

# Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u reakcijama redukcije halogeniranog acetofenona

---

Karin, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:361999>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Marija Karin**

7522/BT

**Primjena niskotemperaturnih eutektskih otapala  
u reakcijama redukcije halogeniranog  
acetofenona**

ZAVRŠNI RAD

**Projekt:** HRZZ IP-2019-04-7712 Racionalan dizajn prirodnih eutektskih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova

**Mentor:** dr. sc. Manuela Panić

**Zagreb, 2021.**

*Zahvaljujem se mentorici dr.sc. Manuli Panić koja mi je svojim stručnim znanjem i brojnim savjetima pomogla pri pisanju i izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo i Miji Radović, mag. ing. na prenesenom znanju, savjetima, razumijevanju i pomoći u izradi ovog rada kao i svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije.*

*Hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na pruženoj podršci i motivaciji tijekom dosadašnjeg studiranja.*

# 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**

## **Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u reakcijama redukcije halogeniranog acetofenona**

***Marija Karin, 0058211522***

**Sažetak:** Niskotemperaturnim eutektičkim otapalima nastoji se smanjiti zagađenje okoliša te se sve više istražuje njihova primjena umjesto hlapivih organskih otapala. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene cijelih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatora za enantioselektivnu redukciju halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida. Ispitan je i utjecaj predtretmana stanica kvasca ultrazvukom i detergentom. S obzirom na praćene parametre može se zaključiti da se povećanjem udjela vode u eutektičkom otapalu povećava konverzija reakcije, a kao najpogodnije otapalo za enantioselektivnu redukciju odabrano je kolin-klorid:etilen-glikol s 30 % (w/w) vode.

**Ključne riječi:** biokataliza, halogenirani acetofenon, niskotemperaturna eutektička otapala, redukcija, *Saccharomyces cerevisiae*

**Rad sadrži:** 30 stranica, 13 slika, 3 tablice, 29 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:** dr.sc. Manuela Panić

**Pomoć pri izradi:** Mia Radović, mag. ing.

**Datum obrane:** 16. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTARY CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Biotechnology**

### **Application of deep eutectic solvents in halogenated acetophenone reduction reactions**

***Marija Karin, 0058211522***

**Abstract:** Deep eutectic solvents are used to reduce environmental pollution and their use instead of volatile organic solvents is increasingly being investigated. The aim of this study was to investigate the possibility of using whole yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocatalyst for enantioselective reduction of halogenated acetophenone in deep eutectic solvents based on choline chloride. The effect of pretreatment of yeast cells with ultrasound and detergent was also examined. Given the monitored parameter, it can be concluded that increasing the water content in the eutectic solvent increases the yield of reactions, and choline chloride: ethylene glycol with 30% (w/w) water was chosen as the most suitable solvent for enantioselective reduction.

**Keywords:** biocatalysis, deep eutectic solvents, halogenated acetophenone, reduction, *Saccharomyces cerevisiae*

**Thesis contains:** 30 pages, 13 figures, 3 tables, 29 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Manuela Panić, Assistant

**Technical support and assistance:** Mia Radović, mag. ing.

**Defence date:** September 16<sup>th</sup> 2021

## Sadržaj:

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio .....	2
2.1. Biokatalitičke reakcije .....	2
2.1.1. Enantiomerno čisti spojevi.....	3
2.1.2. Katalizatori u biokatalizi.....	4
2.1.3. Primjena <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u redukciji prokiralnih spojeva .....	5
2.2. Zelena kemija .....	5
2.2.1. Ekološki prihvatljiva otapala.....	7
2.2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala.....	9
3. Eksperimentalni dio.....	11
3.1. Materijali .....	11
3.1.1. Kemikalije.....	11
3.1.2. Biokatalizator .....	11
3.1.3. Puferi .....	11
3.1.4. Oprema i uređaji .....	11
3.2. Metoda rada .....	12
3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	12
3.2.2. Pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> katalizirana enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona.....	13
3.2.2.1. Određivanje koncentracije halogeniranog acetofenona .....	15
3.2.3. Predtretman pekarskog kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ultrazvukom i detergentom .....	17
3.2.4. Vijabilnost stanica kvasca u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.....	18
3.2.4.1. Mjerenje vijabilnosti kvašćevih stanica .....	18
3.2.4.2. Mjerenje optičke gustoće kvašćevih stanica u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu i vodi .....	18
4. Rezultati i rasprava .....	20
4.1. Priprava niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	20
4.2. Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona katalizirana pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
4.3. Predtretman pekarskog kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ultrazvukom i detergentom .....	22
4.4. Vijabilnost stanica kvasca u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima .....	23
4.4.1. Mjerenje vijabilnosti kvašćevih stanica.....	23

4.4.2. Mjerenje otičke gustoće kvašćevih stanica u niskotemperaturnom eutektskom otapalu i vodi .....	25
5. Zaključci .....	27
6. Popis literature .....	28

## 1. Uvod

U današnje vrijeme sve je veći problem zagađenosti okoliša pa se samim time pojavljuje sve veća zabrinutost i potreba za nalaženjem prirodnijih i manje štetnih otapala u farmaceutskoj, kemijskoj i prehrambenoj industriji. Upravo tim problemima bavi se zelena kemija koja nastoji pronaći rješenja i poboljšati, tj. osmisliti nove načine s ciljem smanjenja onečišćenja i utjecaja na zdravlje ljudi. Zelena kemija se bavi velikim globalnim problemima kao što su klimatske promijene, energetska potrošnja i upravljanje vodenim resursima s ciljem održivosti i upravo je zato zelena kemija program koji traje i koji svakodnevno donosi niz novih ideja i rješenja. Jedno od tih rješenja je primjena ekološki prihvatljivih otapala. Takva otapala trebaju imati nisku toksičnost, nizak tlak pare, dobru biorazgradivost i ne smiju biti štetna za okoliš. Istraživanje takvih otapala je u porastu te se sve više znanstvenika bavi tim problemom te je objavljeno puno znanstvenih radova i članaka na tu temu.

Otapala koja se ističu kao ekološki prihvatljiva su ionske kapljevine, superkritični i subkritični fluidi te otapala dobivena iz prirodnih i obnovljivih izvora. U novije vrijeme pažnja znanstvenika usmjerena je prema niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (eng. deep eutectic solvents, DES) koja su se svojim karakteristikama najviše približila zahtjevima zelene kemije. Ta otapala su pokazala mnoge prednosti, uključujući jeftine komponente, jednostavnu pripremu te nisku ili zanemarivu toksičnost. Još jedna prednost ovih otapala je mogućnost dizajniranja za različite namjene zbog brojnih strukturnih mogućnosti i mogućnosti dizajniranja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene cijelih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatora za enantioselektivnu redukciju halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima nastalim miješanjem kolin-klorida i etilen-glikola prema molarnom omjeru 1:2 uz dodatak 30, 60 i 70% (w/w) vode kao i ispitati utjecaj predtretmana biokatalizatora ultrazvukom i detergentom na uspješnost asimetrične redukcije.



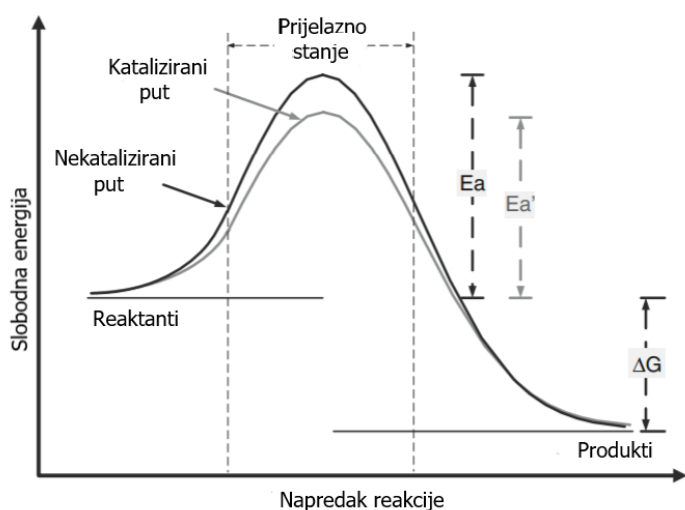
## 2. Teorijski dio

### 2.1. Biokatalitičke reakcije

Biokataliza je tehnologija koja omogućuje široku primjenu. Korištenje izoliranih enzima ili cijelih stanica daje pristup širokom rasponu selektivnih transformacija koje su često nemoguće s kemijskim katalizatorima.

Izraz biokataliza označava uporabu enzima (biokatalizatora) za izvođenje kemijskih transformacija. Stoga je ona sastavni dio kemijske sinteze baš poput heterogene ili homogene katalize. Biokataliza je vrlo dinamično područje istraživanja i razvoja te mnogi njeni dosadašnji nedostaci su riješeni pa ju samim time treba smatrati privlačnim alatom za organsku sintezu (Torrelo i sur., 2014).

Mnoge kemijske reakcije mogu se dogoditi spontano, a neke se moraju katalizirati kako bi se odvijale značajnom brzinom. Katalizatori su molekule koje smanjuju veličinu energetske barijere koju je potrebno prevladati kako bi se tvar kemijski pretvorila u drugu (slika 1). Biokemijske reakcije su kemijske reakcije koje su uključene u metabolizam svih živih stanica, koje je potrebno katalizirati da bi se nastavile brzinom potrebnom za održavanje života. Takvi živi (bio)katalizatori su enzimi. Svaka biokemijska reakcija staničnog metabolizma mora biti katalizirana jednim specifičnim enzimom. Enzimi su prirodno prilagođeni za rad u fiziološkim uvjetima. Međutim, biokataliza se odnosi na uporabu enzima kao katalizatora procesa u uvjetima *in vitro*, pa je veliki izazov u biokatalizi transformacija fizioloških katalizatora u katalizatore koji mogu biti aktivni u industrijskim uvjetima (Illanes, 2008).



**Slika 1.** Mehanizam katalitičke reakcije (Illanes, 2008)

Na temelju načela i mjerila zelene kemije i održivog razvoja, biokataliza je i zelena i održiva tehnologija. To je uglavnom rezultat napretka u području molekularne biologije i biotehnologije postignutog u posljednja dva desetljeća. Inženjering proteina omogućio je optimizaciju postojećih enzima i izum potpuno novih biokatalitičkih reakcija koje su bile ranije nepoznate u prirodi. Sada je moguće dizajnirati enzime za ciljane transformacije koji bi odgovarali unaprijed definiranim parametrima. Ovaj pristup uspješno je primijenjen, primjerice, u industrijskoj sintezi aktivnih farmaceutskih sastojaka. Osim uporabe proteinskog inženjeringa, drugi aspekti inženjeringa biokatalize, kao što su inženjering supstrata, medija i reaktora, mogu se koristiti za poboljšanje učinkovitosti i isplativosti, a time i za održivost biokatalitičkih reakcija. Nadalje, imobilizacija enzima može poboljšati njegovu stabilnost i omogućiti višekratnu uporabu, što rezultira boljim performansima i komercijalnom održivošću. Stoga se biokataliza široko primjenjuje u proizvodnji lijekova i kemikalija (Sheldon i Woodley, 2017).

Regioselektivnost enzima, kojom se reducira broj sintetskih stupnjeva prijeko potrebnih pri klasičnim sintezama, kao i zanemariva količina nusprodukata daju prednost biokatalizi, pa je posljednjih godina povećan interes za kemo-, regio- i enantioselektivne biokatalitičke transformacije sintetskih i prirodnih materijala. Stereoselektivne biokatalitičke reakcije općenito se provode pri sobnoj temperaturi, atmosferskom tlaku, u vodenom mediju uz uporabu malih količina soli i metala, što im daje veliku prednost u odnosu na kemijske reakcije (Jukić i sur., 2005).

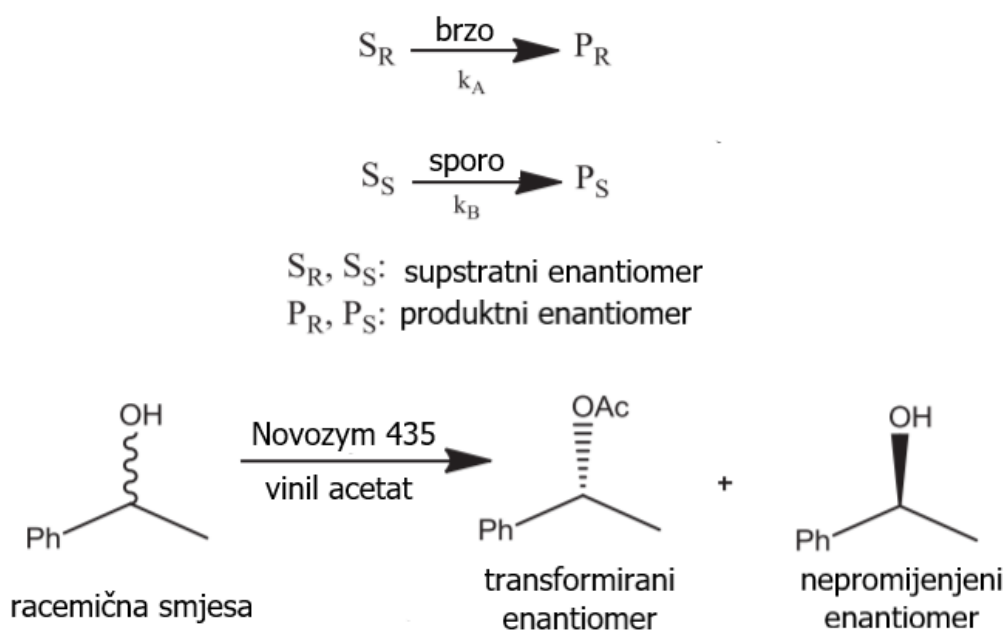
Velik potencijal biokatalitičkih istraživanja usmjeren je na dva područja: razvoj novih biokatalizatora za katalizu reakcija koje je nemoguće provesti tradicionalnim metodologijama i razvoj procesa za tzv. biokatalitičku deracemizaciju koji se temelji na kombiniranoj uporabi nekoliko enzima radi prevođenja racemata u optički čiste stereoisomere (Jukić i sur., 2005).

### **2.1.1. Enantiomerno čisti spojevi**

U današnje vrijeme kemijska i farmaceutska industrija suočava se sa zahtjevima visoke enantiomerne čistoće biološki aktivnih kiralnih spojeva u proizvodnji lijekova, proizvodnji poljoprivrednih kemikalija i drugih kemikalija (Nguyen i sur. 2006). Interakcija enantiomera s enzimima i receptorima u svom prirodnom okruženju može rezultirati različitim, a ponekad i suprotnim biološkim učincima. Stoga, proizvodnja enantiomerno čistih spojeva (oko 72% svih proizvedenih lijekova su čisti enantiomeri) privukla je pozornost akademske i industrijske zajednice (Panić i sur., 2018a).

Postoje mnoge metode dobivanja enantiomerno čistih spojeva uključujući i razdvajanje enantiomera iz racemičnih smjesa. Među tim metodama, enzimski katalizirane transformacije za dobivanje enantiomerno čistih spojeva sve se više razmatraju u proizvodnji širokog spektra međuprodukata u farmaceutskoj, agrokemijskoj i prehrambenoj industriji. U današnje vrijeme enzimski katalizirane transformacije zamjenjuju kemijsku katalizu za prevladavanje nedostataka: neželjenih nusproizvoda, štetnih otpadnih voda i slabe selektivnosti supstrata (Ahmed i sur., 2012).

Do danas, rezolucija (razlučivanje) racemata je najčešći industrijski pristup za dobivanje enantiomerno čistih spojeva. Kinetička rezolucija (KR) definirana je kao postupak u kojem se dva enantiomera racemata različitim brzinom prevode u produkte (slika 2). Ako je KR učinkovit, jedan od enantiomera će se transformirati u željeni proizvod dok će drugi ostati nepromijenjen (Ahmed i sur., 2012).



**Slika 2.** Klasično kinetičko razlučivanje (Ahmed i sur., 2012)

### 2.1.2. Katalizatori u biokatalizi

Enzimi su vrlo poželjni katalizatori kada je specifičnost reakcije jedini cilj (kao što je slučaj u farmaceutskim proizvodima i finim kemikalijama), kada katalizatori moraju biti aktivni u blagim uvjetima (zbog nestabilnosti supstrata i/ili produkta ili kako bi se izbjegle neželjene nuspojave, kao što se javlja u nekoliko reakcija organske sinteze), kada su ekološka ograničenja stroga (što je sada prilično česta situacija koja daje biokatalizi izrazitu prednost u odnosu na

alternativne tehnologije) ili kada je u pitanju oznaka prirodnog proizvoda (kao u slučaju hrane i kozmetičke primjene) (Benković i Ballesteros 1997; Wegman i sur., 2001). Međutim, enzimi su složene molekularne strukture koje su u unutrašnjosti labilne i skupe za proizvodnju, što je nedostatak u odnosu na kemijske katalizatore (Bommarius i Broering, 2005).

Enzimi nikako nisu idealni katalizatori procesa, ali njihova iznimno visoka specifičnost i aktivnost u umjerenim uvjetima istaknute su karakteristike koje sve više cijene različiti sektori proizvodnje, među kojima su farmaceutska i kemijska industrija (Schmid i sur., 2001; Thomas i sur., 2002; Zhao i sur., 2002; Bruggink i sur., 2003).

Enzimi (jednostavne hidrolaze) kao što su esteraze, proteaze i lipaze sve se više koriste za asimetričnu sintezu farmaceutskih i poljoprivrednih kemikalija. Lipaze kataliziraju hidrolizu prirodnih triglicerida u masne kiseline, mono- i digliceride, glicerol te niz drugih reakcija. Nitrilhidrataze kataliziraju konverziju nitrila u amide, dok nitrilaze kataliziraju hidrolize nitrila u odgovarajuće karboksilne kiseline i amonijak (Jukić i sur., 2005).

Pekarski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) smatra se idealnim za kemičare koji traže stereoselektivne biokatalizatore, što bi na kraju trebalo dovesti do kiralnih međuprodukata u sintezi enantiomerno čisti spojevi. Nepatogen je, jeftin, jednostavan za uzgoj u laboratoriju i velikih razmjera te se stanice mogu skladištiti neograničeno u osušenom obliku (Pscheidt i Glieder, 2008).

### **2.1.3. Primjena *Saccharomyces cerevisiae* u redukciji prokiralnih spojeva**

Pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* široko je rasprostranjen i koristi se kao biokatalizator za redukciju prokiralnih spojeva jer je lako dostupan i jeftin (u usporedbi s većinom biokatalizatora koji se koriste u stereoselektivnim biotransformacijama), netoksičan je i biorazgradiv (važna karakteristika u pripremi hrane i farmaceutskih spojeva). Štoviše, sadrži više oksido-redukcijskih enzima i sposoban je regenerirati koenzime prisutne u stanicama. Biokataliza koja uključuje kvasac kao katalizator ne zahtijeva složen postupak obrade i teške reakcijske uvjete (Sheldon, 2016).

## **2.2. Zelena kemija**

Zelena kemija definirana je kao „dizajn kemikalija i procesa koji smanjuju ili u potpunosti uklanjaju upotrebu i stvaranje opasnih tvari“. Ova definicija i koncept zelene kemije prvi je put formuliran početkom devedesetih godina. U sljedećih nekoliko godina došlo je do

međunarodnog usvajanja koje je rezultiralo stvaranjem stotina programa i vladinih inicijativa o zelenoj kemiji diljem svijeta s početnim vodećim programima koji se nalaze u SAD-u, Ujedinjenom Kraljevstvu i Italiji. Važni rani programi uključuju američki program *Green Chemistry Challenge Awards* osnovan 1995., a institut za zelenu kemiju osnovan je 1997. godine. Najvažniji aspekt zelene kemije je koncept dizajna. Dvanaest načela zelene kemije su smjernice koje pomažu kemičarima u održivom razvoju. Zelenu kemiju karakterizira pažljivo planiranje kemijske sinteze i molekularnog dizajna kako bi se smanjile štetne posljedice (Anastas i Eghbali, 2010).

Prema Jukić i sur. (2004) 12 načela na kojima je zasnovana zelena kemija su prikazana u tablici 1:

**Tablica 1:** 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 produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost.
5. Uporabu pomoćnih kemijskih tvari (npr. otapala, sredstava 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 reagenasa u stehiometrijskim količinama.
10. Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte 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).

Ovih 12 načela govore o smanjenju, odnosno uklanjanju opasnih ili štetnih tvari iz sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih produkata. Nemoguće je istodobno udovoljiti zahtjevima svih 12 načela zelenog procesa, ali se tijekom pojedinih stupnjeva sinteze pokušava primjeniti što veći broj načela (Jukić i sur., 2004).

Zelena kemija nastoji se usvojiti u različitim područjima pa se tako u kemijskim procesima primjenjuju katalitičke i biokatalitičke reakcije, koriste se alternativne obnovljive sirovine (biomasa), reakcije se provode u zelenim alternativnim medijima (npr. voda, ionske kapljevine, superkritični fluidi i niskotemperaturna eutektička otapala) i alternativnim reakcijskim uvjetima (npr. reakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima) kao i nove fotokatalitičke reakcije. Svi ti smjerovi zelene kemije imaju zajednički cilj, a to je zaštita okoliša i ekonomska dobit (Jukić i sur., 2005).

### **2.2.1. Ekološki prihvatljiva otapala**

Zelena tehnologija aktivno traži nova otapala koja će zamijeniti uobičajena organska otapala koja predstavljaju svojstvenu toksičnost i imaju visoku hlapljivost, što dovodi do isparavanja hlapivih organskih spojeva u atmosferu (Paiva i sur., 2014).

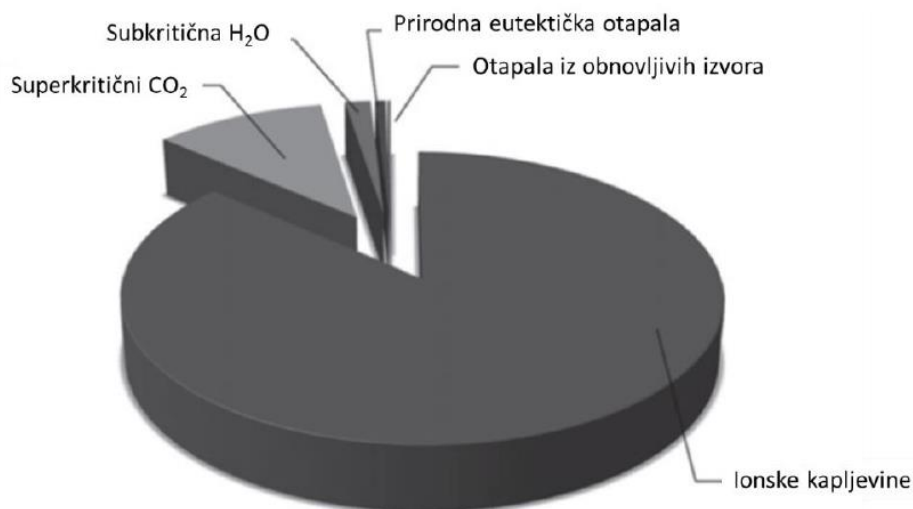
Organska otapala se smatraju glavnim onečišćivačima okoliša iz industrijskih procesa. Ideja o "zelenom otapalu" izražava cilj minimaliziranja utjecaja na okoliš koji nastaje upotrebom otapala u kemijskom procesu. Stoga pojam zeleno otapalo podrazumijeva nisku toksičnost, nizak tlak pare, dobru biorazgradivost i nije štetno za okoliš. Ipak, uvođenje novog otapala u industrijski proces mora se kritički analizirati s tehnološkog, kemijskog, toksikološkog i ekološkog stajališta, jer nije lako naći otapalo koje bi zadovoljavalo svim kriterijima (Hernáiz i sur., 2010).

Otapala koja se koriste u brojnim industrijskim procesima čine gotovo 60% svih industrijskih emisija i 30% svih emisija hlapivih organskih spojeva diljem svijeta, iz tog razloga se javlja potreba za smanjenjem štetnih otapala u industriji. Idealna bi bila provedba procesa bez otapala, ali to nije moguće jer otapala imaju ključnu ulogu u otapanju krutih tvari, prijenosu mase i topline, utjecaju na viskoznost te u koracima odvajanja i pročišćavanja. Postoje dvije glavne strategije razvoja zelenih otapala, a to su: zamjena otapala dobivenih iz nafte otapalima

iz obnovljivih izvora i zamjena otapala onima koja pokazuju bolji utjecaj na okoliš i zdravlje te veću sigurnost (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

Voda je otapalo prvog izbora i već se koristila u industrijskim razmjerima. Ipak, zanemariva topljivost mnogih organskih i organo-metalnih spojeva u vodi, kao i visoki energetska zahtjevi za uklanjanje vode po završetku procesa u koje je uključena, ograničavaju njenu primjenu. Stoga su razmatrana različita okolišu prihvatljiva, podesiva i pametna otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

Iz tog razloga rastuće područje istraživanja u razvoju zelenih tehnologija posvećeno je upravo projektiranju novih, ekološki prihvatljivih i podesivih otapala čija bi upotreba zadovoljila tehnološke i ekonomske zahtjeve. Kao najperspektivnija otapala ističu se ionske kapljevine, niskotemperaturna eutektička otapala, superkritični i subkritični fluidi te otapala dobivena iz prirodnih i obnovljivih izvora (slika 3) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).



**Slika 3.** Zastupljenost zelenih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a)

Tijekom posljednja dva desetljeća ionske kapljevine (IL) privukle su ogromnu pozornost znanstvene zajednice, a broj prijavljenih članaka u literaturi eksponencijalno je narastao. Ipak, „zelenilo“ ionskih kapljevina često se dovodi u pitanje, uglavnom zbog loše biorazgradivosti, biokompatibilnosti i održivosti. Alternativa ionskim kapljevinama su niskotemperaturna eutektička otapala (DES) te se danas intenzivno istražuju za primjenu u industriji (Paiva i sur., 2014).

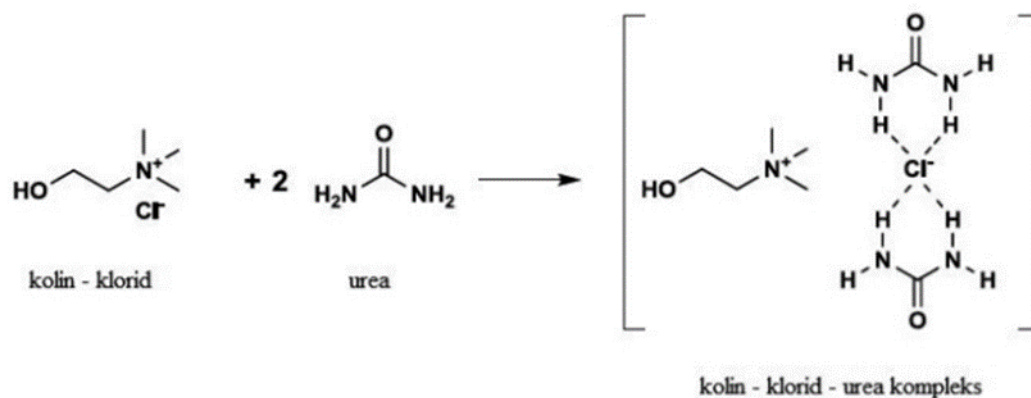
### 2.2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (eng. Deep Eutectic Solvents, DES) definirana su kao smjesa dviju ili više komponenti, koje mogu biti krute ili tekuće i koje u određenom omjeru imaju svojstvo eutektičnosti. Kada su spojevi koji čine DES primarni metaboliti, npr. aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili derivati kolina, DES se nazivaju prirodna eutektička otapala (NADES). NADES u potpunosti udovoljava načelima zelene kemije (Paiva i sur., 2014).

DES se sastoji od akceptora vodika, poput netoksične kvaterne amonijeve soli (npr. kolin-klorid) i donora vodikove veze (npr. amini, šećeri, alkoholi i karboksilne kiseline) u određenom molarnom omjeru. Niskotemperaturna eutektička otapala (DES) i ionske kapljevine (IL) imaju puno sličnosti, npr. nehlapljive su, nezapaljive, viskozne i od sličnih su početnih sirovina pa se DES ponekad nazivaju četvrta generacija IL-a, iako nisu u potpunosti sastavljeni od ionskih vrsta. Niskotemperaturna eutektička otapala se još nazivaju i „dizajnirana otapala“ zbog brojnih strukturnih mogućnosti i mogućnosti dizajniranja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava. DES-ovi imaju mnoge prednosti, uključujući jeftine komponente za pripremu, jednostavnu pripremu, nizak ili zanemariv profil toksičnosti i održivost s obzirom na ekološku i ekonomsku korist. Prve primjene DES-a na bazi kolina bile su u elektrotaloženju i elektropoliranju metala i u proizvodnji biodizela. Nakon toga su DES-ovi privukli pozornost kao otapala u organskoj sintezi i (bio)katalizi, proizvodnji polimera, elektrokemiji, nanomaterijalima, postupcima odvajanja, analizi, biomedicinskim primjenama i ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Mnoga istraživanja tek se trebaju poduzeti; međutim, potencijalni doprinos DES-a nije predviđen samo s tehnološke perspektive, već i sa aspekta sigurnosti okoliša i zdravlja ljudi. Naime, oni su klasa otapala koja se temelje na spojevima sigurnim za ljudsku prehranu (npr. Kolin i šećeri). Osim toga, studije su pokazale da se bioaktivni spojevi mogu otopiti 10-100 puta bolje pomoću DES-a nego u vodi ili lipidima (Cvjetko Bubalo i sur.,2015a).

Klasičan primjer DES-a je smjesa kolin-klorida (ChCl) (302 °C) i uree (132 °C) u molarnom omjeru 1:2 pri čemu se dobiva DES s talištem od 12 °C (slika 4). Kolin klorid (ChCl) je lako dostupan i jeftin dodatak hrani za životinje koji se proizvodi u velikim količinama, a urea je uobičajeno gnojivo. Stoga su smjese ChCl s ureom (U) u molarnim omjerima 1:2, lako dostupne, jeftine, biokompatibilne i biorazgradive (Sheldon i Woodley, 2017).





**Slika 4.** Shema sinteze niskotemperaturnog eutektičkog otapala ChCl : urea (1:2) (Abbott i sur., 2004).

Jedan od uspješnih primjera primjene DES-ova je za biokatalitičku, lipazom kataliziranu, proizvodnju biodizela gdje se mogu koristiti NADES-i na bazi glicerola. Lipaze se široko koriste u enzimskoj proizvodnji biodizela. Zhao i sur. objavili su 2013. upotrebu DES-a u enzimskoj proizvodnji biodizela pomoću DES-a na bazi kolin-klorida. U svom radu autori pokazuju da u reakcijama provedenim u kolin-kloridu/glicerolu enzimi (lipaze) mogu održati visoku biokatalitičku aktivnost te da se ta otapala mogu koristiti u transesterifikaciji triglicerida s etanolom, što rezultira visokim prinosom reakcije. NADES sa svojom niskom cijenom, biorazgradivošću i biokompatibilnošću ima obećavajuću primjenu u industriji kao otapalo za biokatalitičke reakcije, osobito u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Paiva i sur., 2014).

## 3. Eksperimentalni dio

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska
- Etil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen-glikol, puriss. p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Halogenirani acetofenon, Apollo scientific, Manchester, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Metilensko modriilo (praškasti oblik), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Sve upotrjebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

#### 3.1.2. Biokatalizator

- Instant suhi pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, Lesaffre Adriatic d.o.o.

#### 3.1.3. Pufferi

- Kalij-fosfatni puffer, pH = 7  
2,336 g  $K_2HPO_4$  i 1,557 g  $KH_2PO_4$  otopi se u destiliranoj vodi u ukupnom volumenu od 250 mL

#### 3.1.4. Oprema i uređaji

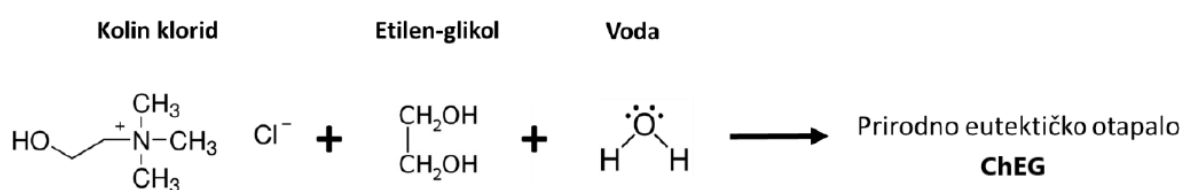
- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete, Deltalab, Španjolska
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Homogenizator/inkubator ES-20/60, Biosan, Latvija

- Laboratorijska tresilica, KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (epruvete, stalak za epruvete, odmjerne tikvice, tikvice s okruglim dnom, menzure, kivete, laboratorijske čaše)
- Magnetska mješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikropipete (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1 mL, 5 mL )
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Rotacioni vakuum uparivač, DEVAROT Slovenija, Buchi R-124, Švicarska
- Transmisijski svjetlosni mikroskop, Axiostar, Zeiss, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj GRANT XUB5, Grant Instruments, Engleska, Ujedinjeno Kraljevstvo
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYSTM 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

## 3.2. Metoda rada

### 3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (eng. Deep Eutectic Solvents, DES) pripremaju se tako da se u tikvicu s okruglim dnom pomiješaju kolin-klorid i etilen-glikol prema zadanom masenom omjeru uz dodatak 30, 60 i 70 % (w/w) vode (slika 5). Mase potrebnih metabolita za pripremu otapala prikazane su u tablici 2. Reakcijska smjesa zagrijava se 2 sata na magnetnoj mješalici pri temperaturi od 50 °C. Reakcija je gotova kada nastane bistra, bezbojna i homogena tekućina.



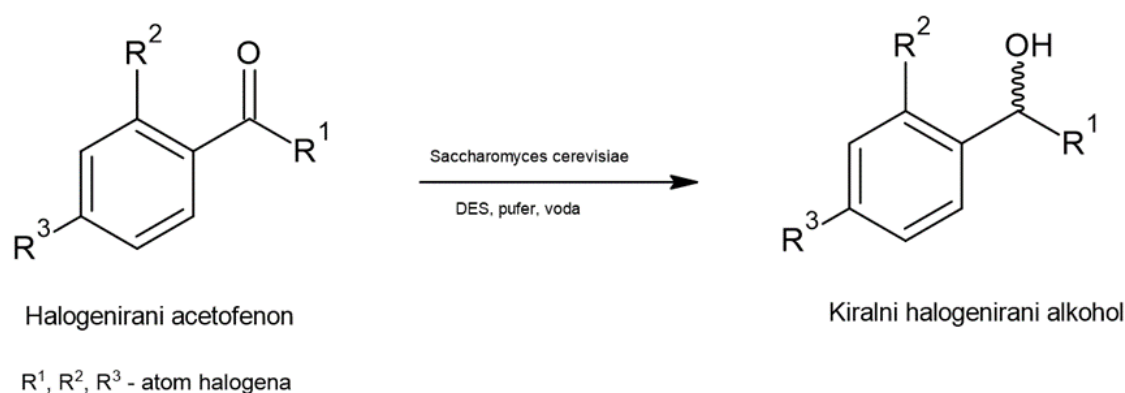
**Slika 5.** Shema pripreme niskotemperaturnog eutektičkog otapala kolin-klorid:etilen-glikol

**Tablica 2.** Mase metabolita za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala kolin-klorid:etilen-glikol

Puni naziv DES-a	Kratika	Udio vode [%, v/v]	m (kolin-klorid) [g]	m (etilen-glikol) [g]	m (voda) [g]
Kolin-klorid: etilen-glikol s 30% vode	ChEG30	30	4,17	3,72	3,38
Kolin-klorid: etilen-glikol s 60% vode	ChEG60	60	2,4	1,33	5,61
Kolin-klorid: etilen-glikol s 70% vode	ChEG70	70	1,67	1,49	7,35

### 3.2.2. Pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae* katalizirana enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona

Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona u *S* halogenirani alkohol u NADES-ima provodi se uz *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizator. Kao referentna otapala korišteni su pufer i voda. Niskotemperaturna eutektička otapala korištena u ovom radu su kolin-klorid:etilen-glikol s 30, 60 i 70 % udjela vode (w/w) (ChEG30, ChEG60 i ChEG70). Reakcija redukcije ketona u kiralni halogenirani alkohol prikazana je na slici 6.



**Slika 6.** Reakcija redukcije halogeniranog acetofenona u *S* halogenirani alkohol

Suhi instant kvasac (5 g) se najprije u epruveti nadopuni do 40 mL s destiliranom vodom te se miješa na homogenizatoru dok se ne dobije homogena smjesa. Ta smjesa se zatim centrifugira na  $4500 \text{ } \sigma \text{ min}^{-1}$  tijekom 20 minuta. Supernatant se nakon centrifugiranja odlije, a talog (kvašćeva biomasa) se koristi dalje za asimetričnu redukciju halogeniranog acetofenona koja se provodi prema protokolu:

Reakcije redukcije provedene su u vodi, puferu i DES-u s tri udjela vode - 30, 60 i 70 % (w/w). U epruvetu se najprije doda 0,5 g pripremljenog kvasca, 1,5 mL odabranog otapala (voda, pufer ili DES s 30,60 ili 70% vode (w/w)) te 10  $\mu\text{L}$  supstrata halogeniranog acetofenona koncentracije  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Supstrat je pripremljen otapanjem 4 g halogeniranog acetofenona u 2 mL acetonitrila. Epruvete sa reakcijskom smjesom se stavljaju na tresilicu 7 dana pri sobnoj temperaturi.

Nakon 7 dana uzorak se centrifugira na  $6000 \text{ } \sigma \text{ min}^{-1}$  tijekom 10 minuta te se nakon toga dekantira kako bi se uklonio kvasac koji zaostaje u talogu. Iz supernatanta se zatim jednokratno ekstrahiraju produkt i zaostali supstrat pomoću etil-acetata. Prije ekstrakcije se dodaje 1,5 mL destilirane vode u supernatant kako bi se razbila struktura DES-a unutar koje su i supstrat i produkt te na taj način omogućila difuziju produkta i supstrata u organsko otapalo. Epruveta sa uzorkom se nadopuni do 30 mL s etil-acetatom te se više puta promiješa i zatim homogenizira na Vortexu. Nakon ekstrakcije, odvoje se dvije faze, hidrofilna i hidrofobna. Gornji sloj je organska faza, a donji sloj DES. U organsku fazu se zatim dodaje sol (natrijev sulfat) kako bi vezala zaostalu vodu. Uzorak se filtrira te uparava do suha na rotacionom vakuum uparivaču. Upareni uzorak se zatim resuspendira u etil-acetatu nakon čega slijedi kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije halogeniranog acetofenona i nastajanja produkata reakcije *R* i *S* halogeniranog alkohola. Ta analiza je provedena pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom (GC-MS).

Kako bi se međusobno usporedila uspješnost redukcije u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu računa se konverzija reakcije i enantiomerni višak prema jednadžbama [1] i [2].

**Konverzija reakcije redukcije  $X$  (%) izračuna se prema jednadžbi:**

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

gdje  $c_A$  predstavlja izmjerenu koncentraciju alkohola ( $\text{mol L}^{-1}$ ), a  $c_{AT}$  početnu koncentraciju acetofenona ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

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

$$ee = \frac{(S_{OH} - R_{OH})}{(S_{OH} + R_{OH})} \times 100 \text{ [2]}$$

Gdje  $R_{OH}$  predstavlja površinu ispod pika  $R$ -halogeniranog alkohola, a  $S_{OH}$  površinu ispod pika  $S$ -halogeniranog alkohola.

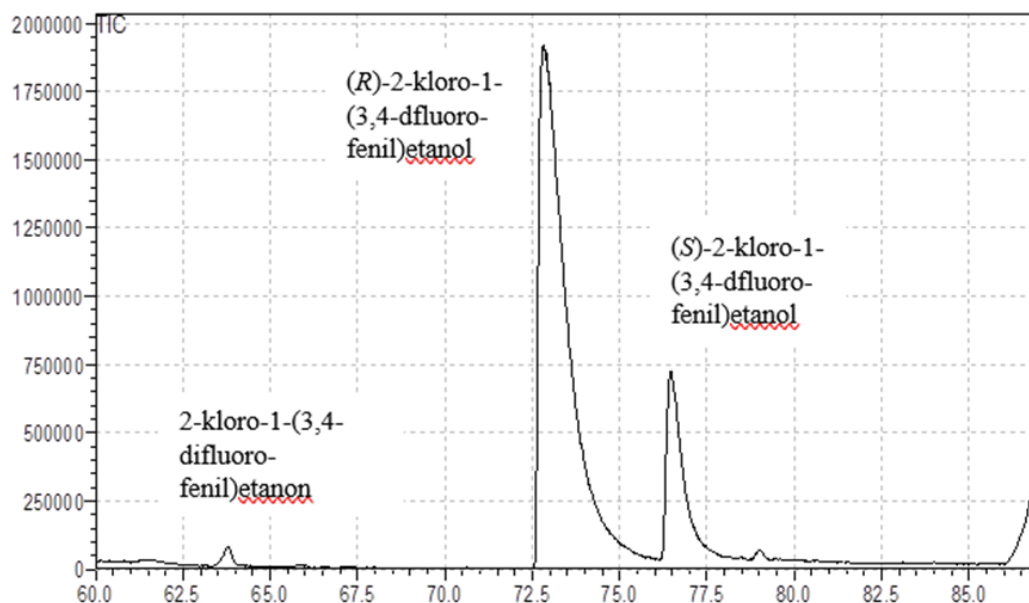
### 3.2.2.1. Određivanje koncentracije halogeniranog acetofenona

Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije halogeniranog acetofenona provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom na uređaju Shimadzu QP2010PLUS.

Kromatografski uvjeti za određivanje supstrata:

- Kromatografska kolona: kapilarna kiralna kolona  $\beta$  DEX 225 (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m)
- Pokretna faza: Helij
- Protok: 6,7 mL min<sup>-1</sup>
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone:  $T_1=90$  °C (1 min),  $T_2 = 155$  °C ( $\Delta = 5$  °C min<sup>-1</sup>),  $T_3 = 220$  °C ( $\Delta = 0,5$  °C min<sup>-1</sup>)
- Vrijeme trajanja analize: 133,30 min

Identifikacija halogeniranog acetofenona te  $R$  i  $S$  halogeniranog alkohola provedena je na temelju vremena izlaženja razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi s kiralne kromatografske kolone te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka. GC kromatogram analize reakcijske smjese enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona prikazan je na slici 7.

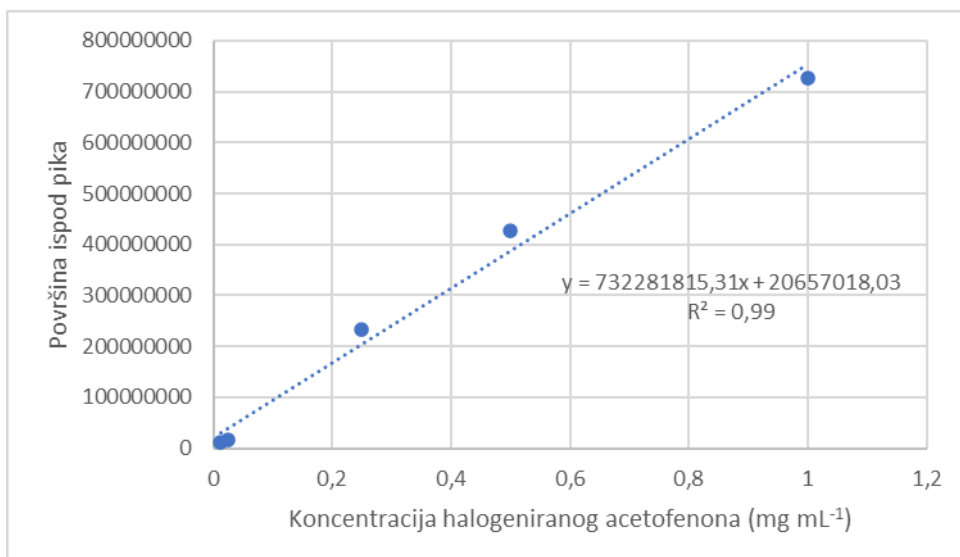


**Slika 7.** Tipičan GC kromatogram analize reakcijske smjese enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona

#### *Izrada baždarnog dijagrama*

Ishodna otopina halogeniranog acetofenona ( $c=1 \text{ mgmL}^{-1}$ ) pripravljena je u etil-acetatu radi izrade baždarnog dijagrama. Potom su pripravljena i razrjeđenja ishodne otopine navedenog supstrata na način da množinske koncentracije iznose  $1 \text{ mgmL}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mgmL}^{-1}$ ;  $0,25 \text{ mgmL}^{-1}$ ;  $0,025 \text{ mgmL}^{-1}$  te  $0,0125 \text{ mgmL}^{-1}$ . Pomoću računala je konstruiran baždarni dijagram ovisnosti množinske koncentracije halogeniranog acetofenona o površini ispod pika. Na apscisi se na grafičkom prikazu nalaze pripadajuće vrijednosti množinskih koncentracija halogeniranog acetofenona, a na ordinati su prikazane izmjerene vrijednosti površine ispod kromatografskog pika (slika 8).

Nepoznate koncentracije *R*-halogeniranog alkohola i *S*-halogeniranog alkohola tijekom reakcije redukcije halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu, puferu i vodi izračunate su izravno iz jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama.



**Slika 8.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije halogeniranog acetofenona

### 3.2.3. Predtretman pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ultrazvukom i detergentom

Najprije se pripremaju suspenzije stanica kvasca tako da se suhi kvasac resuspendira u fosfatnom puferu pH = 7 u omjeru 1:15 na sobnoj temperaturi tijekom 45 minuta. Suspenzija je potom centrifugirana na 6000  $\text{rpm}^{-1}$  tijekom 5 minuta. Kvasac je zatim ispran destiliranom vodom te ponovno centrifugiran.

Za predtretman pomoću ultrazvuka 0,5 g vlažnih stanica kvasca pomiješa se s 1,5 mL pufera, odnosno DES-a. Koristi se DES sa 70 % udjela vode (w/w) (ChEG70). Takav se sastav tikvice podvrgava predtretmanu u ultrazvučnoj kupelji GRANT XUB5 30 minuta na 30°C, pri snazi ultrazvučnog zračenja 250 W.

Predtretman pomoću detergenta priprema se na način da se najprije 5 g vlažnih stanica kvasca pomiješa s 50 mL 0,2 %-tne otopine detergenta Tween-80. Zatim se suspenzija stavi na tresilici tijekom 15 minuta te se nakon toga centrifugira pri 6000  $\text{rpm}^{-1}$ .

Nakon predtretmana ultrazvukom i detergentom u reakcijsku smjesu se dodaje 10  $\mu\text{L}$  supstrata halogeniranog acetofenona čime započinje reakcija redukcije. Epruvete se potom stavljaju na termostatiranu tresilicu na 30°C te se nakon 24 h analizira reakcijska smjesa iz koje se produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju s etil-acetatom, uz snažno miješanje na vrtložnoj miješalici. Ekstrakt se zatim analizira plinskom kromatografijom.



### **3.2.4. Vijabilnost stanica kvasca u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima**

Određivanje vijabilnosti stanica je metoda za analizu utjecaja kemijskih i fizikalnih faktora na mikroorganizame. Vijabilnost stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* se može ispitati na dva načina. Jedan način je mjerenje optičke gustoće UV-Vis spektrofotometrom, a drugi način je brojanje nevijabilnih stanica pod mikroskopom. Mjerenje optičke gustoće se vrši na valnim duljinama od 260 i 280 nm. Apsorbancija otopine pri 260 nm prikazuje prisustvo određene količine nukleinskih kiselina, a apsorbancija pri 280 nm odražava koncentraciju proteina u otopini. Drugi način ispitivanja vijabilnosti stanica je bojanje stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u suspenziji te brojanje živih i neživih stanica pod mikroskopom.

#### **3.2.4.1. Mjerenje vijabilnosti kvašćevih stanica**

Za mjerenje vijabilnosti kvašćevih stanica iz pripremljene suspenzije izuzme se 2 µL uzorka te se u Eppendorf epruveti resuspendira u 1998 µL destilirane vode. Vijabilnost se mjeri pod mikroskopom tijekom 7 dana te se uzorkuje prvi, treći, peti i sedmi dan.

Bojanje se vrši tako da se u alikvot uzorka od 40 µL resuspendira 1 µL boje (metilensko modri) te je 20 µL tako pripremljenog uzorka otpipetirano u jednu Fuchs-Rosenthalovu komoricu. Pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 10x) se zatim broje vijabilne i nevijabilne stanice. Stanice plave boje vizualizirane su i brojane kao mrtve stanice.

Brojanje stanica je vršeno u 4 kvadratića, a vijabilnost stanica kvasca *S. cerevisiae* određena je prema prikazu [3].

$$vijabilnost = \frac{\text{broj mrtvih stanica}}{\text{ukupan broj stanica}} \times 100 \quad [3]$$

#### **3.2.4.2. Mjerenje optičke gustoće kvašćevih stanica u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu i vodi**

Za mjerenje optičke gustoće najprije se pripreme suspenzije stanica kvasca tako da se 0,5 g kvasca *Saccharomyces cerevisiae* resuspendira u 10 mL niskotemperaturnog eutektičkog otapala (ChEG30 i ChEG70), odnosno 10 mL vode. Uzorci za mjerenje optičke gustoće se pripremaju na način da se u Eppendorf epruveti pomiješa 750 µL zadane suspenzije sa 750 µL

destilirane vode te se centrifugira pri  $10\,000\text{ } \sigma\text{ min}^{-1}$  tijekom 10 minuta. Supernatant se odlije u kvarcnu kivetu te se pomoću UV-Vis spektrofotometra očitava apsorbancija pri 260 i 280 nm.

## 4. Rezultati i rasprava

Priprema enantiomerno čistih kemikalija je u središtu istraživanja i u industriji i u akademskoj zajednici, uglavnom zbog visokih zahtjeva za optički čistim građevnim blokovima za proizvodnju lijekova u farmaceutskoj industriji i finih kemikalija u kemijskoj industriji. Razlog sve većim zahtjevima za optički čistim proizvodima uglavnom proizlazi iz različitih bioloških aktivnosti pojedinačnih enantiomera, što može uzrokovati ozbiljne medicinske probleme (Liang i sur., 2015).

Zelena tehnologija aktivno traži nova otapala koja će zamijeniti uobičajena organska otapala koja predstavljaju svojstvenu toksičnost i imaju visoku hlapljivost, što dovodi do isparavanja hlapivih organskih spojeva u atmosferu (Paiva i sur., 2014). Stoga pojam zeleno otapalo podrazumijeva nisku toksičnost, nizak tlak pare, dobru biorazgradivost i nije štetno za okoliš (Hernández i sur., 2010). U novije vrijeme sve se više istražuju niskotemperaturna eutektička otapala koja pripadaju zelenim otapalima te imaju mnoge prednosti, uključujući jeftine komponente za pripremu, jednostavnu pripremu, nizak ili zanemariv profil toksičnosti i održivost s obzirom na ekološku i ekonomsku korist.

U ovom radu, vodeći se principima zelene kemije, primijenjen je biokatalizator kvasac *Saccharomyces cerevisiae* za provođenje enantioselektivne redukcije supstrata halogeniranog acetofenona u kiralni alkohol u cilju nalaženja ekološki prihvatljivog postupka redukcije ketona. Redukcija je provedena u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima s različitim udjelima vode te u vodi i u kalij-fosfatnom puferu kako bi se usporedila uspješnost provedenih reakcija. Također se ispitala optimizacija reakcije predtretmanom biokatalizatora ultrazvukom i detergentom. Kao otapala koristila su se niskotemperaturna eutektička otapala kolin-klorid:etilen-glikol s različitim udjelima vode.

### 4.1. Priprava niskotemperaturnih eutektičkih otapala

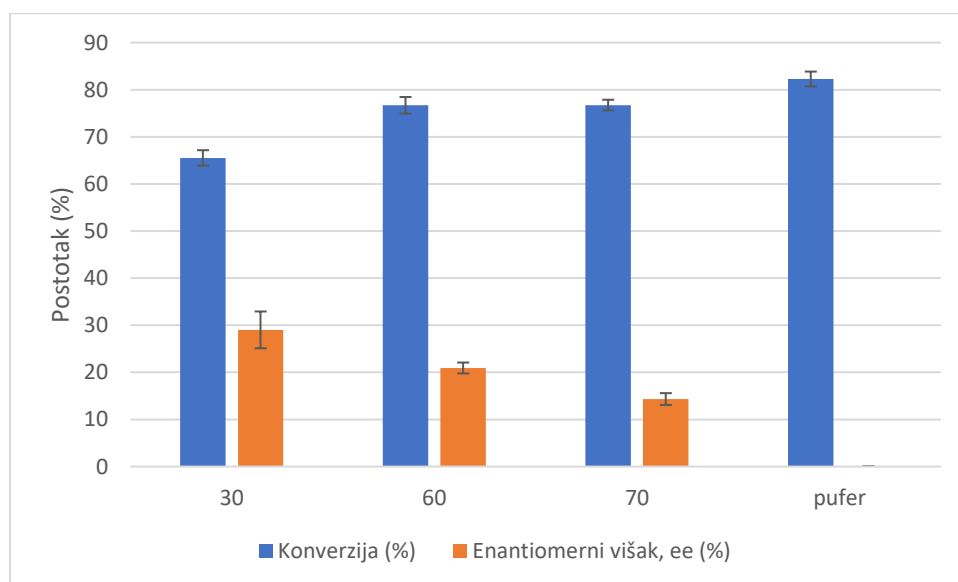
Priprava niskotemperaturnih eutektičkih otapala (eng. deep eutectic solvents, DES) provodila se jednostavnim postupkom u kojem su polazne komponente kolin-klorid i etilen-glikol pomiješane u molarnom omjeru 1:2 uz dodatak vode. Akceptor vodikove veze u pripremljenim otapalima je kolin-klorid, dok je kao donor vodikove veze korišten etilen-glikol. Otopina je lagano zagrijavana uz miješanje dok se ne dobije homogena, bistra i bezbojna tekućina. Iskorištenja priprave ovih otapala je 100 % iz čega možemo zaključiti da ne nastaje otpad. Pripravljena su niskotemperaturna eutektička otapala s udjelima vode od 30, 60 i 70 % (w/w).

## 4.2. Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona katalizirana pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

U ovom radu, pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je korišten kao biokatalizator za redukciju halogeniranog acetofenona u svrhu dobivanja kiralnog *S*-halogeniranog alkohola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. U suspenziju pekarskog kvasca i DES-a kolin-klorid:etilen-glikol (ChEG) uz dodatak 30, 60 ili 70 % (w/w) vode, dodano je 10  $\mu$ L supstrata halogeniranog acetofenona čime je započeta reakcija redukcije. Isti postupak je napravljen i u kalij-fosfatnom puferu kao referentnom otapalu. Reakcijska smjesa je zatim stavljena u tresilicu na 30 °C kroz 7 dana.

Reakcijska smjesa je analizirana pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona uspješno je provedena u svim otapalima te redukcijom nastaju produkti *S* i *R* halogenirani alkoholi. (*S*)-enantiomer poželjan je produkt i ovom reakcijom redukcije praćena je konverzija reakcije i enantiomerni višak u korist (*S*)-enantiomera. Nakon provedene analize pomoću plinske kromatografije, iz dobivenih rezultata izračunata je konverzija procesa redukcije ( $\chi$ ) te enantiomerni višak (*ee*) prema formulama [1] i [2] te su prikazani na slici 9.



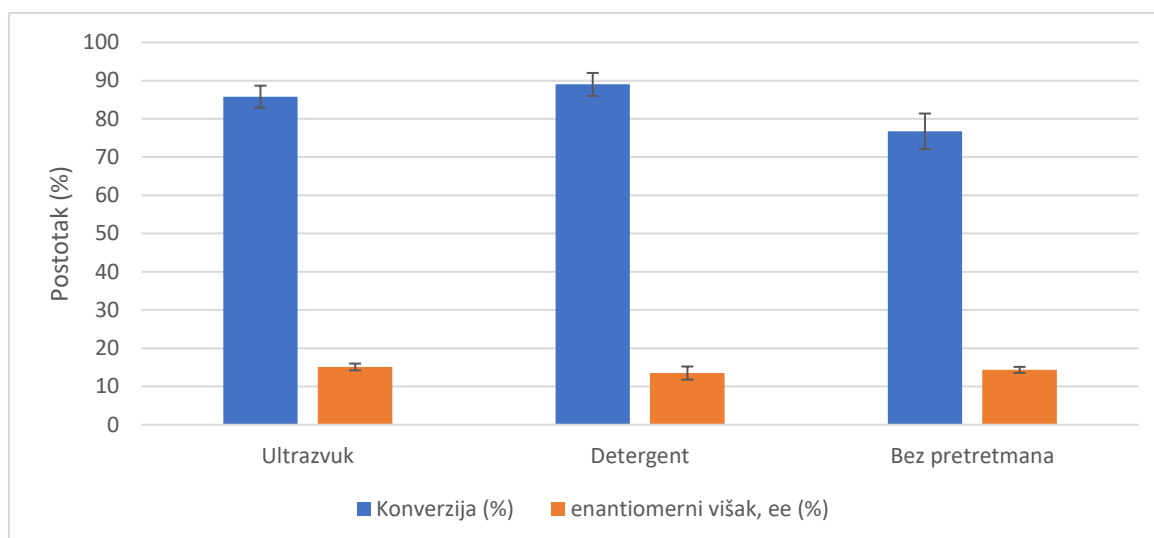
**Slika 9.** Konverzija reakcije i enantiomerni višak redukcije halogeniranog acetofenona katalizirane enzimima pekarskog kvasca u DES-ovima s različitim udjelima vode (ChEG30, ChEG60 i ChEG70) i u puferu. Reakcijski uvjeti: 10  $\mu$ L halogeniranog acetofenona, 0,5 g pekarskog kvasca, 7 dana, 30 °C.

Na konverziju reakcije redukcije halogeniranog acetofenona povoljno utječe povećanje masenog udjela vode te je najveća konverzija reakcije kod DES-ova sa 60 i 70 %-tnim masenim udjelom vode što je vidljivo i na slici 9. Uočeno povećanje konverzije s povećanjem sadržaja vode u DES-u bilo je u skladu s činjenicom da je voda nužna za cijele stanice pekarskog kvasca kako bi iskazale svoju katalitičku aktivnost. Dodavanjem vode u DES također se smanjio njihov viskozitet što omogućuje bolji prijenos tvari te rezultirala većim prinosima reakcije (Panić i sur., 2018a). Pufer se također pokazao kao dobro otapalo za provođenje reakcije redukcije halogeniranog acetofenona katalizirane kvascem pri čemu je konverzija reakcije iznosila 82,3 %. Vrijednosti enantiomernog viška koji se ostvaruje u DES-u kreću se u rasponu od 14 % do 29 %, a enantiomerni višak pufera iznosi 0 % što ukazuje na racemičnu smjesu. Enantioselektivnost je veća u DES-ovima nego u puferu te značajno raste smanjenjem udjela vode u DES-u. U prijašnjim istraživanjima također je uočena povećana enantioselektivnost u DES-u s niskim sadržajem vode što je dovelo do nižih konverzija u koncentriranom DES -u (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b; Panić i sur. 2018a; Panić i sur. 2018b).

Primjenom pekarskog kvasca kao biokatalizatora te DES-a umjesto toksičnih, hlapljivih i nerazgradivih organskih otapala, po principima zelene tehnologije smanjio bi se štetan utjecaj na okoliš i zdravlje ljudi.

#### **4.3. Predtretman pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ultrazvukom i detergentom**

S ciljem povećanja konverzije reakcije, biokatalizator je pretretiran. Nakon predtretmana kvašćevih stanica ultrazvukom i detergentom u reakcijsku smjesu je dodano 10  $\mu$ L supstrata halogeniranog acetofenona čime započinje reakcija redukcije. Reakcija je vođena 24 sata te je analizirana plinskom kromatografijom s masenom spektroskopijom. Rezultati su prikazani na slici 10. koja prikazuje konverziju i enantiomerni višak reakcije redukcije halogeniranog acetofenona vođene bez predtretmana te reakcije s predtretmanom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ultrazvukom i detergentom.



**Slika 10.** Grafički prikaz konverzije i enantiomernog viška enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona bez pretretmana kvasca te s pretretmanom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ultrazvukom i detergentom

Niti jedan od pretretmana ne utječe značajno na enantioselektivnost jer nije vidljiva velika razlika u enantiomernom višku (*ee*). Konverzija reakcije je u laganom porastu kod reakcija s pretretmanom u odnosu na reakciju vođenu bez pretretmana vjerojatno zbog lakše difuzije supstrata i produkta u/iz stanice jer dolazi do povećane permeabilnosti stanične membrane čime je omogućen jednostavniji ulaz supstrata i izlaz produkta iz stanice. Ovi rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima gdje je otkriveno da ultrazvuk ometa membrane vitalnih stanica kavitacijom što rezultira pojačanim prijenosom supstrata/produkta preko membrane (Dai i sur. 2017).

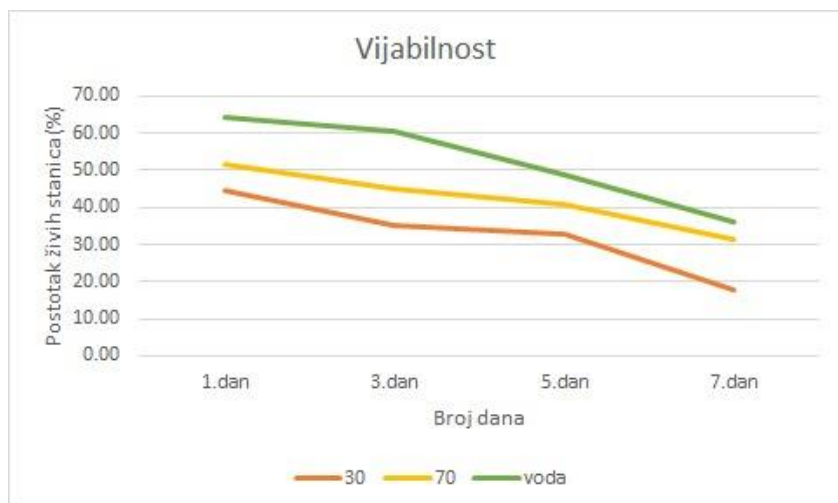
#### 4.4. Vijabilnost stanica kvasca u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

##### 4.4.1. Mjerenje vijabilnosti kvašćevih stanica

Određivanje vijabilnosti definira se kao postotak živih stanica u populaciji. To je najzastupljenija metoda kojom se analizira utjecaj kemijskih i fizikalnih faktora na njihov rast (Gilliland, 1959).

Vijabilnost je mjerena prvi, treći, peti i sedmi dan te su dobiveni rezultati prikazani na slici 11. Mjerenja su izvršena kako bi se saznalo koliko ima živih, a koliko mrtvih kvašćevih stanica tijekom 7 dana. Rezultati nam prikazuju pad broja živih stanica u svim ispitivanim otapalima

(ChEG30, ChEG70 i voda). U niskotemperaturnom eutektičkom otapalu s 30 % vode broj živih stanica kvasca pada s 44,6 % na 17,9 %, u DES-u s 70 % vode broj živih stanica pada s 51,8 % na 31,4 %, a u vodi broj živih stanica pada s 64,1 % na 36,4 % (tablica 3). Najbrži pad broja živih stanica je uočen kod niskotemperaturnog eutektičkog otapala s 30 % vode (ChEG30). Takvi rezultati mogu biti posljedica visokog osmotskog tlaka kod DES-a s manjim udjelom vode što posljedično rezultira difuzijom vode iz stanica. To je u skladu s očekivanim rezultatima jer tijekom 7 dana dolazi do oštećenja stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.



**Slika 11.** Vijabilnost stanica u ispitivanim otapalima tijekom 7 dana. Uvjeti inkubacije: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

**Tablica 3.** Postotak živih stanica tijekom 7 dana. Uvjeti inkubacije: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

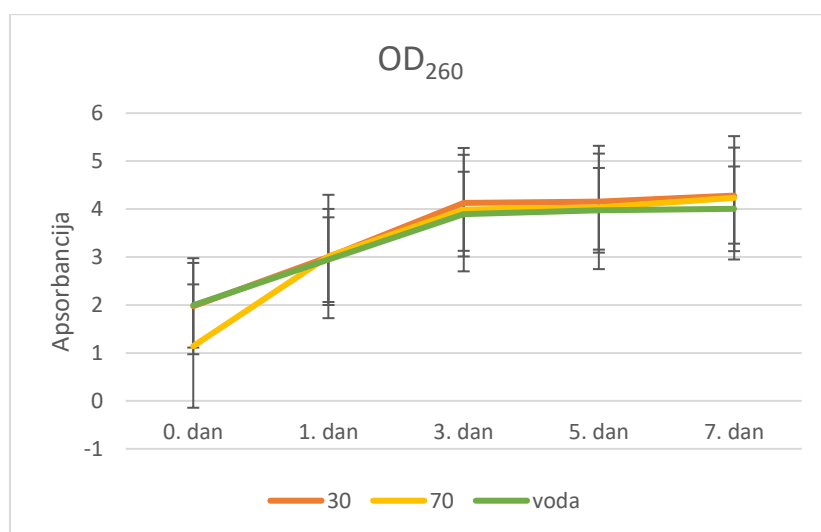
Udio vode u DES-u	Postotak živih stanica (%)			
	1.dan	3.dan	5.dan	7.dan
30	44,61	35,27	32,71	17,90
70	51,75	44,87	40,72	31,44
voda	64,13	60,44	48,85	36,35

#### 4.4.2. Mjerenje optičke gustoće kvašćevih stanica u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu i vodi

Mjerenje optičke gustoće se provodi pri valnoj duljini od 260 i 280 nm.

Mehanizam koji objašnjava djelovanje DES-a na žive organizme uključuje interakcije sa staničnim membranama. U prijašnjim istraživanjima sve ispitane eukariotske stanice pokazuju povećanje propusnosti lipidne membrane kao odgovor na izlaganje DES-ovima. Mogući poremećaj membrane se određuje mjerenjem apsorbancije pri 260 nm odnosno 280 nm koja nam ukazuje na oslobađanje DNA i proteina u medij (Pavoković i sur., 2020).

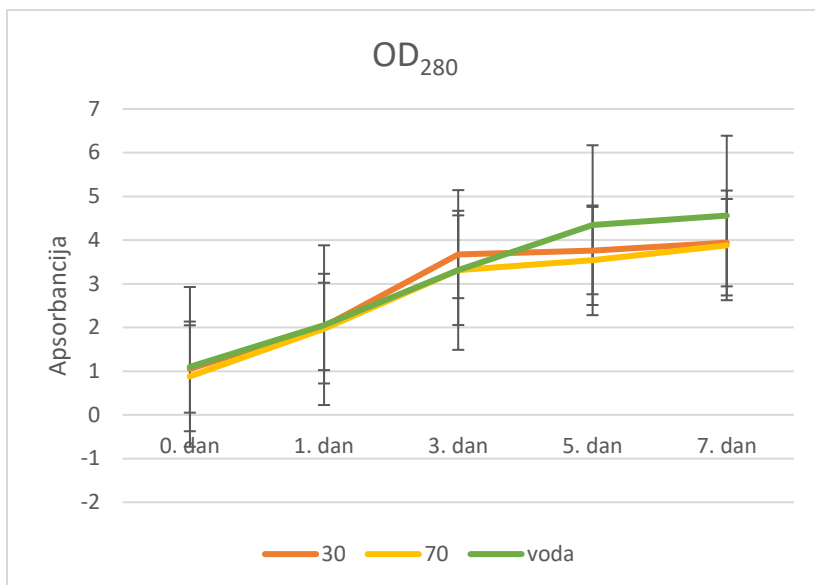
Mjerenjem optičke gustoće na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 260 nm dobiveni su rezultati prikazani na slici 12. Pri valnoj duljini od 260 nm apsorbira DNA molekula. Povećanje apsorbancije tijekom 7 dana ukazuje na povećanje koncentracije DNA molekula te na povećanje oštećenja stanica jer dolazi do istjecanja molekule DNA kroz pore na membrani. Time je potvrđeno povećanje propusnosti lipidne membrane.



**Slika 12.** Apsorbancija kvašćevih stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (ChEG30 i ChEG70) i vodi mjerena pri 260 nm. Reakcijski uvjeti: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

Rezultati mjerenja optičke gustoće na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 280 nm prikazani su na slici 13. Pri valnoj duljini od 280 nm apsorbiraju stanični proteini. Povećanje apsorbancije tijekom 7 dana ukazuje na povećanje koncentracije proteina te samim time na povećanje oštećenja stanica jer dolazi do oslobađanja proteina iz stanica u medij.





**Slika 13.** Apsorbancija kvašćevih stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (ChEG30 i ChEG70) i vodi mjerena pri 280 nm. Reakcijski uvjeti: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

Sumarno, uspješno je provedena redukcija halogeniranog acetofenona primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. S obzirom na reakciju u puferu, u eutektičkim otapalima, dobiven je željeni (*S*)-alkohol u suvišku. Predtretmanom biokatalizatora nije poboljšana konverzija ni enantiomerni višak reakcije. Mjerenjem optičke gustoće pri valnim duljinama 260 i 280 nm uočeno je povećanje koncentracije proteina i DNA molekula kroz vrijeme u svim ispitanim otapalima. Vijabilnost kulture liofiliziranog kvasca smanjuje se kroz vrijeme u svim ispitanim otapalima.

## 5. Zaključci

Na temelju rezultata dobivenih iz provedenog eksperimentalnog dijela izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Niskotemperaturna eutektička otapala (eng. deep eutectic solvents, DES) na bazi kolin-klorida pripravljena su zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida i etilen-glikola u omjeru 1:2 uz 100 %-tno iskorištenje reakcije.
2. Enantiomerni višak redukcije halogeniranog acetofenona pomoću stanica pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u svim ispitanim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima viši je u odnosu na enantiomerni višak u puferu. Kao najpogodnije otapalo za enantioselektivnu redukciju halogeniranog acetofenona odabrano je kolin-klorid:etilen-glikol s 30 % (w/w) vode zbog najvećeg enatiomernog viška.
3. Povećanjem udjela vode u DES-u povećava se konverzija reakcije redukcije halogeniranog acetofenona u *S*-halogenirani alkohol.
4. Predtretmani kvašćevih stanica ultrazvukom i detergentom ne utječu značajno na konverziju i na enantiomerni višak redukcije halogeniranog acetofenona.
5. Broj živih stanica kvasca pada u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima tijekom 7 dana inkubacije zbog nastalih oštećenja stanica.

## 6. Popis literature

1. Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, **126** 9142–9147.
2. Ahmed, M., Kelly, T., & Ghanem, A. (2012). ChemInform Abstract: Applications of Enzymatic and Non-enzymatic Methods to Access Enantiomerically Pure Compounds Using Kinetic Resolution and Racemization. *ChemInform*, **43**.
3. Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 301–312.
4. Benkovic SJ, Ballesteros A (1997) Biocatalysts – the next generation. *TIBTECH* **15**:385–386.
5. Bommarius AS, Broering JM (2005) Established and novel tools to investigate biocatalyst stability. *Biocatal Biotransfor* **23**:125–139.
6. Bruggink A, Straathof AJJ, van der Wielen LAM (2003) Fine chemical industry for life science products: green solutions to chemical challenges. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol 80. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 69–113.
7. Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2015a). Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **90**, 1631–1639.
8. Cvjetko Bubalo M., Mazur M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. (2015b) Baker's yeast-mediated asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutanoate in deep eutectic solvents. *Process Biochemistry* **50**: 1788 - 1792.
9. Dai C, Xiong F, He R, Zhang W, Ma H (2017) Effects of lowintensity ultrasound on the growth, cell membrane permeability and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ultrason Sonochem* **36**:191–197.

10. Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Jukić M., Vorkapić-Furač J. (2004) "Zelena" kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kemija u industriji* **53**: 217-224.
11. Gilliland, R., B. (1959) Determination of Yeast Viability. *J. Inst. Brew.* **65**, 424-428.
12. Hernáiz, M. J., Alcántara, A. R., García, J. I., & Sinisterra, J. V. (2010). Applied Biotransformations in Green Solvents. *Chemistry - A European Journal*, **16**, 9422–9437.
13. Illanes, A. (Ed.). (2008). *Enzyme Biocatalysis*.
14. Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Kovač V., Vorkapić-Furač J.: Dominantni trendovi zelene kemije. *Kem. Ind.*, **54**: 255–272, 2005.
15. 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*, **178**, 558–575.
16. Nguyen LA, He H, Pham-Huy C (2006) Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci* **2**:85–100.
17. 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.
18. Panić, M., Delač, D., Roje, M., Radojčić Redovniković, I., & Cvjetko Bubalo, M. (2018a). Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives: *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. *Biotechnology*.
19. Panić, M, Majerić Elenkov M, Roje M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2018b) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process Biochem* **66**:133–139.

20. Pavoković, D., Košpić, K., Panić, M., Radojčić Redovniković, I., & Cvjetko Bubalo, M. (2020). Natural deep eutectic solvents are viable solvents for plant cell culture-assisted stereoselective biocatalysis. *Process Biochemistry*, **93**, 69–76.
21. Pscheidt, B., & Glieder, A. (2008). Yeast cell factories for fine chemical and API production. *Microbial Cell Factories*, **7**, 25.
22. Schmid A, Dordick JS, Hauer B et al. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**:258–268.
23. Sheldon RA (2016) Biocatalysis and biomass conversion in alternative reaction media. *Chemistry* **22**:12984–12999.
24. Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2017). Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*, **118**, 801–838.
25. Thomas SM, DiCosimo R, Nagarajan V (2002) Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *TIBTECH* **20**:238–242
26. Torrelo, G., Hanefeld, U., & Hollmann, F. (2014). Biocatalysis. *Catalysis Letters*, **145**, 309–345.
27. Wegman M, Janssen M, van Rantwijk F et al. (2001) Towards biocatalytic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Adv Synth Catal* **343**:559–576.
28. Zhao H, Chockalingam K, Chen Z (2002) Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* **13**:104–110.
29. Zhao, H.; Zhang, C.; Crittle, T. D. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2013, **85–86**, 243–247.

## Izjava o izvornosti

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

Marija Karić

ime i prezime studenta