

# Mikrobna redukcija acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

---

Demir, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:676009>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Karla Demir

**MIKROBNA REDUKCIJA  
ACETOFENONA U  
NISKOTEMPERATURNIM  
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Cvjetko Bubalo te uz pomoć Mije Radović, mag. ing. biotechn.

Bakterijske kulture i hranjive podloge korištene u radu osigurao je Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



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

Prvenstveno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na prenesenom znanju, volji i trudu kako bi me upoznala s mnogobrojnim metodama i tehnikama rada u laboratoriju te omogućila što zanimljiviju izradu diplomskog rada.

Zahvaljujem se i Miji Radović, mag. ing. biotechn. i svim suradnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pomoći i savjetima pruženim prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Također se zahvaljujem voditelju studija prof. dr. sc. Božidaru Šanteku i svim ostalim suradnicima studija Bioproceno inženjerstvo na pomoći i susretljivosti tijekom cijelog diplomskog studija.

Veliko hvala mojoj obitelji, dečku, prijateljima i kolegama na motivaciji i bodrenju tijekom cijelog diplomskog studija.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

## MIKROBNA REDUKCIJA ACETOFENONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

*Karla Demir, univ. bacc. ing. biotechn., 0058212759*

**Sažetak:** S obzirom na ubrzani porast industrijalizacije i potrebu za stvaranjem održivijih procesa, razvijen je koncept *zelene* kemije koji se oslanja na primjenu obnovljivih sirovina, alternativnih otapala i biokatalizatora za pretvorbu organskih spojeva u biotransformacijskim procesima. Stoga, u upotrebu sve više ulazi primjena eutektičkih otapala kao pogodnih reakcijskih medija za dobivanje enantiomerno čistih spojeva. U ovom radu pripremljena su nova niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita te su fizikalno-kemijskom karakterizacijom određena njihova karakteristična svojstva. Isto tako, provedena je enantioselektivna redukcija različito supstituiranih acetofenona u optički aktivne alkohole upotrebom bakterija mliječne kiseline *Limosilactobacillus fermentum* MC1 i *Levilactobacillus brevis* MB1, nakon čega je provedena optimizacija redukcije acetofenona kao modelnog supstrata i *L. brevis* MB1 kao pogodnog biokatalizatora u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu. Biokatalitička redukcija acetofenona u otapalu betain : malična kiselina : glukoza s 30 %-tnim masenim udjelom vode rezultirala je većim enantiomernim viškom u odnosu na istu provedenu u hranjivoj podlozi.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, enantioselektivna redukcija, niskotemperaturna eutektička otapala, osmoliti, različito supstituirani acetofenoni

**Rad sadrži:** 63 stranice, 20 slika, 9 tablica, 60 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

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

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Novak (član)
4. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

**Datum obrane:** 21. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### MICROBIAL REDUCTION OF ACETOPHENONE IN DEEP EUTECTIC SOLVENTS

*Karla Demir, univ. bacc. ing. biotechn., 0058212759*

**Abstract:** Considering the accelerated growth of industrialization and the need to create more sustainable processes, the concept of green chemistry was developed. It relies on the use of renewable raw materials, alternative solvents and biocatalysts for the conversion of organic compounds in biotransformation processes. Therefore, the application of eutectic solvents as suitable reaction media for obtaining enantiomerically pure compounds is increasingly being used. In this work, new osmolyte-based deep eutectic solvents were prepared and their characteristic properties were determined by physico-chemical characterization. Likewise, the enantioselective reduction of differently substituted acetophenones into optically active alcohols was carried out using lactic acid bacteria *Limosilactobacillus fermentum* MC1 and *Levilactobacillus brevis* MB1, after which the optimization of the reduction of acetophenone as a model substrate and *L. brevis* MB1 as a suitable biocatalyst in a deep eutectic solvent was carried out. The biocatalytic reduction of acetophenone in the betaine : malic acid : glucose solvent with a 30% water content (w/w) resulted in a higher enantiomeric excess compared to the same one carried out in the nutrient medium.

**Keywords:** *deep eutectic solvents, enantioselective reduction, lactic acid bacteria, osmolytes, substituted acetophenones*

**Thesis contains:** 63 pages, 20 figures, 9 tables, 60 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Mia Radović, Msc

#### **Reviewers:**

1. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor (president)
2. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (mentor)
3. Jasna Novak, PhD, Full professor (member)
4. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** September 21<sup>st</sup>, 2022



# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. BIOTRANSFORMACIJE</b> .....	2
2.1.1. Biokatalizatori .....	3
2.1.1.1. <i>Bakterije mliječne kiseline kao biokatalizatori</i> .....	5
2.1.2. Industrijske biotransformacije .....	6
<b>2.2. ZELENA KEMIJA</b> .....	8
2.2.1. Načela zelene kemije .....	9
2.2.2. Zelena otapala .....	10
2.2.2.1. <i>Niskotemperaturna eutektička otapala</i> .....	11
2.2.2.2. <i>Niskotemperaturna eutektička otapala u biokatalitičkim procesima</i> .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	17
3.1.1. Biokatalizatori .....	17
3.1.2. Kemikalije .....	17
3.1.3. Otopine .....	18
3.1.4. Oprema i uređaji .....	19
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	20
3.2.1. Računalno predviđanje eutektičke točke dvokomponentnih osmolita .....	20
3.2.2. Priprava i karakterizacija novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	22
3.2.2.1. <i>Eksperimentalna provjera računalnog predviđanja eutektičke točke dvokomponentnih osmolita</i> .....	22
3.2.2.2. <i>Empirijska metoda priprave novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita</i> .....	23
3.2.2.3. <i>Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita</i> .....	23
3.2.3. Računalno predviđanje topljivosti različito supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima .....	25
3.2.4. Mikrobna redukcija različito supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima .....	26
3.2.4.1. <i>Probir supstrata i biokatalizatora za enantioselektivnu redukciju acetofenona u eutektičkim otapalima</i> .....	26
3.2.4.2. <i>Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije različito supstituiranih acetofenona</i> .....	28
3.2.4.3. <i>Probir DES-ova za provođenje enantioselektivne redukcije acetofenona u eutektičkim otapalima</i> .....	30
3.2.4.4. <i>Optimizacija reakcije redukcije acetofenona provedene pomoću <i>L. brevis</i> MB1 u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima</i> .....	31

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	33
<b>4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NOVIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA</b> .....	34
4.1.1. Računalno predviđanje eutektičke točke dvokomponentnih osmolita i eksperimentalna provjera dobivenih rezultata .....	36
4.1.2. Empirijska metoda pripreme novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita .....	40
4.1.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita .....	43
<b>4.2. MIKROBNA REDUKCIJA RAZLIČITO SUPSTITUIRANIH ACETOFENONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA</b> .....	45
4.2.1. Računalno predviđanje topljivosti različito supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima .....	45
4.2.2. Probir supstrata, biokatalizatora i reakcijskog otapala za enantioselektivnu redukciju acetofenona u eutektičkim otapalima .....	49
4.2.3. Optimizacija reakcije redukcije acetofenona provedene pomoću <i>L. brevis</i> MB1 u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima .....	53
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	57
<b>6. LITERATURA</b> .....	59
<b>7. PRILOZI</b>	
<b>7.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA</b>	



# 1. UVOD

U prvoj polovici 20. stoljeća došlo je do intenzivnog razvoja industrijalizacije koja je potaknula postavljanje brojnih pitanja vezanih uz zaštitu okoliša. Suočeni s ekološkim problemima i zabrinutošću, proizvođači su promijenili svoje stajalište o konvencionalnoj proizvodnji i razvoju proizvoda kroz napredak u kemijskom istraživanju i ekološkom inženjerstvu, razvijajući pri tome održivije procese. Krajem 20. stoljeća, uspostavljeni su principi *zelene* kemije kao novog ekološki prihvatljivog pristupa u kemijskoj industriji, a koja se zasniva na smanjenju upotrebe otrovnih otapala u kemijskim analizama i procesima te smanjenju generiranja otpada prilikom provođenja istih procesa (Aparecida de Marco i sur., 2019). Slijedeći principe *zelene* kemije, razvijene su biotransformacije, enzimski ili pomoću cijelih stanica katalizirane reakcije pretvorbe organskih spojeva do željenih produkata, uz integraciju različitih područja kemije, mikrobiologije i genetičkog inženjerstva. Za provođenje biokatalitičkih procesa primjenjuju se biokatalizatori s visokom kemo-, regio- i enantioselektivnosti u svrhu proizvodnje različitih finih kemikalija, prehrambenih sastojaka, agrokemijskih proizvoda i intermedijera koji sudjeluju u proizvodnji lijekova (Hegazy i sur., 2015).

Kao zamjena dosadašnjim organskim otapalima, razvijena su nova *zelena* niskotemperaturna eutektička otapala karakterizirana kao nehlapiva, nezapaljiva i stabilna otapala koja su jeftina, netoksična i sigurna za primjenu s tehnološkog i ekološkog aspekta (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). S obzirom na postojanje velikog raspona spojeva koji mogu tvoriti prirodna eutektička otapala, moguće je dizajnirati takva otapala s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima za buduće primjene u ekstrakciji, biokemiji, elektrokemiji, ali i kao reakcijskog medija u biokatalitičkim reakcijama (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Posljednjih godina, niskotemperaturna eutektička otapala pronalaze sve veću primjenu u biokatalitičkim procesima zbog posjedovanja povoljnih karakteristika koje će u budućnosti omogućiti primjene istih u industrijskim procesima (Pätzold i sur., 2019).

Cilj ovog rada je dizajnirati i pripremiti nova niskotemperaturna eutektička otapala u svrhu ocjene njihovih fizikalno-kemijskih svojstava i ispitati mogućnost njihove primjene za provođenje enantioselektivne redukcije različito supstituiranih acetofenona pomoću bakterija mliječne kiseline kao biokatalizatora.

## 2. TEORIJSKI DIO

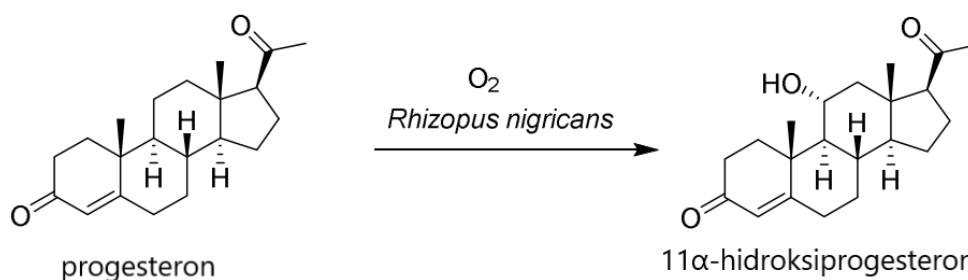
### 2.1. BIOTRANSFORMACIJE

Mikroorganizmi i njihovi ekstrakti imaju dugogodišnju primjenu u kemijskim reakcijama, uglavnom u fermentacijskim i biotransformacijskim procesima pomoću kojih se i danas proizvode alkoholna pića, ocat ili prehrambeni proizvodi kao što je jogurt te farmaceutski značajne molekule (Grogan, 2009). Biotransformacije su pretvorbe organskih spojeva u strukturno srodne spojeve pomoću cijelih stanica te pročišćenih ili sirovih enzima kao biokatalizatora kroz ograničeni broj enzimskih reakcija (Fontanille i sur., 2006). Za razliku od primijenjenih fermentacijskih procesa koji se provode u više katalitičkih koraka, biotransformacije se provode u jednom ili dva katalitička koraka. Glavna karakteristika biotransformacija je sličnost kemijske strukture supstrata i produkta, što nije nužno slučaj kod fermentacijskih procesa (Vasić-Rački, 2006).

S obzirom na potrebu za razvojem ekološki prihvatljivih metoda kemijske sinteze, razvijene su biokatalitičke metode sinteze koje uključuju upotrebu mikrobnih stanica ili iz njih izoliranih enzima (Grogan, 2009). Mikrobne transformacije mogu se provoditi pri gotovo neutralnom pH-u i temperaturi okoline te atmosferskom tlaku, dok kemijska sinteza često zahtijeva ekstremne uvjete koji su ekološki neprihvatljivi i nepoželjni u industriji. Stoga, biotransformacije omogućuju primjenu blagih reakcijskih uvjeta koji su sigurni za osoblje, ali i za okolno područje i širu zajednicu (Hegazy i sur., 2015). U usporedbi s kemijskom sintezom, biokataliza pomoću cijelih stanica omogućuje učinkovitu i ekološki prihvatljivu alternativu tradicionalnim kemijskim postupcima za proizvodnju finih kemikalija. Najvažnija karakteristika biokatalizatora je njegova visoka selektivnost koja, uključujući regio-, kemo-, diastereo- i enantioselektivnost, a također donosi prednosti kao što su niska toksičnost, mogućnost reciklacije biokatalizatora, smanjenje ekoloških problema, olakšano izdvajanje proizvoda te smanjenje nuspojava i upotrebe zaštitnih skupina. Osim toga, provođenje višestupanjskih reakcija s integriranom regeneracijom kofaktora i visoka katalitička učinkovitost čine biokatalizatore vrlo pogodnima u komercijalnim primjenama (Garzón-Posse i sur., 2018; Lin i Tao, 2017).

Prvim biotransformacijskim postupcima smatraju se mikrobna oksidacija etanola do octene kiseline, propanola do propionske kiseline i manitola do fruktoze pomoću bakterije *Bacterium xylinum* te mikrobna oksidacija D-sorbitola do L-sorboze pomoću bakterije *Acetobacter*

*suboxydans* (Vasić-Rački, 2006). Krajem 1940. godine, otkriće Alexandra Fleminga dovelo je do komercijalne proizvodnje penicilina G pomoću plijesni *Penicillium chrysogenum*, iz kojeg su se počeli proizvoditi različiti polusintetski  $\beta$ -laktamski antibiotici (Grogan, 2009; Vasić-Rački, 2006). Reakcija pretvorbe penicilina G u polusintetske  $\beta$ -laktamske antibiotike katalizirana je pomoću enzima penicilin G acilaze koja djeluje kao transferaza i hidrolaza, potičući hidrolizu bočnog lanca donora acilne skupine, penicilina G (Giordano i sur., 2006). Peterson i Murray su 1952. godine proveli mikrobnu hidroksilaciju progesterona u  $11\alpha$ -hidroksiprogesteron, koja je dovela do komercijalno održive proizvodnje kortizona, čime je zamijenjen 31 korak kemijske sinteze kortizona iz žučne kiseline (slika 1). Razvoj biotransformacija dovodi do stvaranja interdisciplinarnog područja koje zahtijeva suradnju mikrobiologa, molekularnih biologa, uz primjenu proteinskog i metaboličkog inženjerstva (Grogan, 2009; Vasić-Rački, 2006).



**Slika 1.** Hidroksilacija progesterona pomoću plijesni *Rhizopus nigricans* (Sheldon i Brady, 2013)

### 2.1.1. Biokatalizatori

Za provođenje biotransformacijskih reakcija najčešće se koriste enzimi, vegetativne stanice, spore, stanice u fazi mirovanja te imobilizirane stanice i enzimi. Bijela biotehnologija naročito primjenjuje mikrobnu transformaciju za stvaranje proizvoda od interesa, a one uključuju upotrebu živih stanica bakterija, filamentoznih plijesni, biljaka i životinja, algi te kvasaca i aktinomiceta (Smitha i sur., 2017). Primjena cijelih stanica kao biokatalizatora nudi neke jedinstvene prednosti u odnosu na upotrebu sirovih, pročišćenih ili imobiliziranih enzimskih pripravaka (tablica 1) (Pinto i sur., 2020).

**Tablica 1.** Usporedba enzima i cijelih stanica kao biokatalizatora (Pinto i sur., 2020)

	<b>ENZIMI</b>	<b>CIJELE STANICE</b>
<b>PREDNOSTI</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✚ Nema provođenja paralelnih reakcija</li><li>✚ Veća propusnost</li><li>✚ Tolerancija na visoke koncentracije supstrata</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✚ Nema dodavanja kofaktora</li><li>✚ Mogućnost provođenja kaskadnih reakcija s istim biokatalizatorom</li><li>✚ Nema procesa pročišćavanja</li></ul>
<b>NEDOSTACI</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✚ Dodatak kofaktora</li><li>✚ Povećano vrijeme i troškovi povezani s njihovim procesima pročišćavanja</li><li>✚ Niža stabilnost izvan stanične okoline</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>✚ Provođenje paralelnih reakcija zbog metaboličkih puteva</li><li>✚ Teško izdvajanje proizvoda</li><li>✚ Niska propusnost zbog stanične membrane</li></ul>

Prirodno prisutni enzimi često imaju nisku aktivnost i stabilnost, zbog čega nisu pogodni za industrijske primjene. Enzimi se obično izoliraju iz biljnog i životinjskog tkiva, a u industrijske svrhe, izoliraju se iz bakterija, kvasaca i plijesni, čiji se rast optimizira kako bi se proizvela dovoljna količina enzima. Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju, enzimi su klasificirani u šest glavnih skupina – oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, ligaze i izomeraze. Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije koje se odvijaju unutar stanice, uključujući oksigenaciju ili uklanjanje i dodavanje ekvivalenata atoma vodika. U skupinu oksidoreduktaza spadaju dehidrogenaze koje su široko primijenjene u industrijskim reakcijama. Putem reakcije nukleofilne suspcitucije, transferaze kataliziraju prijenos funkcionalnih grupa, primjerice amino-, metil-, hidroksimetil-, glikozil-, acil-, alkil-, fosfatne i sulfatne skupine. Hidrolaze kataliziraju reakciju adicije vode na supstrat koja se sve češće primjenjuje u organskoj sintezi za proizvodnju intermedijera lijekova i pesticida, dok su liaze odgovorne za kataliziranje reakcija adicije i eliminacije. Stvaranje veza između dviju molekula ili njihovo spajanje kataliziraju ligaze, uz prisutnost nukleotid trifosfata. Posljednju skupinu enzima čine izomeraze koje kataliziraju preraspodjelu atoma unutar molekule u reakcijama kao što su racemizacija i epimerizacija (Kaushik i sur., 2014).

Mikroorganizmi su široko rasprostranjeni i posjeduju sposobnost iskorištavanja velikog broja supstrata za rast kako bi preživjeli u ekstremnim okolišnim uvjetima koji se razlikuju po prisutnosti supstrata za rast, temperaturi, tlaku i salinitetu. U biotransformacijama se najčešće koriste eubakterije, pripadnice skupine prokariota, među koje spadaju *E. coli*, bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*, bakterije octene kiseline iz rodova *Gluconobacter* i *Acetobacter*, Gram-negativne bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Zymomonas* i *Agrobacterium* te Gram-pozitivne bakterije iz roda *Bacillus*. Široku primjenu u biotransformacijama imaju i mikroorganizmi iz skupine eukariota, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* te filamentozne plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Mucor* (Grogan, 2009). Zbog posjedovanja sposobnosti kataliziranja novih reakcija, plijesni imaju važnu ulogu u katalizi organskih spojeva i proizvodnji komercijalno važnih industrijskih proizvoda. Rodovi *Mucor* i *Rhizopus* koriste se za proizvodnju fermentiranog pića, hrane, fiziološki aktivnih tvari, otapala, polisaharida, organskih kiselina i antibiotika. Sojevi roda *Rhizopus* naročito su važni u proizvodnji limunske kiseline, dok sojevi roda *Mucor* stvaraju veliki broj lipaza i kataliziraju hidroksilaciju širokog spektra organskih spojeva (Cano-Flores i sur., 2020).

#### 2.1.1.1. Bakterije mliječne kiseline kao biokatalizatori

Bakterije mliječne kiseline pripadaju skupini Gram-pozitivnih bakterija oblika koka ili štapića koje ne stvaraju spore, smatraju se nepatogenima i obično su anaerobne ili fakultativno aerobne bakterije sa sposobnošću iskorištavanja ugljikohidrata, pri čemu nastaje mliječna kiselina kao ključni proizvod tijekom fermentacije (Mora-Villalobos i sur., 2020). Izolirane su iz različitih mikrostaništa biljnog ili životinjskog porijekla, dio su i autohtone mikrobne populacije sirovina koje se koriste za proizvodnju fermentirane hrane. S obzirom da su bakterije mliječne kiseline prirodno prisutne u probavnom traktu sisavaca, smatraju se pogodnim simbioticima, odnosno mikroorganizmima koji pozitivno djeluju na domaćina sprječavajući rast štetnih mikroorganizama i održavajući ravnotežu crijevne mikrobiote. Većina rodova bakterija mliječne kiseline prema taksonomskoj klasifikaciji pripadaju koljenu Firmicutes, razred Bacilli i red Lactobacillales koji se sastoji od različitih rodova. Glavni rodovi uključuju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Melissococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Vagococcus* i *Tetragenococcus* (Gupta i sur., 2018).

S obzirom na nedostatak funkcionalnog respiratornog sustava, bakterije mliječne kiseline dobivaju energiju na temelju fosforilacije na razini supstrata putem homofermentativnog i



heterofermentativnog metaboličkog puta. Homofermentativni put temelji se na glikolizi, pri čemu se uglavnom proizvodi mliječna kiselina, dok je heterofermentativni put, poznatiji kao pentozafosfatni put, karakteriziran proizvodnjom CO<sub>2</sub> i etanola ili acetata, uz proizvodnju mliječne kiseline (Mora-Villalobos i sur., 2020). Bakterije mliječne kiseline pogodne su za industrijske primjene zbog posjedovanja GRAS statusa (engl. *Generally Regarded As Safe*, GRAS), tolerancije na različite stresne uvjete, jednostavnog metabolizma, sposobnosti metaboliziranja različitih izvora ugljika i sinteze antimikrobnih spojeva koji inhibiraju rast patogena i uzročnika kvarenja. Istraživanja primjene bakterija mliječne kiseline kao biokatalizatora potaknuta su njihovim velikim značajem za hranu i ljudsko zdravlje, koji je doveo do boljeg razumijevanja genomike, metabolizma i fiziologije te metoda za probir mikroorganizama i razvoj produktivnijih sojeva. Biokatalitički potencijal bakterija mliječne kiseline omogućen je zbog aktivnosti enzima u stanicama, koja se koristi za transformacije prirodnih ili sintetskih supstrata u visokovrijedne proizvode kao što su farmaceutski intermedijeri, nutraceutici i posebne kemikalije. Jedan od najuspješnijih primjera biokatalize je korištenje aktivnosti bakterija mliječne kiseline, odnosno njihovih enzima alkohol-dehidrogenaza, za kataliziranje bioredukcije prokiralnih ketona u optički aktivne alkohole koji su važni farmaceutski intermedijeri (Hatti-Kaul i sur., 2018). Primjerice, kiralni sekundarni alkohol, indanol, sadrži hidroksilnu skupinu koja se može transformirati u amino skupinu, čime nastaju važni intermedijeri za proizvodnju lijekova, kao što su (+)-indatralin, irindalon, indinavir, (+)-sertralin i razagilin mezilat koji se primjenjuje za liječenje Parkinsonove bolesti (Galvão i sur., 2018).

### 2.1.2. Industrijske biotransformacije

Tijekom posljednjeg desetljeća 20. stoljeća došlo je do brzog porasta ukupnog broja biotransformacijskih procesa u industriji. Industrijske biotransformacije počele su se primjenjivati u farmaceutskoj i kemijskoj industriji te agroindustriji za sintezu kiralnih i biološki aktivnih molekula (Muñoz Solano i sur., 2012; Straathof i sur., 2002). Upotreba izoliranih enzima u organskim sintezama samo se povremeno primjenjivala u industrijskim procesima. Razvojem tehnologije rekombinantne DNA u drugoj polovici 20. stoljeća, omogućio se prijelaz na proizvodnju čistih enzima, primjerice enzima penicilin G amidaze, korištenjem rekombinantnih mikroorganizama (Sheldon i Brady, 2013). Primjena biokatalize u industrijskoj sintezi potaknuta je otkrićem Zaksa i Klibanova 1984. godine kojim su dokazali da lipaze dobro funkcioniraju u gotovo bezvodnim organskim otapalima pri povišenim

temperaturama. Ključni korak u razvoju industrijskih biotransformacija bila je kinetička rezolucija kiralnog glicidil estera, katalizirana pomoću komercijalno dostupne lipaze, lipolaze, izolirane iz *Thermomyces lanuginosus*. Korištena lipolaza je bila prva komercijalno dostupna lipaza koja je proizvedena pomoću rekombinantnog mikroorganizma (Sheldon i Brady, 2013). Glavni primjer industrijske sinteze je enzimska transformacija penicilina do 6-aminopenicilanske kiseline (engl. *6-aminopenicillanic acid*, 6-APA) koja je osnovna sirovina za industrijsku proizvodnju polusintetskih penicilina, amoksicilina i ampicilina. Za enzimsku pretvorbu penicilina u 6-APA, primjenjuju se penicilin acilaze ili amidaze u topljivom ili imobiliziranom obliku pri kiselim ili alkalnim uvjetima (Parmar i sur., 2000). Dehidroepiandrosteron (engl. *Dehydroepiandrosterone*, DHEA) je najzastupljeniji cirkulirajući steroid u ljudskom organizmu koji se može transformirati u metaboličke spojeve s korisnim biološkim aktivnostima. Bakterije roda *Penicillium* provode različite vrste steroidnih transformacija, ali su usmjerene na hidroksilaciju, laktonizaciju i hidrogenizaciju. Najvažniji i najčešći oblik pretvorbe DHEA je hidroksilacija C7 atoma kojom nastaju 7-hidroksi derivati DHEA kao glavni produkti mikrobne transformacije. Takvi metabolički spojevi su nekoliko puta aktivniji od DHEA te posjeduju imunoprotektivna i imunoregulacijska svojstva (Huang i sur., 2010).

Industrijski proizvedena L-askorbinska kiselina, poznatija pod nazivom vitamin C, uvelike se primjenjuje u hrani i farmaceutskoj industriji kao konzervans i dodatak prehrani, zbog posjedovanja antioksidacijskih svojstava. Glavni industrijski postupak proizvodnje L-askorbinske kiseline je Reichstein–Grüssner proces kojim se D-sorbitol prevodi u L-askorbinsku kiselinu preko međuprodukta 2-keto-L-glukonske kiseline. Takav proces biooksidacije provodi se pomoću bakterije *Gluconobacter oxydans* kroz nekoliko kemijskih koraka. Danas se u industrijskim procesima primjenjuju dodatni biooksidacijski koraci koje provodi *Ketogulonigenium vulgare*, pri čemu se D-sorbitol pretvara u međuprodukt, 2-keto-L-glukonsku kiselinu, bez potrebe za provođenjem brojnih kemijskih međukoraka (Pappenberger i Hohmann, 2014). Prostaglandini su hormoni nezasićene C20 masne kiseline koji se primjenjuju u različite medicinske svrhe i proizvode se iz nezasićenih masnih kiselina mikrobnom transformacijom pomoću *Cryptococcus neoformans*. Dihidroxiaceton se proizvodi iz glicerola pomoću bakterije octene kiseline *Gluconobacter melanogenus* te se izrazito primjenjuje u kozmetičkoj industriji za proizvodnju losiona i kozmetike. Mikrobna transformacija već postojećih antibiotika provodi se s ciljem razvoja modificiranih i poboljšanih antibiotika sa smanjenom toksičnošću, širokim antimikrobnim spektrom,

poboljšanom adsorpcijom i smanjenim alergijskim učincima. Lankacidin-C14-butirat proizveden je iz lankacidina C i metil-butirata pomoću soja *Bacillus megaterium* IFO 12108, čime je dobiven antibiotik s poboljšanom antimikrobnom aktivnošću i smanjenom toksičnošću. Osim što se primjenjuju za proizvodnju novih aktivnih tvari, mikrobne transformacije koriste se i u svrhu detoksikacije okoliša koja uključuje enzimsku pretvorbu ksenobiotika, tvari kojima je organizam izložen, ali se u njemu ne proizvode i pri većim koncentracijama mogu biti toksične za organizam (Smitha i sur., 2017; Croom, 2012). Ksenobiotici mogu služiti kao supstrati za mikrobni rast i proizvodnju energije, a njihovo uklanjanje iz ekosustava može se provesti putem različitih mehanizama. Primjerice, razgradnja herbicida dalapona, klorirane masne kiseline, katalizirana je bakterijama roda *Arthrobacter*, pri čemu nastaje piruvat koji se razgrađuje do ugljikovog oksida i vode (Smitha i sur., 2017).

Posljednjih godina sve se više povećavaju interesi za biotransformaciju različitih zagađivača okoliša primjenom mikroorganizama. *Mycobacterium vaccae* pokazuje sposobnost razgradnje acetona, cikloheksana, stirena, benzena, etil- i propilbenzena, dioksana i 1,2-dikloroetilena, dok bakterije roda *Pseudomonas* i *Bacillus* vrlo dobro razgrađuju poliklorirane bifenile. Mnogi vodeni mikroorganizmi imaju važnu ulogu u biorazgradnji naftnih ugljikovodika, naročito bakterije rodova *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* i *Mycobacterium* te plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Amorphoteca*, *Neosartorya* i *Cephalosporium* (Smitha i sur., 2017). S obzirom na njihovu stoljetnu primjenu, mikrobne transformacije pokazale su se korisnim rješenjem za olakšavanje proizvodnje različitih kemikalija koje se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj, agrokemijskoj i drugim industrijama. Biotransformacije su danas izrazito primijenjene u farmaceutskom istraživanju i razvoju kako bi se utvrdio metabolizma spojeva na životinjskim modelima (Smitha i sur., 2017). U području zelene kemije i bijele biotehnologije, biotransformacije predstavljaju važnu metodologiju u stvaranju održivijih industrijskih procesa (Cano-Flores i sur., 2020).

## **2.2. ZELENA KEMIJA**

U drugoj polovici 20. stoljeća došlo je do ubrzanog razvoja znanosti i tehnologije koje su rezultirale intenzivnim ekonomskim napretkom i povećanjem životnog standarda. Ekonomski razvoj doveo je do značajnih ekoloških problema, zbog čega se javila potreba za uravnoteženjem upotrebe prirodnih resursa, gospodarskog rasta i očuvanja okoliša. S obzirom

na povećanje svijesti o zaštiti okoliša, velika pozornost usmjerena je na *zelenu* i održivu tehnologiju (Ivanković i sur., 2017). *Zelena* tehnologija može se definirati kao bilo koji proces, proizvod ili usluga koja smanjuje negativan utjecaj na okoliš, pri čemu štiti ljudsko zdravlje i održava kvalitetu ekosustava. Takve čistije ili ekološke tehnologije omogućavaju visoku učinkovitost korištenja energije i resursa, nisku cijenu, korištenje obnovljive energije i sirovina, ne stvaraju sekundarne zagađivače okoliša i pogodne su za ljudsko zdravlje i ekosustav. Primjena i razvoj *zelenih* tehnologija predstavlja prihvatljivu metodu za stvaranje održivog okoliša kako bi se riješili problemi klimatskih promjena, upravljanja otpadom te povećane potražnje za energijom i resursima. Rezultati primjene *zelenih* tehnologija uključuju poboljšanje kvalitete okoliša i dobrobiti ljudi, uz kretanje prema ciljevima održivog razvoja (Pan i sur., 2019).

### 2.2.1. Načela zelene kemije

Anastas i Warner su 1991. godine u svojoj knjizi „*Zelena kemija: Teorija i praksa*“ prvi put opisali *zelenu* kemiju koja predstavlja relativno novo znanstveno područje. Američka agencija za zaštitu okoliša je 2012. godine definirala *zelenu* kemiju kao stvaranje kemijskih procesa i proizvoda koji smanjuju ili uklanjaju upotrebu i proizvodnju štetnih tvari. Neki od ciljeva *zelene* kemije su primjena biokatalize, nekonvencionalnih otapala kao zamjena za štetna organska otapala te korištenje obnovljivih sirovina i alternativnih reakcijskih uvjeta kao što su primjena ultrazvuka i mikrovalova, u svrhu postizanja ekonomske i ekološke učinkovitosti. Iako se *zelena* kemija naizgled čini jednostavnom, cjelokupni koncept je izrazito složen, zbog čega je sažet u dvanaest načela *zelene* kemije koja su 1998. godine uveli Anastas i Warner (Radošević i sur., 2016):

1. Poželjno je spriječiti nastajanje otpada nego ga tretirati ili uklanjati nakon što je već nastao.
2. Novi sintetski procesi trebaju biti kreirani tako da se postigne maksimalna ugradnja svih komponenti u konačni proizvod.
3. Kad god je moguće, u sintetskim metodama trebaju se primjenjivati i proizvoditi tvari koje posjeduju malu ili nikakvu toksičnost za ljude i okolinu.
4. Kemijske produkte treba kreirati tako da se postigne njihova željena funkcija uz minimalnu toksičnost.
5. Treba izbjegavati upotrebu pomoćnih kemikalija kad god je to moguće, a u slučaju

korištenja, potrebno je osigurati sigurne uvjete rada.

6. Energetskih zahtjevi kemijskih procesa trebali bi se minimizirati, a ukoliko je moguće, sintetski procesi bi se trebali provoditi pri sobnoj temperaturi i tlaku.
7. Obnovljive sirovine bi se trebale primjenjivati kad god je to tehnički ili ekonomski izvedivo.
8. Ukoliko je to moguće, potrebno je minimizirati ili izbjegavati nepotrebne modifikacije procesa, s obzirom da one zahtijevaju korištenje dodatnih reagensa i potiču generiranje otpada.
9. Selektivni katalitički reagensi su pogodniji za primjenu od stehiometrijskih reagensa.
10. Nakon prestanka djelovanja, kemijski produkti bi se trebali razgraditi na bezopasne tvari koje ne opstaju u okolini.
11. Trebalo bi razviti analitičke metodologije koje omogućavaju praćenje i kontrolu procesa, u svrhu sprječavanja nastanka opasnih tvari.
12. Kako bi se smanjila mogućnost nastanka nesreća (požara, eksplozija i isparavanja), potrebno je smanjiti korištenje tvari koje mogu uzrokovati negativne posljedice.

*Zelena* kemija predstavlja se kao pogodno rješenje problema koji se javljaju prilikom provođenja kemijskih procesa. Ekološka, ekonomska i socijalna održivost postižu se kreiranjem novih sintetskih metoda i aparature koje pojednostavljuju provođenje operacija u kemijskoj proizvodnji, postavljanjem novih reakcija koje mogu maksimizirati količinu željenih proizvoda i minimizirati nastajanje nusprodukata te otkrivanjem *zelenih* otapala koja su bezopasna za okoliš. Takva nova otkrića u kemijskom području dovode do stvaranja nove generacije kemijske sinteze (Li i Trost, 2008).

### 2.2.2. Zelena otapala

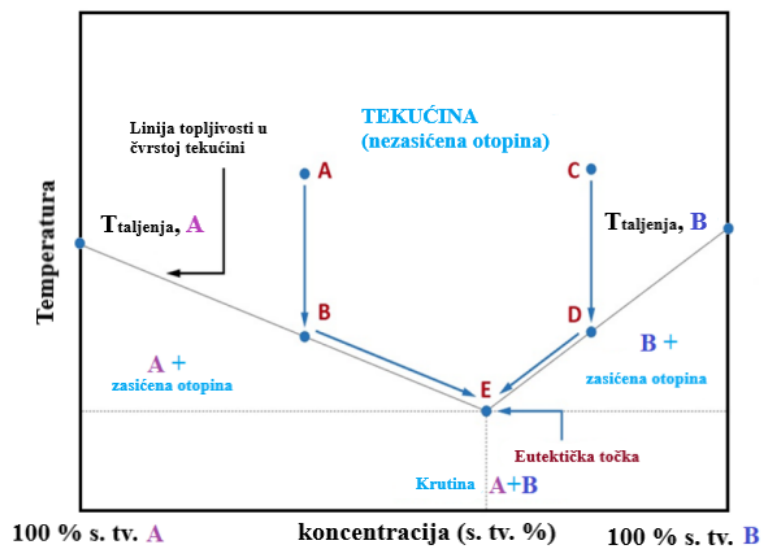
Mnogobrojni industrijski procesi zahtijevaju primjenu otapala koja čine gotovo 60 % cjelokupnih industrijskih emisija i 30 % emisija hlapivih organskih spojeva. Primjena procesa bez otapala bila bi izrazito pogodna, no otapala su neizbježna zbog njihove važne uloge u otapanju čvrstih tvari, prijenosu mase i topline, utjecaju na viskoznost te procesima izdvajanja i pročišćavanja. Sukladno tome, razvijene su strategije za razvoj zelenih otapala koje uključuju primjenu otapala iz obnovljivih sirovina i otapala koja štite zdravlje i okoliš, čime se zamjenjuju opasna otapala i otapala dobivena iz nafte. Među predloženim otapalima, najviše su se istaknule ionske, superkritične i subkritične tekućine te niskotemperaturna eutektička

otapala kao obećavajući pristup razvoja inovativnih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Ionske tekućine (engl. *Ionic Liquids*, ILs) su sastavom organske soli koje imaju temperaturu tališta nižu od 100 °C. ILs se sastoje od kationa, najčešće različito supstituiranih organskih molekula velike molarne mase koje sadrže pozitivno nabijeni atom dušika, sumpora ili fosfora, i anorganskih ili organskih aniona kao što su halogenidi, tetrafluorborat, heksafluorfosfat, acetat i dicijanamid. Ovakva nezapaljiva otapala imaju izrazito niski tlak pare i izvrsnu toplinsku stabilnost, s obzirom da je temperatura razgradnje ILs u rasponu od 250 °C do 450 °C. Primjenom ILs dolazi do poboljšanja prinosa i produktivnosti procesa te povećanja ekonomske učinkovitosti, ukoliko se ILs ponovno koriste i recikliraju (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Uz primjenu ionskih tekućina za uspostavljanje novih visokoučinkovitih procesa i pokretanje procesa koji su sigurniji za upotrebu i ljude, sve više u upotrebu ulaze superkritične i subkritične tekućine. Superkritična tekućina je tekućina zagrijana iznad kritične temperature i komprimirana iznad kritične vrijednosti tlaka. U superkritičnom stanju, superkritični fluidi imaju svojstva između tekućina i plinova, budući da poprimaju vrijednost gustoće sličnu onoj u klasičnim tekućinama, dok je viskoznost bliska vrijednostima normalnih plinova. Ugljikov dioksid je najčešće primjenjivana superkritična tekućina za superkritične ekstrakcije zbog posjedovanja povoljnih kritičnih svojstava, nije toksičan niti eksplozivan, lako je dostupan, jednostavno se uklanja iz proizvoda i zamjenjuje otrovne freone, kao i organska otapala. Najvažniji reakcijski medij u prirodi, voda, ima pogodna svojstva u superkritičnom stanju u kojem se ponaša drugačije od vode u standardnim uvjetima. Mijenjanjem tlaka i temperature dolazi do promjene gustoće superkritične vode od visokih do niskih vrijednosti, pri čemu ne dolazi do faznog prijelaza. Međutim, ukoliko se temperatura održava iznad temperature vrenja, ali ispod kritične vrijednosti temperature, a pri dovoljno visokom tlaku kako bi se zadržala u tekućem stanju, voda se nalazi u subkritičnom stanju. U skladu s održivim iskorištavanjem prirodnih i obnovljivih resursa, izrazito se primjenjuju ionske tekućine na bazi kolina i niskotemperaturna eutektička otapala kao bezopasna, ekološki prihvatljiva i biorazgradiva otapala dobivena iz prirodnih sirovina ili obnovljivih izvora (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

#### 2.2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

Zelena otapala na osnovi ILs, koja su karakterizirana značajnim smanjenjem temperature tališta kod eutektičkog sastava određenih donora i akceptora vodikove veze, nazivaju se niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) (Hansen i sur., 2021). Niskotemperaturna eutektička otapala mogu se definirati kao smjesa dviju ili više

netoksičnih, lako dostupnih i jeftinih komponenti koje se mogu međusobno povezati pri određenom molarnom omjeru i tvoriti novu eutektičku fazu s temperaturom taljenja nižom od 100 °C. Smjesa tekućeg sastava nastaje miješanjem donora i akceptora vodikove veze, pri čemu dolazi do stvaranja vodikovih veza između komponenata, što rezultira smanjenjem temperature tališta (slika 2) (Panić i sur., 2020). Ovakva pojava je prvi put uočena u kombinaciji praškastog kolin-klorida i kristalne uree molarnog omjera 1:2, koja je rezultirala nastajanjem tekućine pri sobnoj temperaturi. Niskotemperaturna eutektička otapala dijele mnoge karakteristike s ILs, uključujući visoku toplinsku stabilnost, nisku hlapljivost, niski tlak pare i podesivu polarnost, što ih čini pogodnima za zamjenu postojećih hlapljivih organskih spojeva. Za razliku od ILs koje su uglavnom skupe, često nisu biorazgradive i mogu biti izrazito toksične, niskotemperaturna eutektička otapala su obično jeftina, biorazgradiva i netoksična, uz jednostavniju pripremu (Benworth i sur., 2021).



**Slika 2.** Fazni dijagram dvokomponentnih eutektičkih smjesa (Benworth i sur., 2021)

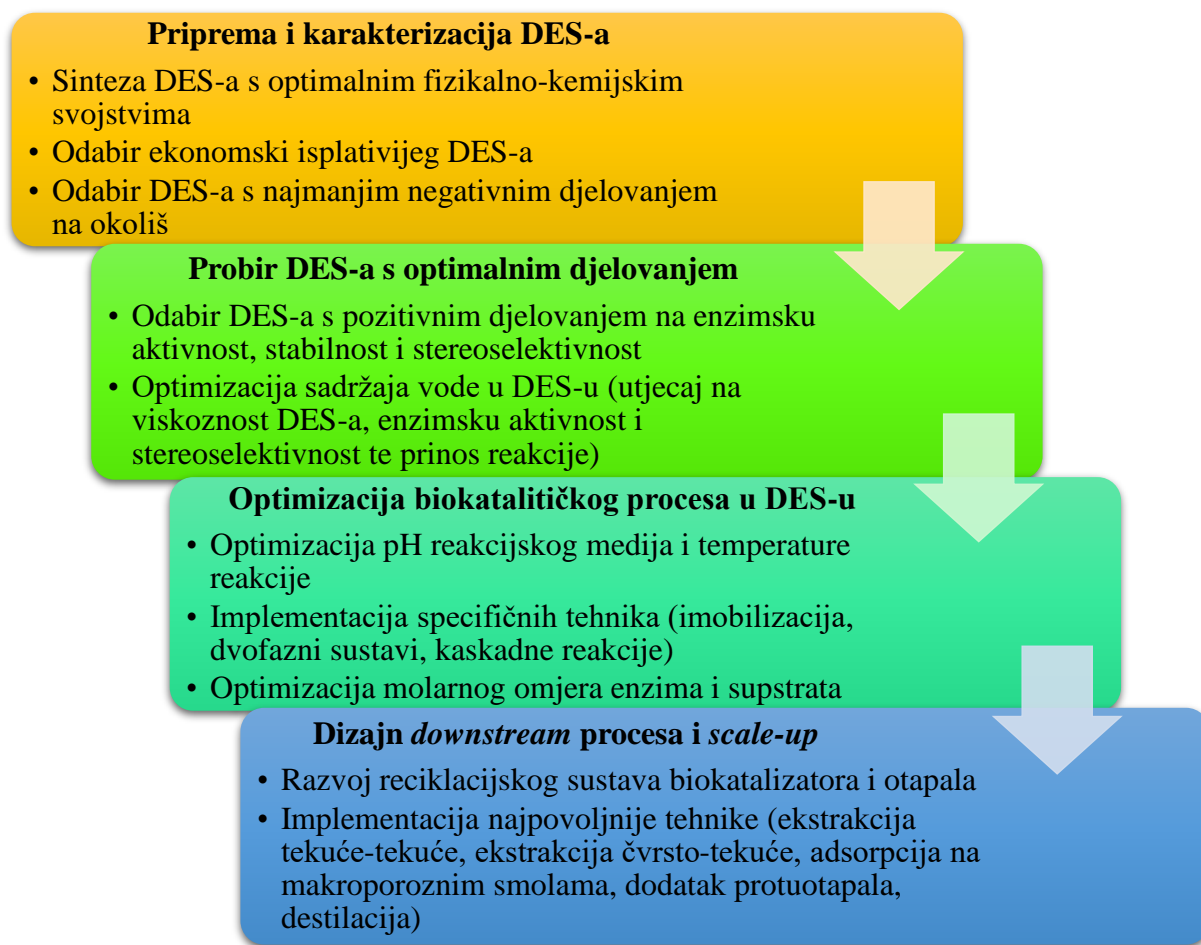
Unatoč tome što se niskotemperaturna eutektička otapala smatraju četvrtom generacijom ILs, ne mogu se u potpunosti smatrati ionskim spojevima jer se mogu sintetizirati i iz neionskih spojeva. S obzirom na jednostavnost pripreme eutektičkih otapala, ona se mogu pripremiti na više načina koji obuhvaćaju pripremu iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži obje komponente te pripremu iz otopine jedne komponente u kojoj je druga komponenta disocirana ili iz čvrste mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do određene vrijednosti temperature. Najčešći postupak pripreme uključuje blago zagrijavanje točno određenih i izvaganih masa komponenata, s ili bez dodatka vode, uz miješanje pri temperaturi od 60 do 80 °C kroz 30 do 240 minuta, sve do trenutka formiranja bistre tekućine. Kemijska priroda

komponentata eutektičkog otapala utječe na molarni omjer komponenata i temperaturu taljenja, dok se vrijeme potrebno za dobivanje tekućeg otapala iz krutih i tekućih komponenata mijenja s obzirom na vrstu komponenata i sadržaj vode unutar otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala mogu se koristiti prirodno prisutni primarni metaboliti kao što su amini, šećeri, alkoholi, šećerni alkoholi, polioli i organske kiseline. Ukoliko su spojevi koji čine eutektička otapala primarni metaboliti, takva otapala nazivaju se prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). S obzirom na njihovu važnu fiziološku i kemijsku ulogu, DES i NADES se najvjerojatnije pojavljuju u živim stanicama u kojima su uključeni u biosintezu, topljivost, skladištenje različitih nestabilnih spojeva i metabolita slabo topljivih u vodi (Panić i sur., 2020).

#### 2.2.2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala u biokatalitičkim procesima

Otapala koja omogućuju visoku topljivost supstrata, visoku enzimsku aktivnost i stabilnost te pozitivne učinke na ravnotežu reakcije smatraju se pogodnim otapalima u biokatalitičkim procesima. Tijekom posljednjih desetljeća, razvijene su mnoge enzimске sintetske reakcije u vodenim i bezvodnim medijima poput organskih otapala, ionskih tekućina i superkritičnih fluida. Međutim, još je uvijek potrebno otkriti nova otapala prikladna za primjenu u različitim vrstama reakcija. U novije vrijeme, niskotemperaturna eutektička otapala ocijenjena su kao ekološki prihvatljiva i bolja alternativa dosadašnjim otapalima primijenjenima u biotransformacijama (Pätzold i sur., 2019). Istovremena upotreba DES-ova i biokatalize može pridonijeti učinkovitoj i održivoj proizvodnji različitih, komercijalno važnih proizvoda. S obzirom da DES može povećati prinos reakcije te aktivnost i stabilnost enzima, poboljšati, odnosno modificirati stereoselektivnost biokatalizatora i doprinijeti cjelokupnoj prirodosti procesa, moguće je sintetizirati DES pogodan za svaki pojedini enzimski reakcijski sustav. U biokatalitičkim procesima, DES može poslužiti kao otapalo ili ko-otapalo, kao ekstrakcijsko otapalo za produkt reakcije i kao otapalo za prethodnu obradu biomase. Prilikom postavljanja biokatalitičkog procesa, važno je uzeti u obzir čistoću i prinos proizvoda, što znači da je potrebno odabrati pogodan tijek reakcije, biokatalizator i reakcijski medij te podesiti reakcijske parametre i uvjete za određeni sustav. Neovisno o vrsti reakcije i korištenom biokatalizatoru, prilikom osmišljavanja biokatalitičkog procesa treba uključiti korake koji su prikazani na slici 3 (Panić i sur., 2020).





**Slika 3.** Uspostavljanje biokatalitičkog procesa u DES-u (Panić i sur., 2020).

Veliki izazov u biokatalitičkim procesima predstavljaju pretvorbe hidrofobnih supstrata, pri čemu je potrebno, uz visoku topljivost supstrata, održati i enzimsku aktivnost ili stabilnost. Biotransformacija supstrata teško topljivih u vodi zahtijeva pogodan reakcijski medij koji osigurava dobar kapacitet otapanja supstrata. DES-ovi mogu biti sintetizirani tako da donor ili akceptor vodikove veze predstavljaju supstrat uklopljen u matricu DES-a ili da svi uključeni supstrati čine DES. S obzirom da ovakav pristup omogućuje upotrebu supstrata uklopljenih u eutektičku matricu, nije potrebno koristiti konvencionalna otapala. Zbog svojih povoljnih karakteristika i dvojake uloge, DES-ovi pronalaze sve veću primjenu u industrijskim biotransformacijama (tablice 2 i 3) (Pätzold i sur., 2019).

**Tablica 2.** Različite vrste reakcija kataliziranih pomoću izoliranih enzima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i utjecaj eutektičkog otapala na provođenje tih reakcija (Panić i sur., 2020)

Niskotemperaturno eutektičko otapalo (DES)	Biokatalizator	Utjecaj DES-a	Vrsta katalizirane reakcije
<b>IZOLIRANI ENZIMI</b>			
Kolin-klorid : glicerol (ChCl : Gly)	Lipaza B iz <i>Candida antarctica</i> (Novozyme 435)	Upotreba DES-a s glicerolom kao HBD koji se koristi kao otapalo i supstrat	Esterifikacija između benzojeve kiseline i glicerola
Kolin-klorid : etilen - glikol (ChCl : EG)	Lipaza iz <i>Burkholderia cepacia</i>	Aktivnost lipaze je znatno ovisna o HBD i sadržaju vode u DES-u	Hidroliza p-nitrofenil-palmitata
Kolin-klorid : glicerol (ChCl : Gly)	Alkohol-dehidrogenaza (ADH) iz <i>Ralstonia</i> sp., <i>Thermoanaerobacter</i> i konjske jetre (prekomjerno eksprimirana u <i>E. coli</i> )	Povećanje enantiomernog viška dodatkom DES-a, smanjenje prinosa reakcije s povećanjem udjela DES-a u vodenom mediju	Redukcija 2-oktanona, benzaldehida ili propiofenona
Kolin-klorid : glicerol (ChCl : Gly)	Imobilizirana dekarboksilaza fenolne kiseline (Pd)	Smanjena topljivost supstrata i smanjena kompatibilnost otapala	Dekarboksilacija p-kumarinske kiseline i spajanje s aril-halidom za sintezu (E)-4-hidroksi-stilbena

**Tablica 3.** Različite vrste reakcija kataliziranih pomoću cijelih stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i utjecaj eutektičkog otapala na provođenje tih reakcija (Panić i sur., 2020)

Niskotemperaturno eutektičko otapalo (DES)	Biokatalizator	Utjecaj DES-a	Vrsta katalizirane reakcije
<b>CIJELE STANICE</b>			
Kolin-klorid : etilen - glikol (ChCl : EG)	Korijen mrkve	Reakcija u vodi nije stereoselektivna, dok u DES-u je, najviša selektivnost postiže se s najmanjim udjelom vode u DES-u	Hidroliza (+/-)-1-feniletacetata
Kolin-klorid : glukoza (ChCl : Glc)	Liofilizirani pekarski kvasac	Povećanje konverzije s povećanjem sadržaja vode u DES-u, veći enantiomerni višak s nižim sadržajem vode	Redukcija 1-(3-metilfenil)-etanona (MPA)
Kolin-klorid : urea (ChCl : U)	Cijele stanice <i>Arthrobacter simplex</i>	Veće početne brzine reakcija od onih provedenih u prisutnosti pojedinačnih komponenti DES-a, povećana topljivost supstrata u DES-u	Dehidrogenacija kortizon acetata
Kolin-klorid : glicerol (ChCl : Gly)	<i>Acetobacter</i> sp. CCTCC M209061	Povećanje topljivosti supstrata dodatkom DES-a	Asimetrična oksidacija 1-(4-metoksifenil)-etanola

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Biokatalizatori

- Bakterijski soj *L. fermentum* MC1 iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK)
- Bakterijski soj *L. brevis* MB1 iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK)

#### 3.1.2. Kemikalije

- Acetofenon, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Alanin, Thermo Fisher GmbH, Kandel, Njemačka
- Betain, Thermo Fisher GmbH, Kandel, Njemačka
- Destilirana voda
- Dietil-eter, Lach-Ner, Češka
- Diklormetan, Lach-Ner, Češka
- Dimetilsulfoksid, CARLO ERBA Reagents GmbH, Njemačka
- Ektoin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etil-acetat, Riedel-de Haën, Njemačka
- Fruktaza, Lach-Ner, Češka
- Glicerol, Lach-Ner, Češka
- Glicin, Fischer Scientific, UK
- Glukoza, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Glutamin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- 4-hidroxiacetofenon, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Halogenirani acetofenon, Apollo Scientific, Manchester, UK
- Halogenirani alkohol, Manchester Organics Ltd., Manchester, UK
- Kolin-klorid, Thermo Fisher Scientific, Fair-Lawn, New Jersey, SAD
- Ksilitol, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Jabučna kiselina, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Manitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- 3-metilacetofenon, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Mio-inozitol, Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD
- Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), Alfa Aesar, Ward Hill, USA
- Natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Nile Red, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Prolin, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Racemična smjesa (R)- i (S)-1-feniletanola, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Racemična smjesa (R)- i (S)-1-(3-metilfenil)etanola, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Saharoza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sorbitol, Fischer Scientific, Fair-Lawn, New Jersey, SAD
- Sorboza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- S-1-feniletanol, Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka
- Taurin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Trimetilamin-N-oksid (TMAO), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Trehaloza, VIO Chemicals, Indija
- Tris baza, Kemika, Zagreb, Hrvatska/ Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD
- Urea, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Valin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

### 3.1.3. Otopine

- Tris-HCl pufer koncentracije  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH=7,5), pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, sastava: 1,514 g Tris baze, 865  $\mu\text{L}$  36 % -tne (v/v) HCl ( $11,65 \text{ mol L}^{-1}$ ), 250 mL destilirane vode.
- Matična otopina NADH u Tris-HCl puferu ( $C_{\text{NADH}} = 50 \text{ mmol L}^{-1}$ )
- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) bujon, pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, sastava ( $\text{g L}^{-1}$  destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  0,05; natrijev-acetat 5,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 15 minuta.

Sve korištene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

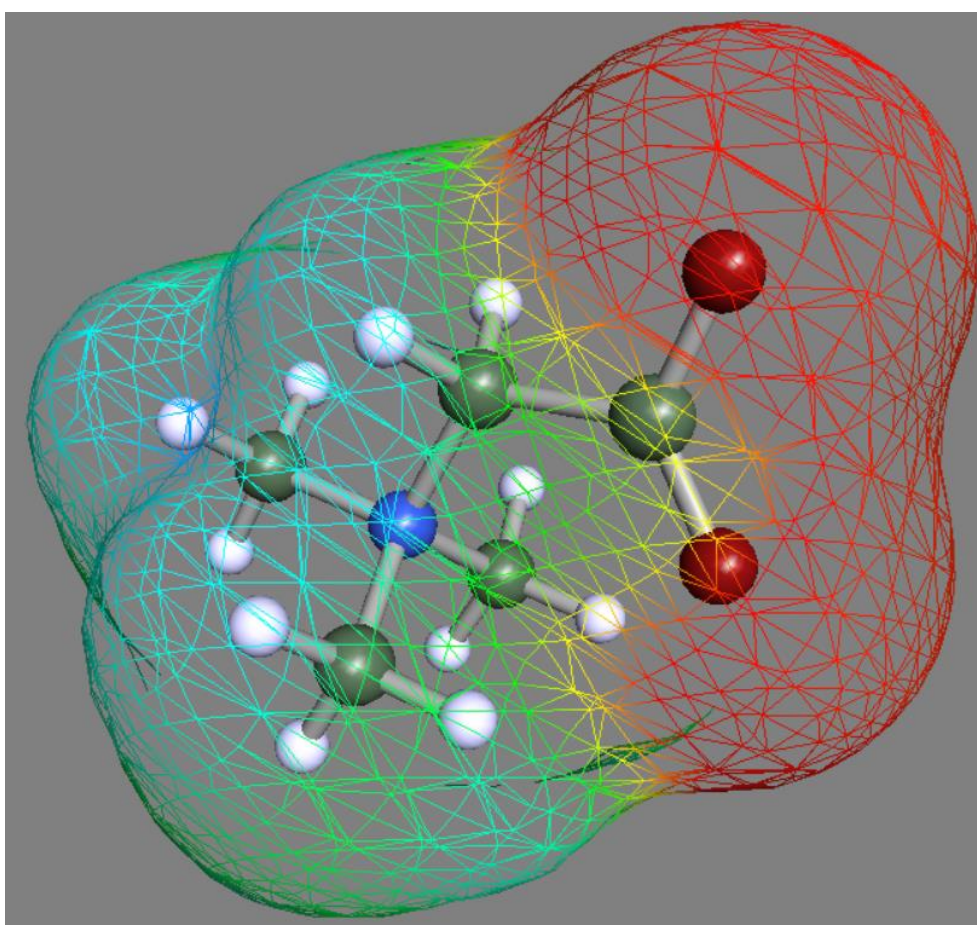
#### 3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Analitička vaga, AROMA ZONE, Zagreb, Hrvatska
- Automatski autoklav, A-63C, Kambič, Slovenija
- Denzitometar DE40, Mettler Toledo, Kolumbija, SAD
- Digitalna magnetna miješalica, Nahita/Blue 692/1, Auxilab, Španjolska
- Homogenizator-IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, ST. Louis, SAD
- Homogenizator s regulacijom temperature, EppendorfThermoMixer C, Njemačka
- Laboratorijska centrifuga ECEN-205, MRC Ltd., Ve
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure, tikvice s okruglim dnom)
- Laboratorijski pribor (plastične kivete za centrifugu od 15 i 50 mL, stalak za epruvete i kivete, Eppendorf tubice od 1,5 i 2 mL, mikropipete (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1 mL, 5 mL), predmetnica, pokrovnica, špatule, pinceta, boca štrcaljka)
- Laminar LFV 12, Iskra PIO, Slovenija
- Laminar SmartFAST, CARLO ERBA Reagents GmbH, Njemačka
- Multimetar pH/ion metar, S220, Mettler Toledo, Kolumbija, SAD
- Plinski kromatograf s masenim spektrometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan
- Računalni program BOVIA COSMOtherm 2020, Verzija 20.0.0 (Revision 5273M), Dessault Systems
- Računalni program TmoleX, Verzija 4.5, COSMOlogic GmbH & Co, Njemačka
- Rotacijski viskozimetar, ViscoQC 300, Anton Paar, Graz, Austrija
- Stolna centrifuga s hlađenjem, Sanyo Falcon 6/300, MSE Ltd., UK
- Transmisijski svjetlosni mikroskop, Axiostar, Zeiss, Njemačka
- Tresilica ES-20/60, BioSan SIA, Riga, Latvija
- Ultrazvučna kupelj GRANT XUB5, Grant Instruments, UK
- UV-Vis spektrofotometar GENESYS™ 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Vodena kupelj, Camlab Limited, SUB 14, Cambridge, UK

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Računalno predviđanje eutektičke točke dvokomponentnih osmolita

Optimalna geometrija, gustoća naboja i minimalna energija pojedinačnih molekula izračunate su pomoću računalnog programskog paketa TURBOMOLE (TmoleX). 3D struktura svih molekula preuzeta je iz *PubChem* baze podataka (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) i ručno unesena u SDF formatu (engl. *Spatial Data File*, SDF). Optimizacija je provedena primjenom DFT teorije (engl. *Density Functional Theory*) i osnovnog skupa funkcija def-TZVP (engl. *default Triple-Zeta Valence Polarized*). Nakon geometrijskog i energetske optimiranja (slika 4), molekule su pohranjene u COSMO datotekama.



**Slika 4.** Geometrijsko i energetsko optimiranje molekule betaina  
(Ukupna energija =  $-402,5367431700 \text{ kJ mol}^{-1}$ )

Za računalno predviđanje eutektičke točke dvokomponentnih osmolita, osmišljene su različite kombinacije osmolita odabirom molekula donora (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) i akceptora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) (tablica 4).

**Tablica 4.** Odabrane kombinacije dvokomponentnih osmolita za računalno ispitivanje eutektičke točke u COSMOthermX programu

HBA	HBD	HBA	HBD
<b>Alanin (Ala)</b>	Glukoza (Glc)	<b>Taurin (Tau)</b>	Glukoza (Glc)
	Glicerol (Gly)		Glicerol (Gly)
	Glutamin (Glu)		Glutamin (Glu)
	Prolin (Pro)		Manoza (Man)
<b>Betain (B)</b>	Alanin (Ala)		Prolin (Pro)
	Fruktoza (Fru)		Saharoza (Suc)
	Glukoza (Glc)		Sorbitol (Sol)
	Glutamin (Glu)		Sorboza (Sor)
	Glicerol (Gly)	<b>Urea (U)</b>	Alanin (Ala)
	Inozitol (Inol)		Glicerol (Gly)
	Manitol (Mol)		Glutamin (Glu)
	Prolin (Pro)		Sorbitol (Sol)
	Saharoza (Suc)		Prolin (Pro)
	Taurin (Tau)		Saharoza (Suc)
Urea (U)	Taurin (Tau)		

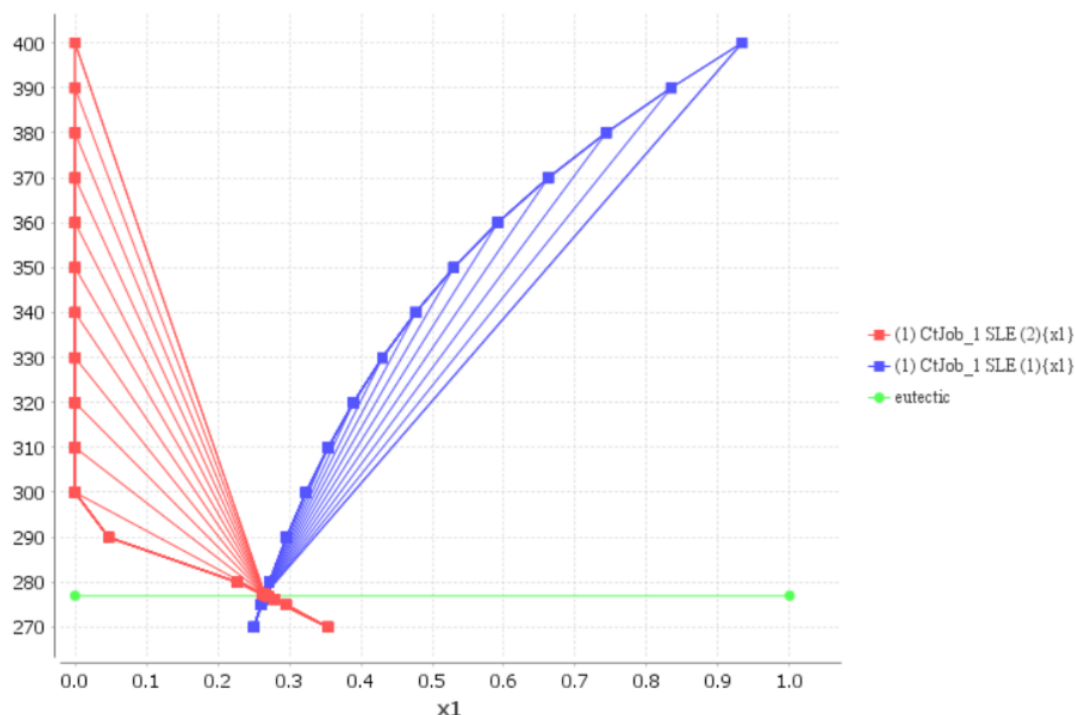
U COSMOthermX unesene su COSMO datoteke za odabrane donore i akceptore vodikove veze. Termodinamički podaci za standardnu entalpiju taljenja ( $\Delta H_{\text{fus}}$  [kJ mol<sup>-1</sup>]) i temperaturu taljenja ( $T_{\text{melt}}$  [K]) preuzeti su iz *NIST Chemistry WebBook* baze podataka (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>) te su ručno upisani za svaku komponentu. Eutektička točka, točka u kojoj se susreću krivulje topljivosti dviju komponenata u odabranom dvokomponentnom sustavu, određuje se pomoću ravnoteže kapljevina-krutina (engl. *Solid-Liquid Equilibrium*, SLE). Izračun SLE u COSMOthermX-u pretpostavlja da postoji jednostavna eutektička točka u faznom dijagramu dvokomponentnih sustava. Za svaki dvokomponentni sustav određen je odgovarajući temperaturni rang na temelju termodinamičkih podataka pojedinih komponenata. Kao rezultat proračuna u COSMOthermX programu, dobiveni su fazni dijagrami prema kojima je predviđena eutektička točka dvokomponentnih osmolita.



### 3.2.2. Priprava i karakterizacija novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

#### 3.2.2.1. Eksperimentalna provjera računalnog predviđanja eutektičke točke dvokomponentnih osmolita

Na temelju računalno predviđenog molarnog udjela prve komponente (slika 5), odnosno akceptora vodikove veze ( $X_{\text{eut}}$ ), određen je molarni udio druge komponente, donora vodikove veze, čime je određen molarni omjer dviju komponenata.



**Slika 5.** Primjer faznog dijagrama dvokomponentnih osmolita U:Gly ( $X_{\text{eut}} = 0,26527$  i  $T_{\text{eut}} = 277,01$  K)

Dvokomponentni sustavi osmolita, za koje je računalno predviđen eutektički sastav, pripremljeni su prema novodobivenom molarnom omjeru komponenti. Prethodno određene mase komponenata izvagane su i dodane u staklene bočice koje su potom stavljene u vodenu kupelj. Reakcijska smjesa je istovremeno miješana na magnetnoj miješalici, pri čemu je temperatura održavana na 60 °C tijekom određenog vremenskog perioda, sve dok sadržaj u bočici nije prešao u homogenu, proziranu i bezbojnu tekućinu. Dobivena niskotemperaturna eutektička otapala čuvana su u staklenim bočicama na dnevnom svjetlu i sobnoj temperaturi.

### *3.2.2.2. Empirijska metoda priprave novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita*

Na temelju literaturnih primjera, postavljene su različite kombinacije osmolita kao potencijalnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita. Kao ishodne sirovine, korišteni su osmoliti TMAO, betain, urea, glicerol, ksilitol, sorbitol, saharoza, kolin-klorid i taurin. Mase pojedinih komponenata proračunate su prema postavljenom molarnom omjeru 1:1 koji je postupno mijenjan, uz dodatak određene količine vode i pojedinih komponenata, sve do formiranja homogene, prozirne i bezbojne tekućine. Ovako pripremljena otapala čuvana su na isti način kako je opisano u poglavlju 3.2.2.1.

### *3.2.2.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita*

Među niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pripremljenima u poglavljima 3.2.2.1. i 3.2.2.2., odabrano je šest otapala za fizikalno-kemijsku karakterizaciju. Odabrana fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih otapala određena su mjerenjem pH vrijednosti, gustoće, viskoznosti i polarnosti. pH vrijednost niskotemperaturnih eutektičkih otapala određena je pomoću pH/ion metra pri sobnoj temperaturi. Za određivanje gustoće niskotemperaturnih eutektičkih otapala korišten je denzitometar. Tijekom mjerenja, temperatura ispitivanog uzorka mora biti jednaka temperaturi postavljenoj na uređaju te se održava pomoću Peltier-ovog termostata povezanog s U-cijevi. U uređaj je ručno injektirano 2 mL niskotemperaturnog eutektičkog otapala, čime je u potpunosti ispunjen volumen staklene U-cijevi, a dobivena vrijednost gustoće očitana je s uređaja.

Za određivanje viskoznosti odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala, korišten je rotacijski viskozimetar (slika 6). Posuda je do oznake napunjena uzorkom, odnosno određenim niskotemperaturnim eutektičkim otapalom, nakon čega je, zajedno s mjernom glavom, pričvršćena za rotacijski viskozimetar. Na uređaju je postavljena odgovarajuća brzina vrtnje koja proizvodi zakretni moment u intervalu između 10 i 90 %, kako ne bi došlo do stvaranja turbulentnog strujanja uslijed djelovanja centrifugalnih sila i sila inercije te pucanja mjerne glave. Po završetku mjerenja, na zaslonu uređaja očitane su vrijednosti postignutog zakretnog momenta i dinamičke viskoznosti ( $\eta$ ). Mjerenje je provedeno na isti način za sve uzorke, uz odabir odgovarajuće brzine vrtnje za svako pojedino otapalo.



**Slika 6.** Rotacijski viskozimetar ViscoQC 300

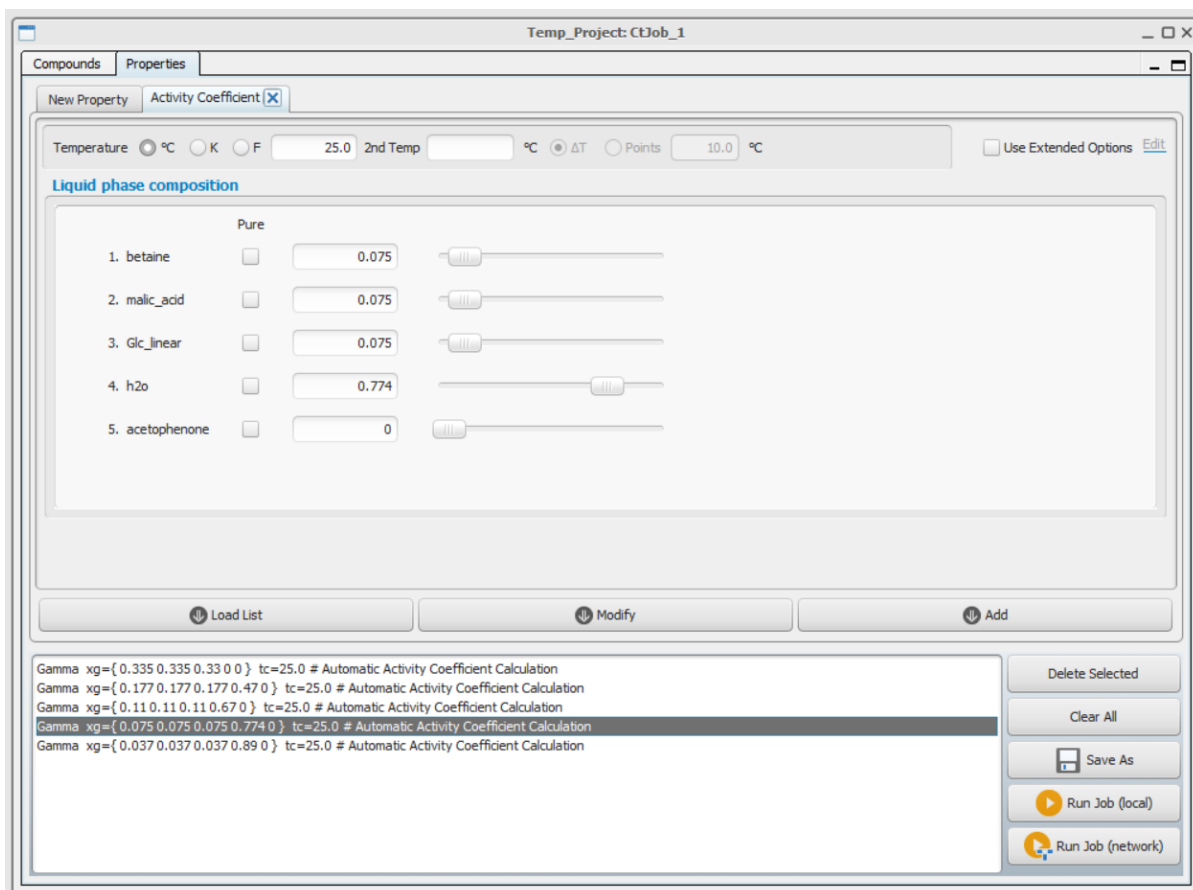
Polarnost odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala određena je pomoću Nile crvene solvatokromne probe prema protokolu opisanom u Jeong i sur. (2017) i Ogihara i sur. (2004). Prethodno je pripremljena crvena stock otopina koncentracije  $1 \text{ g L}^{-1}$  u etanolu i pohranjena na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prije upotrebe, pripremljena stock otopina razrijeđena je 100 puta u etanolu. Uzorci za spektrofotometar pripremljeni su u Eppendorf tubicama od 2 mL tako da je dodano 1,5 mL ispitivanog eutektičkog otapala i 0,5 mL razrijeđene crvene stock otopine. U plastične kivete volumena 1 mL dodano je 800  $\mu\text{L}$  uzorka, a u slijepu probu dodana je destilirana voda. Apsorpcijski spektri odabranih otapala snimljeni su pomoću GENESYS 10S UV-Vis spektrofotometra, pri valnim duljinama u intervalu od 340 do 800 nm. Iz dobivenih apsorpcijskih spektara očitavaju se maksimalne valne duljine apsorpcije ( $\lambda_{\text{max}}$ ). Nakon što su očitane vrijednosti  $\lambda_{\text{max}}$ , iste su korištene za izračunavanje molarne prijelazne energije ( $E_{\text{NR}}$ ), koja je određena prema izrazu [1]:

$$E_{NR} (kcal mol^{-1}) = \frac{hcNA}{\lambda_{max}} = \frac{28591}{\lambda_{max}} \quad [1]$$

pri čemu su  $h$  – Planck-ova konstanta ( $6,62607004 \times 10^{-34}$  J/s),  $c$  – brzina svjetlosti (300 000 km/s),  $NA$  – Avogadro-ova konstanta ( $6,02214076 \times 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>),  $\lambda_{max}$  - maksimalna valna duljina apsorpcije (nm).

### 3.2.3. Računalno predviđanje topljivosti različito supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Geometrijsko i energetsko optimiranje molekula i kreiranje COSMO datoteka provedeno je na isti način kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Za računalno predviđanje topljivosti supstrata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, odabrana su četiri različito supstituirana acetofenona - acetofenon, 3-metilacetofenon, 4-hidroksiacetofenon i halogenirani acetofenon. Kako bi se odredila njihova  $\ln(\gamma_{\infty})$  vrijednost, u COSMO $thermX$  unesene su COSMO datoteke za donore i akceptore vodikove veze, vodu i različito supstituirane acetofenone uz definiranje množinskih udjela [mol mol<sup>-1</sup>] (slika 7). Topljivost spoja u određenom otapalu obrnuto je proporcionalna njegovom koeficijentu aktivnosti u sustavu. Logaritam koeficijenta aktivnosti pri beskonačnom razrjeđenju ( $\ln(\gamma_{\infty})$ ) daje informaciju o topljivosti spoja u ispitivanom otapalu.  $\ln(\gamma_{\infty})$  vrijednost manja od 1 znači da spoj posjeduje dobru topljivost, dok  $\ln(\gamma_{\infty})$  vrijednost veća od 1 znači da je spoj slabo topljiv u promatranom otapalu (Wojeicchowski i sur., 2020; Klamt i sur., 1998). Topljivost navedenih supstrata ispitana je u 26 eutektičkih otapala s betainom, kolin-kloridom, ureom i TMAO-om kao akceptorima vodikove veze i različitim organskim kiselinama, poliolima, aminokiselinama i šećerima kao donorima vodikove veze, uz različiti maseni udio vode (0, 10, 30 i 50 %).



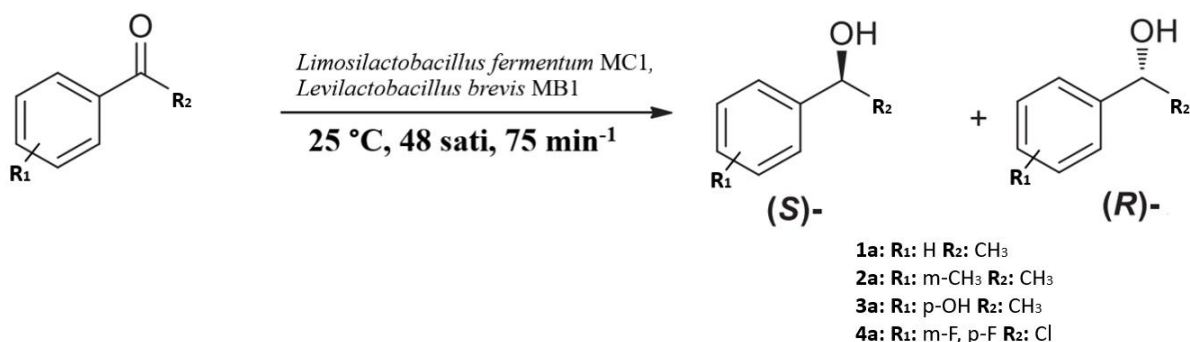
**Slika 7.** Sučelje COSMOthermX programa za određivanje koeficijenta aktivnosti acetofenona pri beskonačnom razrjeđenju ( $\ln(\gamma_\infty)$ ) - sastav smjese za određivanje  $\ln(\gamma_\infty)$  acetofenona u eutektičkom otapalu betain : jabučna kiselina : glukoza (1:1:1) s 30 % vode (w/w) pri 25°C

### 3.2.4. Mikrobna redukcija različito supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

#### 3.2.4.1. Probir supstrata i biokatalizatora za enantioselektivnu redukciju acetofenona u eutektičkim otapalima

Enantioselektivna redukcija acetofenona, 3-metilacetofenona, 4-hidroksiacetofenona i halogeniranog acetofenona provedena je pomoću dva soja bakterija mliječne kiseline, *Limosilactobacillus fermentum* MC1 i *Levilactobacillus brevis* MB1, koji su uzgojeni u MRS bujonu pri 37 °C u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura (slika 8). Neposredno prije provođenja reakcija redukcije supstituiranih acetofenona pomoću *L. fermentum* MC1 ( $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>) i *L. brevis* MB1 ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>), pripremljene su koncentrirane otopine supstituiranih acetofenona (400 mg mL<sup>-1</sup>) u dimetilsulfoksidu, koje su potom filtrirane. U reakcijsku smjesu dodano je 9,9 mL MRS tekuće hranjive podloge (pH = 6,12), 100 µL resuspendirane stanične kulture i 50 µL koncentrirane otopine supstrata (400 mg

mL<sup>-1</sup>). Priprema koncentriranih otopina supstrata i reakcijskih smjesa provedena je u laminaru u sterilnim uvjetima kako ne bi došlo do kontaminacije.



**Slika 8.** Biosinteza kiralnih sekundarnih alkohola iz različito supstituiranih acetofenona pomoću *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB1

1a – acetofenon, 2a – 3-metilacetofenon, 3a – 4-hidroksiacetofenon, 4a – halogenirani acetofenon

Biokatalitička reakcija se provodila na tresilici pri 25 °C i 75 min<sup>-1</sup> tijekom 48 sati. Nakon dva dana, reakcija je zaustavljena centrifugiranjem reakcijske smjese tijekom 5 minuta pri 3 000 min<sup>-1</sup>. Po završetku centrifugiranja, dobiveni supernatant je izdvojen, nakon čega je provedena trokratna ekstrakcija. U izdvojeni supernatant dodano je 10 mL dietil-etera te je dobivena smjesa homogenizirana tijekom 1,5 minute. Nakon homogeniziranja smjese, gornja bistra faza izdvojena je i stavljena u vodenu kupelj na uparavanje pri 60 °C. Ovakav postupak ponovljen je tri puta za svaku paralelu. Upareni uzorci otopljeni su u 1 mL etil-acetata, nakon čega je dodan bezvodni natrijev sulfat kako bi se uklonila voda iz otopine. Iz gornjeg tekućeg sloja pripremljenog uzorka uzeto je 100 µL za analizu na plinskom kromatografu s masenim spektrometrom Shimadzu QP2010PLUS. Provođenje biokatalitičke redukcije i analiza svih uzoraka napravljeni su u tri paralele. Uspješnost redukcije supstrata u hranjivoj podlozi određuje se izračunom stupnja konverzije ( $\eta$ ) i enantiomernog viška (*ee*) (engl. *enantiomeric excess*, *ee*) prema jednadžbama [2] i [3]:

**Stupanj konverzije,  $\eta$  (%)** izračunava se prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{pA_{(R)\text{-kiralnog alkohola}} + pA_{(S)\text{-kiralnog alkohola}}}{pA_{\text{supstrata}}} * 100 \quad [2]$$

pri čemu su  $pA_{(R)\text{-kiralnog alkohola}}$  – površina ispod pika (*R*)-kiralnog alkohola,  $pA_{(S)\text{-kiralnog alkohola}}$  – površina ispod pika (*S*)-kiralnog alkohola,  $pA_{\text{supstrata}}$  - površina

ispod pika supstrata.

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

$$ee = \frac{(S_{OH} - R_{OH})}{(S_{OH} + R_{OH})} * 100 \quad [3]$$

pri čemu su  $R_{OH}$  – površina ispod pika ( $R$ )-halogeniranog alkohola i  $S_{OH}$  – površina ispod pika ( $S$ )-halogeniranog alkohola.

#### 3.2.4.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije različito supstituiranih acetofenona

U svrhu provođenja kvalitativne i kvantitativne analize redukcije supstituiranih acetofenona i nastajanja produkata ( $R,S$ )-kiralnih alkohola, korišten je plinski kromatograf s masenim spektrometrom (GC-MS). Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu supstituiranih acetofenona i ( $R,S$ )-kiralnih alkohola, primijenjeni su navedeni kromatografski uvjeti:

- Kromatografska kolona: kapilarna kiralna kolona  $\beta$  DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m)
- Temperatura kolone:  $T_1 = 90$  °C (1 min),  $T_2 = 155$  °C ( $\Delta = 5$  °C  $\text{min}^{-1}$ ),  $T_3 = 220$  °C ( $\Delta = 0,5$  °C  $\text{min}^{-1}$ )
- Temperatura injektora:  $T = 220$  °C
- Pokretna faza: helij (He)
- Protok: 6,7 mL  $\text{min}^{-1}$
- Protok u koloni: 0,71 mL  $\text{min}^{-1}$
- Linearna brzina strujanja: 31,2 cm  $\text{sec}^{-1}$
- Tlak: 42,3 kPa
- Protok za pročišćavanje: 6,0 mL  $\text{min}^{-1}$
- Vrijeme trajanja analize: 133,34 min
- Detektor: maseni spektrometar (MS)

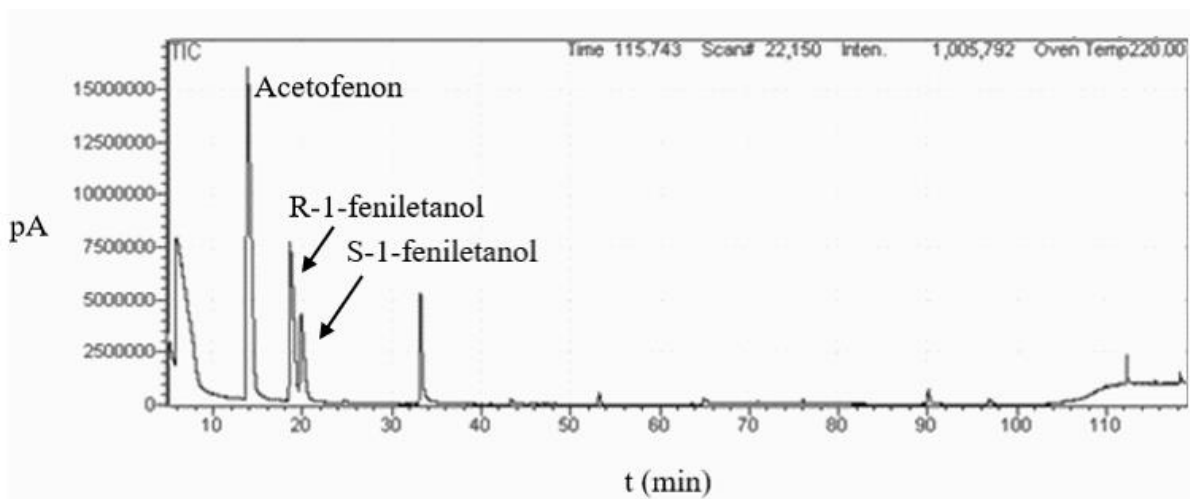
Za određivanje vremena izlaska razdvojenih pikova reakcijske smjese s kiralne kromatografske kolone pripremljene su i navedenom kolonom propuštene standardne otopine supstrata i produkata u etil-acetatu koncentracije 5 mg mL<sup>-1</sup>. Identifikacija acetofenona, 3-metilacetofenona, 4-hidroksiacetofenona, halogeniranog acetofenona te (*R*)-kiralnog alkohola i (*S*)-kiralnog alkohola provedena je na temelju usporedbe dobivenih retencijskih vremena (*R*<sub>t</sub>) s retencijskim vremenima pikova standardnih otopina, a dodatna potvrda pojedinih spojeva provedena je usporedbom masenih spektara iz baze podataka. Retencijska vremena (*R*<sub>t</sub>) navedenih spojeva prikazana su u tablici 5.

**Tablica 5.** Retencijska vremena supstituiranih acetofenona i kiralnih alkohola

<b>Supstituirani acetofenon</b>	<b>Retencijsko vrijeme (<i>R</i><sub>t</sub>) [min]</b>
Acetofenon	13,855
3-metilacetofenon	19,85
4-hidroksiacetofenon	96,855
Halogenirani acetofenon	74,875
<b>Kiralni alkohol</b>	<b>Retencijsko vrijeme (<i>R</i><sub>t</sub>) [min]</b>
R-1-feniletanol	18,505
S-1-feniletanol	19,68
1-(3-metilfenil)etanol (1. pik)	22,425
1-(3-metilfenil)etanol (2. pik)	24,175
Halogenirani alkohol	85,21

Iz dobivenih plinskih kromatograma nakon analize reakcijske smjese za enantioselektivnu redukciju supstituiranih acetofenona pomoću bakterija mliječne kiseline, iščitane su vrijednosti površine ispod pikova supstrata i produkata, koje su korištene za izračunavanje stupnja konverzije ( $\eta$ ) i enantiomernog viška (*ee*) (slika 9).





**Slika 9.** Primjer plinskog kromatograma nakon analize reakcijske smjese enantioselektivne redukcije acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u hranjivoj podlozi. Vrijednosti retencijskih vremena acetofenona ( $R_t = 13,855$  min), *R*-1-feniletanola ( $R_t = 18,505$  min) i *S*-1-feniletanola ( $R_t = 19,68$  min)

### 3.2.4.3. Probir DES-ova za provođenje enantioselektivne redukcije acetofenona u eutektičkim otapalima

Na temelju provedene enantioselektivne redukcije supstituiranih acetofenona pomoću *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB1 u hranjivoj podlozi, izračunati su stupnjevi konverzije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak ( $ee$ ) za sve supstrate. *L. brevis* MB1 odabran je kao pogodniji biokatalizator, dok je acetofenon odabran kao najpogodniji supstrat pri odabranim uvjetima. Za probir niskotemperaturnih eutektičkih otapala i njihovu primjenu u enantioselektivnoj redukciji acetofenona pomoću *L. brevis* MB1, odabrana su tri eutektička otapala s različitim udjelima vode, uz pomoć računalnog predviđanja topljivosti supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (tablica 6). U reakcijsku smjesu dodano je 9,8 mL niskotemperaturnog eutektičkog otapala, 200  $\mu$ L resuspendirane bakterijske kulture *L. brevis* MB1 koncentracije  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  i 50  $\mu$ L koncentrirane otopine acetofenona ( $400$  mg  $\text{mL}^{-1}$ ). Postavljanje biokatalitičke reakcije, izdvajanje (*R,S*)-kiralnih alkohola i analiza reakcijskih smjesa provedeni su prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.1., uz primjenu prilagođene kromatografske metode sa skraćenim vremenom provođenja analize od 65,50 minuta. Reakcijske smjese i analiza svih uzoraka napravljeni su u dvije paralele.

**Tablica 6.** Sastav odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ispitivanje u reakciji redukcije acetofenona pomoću *L. brevis* MB1

Niskotemperaturno eutektičko otapalo (DES)*	Molarni omjer komponenata	Udio vode (%)
B : Suc	4 : 1	50
	4 : 1	80
B : MA : Glc	1 : 1 : 1	30
	1 : 1 : 1	50
	1 : 1 : 1	80
ChCl : Xylol	2 : 1	30
	2 : 1	50
	2 : 1	80

\*KRATICE: betain (B), saharoza (Suc), jabučna kiselina (MA), glukoza (Glc), kolin-klorid (ChCl), ksilitol (Xylol)

#### 3.2.4.4. Optimizacija reakcije redukcije acetofenona provedene pomoću *L. brevis* MB1 u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Analizom plinskih kromatograma enantioselektivne redukcije acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, dobiveni su stupnjevi konverzije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak ( $ee$ ), na temelju kojih je odabrano niskotemperaturno eutektičko otapalo B:MA:Glc s 30 % vode (pH = 2,66) za optimizaciju reakcije redukcije acetofenona pomoću *L. brevis* MB1. Optimizacija reakcije redukcije acetofenona provedena je na dva načina koja uključuju mijenjanje udjela niskotemperaturnog eutektičkog otapala B:MA:Glc s 30 % vode u hranjivoj podlozi i primjenu ultrazvuka. Reakcijske smjese s različitim udjelom B:MA:Glc s 30 % vode u hranjivoj podlozi pripremljene su dodatkom 0, 5, 10, 20, 30, 50, 80 % eutektičkog otapala, 100  $\mu$ L resuspendirane bakterijske kulture *L. brevis* MB1 koncentracije  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> i 25  $\mu$ L koncentrirane otopine acetofenona (400 mg mL<sup>-1</sup>) u dimetilsulfoksidu.

Reakcijske smjese za provođenje reakcije redukcije acetofenona u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu B:MA:Glc s 30 % vode, uz primjenu ultrazvučne frekvencije 38 kHz, pripremljene su dodatkom 4,9 mL B:MA:Glc s 30 % vode i 100  $\mu$ L resuspendirane bakterijske kulture *L. brevis* MB1 koncentracije  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, nakon čega je tako pripremljena smjesa

tretirana ultrazvukom u vremenskom intervalu od 15, 30 i 60 minuta. Kako ne bi došlo do razaranja strukture acetofenona, u reakcijske smjese dodano je 25  $\mu\text{L}$  koncentrirane otopine acetofenona ( $400 \text{ mg mL}^{-1}$ ) nakon što je provedena liza stanica pomoću ultrazvuka. Optimizacija redukcije acetofenona, izdvajanje (*R,S*)-1-feniletanola i analiza reakcijskih smjesa provedeni su prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.3. Reakcijske smjese i analiza svih uzoraka napravljeni su u dvije paralele.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom posljednja dva stoljeća, znanstvenici su razvili sintetske metode za pripravu različitih prirodnih proizvoda i njihovih derivata, kao i posve novih molekula, stoga je organska sinteza postala je vrlo primijenjena metoda koja omogućuje proizvodnju kemijskih spojeva, neophodnih za svakodnevne društvene potrebe. Unatoč tome, ekonomski, ekološki i društveni standardi još uvijek zahtijevaju da se organska sinteza učini što učinkovitijom, fleksibilnijom i isplativijom. Kemijski proizvodi trebali bi biti lako dostupni, a njihova proizvodnja trebala bi omogućiti očuvanje trenutnog stanja okoliša ili ga čak poboljšati, djelujući u skladu s dvanaest principa *zelene kemije* (Winkler i sur., 2021). U svrhu doprinosa zaštiti okoliša, *zelena* tehnologija intenzivno traži nova otapala kako bi se zamijenila toksična i izrazito hlapljiva organska otapala. Stoga su se, u posljednja dva desetljeća, pojavila niskotemperaturna eutektička otapala kao alternativa dosad proučavanim ionskim tekućinama. Ovakva eutektička otapala predstavljaju smjesu ionskih ili neionskih donora i akceptora vodikove veze, koja je karakterizirana talištem znatnije nižim od tališta bilo koje pojedinačne komponente. Primjenom prirodnih spojeva, točnije primarnih metabolita, za dobivanje novih eutektičkih otapala, moguće je sintetizirati prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES) (Paiva i sur., 2014).

U današnje vrijeme se, osim razvoja novih prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala, uvelike primjenjuje biokataliza koja, koristeći enzime ili cijele stanice kao biokatalizatore, predstavlja pogodnu metodu u organskoj sintezi, a očituje se kroz visoku aktivnost biokatalizatora i njegovu stereo-, regio- i enantioselektivnost. S obzirom da industrijski zahtjevi postaju sve složeniji, potražnja za novim biotransformacijskim reakcijama raste, naglašavajući pri tome potrebu za brzinom u njihovom razvoju (Fryszkowska i Devine, 2020). Kao novi biotehnološki pristup, istovremena upotreba niskotemperaturnih eutektičkih otapala i biokatalize pridonosi učinkovitoj i održivoj proizvodnji kiralnih aromatskih sekundarnih alkohola. Ovakva *zelena* tehnologija osigurava kataliziranje složenijih transformacija pri blagim i ekonomičnim uvjetima, dok eutektička otapala služe kao potpora za moduliranje, odnosno usmjeravanje tijeka reakcije, u svrhu dobivanja željenog proizvoda (Panić i sur., 2020).

Kiralni aromatski sekundarni alkoholi predstavljaju se kao vodeće molekule u organskoj kemiji i farmaceutskoj industriji zbog svoje stabilne strukture te spadaju u skupinu najvažnijih kiralnih građevnih blokova za mnoge farmaceutske lijekove poput *S*-fluoksetina, *R*-tomoksetina i *L*-klorprenalina (Yılmaz i sur., 2017). Biokatalitička reakcija je važan dio sintetičke organske kemije za sintezu lijekova ili biološki aktivnih molekula, s obzirom da omogućuje sintezu enantiomerno čistih kiralnih molekula. Mnogi lijekovi sastoje se od enantiomera koji mogu imati različitu biološku aktivnost zbog prisutnosti kiralnog centra, iako su njihova fizikalna i kemijska svojstva slična. Stoga, kiralnost ima ključnu ulogu u asimetričnoj organskoj sintezi, budući da utječe na interakciju lijekova u ljudskom organizmu (Baydaş i sur., 2020).

U ovom radu proveden je dizajn te priprema novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita (engl. *osmolyte-based Deep Eutectic Solvents*, osmoDES), uz pomoć COSMOthermX programa te konvencionalnim empirijskim postupkom, nakon čega je provedena fizikalno-kemijska karakterizacija odabranih osmoDES-ova. U svrhu primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala za provođenje enantioselektivne redukcije supstituiranih acetofenona u enantiomerno čiste kiralne sekundarne alkohole, korišten je COSMOthermX program za procjenu topljivosti supstituiranih acetofenona u različitim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Kao biokatalizatori, korištena su dva soja bakterija mliječne kiseline, *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB1, zbog posjedovanja bioredukcijskih sposobnosti, omogućenih aktivnošću enzima dehidrogenaza, ali i sposobnosti proizvodnje enantiomerno čistih spojeva u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima kao potencijalnim reakcijskim medijima (Yılmaz i sur., 2017).

#### **4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NOVIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA**

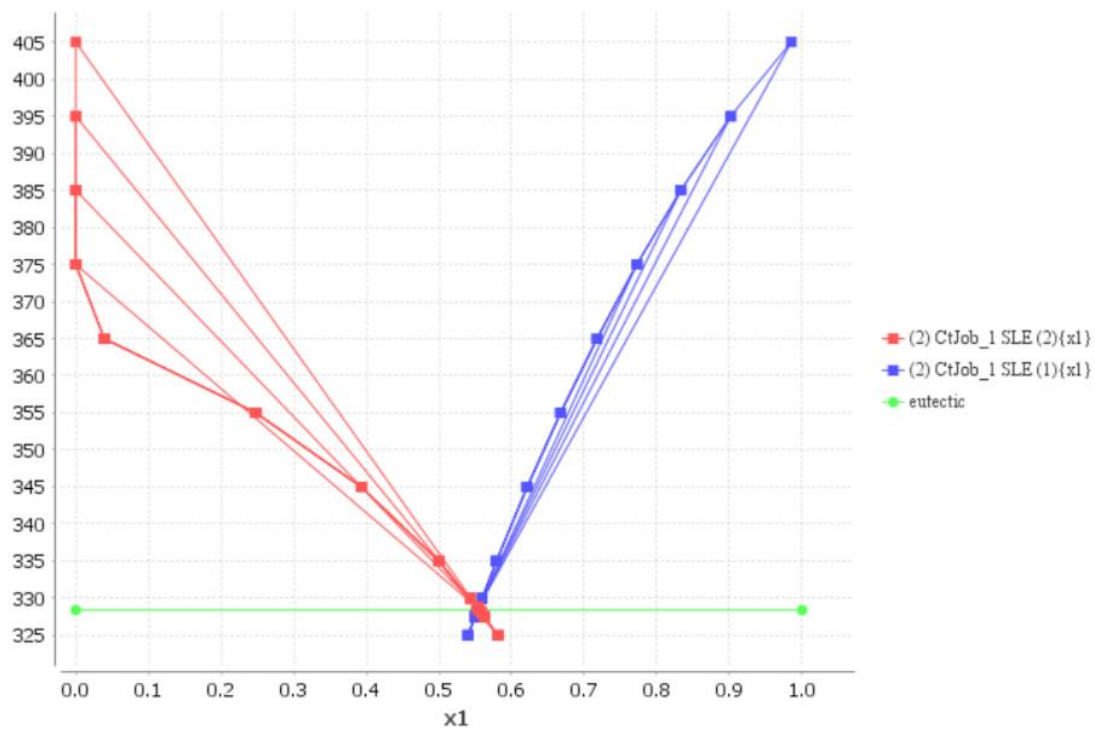
Mnogi organizmi se u prirodi suočavaju s brojnim stresnim uvjetima i ograničenjima u dostupnosti hranjivih tvari, zbog čega se moraju prilagoditi kako bi osigurali opstanak, postojanost i rast. Ekstremofilne bakterije, morski organizmi, sporulirajući mikroorganizmi i biljke često su izloženi ekstremnim okolišnim uvjetima, kao i žive skupine mikroorganizama koje funkcioniraju u složenim mikrookolišima poput ljudskog bubrega. Gubitkom unutarstanične vode zbog suše, ekstremnih temperatura ili bolesti koje uzrokuju osmotsku neravnotežu, dolazi do akumulacije visokih koncentracija soli i organskih otopljenih tvari. Svi navedeni organizmi primjenjuju sličan mehanizam prilagodbe na stresne uvjete okoliša koji

uključuje nakupljanje malih molekula koje se nazivaju osmoliti. Osmoliti su različite organske molekule koje imaju nekoliko bioloških funkcija, među kojima je najvažnije povećanje termodinamičke stabilnosti makromolekula, bez narušavanja njihove prirodne funkcije (Czech i sur., 2018). Svi poznati osmoliti mogu se podijeliti u nekoliko glavnih kategorija, uključujući poliole i šećerne poliole (glicerol, manitol, sorbitol, inozitol), šećere i njihove derivate (glukoza, fruktoza, saharoza, trehaloza, manoz, sorboza), aminokiseline i njihove derivate (glicin, alanin, prolin, valin, serin, taurin, glutamin, ektoin, sarkozin), metilamine i njihove derivate (betain, trimetilamin-N-oksidi (TMAO), kolin, glicerofosforil-kolin (GPC)), metilsulfonij i njegove derivate (dimetilsulfonopropionat (DMSP)) i osmolite sa štetnim učincima (urea, gvanidij-klorid). Zbog njihove raznolikosti, višestruke biološke funkcije i netoksičnosti u širokom rasponu koncentracija, osmoliti se uvelike primjenjuju u molekularnoj biologiji, poljoprivredi i biotehnologiji kao stabilizatori proteina i zaštitnici stanica (Kushwah i sur., 2020; Yancey, 2005). Visoke koncentracije otopljenih tvari, kao što su šećeri, alkoholi, organske kiseline i aminokiseline, mogu doprinijeti unutarstaničnoj organizaciji u određenim biološkim sustavima formiranjem DES-ova. Choi i sur. (2011) su prvi postavili hipotezu da metaboliti koji se pojavljuju u značajnim količinama *in vivo*, tvore treću vrstu tekućina, prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES), prilagođavajući sadržaj vode u biljnim stanicama i štiteći stanice u teškim uvjetima. Hipoteza je temeljena na zapažanju da visoka akumulacija određenih primarnih metabolita, koji se koriste kao komponente za pripremu eutektičkih otapala, dominira u biljnim izlučevinama i često se pojavljuje u tipičnim molarnim omjerima DES-a (O'Donnell i sur., 2013; Choi i sur., 2011). U ovom radu provedena je priprava novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita pomoću COSMO $thermX$  programa i primjenom empirijske metode pokušaja i pogreške, nakon čega su izabranim otapalima određena njihova karakteristična fizikalno-kemijska svojstva.

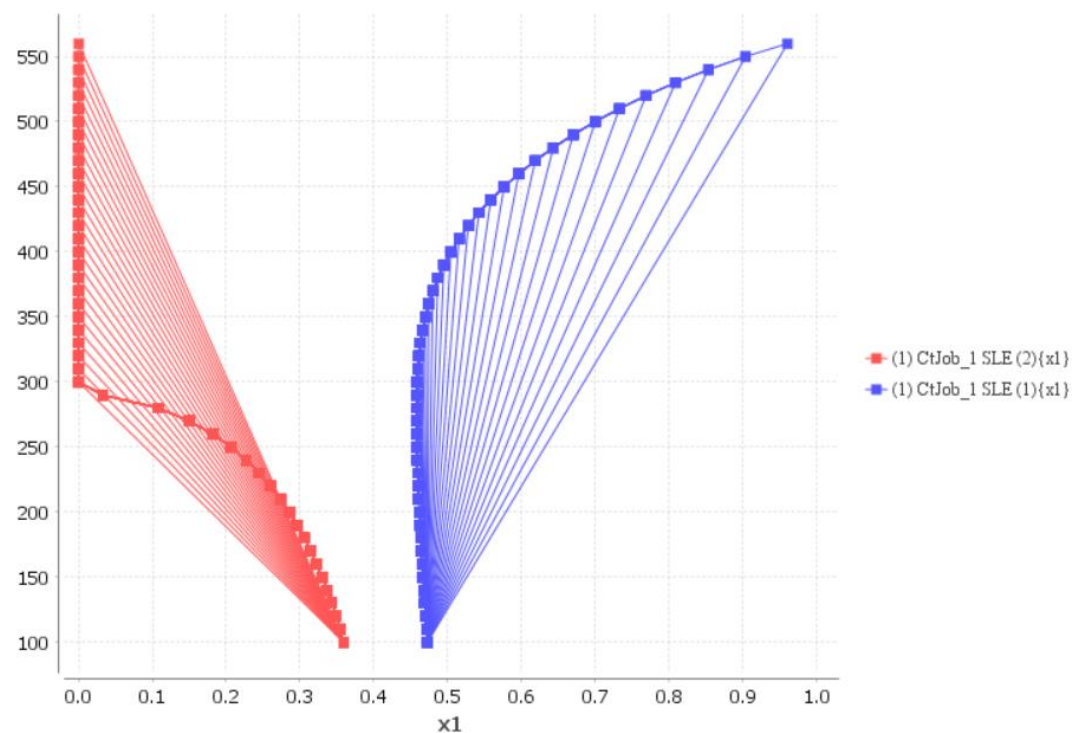
#### 4.1.1. Računalno predviđanje eutektičke točke dvokomponentnih osmolita i eksperimentalna provjera dobivenih rezultata

Unatoč intenzivnom istraživanju, probir niskotemperaturnih eutektičkih otapala za primjenu u biokatalitičkim reakcijama još se uvijek oslanja na eksperimentalnu metodu pokušaja i pogreške. S obzirom na veliku raznolikost potencijalnih komponenti koje pri različitim omjerima formiraju DES, ova metoda povećava potrebu za eksperimentalnim radom, ali zahtijeva i veliku potrošnju potrebnih kemikalija (Song i sur., 2021). Prilikom dizajniranja eutektičkih otapala, potrebno je predvidjeti ravnotežu kapljevina-krutina između komponenata. Za brži probir niskotemperaturnih eutektičkih otapala, primijenjen je COSMO-RS model, termodinamički model temeljen na kvantnoj kemiji i statističkoj termodinamici, koji može predvidjeti kemijski potencijal spojeva u tekućim smjesama. Njegovom primjenom za kreiranje novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala, moguće je predvidjeti fazni dijagram ravnoteže kapljevina-krutina ispitivanog dvokomponentnog sustava, uključujući predviđanje eutektičke temperature sustava, topljivost organskih molekula u DES-ovima i druga fizikalno-kemijska svojstva potencijalnog eutektičkog otapala (Wojeicchowski i sur., 2020).

Računalno predviđanje eutektičke točke dvokomponentnih osmolita provedeno je pomoću COSMO-RS modela prema protokolu navedenom u poglavlju 3.2.1., pri čemu je ispitana primjenjivost ove računalne metode za kreiranje novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita (osmoDES). Kao rezultat ispitivanja eutektičke točke, dobiveni su fazni dijagrami ravnoteže kapljevina-krutina iz kojih su iščitane vrijednosti molarnog udjela prve komponente i temperatura pri kojoj se postiže eutektička točka. Slika 10 prikazuje fazni dijagram ravnoteže kapljevina-krutina dvokomponentnih osmolita urea : sorbitol prema kojem je uspješno određena eutektička točka navedene smjese iz sjecišta krivulja topljivosti pojedinih komponenata smjese. Suprotno tome, slika 11 prikazuje fazni dijagram ravnoteže kapljevina-krutina za dvokomponentne osmolite betain : glicerol koja ukazuje na nemogućnost postizanja eutektičke točke u ovakvim smjesama, s obzirom na nepostojanje sjecišta između dviju krivulja topljivosti prisutnih komponenata.



**Slika 10.** Primjer faznog dijagrama ravnoteže kapljevine-krutina dvokomponentnih osmolita urea : sorbitol (U:Sol) ( $X_{eut} = 0,55332$  i  $T_{eut} = 328,41$  K)



**Slika 11.** Primjer faznog dijagrama ravnoteže kapljevine-krutina dvokomponentnih osmolita betain : glicerol (B:Gly)



U tablici 7 prikazane su vrijednosti molarnog udjela prve komponente, temperature pri kojoj se postiže eutektička točka i molarni omjer dviju komponenata dobiven na temelju molarnog udjela prve komponente, za sve ispitane dvokomponentne osmolite. Prema tablici 7, za većinu postavljenih dvokomponentnih osmolita računalno je određena eutektička točka i molarni udio prve komponente, što znači da se primjenom COSMOthermX programa može pretpostaviti eutektički sastav velikog broja još neistraženih dvokomponentnih osmolita, čime se olakšava daljnji proces dizajniranja istih. Na temelju rezultata prikazanih u tablici 7, provedeno je eksperimentalno ispitivanje ponašanja navedenih smjesa. U laboratoriju su uspješno dizajnirana tri nova niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita, U:Gly, U:Sol i U:Suc, pri čemu je otapalo U:Gly s molarnim omjerom 3:7 kreirano bez dodatka vode, dok su preostala dva otapala U:Sol i U:Suc kreirana uz dodatak određenog postotka vode koji redom iznosi 3 %, odnosno 20 %. Unatoč tome što su uspješno kreirana samo tri eutektička otapala na temelju računalnog predviđanja njihovog sastava, COSMOthermX program pokazao se korisnim alatom za dizajniranje novih otapala, omogućujući brzu i jednostavnu eksperimentalnu provjeru eutektičke točke potencijalnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita.

**Tablica 7.** Računalno predviđena eutektička točka dvokomponentnih osmolita

Dvokomponentna smjesa osmolita	Kratika	$X_{eut}$	$T_{eut}$ [K]	Molarni omjer	Eksperimentalna potvrda*
Alanin : Glukoza	Ala:Glc	0,59697	266,67	3:2	-
Alanin : Glicerol	Ala:Gly	0,58512	268,47	3:2	-
Alanin : Glutamin	Ala:Glu	0,52923	254,25	1:1	-
Alanin : Prolin	Ala:Pro	0,585	262,18	3:2	-
Betain : Alanin	B:Ala	nije određen	nije određena	nije određen	-
Betain : Fruktioza	B:Fru	nije određen	nije određena	nije određen	-
Betain : Glukoza	B:Glc	nije određen	nije određena	nije određen	-
Betain : Glutamin	B:Glu	0,39836	184,39	2:3	-
Betain : Glicerol	B:Gly	nije određen	nije određena	nije određen	-
Betain : Inozitol	B:Inol	0,59195	404,41	3:2	-
Betain : Manitol	B:Mol	0,61139	266,4	3:2	-
Betain : Prolin	B:Pro	0,31003	191,3	3:7	-
Betain : Saharoza	B:Suc	nije određen	nije određena	nije određen	-
Betain : Taurin	B:Tau	nije određen	nije određena	nije određen	-
Betain : Urea	B:U	0,31824	332,85	3:7	-
Taurin : Glukoza	Tau:Glc	0,33582	283,09	3:7	-
Taurin : Glicerol	Tau:Gly	0,19729	286,94	1:4	-
Taurin : Glutamin	Tau:Glu	nije određen	nije određena	nije određen	-
Taurin : Manioza	Tau:Man	0,31959	283,79	3:7	-
Taurin : Prolin	Tau:Pro	nije određen	nije određena	nije određen	-
Taurin : Saharoza	Tau:Suc	0,82821	405,87	4:1	-
Taurin : Sorbitol	Tau:Sol	0,48756	348,88	1:1	-
Taurin : Sorboza	Tau:Sor	0,70727	393,23	7:3	-
Urea : Alanin	U:Ala	0,13035	281,92	1:9	-
Urea : Glicerol	U:Gly	0,26527	277,01	3:7	viskozna i homogena tekućina
Urea : Glutamin	U:Glu	0,13093	269,13	1:9	-
Urea : Sorbitol	U:Sol	0,55332	328,41	3:2	viskozna i homogena tekućina
Urea : Prolin	U:Pro	0,10947	288,07	1:9	-
Urea : Saharoza	U:Suc	0,81756	377,52	4:1	viskozna i homogena tekućina
Urea : Taurin	U:Tau	nije određen	nije određena	nije određen	-

\* (-) otapalo nije uspješno pripravljeno u laboratoriju

#### 4.1.2. Empirijska metoda pripreme novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

S obzirom da pomoću COSMO $thermX$  programa nije dobiven veliki broj niskotemperaturnih eutektičkih otapala, primijenjena je empirijska metoda pokušaja i pogreške za pripremu novih eutektičkih otapala na bazi osmolita, pri čemu su praćeni molarni omjeri osmolita koji se javljaju u različitim organizmima. Naime, urea, često korišten donor vodika za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala, denaturirajući je agens koji je pronađen u nekim životinjama i morskim organizmima te može narušiti funkciju proteina i uzrokovati oštećenje proteinske strukture pri visokim koncentracijama. Yancey i sur. proveli su niz *in vitro* eksperimentalnih istraživanja kojima su dokazali da tkiva bogata ureom sadrže visoke koncentracije određenih osmolita kao što su betain, glicerofosfokolin (GPC) i trimetilamin-N-oksidi (TMAO). Kada molarni omjeri navedenih osmolita i uree iznose 1:2, osmoliti štite tkivo bogato ureom stabilizirajući proteine, pri čemu se suprotstavljaju negativnom djelovanju uree (Zeng i sur., 2016). Isto tako, Singh i sur. (2007) otkrili su da TMAO i sarkozin pri molarnom omjeru 2:1 izrazito dobro stabiliziraju  $\alpha$ -laktalbumin u prisutnosti uree, čime sprječavaju denaturirajući učinak uree na protein. Također, Khan i sur. (2013) otkrili su da mio-inozitol u prisustvu uree pri molarnom omjeru 1:2 izvrsno stabilizira proteine RNazu-A, lizozim i  $\alpha$ -laktalbumin, dok taurin stabilizira iste u prisustvu uree pri molarnom omjeru 1,5:2 za RNazu-A, 1,2:2 za lizozim i 1:2 za  $\alpha$ -laktalbumin, čime je dokazano da djelovanje kompatibilnih osmolita na ureu nije ograničeno na molarni omjer 1:2, već ovisi o strukturi proteina i njegovom podrijetlu.

Vođeno molarnim omjerima osmolita (*in vivo* i *in vitro*), pripremljena su nova niskotemperaturna eutektička otapala na bazi betaina, TMAO-a i uree kao akceptora vodikove veze (HBA) i šećera, poliola, aminokiselina i metilamina kao donora vodikove veze (HBD), uz prisutnost određenog masenog udjela vode (tablica 8). Prema rezultatima prikazanim u tablici 8, vidljivo je da sadržaj vode varira ovisno o komponentama koje tvore niskotemperaturno eutektičko otapalo, pri čemu otapalo TMAO:U:H<sub>2</sub>O, s molarnim omjerom komponenata 1:1:3,5, sadrži najveći maseni udio vode koji iznosi 27 %. Važnost primjene otapala na bazi TMAO-a kao akceptora i uree kao donora vodikove veze temelji se na predviđanju da je glavni učinak uree destabilizacija proteina, ulazeći pri tome s njima u interakciju putem vodikove veze, dok TMAO stabilizira proteine jačanjem vodikovih veza s vodom u otopini, sprječavajući agregaciju proteina i narušavanje njihove strukture (Teng i Ichiye, 2020). Isto tako, betain može spriječiti denaturirajući učinak uree prema proteinima

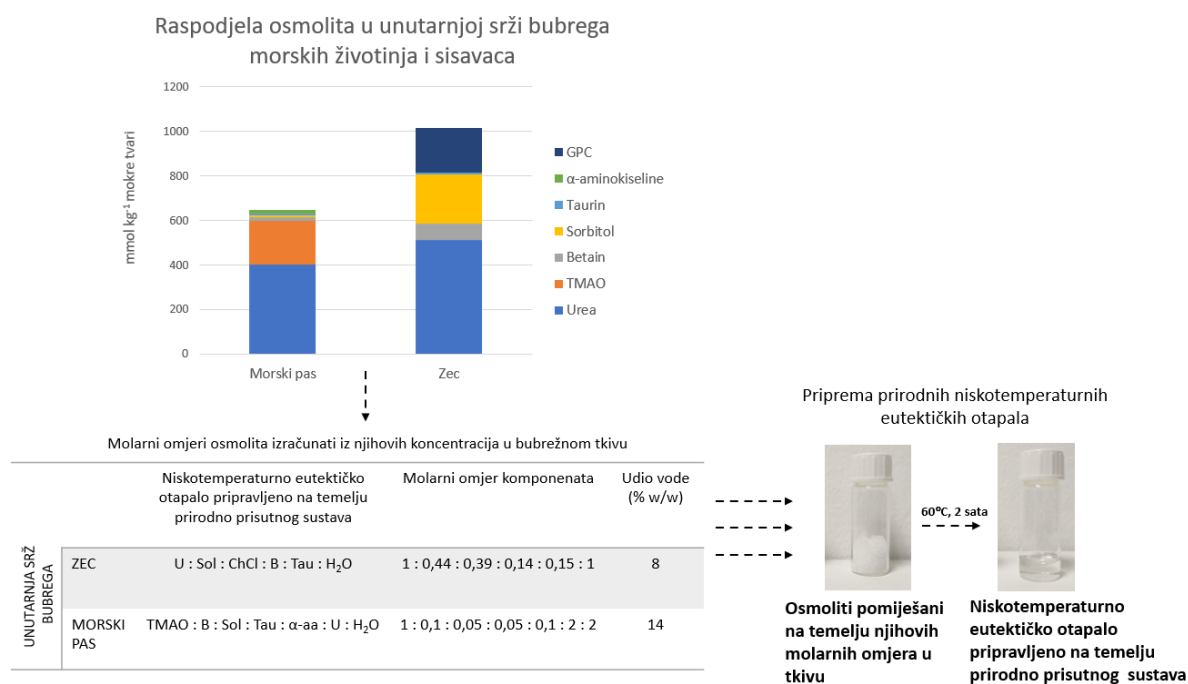
uspostavljanjem jakih interakcija s ureom i vodom prisutnom u sustavu, ne ulazeći u izravnu interakciju s površinom peptida. Nedavna istraživanja ukazala su na sinergistički učinak između betaina, uree i vode, pri čemu se uspostavljanje vodikovih veza između betaina i vode povećava prisutnošću uree, ali i između vode i uree uz prisutnost betaina (Abranches i sur., 2020). Ovakva istraživanja podupiru hipotezu da metaboliti koji se javljaju u velikim količinama u stanicama mogu tvoriti treću vrstu tekućina. Dizajniranjem novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita omogućuje se istraživanje mehanizma međusobnog djelovanja osmolita i bolje razumijevanje funkcije ovakvih otapala u prisutnosti malih molekula osmolita (Zeng i sur., 2016).

**Tablica 8.** Sastav pripremljenih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

<b>Niskotemperaturno eutektičko otapalo na bazi osmolita (osmoDES)</b>	<b>Kratica</b>	<b>Molarni omjer komponenata</b>	<b>Udio vode [w/w %]</b>
Trimetilamin-N-oksid: glicerol	TMAO:Gly	1:3	-
Trimetilamin-N-oksid: urea: glicerol : voda	TMAO:U:Gly:H <sub>2</sub> O	1:2:2:1	4
Trimetilamin-N-oksid: urea: voda	TMAO:U:H <sub>2</sub> O	1:1:3,5	27
Trimetilamin-N-oksid: ksilitol: voda	TMAO:Xylol:H <sub>2</sub> O	1:1:3	17
Urea: sorbitol: voda	U:Sol:H <sub>2</sub> O	3:2:1	3
Urea: saharoza: voda	U:Suc:H <sub>2</sub> O	4:1:8	20
Trimetilamin-N-oksid: sorbitol: urea: voda	TMAO:Sol:U:H <sub>2</sub> O	3:2:1:4	15
Betain: trimetilamin-N-oksid: urea: voda	B:TMAO:U:H <sub>2</sub> O	1:1:2:2,5	12
Trimetilamin-N-oksid: glukoza: voda	TMAO:Glc:H <sub>2</sub> O	5:2:4	2

Priprema novih višekomponentnih eutektičkih otapala na bazi osmolita temeljena je na prirodno prisutnim sustavima osmolita, poput onih pronađenih u bubrezima hrskavičnih riba (morski pas) i sisavaca (zec). Navedeni organizmi u svojim bubrezima akumuliraju ureu do visokih koncentracija kao dio osmoregulacijskog mehanizma u koji su uključeni kompatibilne otopljene tvari kako bi se suprotstavili negativnom djelovanju uree na strukturu proteina. Osmoliti pomažu u regulaciji volumena stanica bez ometanja staničnih funkcija i sudjeluju u neutralizaciji negativnih učinaka nastalih prisustvom uree u visokim koncentracijama. U uvjetima nedostatka vode, sisavci akumuliraju visoke koncentracije kompatibilnih osmolita u

bubrežnim medularnim stanicama, uključujući sorbitol, glicerofosforilkolin (GPC), inozitol i betain, dok u hrskavičnim morskim psima i drugim prečnoustim ribama prevladava TMAO (Yancey i Burg, 1989). Za pripremu višekomponentnih eutektičkih otapala na bazi osmolita, molarni omjeri osmolita izračunati su izravno iz njihovih koncentracija u bubrežnom tkivu te su korišteni za određivanje molarnih omjera osmolita koji tvore niskotemperaturno eutektičko otapalo (slika 12).



**Slika 12.** Nova višekomponentna niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita pripravljena praćenjem raspodjele osmolita u unutarnjoj srži bubrega morskog psa i zeca

Na slici 12 prikazan je sastav novih, višekomponentnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita koja su dizajnirana na temelju raspodjele osmolita u unutarnjoj srži bubrega morskog psa i zeca. Oponašajući prirodni sustav bubrega zeca, kreirano je otapalo koje u svom sastavu sadrže ureu, sorbitol, kolin-klorid, betain i taurin pri molarnom omjeru (1:0,44:0,39:0,14:0,15:1) i masenom udjelu vode koji iznosi 8 %. Isto tako, dobiveno je otapalo koje sadrži osmolite TMAO, betain, sorbitol, taurin,  $\alpha$ -aminokiseline i ureu pri molarnom omjeru (1:0,1:0,05:0,05:0,1:2:2) i masenom udjelu vode u iznosu od 14 %, imitirajući pri tome prirodni sustav bubrega morskog psa. Na temelju praćenja raspodjele osmolita u određenim biološkim sustavima, moguće je kreirati nova dvo-, tro- ili višekomponentna eutektička otapala na bazi osmolita koja bi mogla biti vrlo učinkovita u oponašanju prirodnog mikrookruženja proteina i drugih makromolekula koje djeluju unutar ovakvih bioloških sustava.

#### 4.1.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

Nakon pripreme niskotemperaturnih eutektičkih otapala, potrebno je odrediti njihova fizikalno-kemijska svojstva koja su važna za primjenu u biokatalitičkim procesima i procjenu utjecaja na okoliš, ali i za određivanje cijene otapala. S obzirom na postojanje velikog broja kombinacija koje mogu formirati eutektičko otapalo, fizikalno-kemijska svojstva svakog DES-a su jedinstvena i ovise o njegovoj strukturi (Panić i sur., 2020). Provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita, koja su pripravljena prema protokolu opisanom u poglavljima 3.2.2.1. i 3.2.2.2. Ispitana fizikalno-kemijska svojstva navedenih otapala su pH, gustoća, viskoznost i polarnost, a dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 9.

**Tablica 9.** Fizikalno-kemijska svojstva odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

Niskotemperaturno eutektičko otapalo (DES)	pH	Gustoća $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Viskoznost $\eta$ (mPas)	Polarnost $E_{NR}$ (kcal/mol)
U:Sol:ChCl:B:Tau:H <sub>2</sub> O	7,48	1,2654	440,6	50,2478
TMAO:U:Gly	9,92	1,1785	187,6	50,1596
TMAO:Sol:U:H <sub>2</sub> O	9,55	1,1972	110,3	50,1596
TMAO:U:H <sub>2</sub> O	10,72	1,1025	20,17	50,6035
U:Suc	9,78	1,3326	114,55	49,202
U:Gly	9,75	1,2714	471	50,0718

Priroda akceptora i donora vodikove veze određuje kiselost i bazičnost DES-ova, pri čemu su DES-ovi na bazi organskih kiselina po prirodi kiseli (pH < 3), dok ostali DES-ovi pripadaju skupini slabo kiselih do neutralnih otapala (pH > 4) koja su prikladnija za biokatalizu (Panić i sur., 2020). Prema dobivenim pH vrijednostima odabranih otapala, moguće je zaključiti da su navedena otapala neutralna do blago lužnata, s obzirom da se pH vrijednosti kreću u intervalu od 7 do 10. Povećane pH vrijednosti pripremljenih osmoDES-ova rezultat su prisutnosti uree koja ima blaga bazična svojstva (PubChem), dok je variranje njihovih pH vrijednosti posljedica razlike u relativnoj kiselosti pojedinih donora vodikove veze (Hansen i sur., 2021).

Gustoća, kao jedno od osnovnih fizikalnih svojstava otapala, definira se kroz omjer mase i volumena te daje informaciju o međumolekularnim interakcijama u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Općenito, navedena otapala imaju gustoću veću od gustoće vode, s vrijednostima u rasponu između 1,1 i 1,4 g cm<sup>-3</sup> pri 25 °C. Dobivene vrijednosti gustoće ispitanih osmoDES-ova nalaze se u navedenom intervalu, pri čemu U:Suc ima najveću gustoću (1,3326 g cm<sup>-3</sup>), što odgovara činjenici da niskotemperaturna eutektička otapala na bazi šećera pripadaju skupini najgušćih DES-ova. S obzirom na prisutnost poliola i šećernih poliola u BUBREGU (1,2654 g cm<sup>-3</sup>), TMAO:U:Gly (1,1785 g cm<sup>-3</sup>), TMAO:Sol:U:H<sub>2</sub>O (1,1972 g cm<sup>-3</sup>) i U:Gly (1,2714 g cm<sup>-3</sup>), navedeni osmoDES-ovi imaju veću gustoću u odnosu na TMAO:U:H<sub>2</sub>O (1,1025 g cm<sup>-3</sup>) zbog prisutnosti hidroksilnih funkcionalnih skupina poliola koje omogućuju stvaranje više vodikovih veza, čime se smanjuje dostupnost slobodnog volumena (Hansen i sur., 2021; Panić i sur., 2020).

Kao treće fizikalno-kemijsko svojstvo, određena je viskoznost odabranih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita, koja opisuje njihov otpor pri protjecanju. Prema rezultatima prikazanim u tablici 9, najmanju viskoznost imaju TMAO:Sol:U:H<sub>2</sub>O (110,3 mPas) i TMAO:U:H<sub>2</sub>O (20,17 mPas), što je posljedica dodatka vode koja uzrokuje smanjenje viskoznosti otapala. Iako u svom sastavu sadrži vodu, DES inspiriran distribucijom osmolita u bubregu zeca ima izrazito veliku viskoznost (440,6 mPas) zbog prisustva većeg broja komponenata različite prirode i molarnog omjera. S obzirom da sadrže glicerol koji je po prirodi viskozna tvar, otapalima U:Gly i TMAO:U:Gly izmjerene su visoke vrijednosti viskoznosti koje iznose 471 mPas, odnosno 187,6 mPas, kao i otapalu sa šećernom komponentom, U:Suc, čija viskoznost iznosi 114,55 mPas. S obzirom da im je viskoznost veća od 100 mPas, izuzevši TMAO:U:H<sub>2</sub>O, pripremljena eutektička otapala na bazi osmolita smatraju se viskoznim otapalima, što se može pripisati gustoj mreži vodikovih veza koja se formira između komponenata (Hansen i sur., 2021; Panić i sur., 2020).

Važno fizikalno-kemijsko svojstvo koje ukazuje na jačinu otapala te je povezano s topljivošću supstrata i produkata u reakcijskoj smjesi je polarnost. Polarnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala uvelike ovisi o komponentama koje formiraju DES i njihovom molarnom omjeru. Na temelju dobivenih vrijednosti za polarnost pripremljenih osmoDES-ova, vidljivo je da svih šest otapala ima približno jednaku polarnost koja u prosjeku iznosi oko 50 kcal mol<sup>-1</sup>. Zbog prisutnosti poliola i šećera u njihovom sastavu, ispitani osmoDES-ovi pripadaju skupini najmanje polarnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Panić i sur., 2020).

## 4.2. MIKROBNA REDUKCIJA RAZLIČITO SUPSTITUIRANIH ACETOFENONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Kiralni sekundarni alkoholi mogu se sintetizirati pomoću nekoliko metoda, među kojima je biokatalitička metoda jedna od najodabranijih metoda zbog određenih prednosti u usporedbi s kemijskom sintezom. U redukcijским reakcijama primjenjuju se asimetrični ligandi koji tvore veliku količinu nepoželjnih i toksičnih proizvoda, dok biokatalizatori omogućuju primjenu ekološki prihvatljive i čiste metode za provođenje reakcija pri blagim uvjetima (Baydaš i sur., 2020). Asimetrična redukcija prokiralnih ketona predstavlja se kao pogodna biokatalitička metoda za sintezu optički aktivnih alkohola, ostvarujući pri tome visoki prinos i visoku enantioselektivnost biokatalizatora. Reakciju pretvorbe prokiralnih ketona u optički aktivne alkohole kataliziraju alkohol dehidrogenaze koje zahtijevaju prisutnost NADH ili NADPH kofaktora kao donora atoma vodika. Slijedeći Prelogovo pravilo, većina alkohol dehidrogenaza katalizira prijenos atoma vodika s kofaktora na *re*-stranu prokiralnog ketona, proizvodeći (*S*)-alkohole uz poštivanje Cahn-Ingold-Prelog (CIP) pravila prema kojem veća skupina ima viši stupanj prioriteta u odnosu na manju skupinu. Alkohol dehidrogenaze koje slijede *anti*-Prelog pravilo kataliziraju prijenos atoma vodika s kofaktora na *si*-stranu prokiralnog ketona, pri čemu nastaju alkoholi *R*-konfiguracije. U današnje vrijeme, naročito se primjenjuju ketoreduktaze iz bakterija mliječne kiseline za provođenje redukcije ketona do optički aktivnih alkohola određene konfiguracije (Musa, 2022).

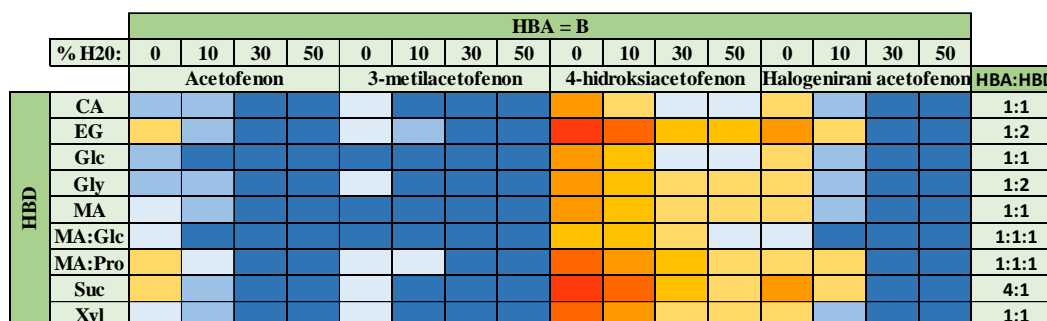
U ovom je radu ispitan biokatalitički potencijal bakterija mliječne kiseline *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB1 za provođenje enantioselektivne redukcije različito supstituiranih acetofenona u hranjivoj podlozi, pri čemu je proveden probir biokatalizatora i supstrata za daljnju optimizaciju reakcije redukcije modelnog supstrata u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, čiji je probir proveden primjenom COSMO*therm*X programa za procjenu topljivosti različito supstituiranih acetofenona u raznim eutektičkim otapalima.

### 4.2.1. Računalno predviđanje topljivosti različito supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Topljivost supstrata jedan je od najvažnijih parametara koji utječu na produktivnost biokatalitičkih reakcija. Prisustvo eutektičkog otapala može značajno djelovati na učinkovitost reakcije poboljšavajući topljivost supstrata, što posljedično dovodi do povećanja produktivnosti biokatalitičkog procesa (Panić i sur., 2020). Niskotemperaturno eutektičko



otapalo može uzrokovati povećanje permeabilnosti stanične membrane, čime se omogućuje bolji prijenos supstrata i produkata kroz membranu, koji rezultira višim stupnjem konverzije i enantiomernim viškom (Wei i sur., 2016). Za procjenu topljivosti različito supstituiranih acetofenona u ovakvim otapalima, primjenjen je računalni program COSMO $thermX$  u kojem je ispitana njihova topljivost u odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima s različitim molarnim omjerima akceptora i donora vodikove veze i različitim udjelom vode. Topljivost supstrata u ispitanim otapalima određena je na temelju računalno proračunatih logaritama koeficijenata aktivnosti pri beskonačnom razrjeđenju ( $\ln(\gamma_\infty)$ ) (slike 13-15). Ukoliko je vrijednost koeficijenta aktivnosti ( $\ln(\gamma_\infty)$ ) manja od 1, znači da je određeni supstrat dobro topljiv u promatranom otapalu. Slike 13 i 14 prikazuju topljivost različito supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi betaina i kolin-klorida kao akceptora vodikove veze (HBA) i različitih spojeva kao donora vodikove veze (HBD), s različitim masenim udjelom vode (0 – 80 %), dok slika 15 prikazuje njihovu topljivost u pripremljenim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita, uz betain, TMAO ili ureu kao akceptore vodikove veze (HBA) te različite poliole i šećere kao donore vodikove veze (HBD), s točno određenim masenim udjelom vode (%).



Legenda ( $\ln(\gamma_\infty)$ ):



**Slika 13.** Računalno predviđena topljivost supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi betaina kao akceptora vodikove veze (HBA) i različitih vrsta donora vodikove veze (HBD)

Ispitani različiti molarni omjeri i maseni udjeli vode (% H<sub>2</sub>O) za različite vrste donora vodikove veze (HBD) prema COSMO $thermX$  software-u.

\*HBD = betain (B), limunska kiselina (CA), etilen-glikol (EG), glukoza (Glc), glicerol (Gly), jabučna kiselina (MA), prolin (Pro), saharoza (Suc), ksiloza (Xyl)

		HBA = ChCl																
% H2O:		0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	HBA:HBD
		Acetofenon				3-metilacetofenon				4-hidroksiacetofenon				Halogenirani acetofenon				
HBD	CA																	1:1
	EG																	1:2
	Glc																	1:1
	Gly																	1:2
	MA																	1:1
	Suc																	2:1
	Xylol																	5:2

Legenda ( $\ln(\gamma^\infty)$ ):



**Slika 14.** Računalno predviđena topljivost supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida kao akceptora vodikove veze (HBA) i različitih vrsta donora vodikove veze (HBD)

Ispitani različiti molarni omjeri i maseni udjeli vode (% H<sub>2</sub>O) za različite vrste donora vodikove veze (HBD) prema COSMOthermX software-u.

\*HBD = kolin-klorid (ChCl), limunska kiselina (CA), etilen-glikol (EG), glukoza (Glc), glicerol (Gly), jabučna kiselina (MA), saharoza (Suc), ksilitol (Xylol)

		HBA = TMAO																
% H2O:		0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	HBA:HBD
		Acetofenon				3-metilacetofenon				4-hidroksiacetofenon				Halogenirani acetofenon				
HBD	Gly	0																1:3
	U:Gly	4																1:2:2
	U	27																1:1
	Xylol	17																1:1
	Sol:U	15																3:2:1
	Glc	2																0,2
		HBA = B																
% H2O:		0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	HBA:HBD
		Acetofenon				3-metilacetofenon				4-hidroksiacetofenon				Halogenirani acetofenon				
HBD	TMAO:U	12																1:1:2
		HBA = U																
% H2O:		0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	0	10	30	50	HBA:HBD
		Acetofenon				3-metilacetofenon				4-hidroksiacetofenon				Halogenirani acetofenon				
HBD	Sol	3																3:2
	Suc	20																4:1
	Sol:ChCl:B:Tau	8																1:0,44:0,39:0,14:0,15

Legenda ( $\ln(\gamma^\infty)$ ):



**Slika 15.** Računalno predviđena topljivost supstituiranih acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi TMAO, betaina i uree kao akceptora vodikove veze (HBA) i različitih vrsta donora vodikove veze (HBD)

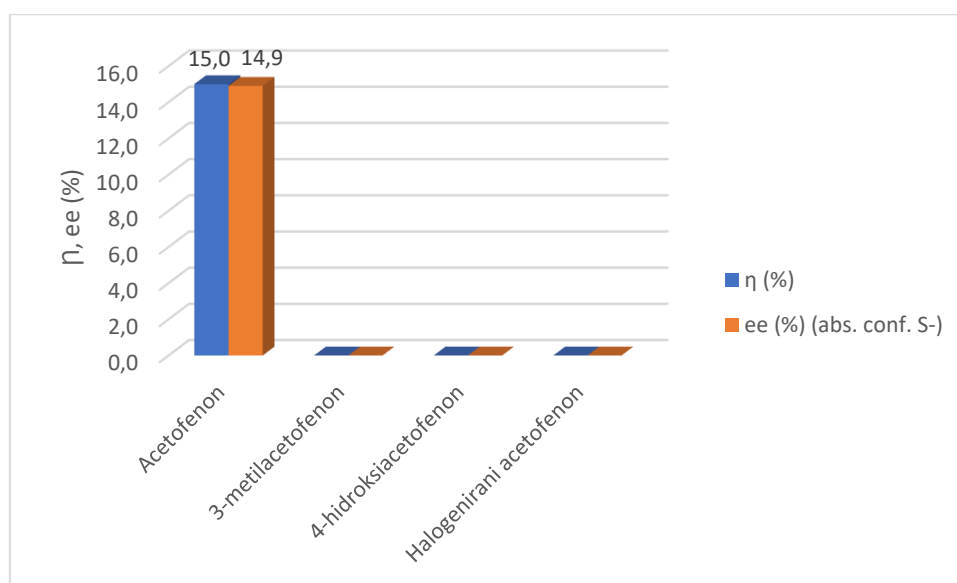
Ispitani različiti molarni omjeri i maseni udjeli vode (% H<sub>2</sub>O) za različite vrste donora vodikove veze (HBD) prema COSMOthermX software-u.

\*HBD = glicerol (Gly), urea (U), ksilitol (Xylol), sorbitol (Sol), glukoza (Glc), trimetilamin-N-oksidi (TMAO), saharoza (Suc), kolin-klorid (ChCl), betain (B), taurin (Tau)

Na temelju rezultata prikazanih na slikama 13-15, moguće je zaključiti da ispitana niskotemperaturna eutektička otapala relativno slabo otapaju različito supstituirane acetofenone, pri čemu je vidljiv utjecaj akceptora vodikove veze (HBA) na topljivost supstrata u ispitanim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Niskotemperaturna eutektička otapala na bazi betaina kao akceptora vodikove veze pokazuju veću topljivost supstrata ostvarenu pri masenim udjelima vode od 0 i 10 %, dok su vrijednosti  $\ln(\gamma_\infty)$  dobivene u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida pri masenim udjelima vode od 0 i 10 % uglavnom veće od 1 i pokazuju lošiju topljivost supstrata u tim otapalima. Unatoč vidljivom utjecaju akceptora vodikove veze na topljivost supstituiranih acetofenona u ispitanim otapalima, utjecaj donora vodikove veze (HBD) na topljivost supstrata nije vidljiv. Najveću topljivost u ispitanim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pokazuje 4-hidroksiacetofenon koji u većini ispitanih otapala ima vrijednost  $\ln(\gamma_\infty)$  manju od 1, što se može objasniti prisutnošću hidroksilne skupine koja može formirati vodikove veze s komponentama niskotemperaturnog eutektičkog otapala (Panić i sur., 2020). Također, važan utjecaj na topljivost supstrata ima prisutnost određenog masenog udjela vode u ispitanim otapalima. Povećanjem masenog udjela vode od 0 do 80 % u otapalima na bazi betaina i kolin-klorida, dolazi do povećanja vrijednosti  $\ln(\gamma_\infty)$ , odnosno smanjenja topljivosti supstrata. Topljivost supstrata u pripremljenim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita je izrazito niska, s vrijednosti  $\ln(\gamma_\infty)$  uglavnom većom od 2, unatoč prisutnosti niskog masenog udjela vode koji se kreće od 0 do 27 % za ispitana otapala. Moguće je zaključiti da povećanje masenog udjela vode u promatranim otapalima negativno utječe na topljivost supstituiranih acetofenona, budući da su navedeni supstrati hidrofobnog karaktera (Wojeicchowski i sur., 2020). Dodatkom određene količine vode u niskotemperaturna eutektička otapala smanjuje se viskoznost otapala, čime se poboljšava prijenos mase supstrata i produkata, kao i produktivnost reakcije jer prisutnost vode u reakcijskoj smjesi omogućuje održavanje katalitičke aktivnosti stanica (Pätzold i sur., 2019). Uzimajući u obzir sve navedene karakteristike eutektičkih otapala i dobivene vrijednosti  $\ln(\gamma_\infty)$  koje su proračunate pomoću COSMOthermX programa, odabrana niskotemperaturna eutektička otapala za provođenje enantioselektivne reakcije redukcije modelnog supstrata su betain : saharoza (B:Suc) uz dodatak 50 i 80 % vode, betain : jabučna kiselina : glukoza (B:MA:Glc) s masenim udjelom vode od 30, 50 i 80 % vode i kolin-klorid : ksilitol (ChCl:Xylol) uz maseni udio vode od 30, 50 i 80 % vode.

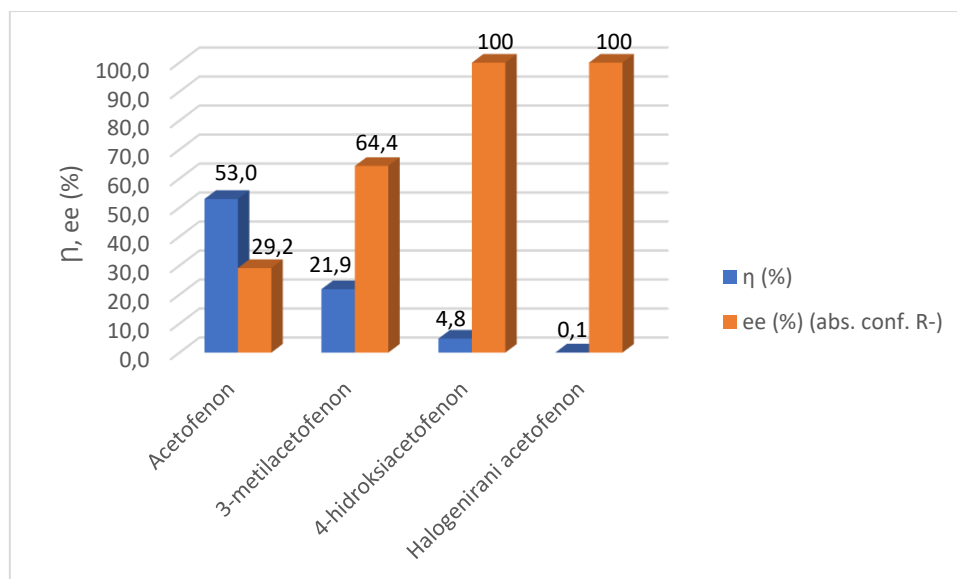
#### 4.2.2. Probir supstrata, biokatalizatora i reakcijskog otapala za enantioselektivnu redukciju acetofenona u eutektičkim otapalima

U radu je najprije provedena redukcija različito supstituiranih acetofenona u hranjivoj podlozi pomoću bakterija mliječne kiseline *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB1 u svrhu probira mikroorganizama, supstrata i niskotemperaturnih eutektičkih otapala za daljnje ispitivanje njihovog ponašanja u odabranim eutektičkim otapalima, nakon čega je provedena optimizacija enantioselektivne redukcije acetofenona u najpogodnijem otapalu. Nakon što je provedena enantioselektivna redukcija različito supstituiranih acetofenona u hranjivoj podlozi pomoću *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB1, dobiveni uzorci analizirani su na plinskom kromatografu s ugrađenim masenim spektrometrom pomoću kojeg su izračunati stupnjevi konverzije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak reakcije ( $ee$ ) prema izrazima [2] i [3] (slike 16 i 17). Procjena uspješnosti reakcije redukcije različito supstituiranih acetofenona u hranjivoj podlozi provedena je na temelju dobivenih vrijednosti. Na slikama 16 i 17 prikazan je stupanj konverzije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak reakcije ( $ee$ ) redukcije katalizirane pomoću *L. fermentum* MC1, odnosno *L. brevis* MB1.



**Slika 16.** Stupnjevi konverzije i enantiomerni višak za enantioselektivnu redukciju supstituiranih acetofenona pomoću *L. fermentum* MC1 u hranjivoj podlozi

Reakcijski uvjeti: 50  $\mu$ L supstituiranog acetofenona (400 mg mL<sup>-1</sup>); 100  $\mu$ L resuspendirane stanične kulture *L. fermentum* MC1; 9,9 mL MRS tekuće hranjive podloge; 48 sati; 25 °C; 75 min<sup>-1</sup>.



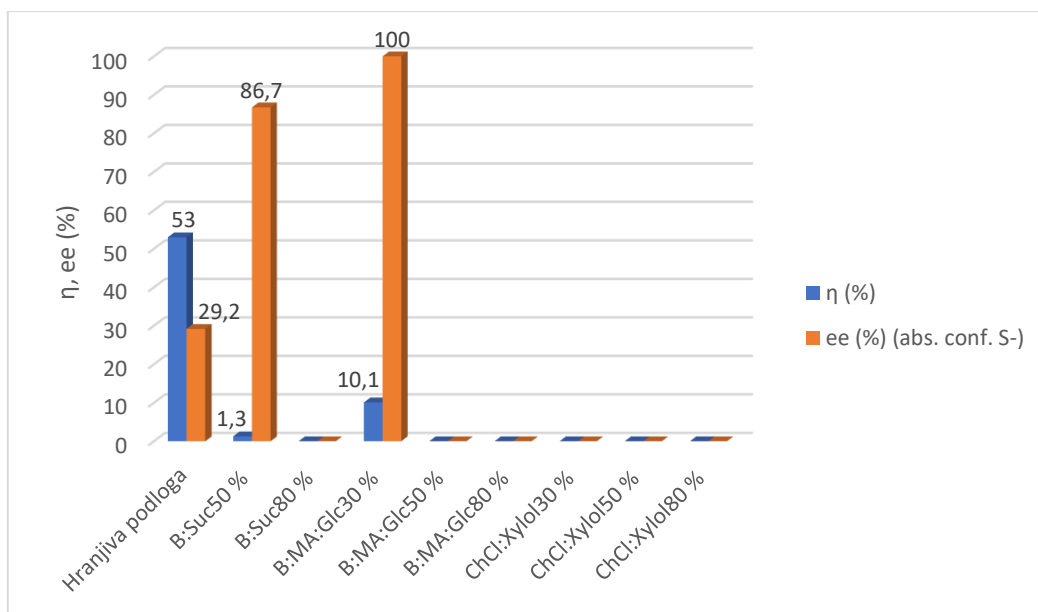
**Slika 17.** Stupnjevi konverzije i enantiomerni višak za enantioselektivnu redukciju supstituiranih acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u hranjivoj podlozi

Reakcijski uvjeti: 50  $\mu$ L supstituiranog acetofenona ( $400 \text{ mg mL}^{-1}$ ); 100  $\mu$ L resuspendirane stanične kulture *L. brevis* MB1; 9,9 mL MRS tekuće hranjive podloge; 48 sati; 25 °C; 75  $\text{min}^{-1}$ .

Prema rezultatima prikazanim na slici 16, moguće je zaključiti da biokatalizator *L. fermentum* MC1 ima visoku enantioselektivnost prema (*S*)-alkoholu, slijedeći pri tome Prelogovo pravilo. Suprotno tome, rezultati prikazani na slici 17 ukazuju na visoku enantioselektivnost biokatalizatora *L. brevis* MB1 prema (*R*)-alkoholu, što se može objasniti *anti*-Prelogovim pravilom asimetrične redukcije prokiralnih ketona. Stupanj konverzije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak reakcije (*ee*) enantioselektivne redukcije acetofenona pomoću soja *L. fermentum* MC1 u hranjivoj podlozi su izrazito niski i redom iznose 15 %, odnosno 14,9 %, dok za reakcije redukcije ostalih supstituiranih acetofenona stupanj konverzije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak reakcije (*ee*) iznose 0 %. Pretpostavlja se da su ovakvi negativni rezultati posljedica primjene reakcijskih uvjeta koji ne pogoduju korištenom biokatalizatoru za provođenje reakcije redukcije, postavljanje reakcije redukcije uz primjenu stanične kulture koja već ulazi u stacionarnu fazu rasta i/ili izostanak transportnih mehanizama kojima se supstrati i produkti unose, odnosno iznose iz stanice. Međutim, stupnjevi konverzije ( $\eta$ ) i enantiomerni višak reakcija (*ee*) dobiveni za enantioselektivnu redukciju različito supstituiranih acetofenona pomoću soja *L. brevis* MB1 u hranjivoj podlozi su visoki u usporedbi s rezultatima dobivenim za soj *L. fermentum* MC1, pri čemu je najvišu stupanj konverzije ostvaren za acetofenon i iznosi 53 %, dok je za isti ostvarena najniža vrijednost enantiomernog viška reakcije koja iznosi 29,2 %. Najviši enantiomerni višak reakcije ostvaren je za 4-hidroksiacetofenon i halogenirani

acetofenon, no vrijednost stupnja konverzije za oba supstrata iznosi manje od 5 %. Na temelju dobivenih rezultata, soj *L. brevis* MB1 odabran je kao pogodan biokatalizator, a kao modelni supstrat za provođenje optimizacije reakcije redukcije u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima odabran je acetofenon zbog postizanja najvećeg stupnja konverzije u reakcijama redukcije kataliziranim pomoću navedenih sojeva.

U svrhu probira niskotemperaturnog eutektičkog otapala za provođenje optimizacije reakcije redukcije acetofenona u istima, provedena je enantioselektivna redukcija acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u prethodno odabranim otapalima BSuc50 %, BSuc80 %, B:MA:Glc30 %, B:MA:Glc 50 %, B:MA:Glc 80 %, ChCl:Xylol30 %, ChCl:Xylol 50 % i ChCl:Xylol 80 %. Na slici 18 prikazane su vrijednosti stupnjeva konverzije ( $\eta$ ) i enantiomernog viška reakcije ( $ee$ ) koji su izračunati prema izrazima [2] i [3] nakon analize uzoraka na plinskom kromatografu s ugrađenim masenim spektrometrom. Rezultati dobiveni na slici 18 pokazuju da su proračunati stupnjevi konverzije reakcija redukcije acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u odabranim otapalima relativno slični, pri čemu je u otapalu B:MA:Glc30% ostvaren veći stupanj konverzije koji iznosi 10,1 % i enantiomerni višak reakcije u iznosu od 100 %, u odnosu na stupanj konverzije i enantiomerni višak reakcije za otapalo B:Suc50%, koji redom iznose 1,3 %, odnosno 86,7 %. U preostalim otapalima stupanj konverzije i enantiomerni višak reakcije iznose 0 %, što znači da u navedenim otapalima nije provedena reakcija redukcije acetofenona. Pretpostavljeni razlozi neuspjele provedbe reakcije redukcije u većini ispitanih otapala su nepogodan odabir niskotemperaturnog eutektičkog otapala, nepovoljni reakcijski uvjeti za provođenje redukcijских reakcija u ovakvim zelenim otapalima, povećanje udjela vode koje može narušiti strukturu otapala, ali i moguće neadekvatno rukovanje staničnom kulturom prilikom pripreme reakcijskih smjesa.



**Slika 18.** Stupnjevi konverzije i enantiomerni višak za enantioselektivnu redukciju acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u niskotemperaturnim eutektičkim otopalima (B:Suc), (B:MA:Glc) i (ChCl:Xylol) s različitim udjelima (%) vode

Reakcijski uvjeti: 50  $\mu\text{L}$  supstituiranog acetofenona ( $400 \text{ mg mL}^{-1}$ ); 200  $\mu\text{L}$  resuspendirane stanične kulture *L. brevis* MB1; 9,8 mL niskotemperaturnog eutektičkog otopala; 48 sati;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $75 \text{ min}^{-1}$ .

Kratice: betain : saharoza (BSuc50 %, 80 %), betain : jabučna kiselina : glukoza (B:MA:Glc30 %, 50 %, 80 %) i kolin-klorid : ksilitol (ChCl:Xylol30 %, 50 %, 80 %)

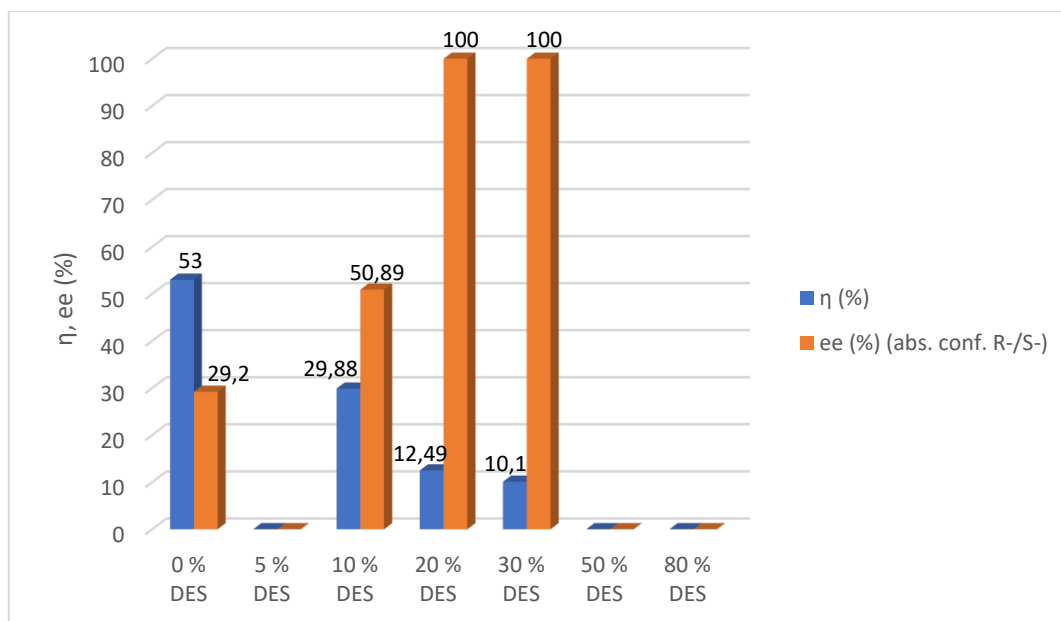
Kao rješenje za poboljšanje provedbe reakcije redukcije acetofenona u navedenim otopalima, predlaže se primjena produktivnijeg soja bakterija mliječne kiseline, uz optimizaciju koncentracije supstrata. Nadalje, moguće je vidjeti da *L. brevis* MB1 u ovom slučaju pokazuje visoku enantioselektivnost prema (*S*)-alkoholu, što može značiti da prisutnost niskotemperaturnog eutektičkog otopala kao reakcijskog medija, zajedno s primijenjenim reakcijskim uvjetima, potencijalno utječe na enantioselektivnost biokatalizatora. S obzirom na dobivene rezultate, niskotemperaturno eutektičko otopalo B:MA:Glc s 30 % vode najviše pogoduje soju *L. brevis* MB1 za pretvorbu acetofenona u (*S*)-1-feniletanol, što se može objasniti niskom pH vrijednošću ovog otopala ( $\text{pH} = 2,66$ ), koja je bliska pH vrijednosti mliječne kiseline i odgovora optimalnoj pH vrijednosti medija za provođenje reakcija pomoću bakterija mliječne kiseline (Hatti-Kaul i sur., 2018). Stoga je otopalo B:MA:Glc s 30 % vode odabrano kao pogodno niskotemperaturno eutektičko otopalo za provedbu optimizacije reakcije redukcije acetofenona.

#### 4.2.3. Optimizacija reakcije redukcije acetofenona provedene pomoću *L. brevis* MB1 u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Prilagođavanje procesnih parametara provodi se radi postizanja maksimalnog stupnja konverzije i enantiomernog viška biokatalitičke reakcije koja se provodi u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Osim provođenja optimizacije koncentracije supstrata i produkata, pH, temperature, vremena inkubacije i brzine miješanja, uvode se nove tehnike poput imobilizacije biokatalizatora, razvoja dvofaznih sustava i prethodne obrade enzima ili stanica. Također, odabir odgovarajućeg niskotemperaturnog eutektičkog otapala za određeni biokatalitički sustav glavni je dio optimizacije biokatalitičkog procesa budući da izravno utječe na pH, polarnost i viskoznost medija, kao i na učinak biokatalizatora i topljivost supstrata, odnosno proizvoda (Baydaş i sur., 2020; Panić i sur., 2020).

Provedena je optimizacija reakcije redukcije acetofenona uz primjenu bakterije mliječne kiseline *L. brevis* MB1 kao biokatalizatora u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu B:MA:Glc s 30 % vode. Prvi način provođenja optimizacije reakcije redukcije acetofenona uključivao je dodatak određenog volumnog udjela otapala B:MA:Glc s 30 % vode u hranjivu podlogu, u rasponu od 0 do 80 % (v/v) navedenog otapala u reakcijskoj smjesi. Drugi način provođenja optimizacije reakcije redukcije acetofenona uključivao je primjenu ultrazvuka u različitom vremenskom trajanju od 15, 30 i 60 minuta. Nakon provedene optimizacije reakcije redukcije acetofenona, dobivene su vrijednosti stupnjeva konverzije ( $\eta$ ) i enantiomernog viška reakcije ( $ee$ ) prema izrazima [2] i [3] uz pomoć analize plinskih kromatograma (slike 19 i 20). Na temelju rezultata prikazanih na slici 19, moguće je zaključiti da prisutnost određenog udjela niskotemperaturnog eutektičkog otapala u hranjivoj podlozi utječe na stupanj konverzije i enantiomerni višak reakcije redukcije acetofenona, pri čemu povećanjem volumnog udjela otapala BMAGlc30 % dolazi do smanjenja stupnja konverzije i povećanja enantiomernog viška reakcije. Uspoređujući dobivene vrijednosti stupnjeva konverzije i enantiomernog viška, zapaženo je da su spomenute vrijednosti znatno niže u hranjivoj podlozi s određenim udjelom otapala BMAGlc30 % u odnosu na iste vrijednosti dobivene u čistoj hranjivoj podlozi. Uz izuzetak dobivenih rezultata za reakciju redukcije acetofenona u hranjivoj podlozi bez niskotemperaturnog eutektičkog otapala, najveći stupanj konverzije i enantiomerni višak reakcije postignuti su u hranjivoj podlozi s 10 % otapala BMAGlc30 % te iznose 29,88 %, odnosno 50,89 %, dok su u hranjivoj podlozi s 5, 50 i 80 % otapala BMAGlc30 % navedene vrijednosti najniže i iznose 0 %.



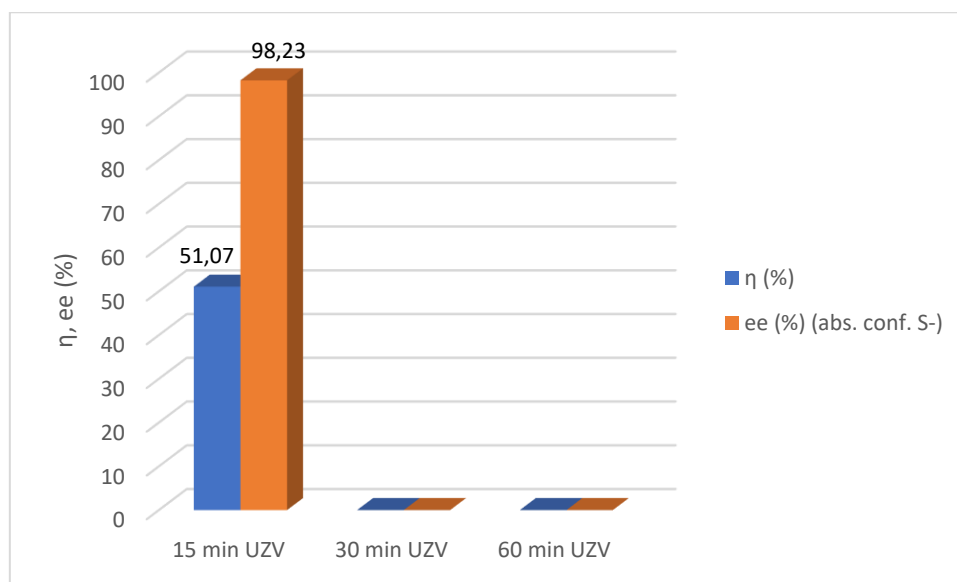


**Slika 19.** Stupnjevi konverzije i enantiomerni višak dobiveni optimizacijom enantioselektivne redukcije acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u hranjivoj podlozi s različitim udjelima niskotemperaturnog eutektičkog otapala B:MA:Glc s 30 % vode (0, 5, 10, 20, 30, 50 i 80 % BMAGlc30 %)

Reakcijski uvjeti: 25  $\mu$ L supstituiranog acetofenona ( $400 \text{ mg mL}^{-1}$ ); 100  $\mu$ L resuspendirane stanične kulture *L. brevis* MB1; 48 sati; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 75  $\text{min}^{-1}$ .

Hranjiva podloga s određenim volumnim udjelom niskotemperaturnog eutektičkog otapala primjenjena je za povećanje učinkovitosti reakcije, pri čemu eutektičko otapalo djeluje kao ko-otapalo s velikim potencijalom u biokatalitičkoj redukciji. Dodatkom niskotemperaturnog eutektičkog otapala u hranjivu podlogu može se utjecati na poboljšanje određenih fizikalno-kemijskih svojstava, primjerice topljivosti supstrata, ali i na stabilnost i aktivnost biokatalizatora. Međutim, primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala koja u svom sastavu sadrže organske kiseline kao donore vodikovih veza, može rezultirati drastičnim promjenama u pH vrijednosti pripremljenog reakcijskog medija. Isto tako, prisutnost oksalne i jabučne kiseline kao donora vodikove veze povezana je s negativnim djelovanjem na stanice, što ukazuje na njihovu visoku toksičnost za stanice (Pätzold i sur., 2019; Xu i sur., 2016). Shodno tome, može se pretpostaviti da u hranjivoj podlozi s 10 % otapala BMAGlc30 % dolazi do povećanja stabilnosti biokatalizatora, zbog čega je ostvaren najviši stupanj konverzije i enantiomerni višak reakcije, dok u hranjivim podlogama s većim volumnim udjelom otapala BMAGlc30 % vjerojatno dolazi do promjene pH vrijednosti medija, što uzrokuje smanjenje aktivnosti biokatalizatora, zbog čega u hranjivim podlogama s 50 i 80 % otapala BMAGlc30 % nije došlo do pretvorbe acetofenona u odgovarajući alkohol. Isto tako, moguće je zaključiti da se povećanjem volumnog udjela otapala BMAGlc30 % u hranjivoj podlozi mijenja

enantioselektivnost biokatalizatora *L. brevis* MB1, pri čemu isti pokazuje visoku selektivnost prema (*R*)-1-feniletanolu u čistoj hranjivoj podlozi i hranjivim podlogama s 10 i 20 % otapala BMAGlc30 %, dok visoku selektivnost prema (*S*)-1-feniletanolu ima u hranjivoj podlozi s 30 % otapala BMAGlc30 %.



**Slika 20.** Stupnjevi konverzije i enantiomerni višak dobiveni optimizacijom enantioselektivne redukcije acetofenona pomoću *L. brevis* MB1 u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu B:MA:Glc s 30 % vode uz primjenu ultrazvuka

Reakcijski uvjeti: 25  $\mu\text{L}$  supstituiranog acetofenona ( $400 \text{ mg mL}^{-1}$ ); 100  $\mu\text{L}$  resuspendirane stanične kulture *L. brevis* MB1; 4,9 mL otapala B:MA:Glc s 30 % vode; 48 sati; 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 75  $\text{min}^{-1}$ .

Ultrazvuk je tehnika kojom se stvara kavitacija uvođenjem ultrazvučnih valova u tekući medij preko rezonirajuće sonde. Kavitacija nastaje kada se mjehurići pare tekućine formiraju na mjestu gdje je tlak tekućine niži od tlaka pare tekućine. Mjehurići se šire pod negativnim tlakom i stisnu pod pozitivnim tlakom, uzrokujući snažan raspad ovih mjehurića. Sposobnost ultrazvuka da djeluje kao metoda za razaranje stanične stijenke bakterija, temelji se na primjeni prikladnih kavitacijskih sila pri razaranju stanične stijenke, što uvelike ovisi o sastavu stanične stijenke (Nemer i sur., 2021). Međutim, ultrazvuk može značajno utjecati na gubitak strukture i aktivnosti molekula prisutnih unutar stanica te posljedično dovesti do njihovog potpunog uništenja, uzrokujući fragmentaciju bakterijskih stanica (Peternel, 2013). Rezultati prikazani na slici 20 ukazuju na uspješnost primjene ultrazvuka kao metode za razaranje stanične stijenke bakterija i povećanje uspješnosti biokatalitičke redukcije. Stupanj konverzije i enantiomerni višak reakcije redukcije acetofenona uz tretman ultrazvukom u trajanju od 15 minuta iznose redom 51,07 % i 98,23 %, dok vrijednosti istih uz tretman ultrazvukom u trajanju od 30 i 60

minuta iznose 0 %. Isto tako, bolji stupanj konverzije ostvaren je primjenom ultrazvuka u trajanju od 15 minuta u odnosu na isti postignut za otapalo BMAGlc30 % bez tretmana ultrazvukom (10,1 %). Shodno dobivenim rezultatima, tretman ultrazvukom u trajanju od 15 minuta pokazao se najpogodnijom metodom za ostvarenje najvećeg stupnja konverzije reakcije redukcije acetofenona pomoću biokatalizatora *L. brevis* MB1 s visokom enantioselektivnosti prema (*S*)-alkoholu u otapalu BMAGlc30 %. S obzirom na negativne rezultate tretmana ultrazvukom u trajanju od 30 i 60 minuta, moguće je pretpostaviti da je došlo do potpune fragmentacije stanica te narušavanja strukture alkohol dehidrogenaza prisutnih u stanicama, što je moglo rezultirati njihovom inaktivacijom.

Općenito, u ovom su radu pripremljena nova niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita, predstavljena kao *zelen*a otapala koja, uz daljnja istraživanja, mogu pronaći primjenu u biotransformacijskim procesima. Isto tako, probirom mikroorganizama, supstrata i niskotemperaturnih eutektičkih otapala te optimizacijom biokatalitičkih procesa moguće je utjecati na stupanj konverzije i enantioselektivnost biokatalizatora prema produktima dobivenim pretvorbom susptituiranih acetofenona pomoću bakterija mliječne kiseline. Kreiranjem novih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i njihovom upotrebom u biokatalitičkim procesima, omogućuje se stvaranje održivijih i *zelenijih* procesa.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu dizajnirana su nova niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita uz primjenu računalnog programa COSMO $thermX$ , nakon čega su ispitana fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih otapala. Isti program primijenjen je za ispitivanje topljivosti supstituiranih acetofenona u odabranim i pripremljenim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima u svrhu probira najpogodnijeg otapala za postavljanje biokatalitičke reakcije. U odabranom otapalu postavljena je reakcija enantioselektivne redukcije acetofenona, modelnog supstrata, pomoću bakterije mliječne kiseline *L. brevis* MB1 kao najpogodnijeg biokatalizatora kako bi se ispitao utjecaj niskotemperaturnog eutektičkog otapala kao reakcijskog medija na ponašanje primijenjenog biokatalizatora. Optimizacija reakcije redukcije provedena je mijenjanjem volumnog udjela niskotemperaturnog eutektičkog otapala u hranjivoj podlozi i tretiranjem bakterijskih stanica ultrazvukom.

Na temelju provedenog eksperimentalnog rada i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Primjenom računalnog programa COSMO $thermX$ -a moguće je predvidjeti eutektički sastav potencijalnog eutektičkog otapala, čime je omogućena brza i jednostavna eksperimentalna provjera predviđenih eutektičkih sastava ispitanih sustava. Uspješno su pripremljena tri niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita, U:Gly (3:7), U:Sol (3:2) s masenim udjelom vode od 3 % i U:Suc (4:1) uz dodatak 20 %, što ukazuje na veliku pogodnost primjene COSMO $thermX$ -a za dizajniranje novih eutektičkih otapala.
2. Fizikalno-kemijska svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala značajno ovise o prirodi donora i akceptora vodikove veze i njihovom molarnom omjeru. Karakterizirana otapala (U:Sol:ChCl:B:Tau:H<sub>2</sub>O, TMAO:U:Gly, TMAO:Sol:U:H<sub>2</sub>O, TMAO:U:H<sub>2</sub>O, U:Suc i U:Gly) su slabo viskozna do viskozna i neutralna do blago lužnata otapala male polarnosti koja imaju gustoću sličnu gustoći većine eutektičkih otapala pri sobnoj temperaturi.
3. Procjenu topljivosti supstituiranih acetofenona moguće je provesti upotrebom računalnog programa COSMO $thermX$ , što omogućuje brzi probir niskotemperaturnih eutektičkih otapala za primjenu u biokatalitičkim procesima. Visoke vrijednosti koeficijenta  $\ln(\gamma_\infty)$  u programu COSMO $thermX$  procijenjene su za većinu ispitanih

otapala, što ukazuje na nepogodnost primjene istog za procjenu topljivosti supstrata u odabranim otapalima. S obzirom na povoljne fizikalno-kemijske karakteristike, odabrana otapala BSuc50%, BSuc80 %, B:MA:Glc30%, B:MA:Glc50 %, B:MA:Glc80%, ChCl:Xylol30 %, ChCl:Xylol50 %, ChCl:Xylol80 % s većim masenim udjelom vode pogoduju boljem prijenosu mase supstrata i produkata i održavanju katalitičke aktivnosti stanica.

4. Uspoređujući stupanj konverzije i enantiomerni višak reakcije enantioselektivne redukcije supstituiranih acetofenona u (*S*)-, odnosno (*R*)-alkohol pomoću bakterija mliječne kiseline *L. fermentum* MC1 i *L. brevis* MB1 u hranjivoj podlozi, najuspješnija je reakcija redukcije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol pomoću soja *L. brevis* MB1, u kojoj je ostvaren stupanj konverzije od 53 % i enantiomerni višak na stranu (*R*)-enantiomera od 29,2 %. *L. brevis* MB1 pokazuje se obećavajućim biokatalizatorom za daljnja istraživanja reakcije redukcije acetofenona kao modelnog supstrata.
5. Na temelju dobivenog stupnja konverzije i enantiomernog viška reakcije u odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (BSuc50%, BSuc80 %, B:MA:Glc30%, B:MA:Glc50 %, B:MA:Glc80%, ChCl:Xylol30 %, ChCl:Xylol50 %, ChCl:Xylol80 %), enantioselektivna redukcija acetofenona u (*S*)-alkohol pomoću soja *L. brevis* MB1 najuspješnija je u otapalu B:MA:Glc30%, uz ostvareni stupanj konverzije od 10,1 % i enantiomerni višak na stranu (*S*)-enantiomera od 100 %. Niskotemperaturno eutektičko otapalo, zajedno s primijenjenim reakcijskim uvjetima, može značajno utjecati na enantioselektivnost biokatalizatora.
6. Prema stupnjevima konverzije i enantiomernom višku reakcije ostvarenim prilikom optimizacije enantioselektivne redukcije acetofenona u (*R*)-, odnosno (*S*)-alkohol pomoću soja *L. brevis* MB1, tretman ultrazvukom u trajanju od 15 minuta u otapalu B:MA:Glc30% najuspješnija je metoda optimizacije u kojoj je ostvaren stupanj konverzije od 51,07 % i enantiomerni višak na stranu (*S*)-enantiomera od 98,23 %.
7. Niskotemperaturno eutektičko otapalo B:MA:Glc30% pogodno je za provedbu enantioselektivne redukcije acetofenona do (*S*)-alkohola pomoću soja *L. brevis* MB1 s obzirom da je postignuti enantiomerni višak veći u odnosu na isti postignut u hranjivoj podlozi. Općenito, provođenje enantioselektivne redukcije acetofenona pomoću bakterija mliječne kiseline u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima rezultira većim enantiomernim viškom, ali nižim stupnjem konverzije. U svrhu povećanja iskorištenja reakcije potrebno je provesti daljnju optimizaciju enantioselektivne redukcije acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.

## 6. LITERATURA

Abranches DO, Silva LP, Martins MAR, Pinho SP, Coutinho JAP (2020) Understanding the Formation of Deep Eutectic Solvents: Betaine as a Universal Hydrogen Bond Acceptor. *Chem Sus Chem* **13**, 4916-4921.

Aparecida de Marco B, Rechelo BS, Gandolpho Tòtoli E, Kogawa AC, Nunes Saldago H R (2019) Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharm J* **27**, 1-8.

Baydaş Y, Dertli E, Şahin E (2020) Green synthesis of chiral aromatic alcohols with *Lactobacillus kefir* P2 as a novel biocatalyst. *Synth Commun* **50**, 1035-1045.

Benworth BH, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, i sur. (2021) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **121**, 1232–1285.

Cano-Flores A, Gómez J, Escalona-Torres IS, Velasco-Bejarano B (2020) Microorganisms as Biocatalysts and Enzyme Sources. U: Blumenberg M, Shaaban M, Elgaml A (ured.) *Microorganisms*, 1. izd., IntechOpen, London, str. 1-32.

Choi YH, Spronsen Y, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends WCEI, i sur. (2011) Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol* **156**, 1701–1705.

Croom E (2012) Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci* **112**, 31-88.

Cvjetko Bubalo M, Panić M, Radošević K, Radojčić Redovniković I (2016) Methods for deep eutectics solvents preparation. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 164-168.

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

Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green Solvents for Green Technologies. *J Chem Technol Biotechnol* **90**, 1631-1639.

Czech L, Hermann L, Stöveken N, Richter AA, Höppner A, Smits SHJ, i sur. (2018) Role of the Extremolytes Ectoine and Hydroxyectoine as Stress Protectants and Nutrients: Genetics, Phylogenomics, Biochemistry, and Structural Analysis. *Genes* **9**, 177.

Fontanille P, Gros JB, Larroche C (2006) Biotransformations with Crude Enzymes and

- Whole Cells. U: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C (ured.) Enzyme Technology, 1. izd., Springer, New York, str. 123-155.
- Fryszkowska A, Devine PN (2020) Biocatalysis in drug discovery and development. *Curr Opin Chem Biol* **55**, 151-160.
- Galvão WS, Pinheiro BB, Golçalves LRB, de Mattos MC, Fonseca TS, Regis T, i sur. (2018) Novel nanohybrid biocatalyst: application in the kinetic rezolutan of secondary alcohols. *J Mater Sci* **53**, 14121–14137.
- Garzón-Posse F, Becerra-Figueroa L, Hernández-Arias J, Gamba-Sánchez D (2018) Whole Cells as Biocatalysts in Organic Transformations. *Molecules* **23**, 1265.
- Giordano RC, Ribeiro MP, Giordano RL (2006) Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnol Adv* **24**, 27-41.
- Grogan G (2009) Practical Biotransformations: A Beginner's Guide, 1. izd., A John Wiley and Sons, Ltd., str. 1-39.
- Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A (2018) Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review). *J Emerg Technol Innov Res* **5**, 411-424.
- Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, i sur. (2021) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **121**, 1232–1285.
- Hatti-Kaul R, Chen L, Dishisha T, Enshasy HE (2018) Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiol Lett* **365**, 213-233.
- Hegazy ME, Mohamed TA, ElShamy AI, Mohamed AE, Mahalel UA, Reda EH, i sur. (2015) Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. *J Adv Res* **6**, 17-33.
- Huang LH, Li J, Xu G, Zhang XH, Wang YG, Yin YL, i sur. (2010) Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with *Penicillium griseopurpureum* Smith and *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. *Steroids* **75**, 1039-1046.
- Ivanković A, Dronjić A, Martinović Bevanda A, Talić S (2017) Review of 12 Principles of Green Chemistry in Practice. *Int J Sustain Energy* **6**, 39-48.
- Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY, Lee J (2017) Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J Clean Prod* **151**, 87-95.
- Kaushik N, Biswas S, Singh J (2014) Biocatalysis and Biotransformation Processes – An

Insight. *The Scitech Journal* **01**, 15-22.

Khan S, Bano Z, Singh LR, Hassan MI, Islam A, Ahmad F (2013) Testing the ability of non-methylamine osmolytes present in kidney cells to counteract the deleterious effects of urea on structure, stability and function of proteins. *PLoS One* **8**, 72533.

Klamt A, Jonas V, Burger T, Lohrenz JCW (1998) Refinement and parametrization of COSMO-RS. *J Phys Chem A* **102**, 5074-5085.

Kushwah N, Jain V, Yadav D (2020) Osmolytes: A Possible Therapeutic Molecule for Ameliorating the Neurodegeneration Caused by Protein Misfolding and Aggregation. *Biomolecules* **10**, 132.

Li CJ, Trost BM (2008) Green chemistry for chemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 13197-13202.

Lin B, Tao Y (2017) Whole-cell biocatalysts by design. *Microb Cell Fact* **16**, 106.

Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M, i sur. (2020) Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* **6**, 23-44.

Muñoz Solano D, Hoyos P, Hernáiz MJ, Alcántara AR, Sánchez-Montero JM (2012) Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour Technol* **115**, 196-207.

Musa MM (2022) Alcohol Dehydrogenases with anti-Prelog Stereopreference in Synthesis of Enantiopure Alcohols. *ChemistryOpen* **11**, 1.

Nemer G, Louka N, Vorobiev E, Salameh D, Nicaud JM, Maroun RG i sur. (2021) Mechanical Cell Disruption Technologies for the Extraction of Dyes and Pigments from Microorganisms: A Review. *Ferment* **7**, 36.

NIST Chemistry WebBook, <<https://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Pristupljeno 01.09.2022.

O'Donnell NH, Møller BL, Neale AD, Hamill JD, Blomstedt CK, Gleadow RM (2013) Effects of PEG-induced osmotic stress on growth and dhurrin levels of forage sorghum. *Plant Physiol Biochem* **73**, 83-92.

Ogihara W, Aoyama T, Ohno H (2004) Polarity Measurement for Ionic Liquids Containing Dissociable Protons. *Chem Lett* **33**, 1414-1415.

Paiva P, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural Deep Eutectic Solvents-Solvents for the 21st Century. *ACS Sus Chem Eng* **2**, 1063-1071.

Pan SY, Fan C, Lin YP (2019) Development and Deployment of Green Technologies for Sustainable Environment. *Environments* **6**, 114.



- Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2020) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. *J Chem Technol Biotechnol* **96**, 14-30.
- Pappenberger G, Hohmann HP (2014) Industrial Production of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) and D-Isoascorbic Acid. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **143**, 143-188.
- Parmar A, Kumar H, Marwaha SS, Kennedy JF (2000) Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnol Adv* **18**, 289-301.
- Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syltatk C, Holtmann D (2019) Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends Biotechnol* **37**, 943-959.
- Peternel Š (2013) Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production. *N Biotechnol* **30**, 250-254.
- Pinto A, Contente ML, Tamborini L (2020) Advances on whole-cell biocatalysis in flow. *Curr Opin Green Sustain Chem* **25**, 100343.
- PubChem – Urea, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=urea>  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=urea>>. Pristupljeno 21.08.2022.
- Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Slivac I, Gaurina Srček V, Radojčić Redovniković I (2016) Green technology meets ecotoxicology. *Croat J Food Sci Technol* **8**, 120-128.
- Sheldon RA, Brady D (2013) The Limits to Biocatalysis: Pushing the Envelope. *Chem Commun* **00**, 1-3.
- Singh LR, Ali Dar T, Haque I, Anjum F, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F (2007) Testing the paradigm that the denaturing effect of urea on protein stability is offset by methylamines at the physiological concentration ratio of 2:1 (urea:methylamines). *Biochim Biophys Acta* **1774**, 1555-1562.
- Smitha MS, Singh S, Singh R (2017) Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access* **4**, 00085.
- Song Z, Wang J, Sundmacher K (2021) Evaluation of COSMO-RS for solid–liquid equilibria prediction of binary eutectic solvent systems. *Green Energy Environ* **6**, 371-379.
- Straathof AJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 548 – 556.
- Teng X, Ichiye T (2020) Dynamical Model for the Counteracting Effects of Trimethylamine N-Oxide on Urea in Aqueous Solutions under Pressure. *J Phys Chem B* **124**, 1978-1986.
- Vasić-Rački Đ (2006) History of industrial biotransformations—dreams and realities. U: Liese A, Seelbach K, Wandrey K (ured.) *Industrial biotransformations*, 2. izd., Wiley-VCH

Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 1 – 36.

Zeng CX, Qi SJ, Xin RP, Yang B, Wang YH (2016) Synergistic behavior of betaine–urea mixture: Formation of deep eutectic solvent. *J Mol Liq* **219**, 74-78.

Wei P, Liang J, Cheng J, Zong MH, Lou WY (2016) Markedly improving asymmetric oxidation of 1-(4-methoxyphenyl) ethanol with *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells by adding deep eutectic solvent in a two-phase system. *Microb Cell Fact* **15**, 5.

Winkler CK, Schrittwieser JH, Kroutil W (2021) Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. *ACS Cent Sci* **7**, 55-71.

Wojeicchowski JP, Ferreira AM, Abranches DO, Mafra MR, Coutinho JAP (2020) Using COSMO-RS in the Design of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Antioxidants from Rosemary. *ACS Sustainable Chem Eng* **8**, 12132-12141.

Xu P, Du PX, Zong MH, Li N, Lou WY (2016) Combination of deep eutectic solvent and ionic liquid to improve biocatalytic reduction of 2-octanone with *acetobacter pasteurianus* GIM1.158 cell. *Sci Rep* **6**, 26158.

Yancey PH (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**, 2819-2830.

Yancey PH, Burg MB (1989) Distribution of major organic osmolytes in rabbit kidneys in diuresis and antidiuresis. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol* **257**, 602-607.

Yılmaz D, Şahin E, Dertli E (2017) Highly Enantioselective Production of Chiral Secondary Alcohols Using *Lactobacillus paracasei* BD101 as a New Whole Cell Biocatalyst and Evaluation of Their Antimicrobial Effects. *Chem Biodivers* **14**, 1.

## 7. PRILOZI

### 7.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA

Ala = alanin

B = betain

ChCl = kolin-klorid

COSMO-RS = engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*

def-TZVP = engl. *default Triple-Zeta Valence Polarized*

DES = niskotemperaturna eutektska otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*)

DFT teorije = engl. *Density Functional Theory*

DHEA = dehidroepiandrosteron (engl. *Dehydroepiandrosterone*)

EG = etilen-glikol

ee = enantiomerni višak (engl. *enantiomeric excess*)

Fru = fruktoza

GC-MS = plinski kromatograf s masenim spektrometrom

Glc = glukoza

Glu = glutamin

Gly = glicerol

GRAS = engl. *Generally Regarded As Safe*

HBA = akceptor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*)

HBD = donor vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*)

ILs = ionske tekućine (engl. *Ionic Liquids*)

Inol = *mio*-inozitol

$\ln(\gamma_\infty)$  = logaritam koeficijenta aktivnosti

MA = malična kiselina

Mol = manitol

MRS bujon = engl. *De Man, Rogosa, Sharpe broth*

NADES = prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*)

OsmoDES = niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita (engl. *osmolyte-based Deep Eutectic Solvents*)

Pro = prolin

$R_t$  = retencijsko vrijeme

SDF format = engl. *Spatial Data File*

SLE opcija = engl. *Solid-Liquid Equilibria*

Sol = sorbitol

Sor = sorboza

Suc = saharoza

Tau = taurin

$T_{eut}$  = temperatura pri kojoj se postiže eutektički sastav

TMAO = trimetilamin-N-oksid (engl. *trimethylamine-N-oxide*)

U = urea

$X_{eut}$  = računalno proračunati molarni sastav akceptora vodikove veze

Xyl = ksiloza

Xylol = ksilitol

6-APA = 6-aminopenicilanska kiselina (engl. *6-aminopenicillanic acid*, 6-APA)

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja KARLA DEMIR izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis