 25-29, (2010). doi:10.1016/j.procbio.2009.07.020.
- [8] Ghanem A. and Aboul-Enein H.Y., “Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents”, *Tetrahedron: Asymmetry*, 78(15): 3331-3351, (2004).
- [9] Li X., Xu L., Wang G., Zhang H. and Yan Y., “Conformation studies on *Burkholderia cenocepacia* lipase via resolution of racemic 1-phenylethanol in non-aqueous medium and its process optimization”, *Process Biochemistry*, 48: 1905-1913, (2013).
- [10] Kamble M.P., Chaudhari S.A., Singhal R.S. and Yadav G.D., “Synergism of microwave irradiation and enzyme catalysis in kinetic resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol by cutinase from novel isolate *Fusarium ICT SACI*”, *Biochemical Engineering Journal*, 117: 121-128, (2017).
- [11] Suan C.L. and Sarmidi M.R., “Immobilised lipase-catalysed resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28: 111-119, (2004). doi:10.1016/j.molcatb.2004.02.004.
- [12] Cazetta T, Moran P.J.S. and Rodrigues A.R., “Highly enantioselective deracemization of 1-phenyl-1,2-ethanediol and its derivatives by stereoinversion using *Candida albicans* in a one-pot process”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109: 178-183, (2014).
- [13] Melais N, Zouiouche L.A. and Riant O., “The effect of the migrating group structure on enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol”, *C. R. Chimie*, 19: 971-977, (2016).
- [14] Jurček O., Wimmerová M. and Wimmer Z., “Selected chiral alcohols: Enzymic resolution and reduction of convenient substrates”, *Coordination Chemistry Reviews*, 252: 767-781, (2008). doi:10.1016/j.ccr.2007.09.026.
- [15] Gupta S.M., Kamble M.P. and Yadav G.D., “Insight into microwave assisted enzyme catalysis in process intensification of reaction and selectivity: Kinetic resolution of (*R, S*)-flurbiprofen with alcohols”, *Molecular Catalysis*, 440: 50-56, (2017).
- [16] Basso A. and Serban S., “Industrial applications of immobilized enzymes – A review”, *Molecular Catalysis*, 479: 1-20, (2019).
- [17] Villalba M., Verdasco-Martín C.M., Santos J.C.S., Fernandez-Lafuente R. and Otero C., “Operational stabilities of different chemical derivatives of Novozym 435 in an alcoholysis reaction”, *Enzyme and Microbial Technology*, 90: 35-44, (2016).
- [18] Almeida J.M., Alnoch R.C., Souza E.M., Mitchell D.A. and Krieger N., “Metagenomics : Is it a powerful tool to obtain lipases for application in biocatalysis?”, *BBA – Proteins and Proteomics*, 1868: 1-13, (2020).
- [19] Gu Y. and Jérôme F., “Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry”, *Chemical Society Reviews*, 42: 9550-9570, (2013).
- [20] Schäffner B., Schäffner F., Verevkin S.P. and Börner A., “Organic Carbonates as Solvents in Synthesis and Catalysis”, *Chemical Reviews*, 110: 4554-4581, (2010).
- [21] Lozano P., Bernal J.M., Gómez C., Garcia Verdugo E., Burguete M.I., Sánchez G., Vaultier M. and Luis S.V., “Green bioprocesses in sponge-like ionic liquids”, *Catalysis Today*, 255: 54-59, (2015).
- [22] Hoang H.N., Nagashima Y., Mori S., Kagechika H. and Matsuda T., “CO<sub>2</sub>-expanded bio-based liquids as novel solvents for enantioselective biocatalysis”, *Tetrahedron*, 73: 2984-2989, (2017).
- [23] Khandelwal S., Tailor Y.K. and Kumar M., “Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations”, *Journal of Molecular Liquids*, 215: 345-386, (2016).
- [24] Belafriekh A., Secundo F., Serra S. and Djeghaba Z., “Enantioselective enzymatic resolution of racemic alcohols by lipases in green organic solvents”, *Tetrahedron : Asymmetry*, 28: 473-478, (2017).
- [25] Xia C.G., Wu X.M., Sun W. and Xin J.Y., “Lipase catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols with improved enantioselectivity in propylene carbonate”, *World J Microbiol Biotechnology*, 24: 2421-2424, (2008). doi: 10.1007/s11274-008-9762-y.
- [26] Wu X., Zhu L.M., Branford-White C.J. and Xia C.G., “Propylene Carbonate as a Green Solvent for Kinetic Resolution of Secondary Alcohols Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase”, *3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, Beijing, 1-4, (2009). doi: 10.1109/ICBBE.2009.5163254.
- [27] Pyo S.H., Park J.H., Chang T.S. and Hatti-Kaul R., “Dimethyl carbonate as a green chemical”, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5: 61-66, (2017).
- [28] Ülger C. and Takaç S., “Kinetics of lipase-catalysed methyl gallate production in the presence of deep eutectic solvent”, *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(6): 407-416, (2017).

- [29] Hara P., Mikkola J.P., Murzin D.Y. and Kanerva L.T., "Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67: 129-134, (2010). doi: 10.1016/j.molcatb.2010.07.018.
- [30] Rios A.P., Rantwijk F. and Sheldon R.A., "Effective resolution of 1-phenyl ethanol by *Candida antarctica* lipase B catalysed acylation with vinyl acetate in protic ionic liquids (PILs)", *Green Chemistry*, 14: 1584-1588, (2012). doi: 10.1039/c2gc35196j.
- [31] Chen Z.G., Zhang D.N., Cao L. and Han Y.B., "Highly efficient and regioselective acylation of pharmacologically interesting cordycepin catalyzed by lipase in the eco-friendly solvent 2-methyltetrahydrofuran", *Bioresource Technology*, 133: 82-86, (2013).
- [32] Espino M., Fernández M.Á, Gomez F.J.V. and Silva M.F., "Natural designer solvents for greening analytical chemistry", *Trends in Analytical Chemistry*, 76: 126-136, (2016).
- [33] Shah S. and Gupta M.N., "Kinetic resolution of ( $\pm$ )1-phenylethanol in [Bmim][PF<sub>6</sub>] using high activity preparations of lipases", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17: 921-924, (2007). doi:10.1016/j.bmcl.2006.11.057.
- [34] Mohamed H.M., "Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis", *Trends in Analytical Chemistry*, 66: 176-192, (2015).
- [35] Hoyos P., Quezada M.A., Sinisterra J.V. and Alcántara A.R., "Optimised Dynamic Kinetic Resolution of benzoin by a chemoenzymatic approach in 2-MeTHF", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72: 20-24, (2011).
- [36] Magadum D.B. and Yadav G.D., "Enantioselective resolution of (R,S)- $\alpha$ -methyl-4-pyridinemethanol using immobilized biocatalyst : Optimization and kinetic modeling", *Biochemical Engineering Journal*, 122: 152-158, (2017).
- [37] Kirilin A., Sahin S., Mäki Arvela P., Wärnå J., Salmi T., Murzin D.Y., "Kinetics and Modeling of (R,S)-1-Phenylethanol Acylation over Lipase", *International Journal of Chemical Kinetics*, 42 (10): 629-639, (2010). doi: 10.1002/kin.20504.
- [38] Fogler H.S., "Elements of Chemical Reaction Engineering", 4, *Pearson Education International*, Massachusetts, (2008).
- [39] Goswami A. and Goswami J., "DMSO-triggered enhancement of enantioselectivity in Novozyme[435]-catalyzed transesterification of chiral 1-phenylethanol", *Tetrahedron Letters*, 46: 4411-4413, (2005). doi:10.1016/j.tetlet.2005.03.147.
- [40] Zhou H., Chen J., Ye L., Lin H. and Yuan Y., "Enhanced performance of lipase-catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in monoether-functionalized ionic liquids", *Bioresource Technology*, 102: 5562-5566, (2011).