

Enantioselektivna bioredukcija ketona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Lacić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:751288>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij biotehnologije

Petra Lacić

7368/BT

**ENANTIOSELEKTIVNA BIOREDUKCIJA KETONA U
NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**
ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo

Zagreb, 2021.

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na prenesenom znanju, razumijevanju, uloženom trudu, strpljenju i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i mag. Ing. Miji Radović, dr. sc. Manueli Panić te ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na prenesenom znanju i nesebičnoj pomoći tijekom čitavog obavljanja praktičnog dijela.

Posebno hvala cijeloj mojoj obitelji, dečku i svim prijateljima na pruženoj podršci i motivaciji tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ENANTIOSELEKTIVNA BIOREDUKCIJA KETONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Petra Lacić, 0058210429

Sažetak: Posljednjih godina nastoji se smanjiti upotreba organskih hlapljivih otapala zbog negativnog utjecaja na okoliš. Takva otapala se pristupom zelene kemije nastoje zamijeniti prirodnom alternativom koja ne štodi ljudskom zdravlju i okolišu. Nova generacija takvih otapala su niskotemperaturna eutektička otapala (engl. Deep Eutectic solvents, DES) koja karakteriziraju jednostavna sinteza, niska hlapljivost, biorazgradivost. U ovom radu provedena je reakcija enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona katalizirane enzimima pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u niskotemperaturnom eutektskom otapalu kolin klorid:etilen-glikol s različitim masenim udjelima vode. Također, ispitana je i vijabilnost stanica te utjecaj predtretmana stanica kvasca kuglicama na konverziju reakcije i stereoselektivnost biokatalizatora. S obzirom na rezultate konverzije i enantiomerni višak DES su se pokazala kao povoljan izbor za bioredukciju kao i korištenje kvasca kao biokatalizatora u odnosu na pufer.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 13 slika, 6 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: Hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: mag. ing. Mia Radović

Datum obrane: rujna, 2021

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

ENANTIOSELECTIVE BIOREDUCTION OF KETONES IN NATURAL LOW TEMPERATURE DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Petra Lacić, 0058210429

Abstract: In recent years, efforts have been made to reduce the use of organic volatile solvents due to the negative impact on the environment. With the approach of green chemistry, such solvents are being replaced by a natural alternative that does not harm human health and the environment. A new generation of such solvents are low temperature deep eutectic solvents characterized by simple synthesis, low volatility, biodegradability. In this study, the enantioselective reduction of halogenated acetophenone catalyzed by enzymes of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in low temperature deep eutectic solvents choline chloride:ethylene-glycol with different water contents was performed. Also, cell viability and the influence of yeast cell pretreatment with beads on the reaction yield and stereoselectivity of biocatalysts were examined. Given the results of utilization and enantiomeric excess DES have been proved to be a favorable choice for bioreduction as well as the use of yeast as a biocatalyst compared to buffer.

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

Thesis contains: 34 pages, 13 figures, 6 tables, 50 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Marina Cvjetko Bubalo

Technical support and assistance: Mia Radović, M. Ing

Defence date: September 2021

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Biotransformacije	2
2.1.1. Primjena kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u biokatalitičkim reakcijama	3
2.1.1.1. Asimetrična redukcija prokiralnih ketona primjenom <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2. Ekološki prihvatljiva otapala.....	4
2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala	6
2.2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biokatalizi	8
2.2.3. Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala	9
3. Eksperimentalni dio	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Kemikalije	11
3.1.2. Biokatalizator	11
3.1.3. Otopine i puferi	11
3.1.4. Oprema i uređaji	11
3.2. Metode rada.....	12
3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala	12
3.2.2. Enantioselektivna asimetrična redukcija halogeniranog acetofenona katalizirana pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
3.2.3. Identifikacija halogeniranog acetofenona	15
3.2.4. Predtretman pekarskog kvasca <i>S.cerevisiae</i> lizom stanica pomoću kuglica	17
3.2.5. Vijabilnost <i>S. cerevisiae</i> u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	18
3.2.5.1. Mjerenje optičke gustoće kvašćevih stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	18
3.2.5.2. Praćenje rasta stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	18
4. Rezultati i rasprava	20
4.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala	20

4.2. Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona katalizirana pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
4.2.1. Predtretman pekarskog kvasca <i>S. cerevisiae</i> lizom stanica pomoću kuglica	23
4.3. Vijabilnost <i>S. cerevisiae</i> u niskotemperaturnim eutektskim otapalima	24
4.3.1. Praćenje rasta stanica tijekom inkubacije	24
4.3.2. Mehanizam djelovanja DES-a na stanice kvasca	26
5. Zaključci	29
6. Literatura	30

1. UVOD

U mnogim industrijskim procesima korištene su velike količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala u reakcijskim sustavima. Takva upotreba uveliko utječe na onečišćenje okoliša koje je posljednjih godina sve veći problem zbog globalnih promjena. Upravo zbog toga rastuće područje istraživanja u razvoju zelenih tehnologija posvećeno je projektiranju novih, ekološki prihvatljivih otapala čija bi upotreba zadovoljila tehnološke i ekonomske zahtjeve.

Prema načelima zelene kemije, idealno otapalo trebalo bi biti netoksično, kemijski i fizički stabilno, imati nisku hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe te biti jednostavno za rukovanje (Cvjetko, 2012). Poseban naglasak stavlja se na zelena otapala među kojima se ističu niskotemperaturna eutektička otapala koja karakteriziraju niska hlapljivost, netoksičnost, biorazgradivost, jednostavna sinteza, niska cijena, velika sposobnost otapanja te izvedivost strukturnog dizajna (Hou i sur., 2018).

Danas, kemijska i farmaceutska industrija suočava se sa zahtjevom visoke enantiomerne čistoće biološki aktivnih kiralnih spojeva u proizvodnji lijekova. Jedna od najvažnijih reakcija u proizvodnji intermedijera i prekursora kiralnih lijekova je asimetrična redukcija ketona u prokiralne alkohole. U skladu sa zahtjevima zelene kemije taj proces se provodi primjenom enzima ili cijelih stanica. Pekarski kvasac je idealan biokatalizator za industrijsku primjenu jer je jeftin, lako dostupan i dobro proučen mikroorganizam, posjeduje GRAS status, a karakterizira ga netoksičnost, biološka razgradivost i lagano rukovanje (Cvjetko Bubalo i sur., 2015c; Xiao i sur., 2012).

Cilj ove studije bio je provesti reakciju asimetrične redukcije halogeniranog acetofenona u svrhu nastajanja optički aktivnog alkohola za sintezu lijekova udružujući dva zelena pristupa: (1) pristup biokatalize primjenom biokatalizatora *Saccharomyces cerevisiae* te (2) upotreba ekološki prihvatljivih otapala – niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. Deep Eutectic Solvents , DES).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biotransformacije

Biotransformacije su enzimski katalizirane pretvorbe organskih spojeva, odnosno enzimске modifikacije definiranih čistih spojeva u definirane konačne produkte (Bommarius i Riebel, 2004). Takvi procesi najveću primjenu imaju u farmaceutskoj industriji, osobito zbog velike potražnje za enantiomerno čistim lijekovima u posljednjih nekoliko godina. Jedna od najznačajnijih biotransformacija u farmaceutskoj industriji je reakcija enantioselektivne hidrolize pri čemu se dobiva 6-aminopenicilinska kiselina iz prirodnog penicilina primjenom enzima penicilin-acilaze. Primjena biokatalitičkih reakcija povećana je zadnjih godina zahvaljujući dostignućima u razumijevanju strukture i funkcije proteina. Prisustvo katalizatora omogućuje drugi reakcijski put sa smanjenom energijom aktivacije, što rezultira većom brzinom reakcije pri istoj temperaturi i istoj koncentraciji reaktanata (Masel, 2001). Biokatalizatori su prihvatljivi za okoliš, jer su potpuno biorazgradivi i pritom bezopasni za okoliš, stvaraju manje otpada te je takav bioproces energetski učinkovit (Milner i Maguire, 2012). U usporedbi sa uobičajenim katalizatorima, biokatalizatori pokazuju brojne prednosti poput visoke stereo-, regio-, kemo- i enantioselektivnosti. Uglavnom su stabilni i aktivni u uvjetima koji se slažu sa principima zelene kemije i tehnologije, netoksični su, biorazgradivi i ponekad ih je moguće reciklirati. Ipak, upotreba biokatalizatora ima i svoje nedostatke koji su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci upotrebe biokatalizatora (Milner i Maguire, 2012)

PREDNOSTI	NEDOSTATCI
Visoka supstratna regio- i enantioselektivnost	Ograničena supstratna specifičnost
Netoksičnost	Smanjena stabilnost
Biorazgradivost	Ograničena uporaba enzima
Povećana brzina reakcije	Inaktivacija enzima temperaturom, pH, supstratom i/ili produktom

Biokatalizatori mogu biti čiste kulture mikroorganizama (kvasci, bakterije, plijesni i alge), sirovi ili pročišćeni enzimi, biljne i životinjske stanice i tkiva te umjetni enzimi (abzimi) (Grogan, 2009a). Biokatalizatori u biotransformacijama često smanjuju broj reakcijskih stupnjeva te osiguravaju

nastajanje željenog produkta u samo jednom koraku, povećanje prinosa produkta i vođenje procesa u blagim reakcijskim uvjetima.

2.1.1. Primjena kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u biokatalitičkim reakcijama

Kvasci su eukariotski jednostanični mikroorganizmi svrstani u carstvo gljiva koji imaju mogućnost fermentacije. Fermentacija je metabolički proces pretvorbe organskih supstrata uz korištenje katalizatora, točnije pretvorbe šećera u ugljikov dioksid i alkohol. Upravo zbog te činjenice, primjena kvasca u industrijskim procesima poput proizvodnje alkoholnih pića, biomase (pekarski i krmni kvasac) i različitih metaboličkih produkata je široko rasprostranjena. Jedan od najpoznatijih i najčešće upotrebljivanih mikroorganizama jest pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae se zbog svoje dostupnosti i cijene (u usporedbi s većinom biokatalizatora koji se koriste za stereoselektivne biotransformacije) koristi kao biokatalizator za redukciju prokiralnih spojeva. Netoksičan je i biorazgradiv što je važna karakteristika u farmaceutskoj i prehrambenoj proizvodnji. Nadalje, sadrži više oksido-redukcijskih enzima te je sposoban regenerirati koenzime prisutne u stanicama. Zahvaljujući tim brojnim enzimima može reducirati male alifatske i aromatske ketone prema Prelogovom pravilu što rezultira najčešće S-alkoholom (Glieder, 2008). Cijele stanice pekarskog kvasca pokazuju nisku aktivnost zbog čega se koriste različiti postupci permeabilizacije stanične stjenke čime se smanjuje otpor prijenosa tvari za reaktant i produkt te povećava aktivnost enzima (Sekhar i sur., 1999; Bhat i sur, 1993). Najznačajniju upotrebu pekarski kvasac ima u asimetričnoj redukciji karbonilnih skupina pri čemu nastaju optički aktivni alkoholi. Biokataliza koja uključuje kvasac kao katalizator ne zahtijeva složen postupak obrade i kompleksne reakcijske uvjete (Sheldon, 2016).

2.1.1.1. Asimetrična redukcija prokiralnih ketona primjenom *Saccharomyces cerevisiae*

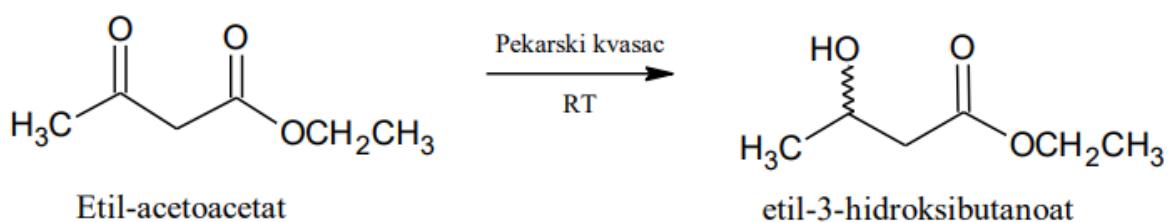
Optički čisti lijekovi se obično sintetiziraju iz kiralnih građevnih elemenata dobivenih kemijskom katalizom ili biokatalizom. Zahvaljujući njihovoj jedinstvenoj strukturi, kiralni alkoholi su jedni od najvažnijih građevnih jedinica velikog broja kiralnih lijekova. Stereoselektivna redukcija prokiralnih ketona do kiralnih neracemičnih sekundarnih alkohola uz kvasac *Saccharomyces cerevisiae* kao

biokatalizator osnovni je proces u organskoj sintezi takvih optički aktivnih alkohola. Aldehidi i ketoni su prokiralni supstrati jer vezanjem liganda na ugljikov atom karbonilne skupine karbonilni ugljik može postati asimetrični centar molekule.

Tijekom reakcije redukcije ketona u kiralni alkohol, enzimi prenose hidrid sa si- ili re-strane ketona dajući jednostavne (*R*)- ili (*S*)-alkohole. Stereokemijski ishod bioredukcije se može predvidjeti Prelogovim modelom za redukciju prokiralnih ketona prema kojem se hidrid-ion prenosi prvenstveno s anti-strane prokiralnog ketona (Faber, 2004; Gorke, 2010). *Saccharomyces cerevisiae* se koristi za redukciju ketona uz iskorištenje reakcije 27 - 87 %.

Redukcija se odvija uz regeneraciju reduciranog oblika nikotinamidnog koenzima uz oksidaciju kosupstrata (ugljikohidrata ili etanola). Mehanizam obnavljanja kofaktora u kvascu još nije u potpunosti objašnjen. Ugljikohidrati kao energetski izvor za regeneraciju NAD(P)H zahtijevaju visoku koncentraciju glukoze u usporedbi sa koncentracijom supstrata te se zbog tog razloga izbjegavaju. Također metabolizmom ugljikohidrata dolazi do formiranja pjene od ugljikovog dioksida i proizvodnje štetnih nusprodukata (Kometani i sur., 1996).

Najpoznatija redukcija uz upotrebu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatora je redukcija etil-acetoacetata u kiralni alkohol etil-3-hidroksibutanoat, kiralni blok važan u proizvodnji industrijski važnih kemikalija (Slika 1).

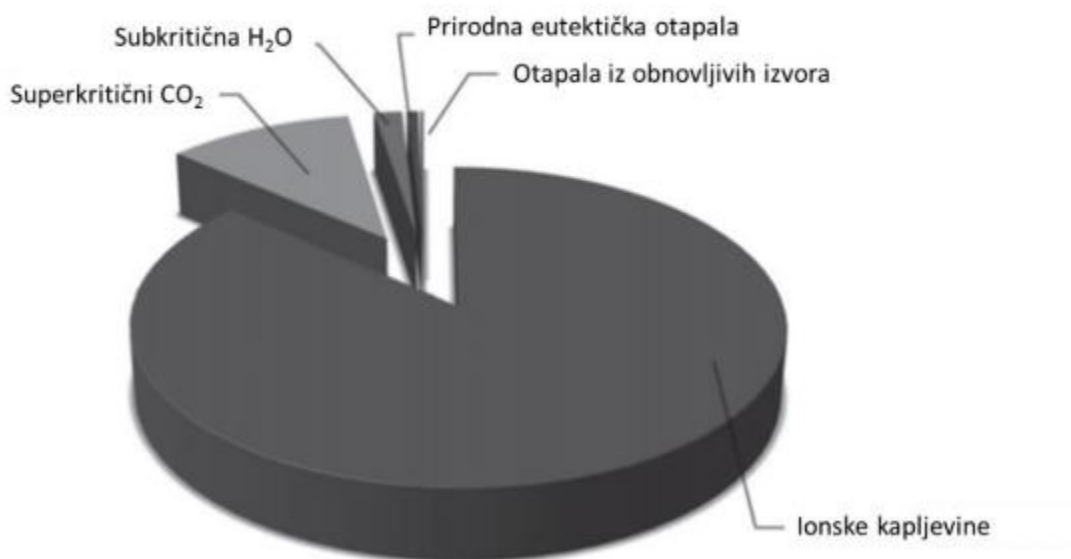


Slika 1. Redukcija etil-acetoacetata u kiralni alkohol etil-3-hidroksibutanoat

2.2. Ekološki prihvatljiva otapala

Otapala se svakodnevno koriste u brojnim industrijskim procesima te se procjenjuje da čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija i 30 % emisija hlapljivih organskih spojeva (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Smanjenje opasnih i toksičnih otapala u industriji jedan je od prioriteta zelene

kemije, specifičnog pristupa kemiji s ciljem smanjenja zagađenja okoliša. U sklopu zelene tehnologije, aktivno se istražuju nova otapala koja će zamijeniti uobičajena štetna organska otapala. Idealno otapalo trebalo bi biti jednostavno za upotrebu, kemijski i fizički stabilno, netoksično, niske hlapljivosti, biorazgradivo te iskoristivo za ponovnu upotrebu. Otapala koja su se najviše približila ovim zahtjevima su superkritični i subkritični fluidi, ionske kapljevine, niskotemperaturna eutektička otapala i otapala iz prirodnih/obnovljivih sirovina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Najbrojnija i prva istraživana otapala bila su ionske kapljevine (Slika 2). Međutim, njihova uporaba se izbjegava zbog činjenice da su većina toksična i nebiorazgradiva, a proces proizvodnje složen i skup. Posljednjih se godina iz tog razloga kao nova zelena, ekološki prihvatljiva otapala intenzivno istražuju eutektička prirodna otapala čija upotreba zadovoljava jedno od 12 načela zelene kemije, koncepta koji je započeo već 1991.godine (Tablica 2).



Slika 2. Zastupljenost zelenih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a)

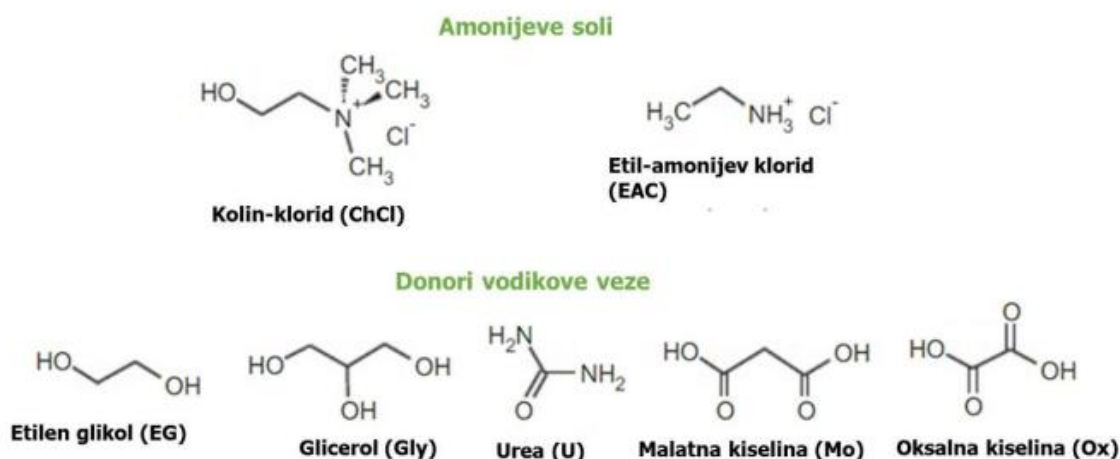
Tablica 2. Načela zelene kemije (Anastas, 2001)

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

2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

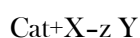
Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. Deep Eutectic Solvent, DES) su mješavine dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koja u određenom omjeru imaju niže talište od pojedinačnih komponenti smjese (Zhang i sur., 2012). Nastaju kombiniranjem kvaterne amonijeve soli s donatorom vodikove veze ili Lewisovom kiselinom (Slika 3). U pripravi niskotemperaturnih eutektičkih otapala široku primjenu ima kolin klorid (ChCl), netoksična kvaterna amonijeva sol, koja lako stupa u interakcije s jeftinim i lako dostupnim donatorima vodika poput uree i glicerola. Komponente u DES-u povezuju se vodikovim vezama koje rezultiraju mjestimičnom delokalizacijom naboja pri čemu dolazi do sniženja točke tališta smjese, u odnosu na točke tališta polaznih sirovina. Svojstva su slična ionskim kapljevinama, no glavna prednost DES-ova je ta da su ekonomičniji i jednostavniji za proizvodnju, manje toksični te biorazgradivi. Ukoliko se u strukturi DES-ova nađu primarni metaboliti, takva otapala nazivaju se prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. Natural Eutectic Solvents, NADES) koja u potpunosti

udovoljavaju zahtjevima idealnog zelenog otapala prema principima zelene kemije. Fizikalno-kemijska svojstva ovise o strukturi otapala, a broj mogućih kemijskih struktura koje proizlaze iz različitih kombinacija akceptora i donora vodikove veze je opsežan.



Slika 3. Najčešće korišteni akceptori (amonijeve soli) i donori vodikove veze u pripravi niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Durand i sur., 2013.)

Opća formula kojom se mogu definirati je (Smith i sur., 2014):



Cat⁺ - bilo koji amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation

X - Lewisova baza, anion halogenog elementa

Z – broj Z molekula koje reagiraju s anionom X

Y – Lewisova ili Bronstedova kiselina

Po kemijskom sastavu niskotemperaturna eutektička otapala klasificiraju se u četiri skupine. Otapala skupine I čine kvaterne amonijeve soli i metalni kloridi (MCl_x). U skupinu II ubrajamo hidrirane metalne kloride ($\text{MCl}_x \cdot y\text{H}_2\text{O}$). Skupinu III čine donori vodikove veze (RZ). IV. skupinu karakteriziraju smjese metalnih klorida i donora vodikove veze ($\text{MCl}_x + \text{RZ}$). Generalne formule za klasifikaciju DES-ova su prikazane u Tablici 3 (Smith i sur., 2014). Od svih skupina, najčešće

korištena i istraživana su otapala skupine III na bazi kolin klorida kombiniranim sa nenabijenim donorom vodikove veze poput uree, acetamida i etilen-glikola.

Tablica 3. Podjela DES-ova (Smith i sur., 2014)

Skupina	Generalna formula	Objašnjenje kratica
I	$Cat^+X^-zMCl_x$	M=Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II	$Cat^+X^-zMCl_x \cdot yH_2O$	M=Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III	Cat^+X^-zRZ	Z=CONH ₂ , COOH, OH
IV	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1}^+ \cdot RZ + MCl_{x+1}$	M=Al, Zn ; Z=CONH ₂ , OH

2.2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biokatalizi

Upotreba niskotemperaturnih eutektičkih otapala široko je rasprostranjena u reakcijama biotransformacije zbog mogućnosti modifikacije sastavnica DES-a izborom njegovih komponenti. DES-ovi imaju višestruku ulogu u različitim tipovima reakcija poput esterifikacije, hidrolize, redukcije i oksidacije. Također se koriste kao čista otapala, kootapala u vodenim medijima, dijelovi dvofaznog sustava ili supstrati u reakcijama biokatalize (Faber, 2011). U odnosu na ionske kapljevine i organska otapala, upotreba DES-a pokazuje veću učinkovitost u lipazom kataliziranim reakcijama (Gorke i sur., 2008). Niskotemperaturna eutektička otapala utječu na tijek biokatalize, ali i na strukturu i aktivnost biokatalizatora (Xu i sur., 2017).

Primjerice, povećanjem molarnog omjera donora vodika u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi kolin klorida povećava se udio α -uzvojnica u peroksidazi hrena što posljedično otvara terciarnu strukturu proteina i povećava aktivnost i stabilnost enzima (Wu i sur., 2014).

Odabir komponenti DES-a, donora i akceptora vodikove veze bitno određuje proces biokatalize te molarni omjer sastavnica koji utječe na svojstva otapala.

2.2.3. Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala mogu se podešavati s obzirom na mogućnost velikog broja kombinacija zadanih komponenti. Na taj način postižu se željena kiselost, polarnost, topljivost otapala, točka ledišta, viskoznost i vodljivost (Zhang i sur., 2012).

Viskoznost

Viskoznost je bitno svojstvo svake otopine jer utječe na fenomen prijenosa mase i na vodljivost fluida. Većina niskotemperaturnih eutektičkih otapala ima relativno visoku viskoznost pri sobnoj temperaturi koja je najčešće posljedica prisutnosti široke mreže vodikovih veza koje se formiraju među komponentama otapala te utječu na mobilnost. Također, važno je spomenuti i veličine iona te mali volumen praznog prostora između molekula otapala kao i elektrostatičke i van der Waalsove interakcije koje rezultiraju visokom viskoznošću. Otapala manje viskoznosti više zadovoljavaju kriterije zelene kemije te su prihvatljivija opcija u industrijskim procesima. Visoka viskoznost svojstvo je DES-a koje se može spriječiti uporabom manjih kationa te fluoriranih donora vodikove veze. Viskoznost većine niskotemperaturnih eutektičkih otapala ovisi o temperaturi i ponaša se prema Arrheniusovom modelu, odnosno, porastom temperature dolazi do smanjenja viskoznosti (Zhang i sur., 2012).

Gustoća

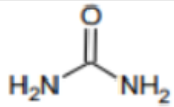
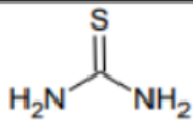
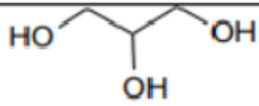
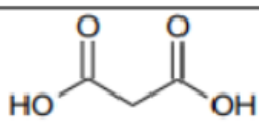
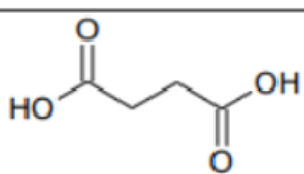
Gustoća DES-a bitno je svojstvo zbog svog utjecaja na prijenos mase i termodinamičke parametre poput kinematičke viskoznosti i izotermne kompresije. Ovisi o čistoći, omjeru komponenti te načinu pripreme DES-a. Osobit utjecaj ima molarni omjer organske soli i donora vodikove veze. Gustoća većine niskotemperaturnih eutektičkih otapala veća je od gustoće vode, a razlike su posljedica drugačije organizacije molekula ili nastajanja otapala. Velika gustoća može stvarati probleme prilikom rukovanja i upotrebe DES-a (Zhang i sur., 2012).

Točka ledišta

Glavna karakteristika DES-a je niska točka ledišta. Otapala sa točkom ledišta nižom od 50 °C su najpraktičnija za primjenu u industriji (Zhang i sur., 2012). Već spomenuto u poglavlju 2.2.1. komponente DES-a povezuju se vodikovim vezama koje rezultiraju mjestimičnom delokalizacijom naboja pri čemu dolazi do sniženja točke tališta smjese, u odnosu na točke tališta polaznih sirovina

(Tablica 4). Odličan primjer je smjesa kolin klorida (ChCl) čija temperatura tališta iznosi 302 °C pomiješanog s ureom temperature tališta 133 °C u molarnom omjeru 1:2, gdje temperatura taljenja dobivenog niskotemperaturnog eutektičkog otapala iznosi 12 °C (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

Tablica 4. Točke tališta nekih niskotemperaturnih eutektičkih otapala. (T_m): temperatura tališta čistog donora vodikovih veza; CC - kolin klorid

Donor vodikovih veza	CC/donor H-veza	T _m / °C	T _m / °C	Ref.	
	Urea	1:2	134	12	Abbott i sur., 2003
	Tiourea	1:2	175	69	Abbott i sur., 2003
	Glicerol	1:2	17,8	-40	Hayyan i sur., 2010
	Malonska kiselina	1:1	135	10	Abbott i sur., 2004
	Sukcinska (jantarna) kiselina	1:1	185	71	Abbott i sur., 2004

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Etil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen-glikol, puriss. p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Halogenirani acetofenon, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.2. Biokatalizator

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

3.1.3. Otopine i puferi

- Kalij-fosfatni pufer, pH = 7
2,336g K_2HPO_4 i 1,577g KH_2PO_4 otopi se u destiliranoj vodi u ukupnom volumenu od 250 mL

3.1.4. Oprema i uređaji

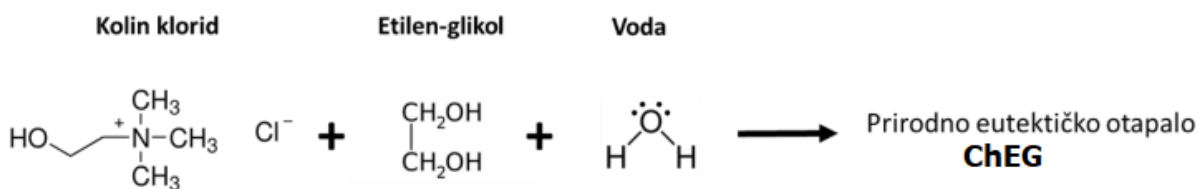
- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete, Deltalab, Španjolska
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija

- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Homogenizator/inkubator ES-20/60, Biosan, Latvija
- Laboratorijska tresilica, KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (epruvete, kivete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice, stalak za epruvete, tikvice s okruglim dnom)
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikropipete (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1 mL, 5 mL)
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Rotacioni vakuum uparivač, DEVAROT Slovenija, Buchi R-124, Švicarska
- Ultrazvučna kupelj GRANT XUB5, Grant Instruments, Engleska, Ujedinjeno Kraljevstvo
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYSTM 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala

U ovom radu pripremljena su niskotemperaturna eutektička otapala na bazi kolin klorida. U tikvici s okruglim dnom pomiješaju se kolin klorid i etilen-glikol u zadanom masenom omjeru uz dodatak 10, 50, 70 i 90 % (w/w) vode (Slika 4). Mase komponenata prikazane su u Tablici 5. Reakcijska smjesa se zagrijava na magnetnoj miješalici pri temperaturi od 50°C tijekom 2 sata. Dobivena tekućina je prozirno, bezbojno i homogeno niskotemperaturno eutektičko otapalo.



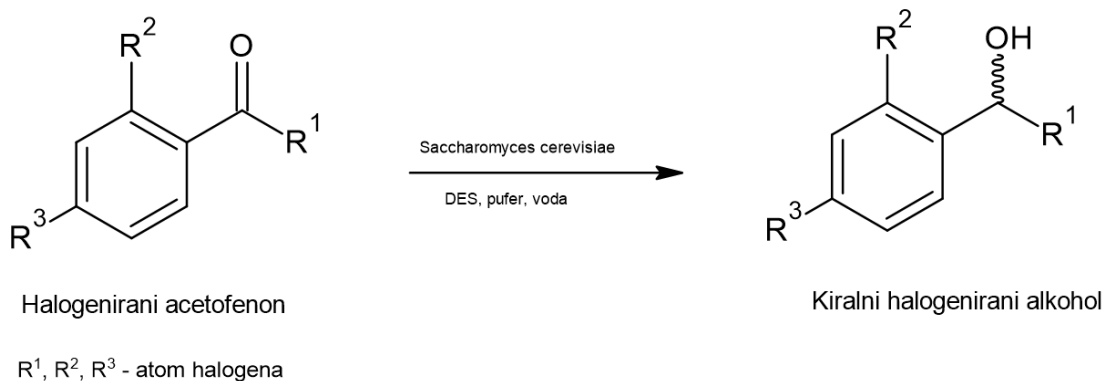
Slika 4. Priprema niskotemperaturnog eutektičkog otapala kolin klorid:etilen-glikol

Tablica 5. Mase komponentata za pripremu niskotemperaturnog eutektičkog otapala

Puni naziv DES-a	Kratica	Udio vode [%, w/w]	m (kolin klorid) [g]	m (etilen-glikol) [g]	m (voda) [g]
Kolin klorid: etilen-glikol s 10 % vode	ChEG10	10	5,560	4,960	1,170
Kolin klorid: etilen-glikol s 50 % vode	ChEG50	50	2,780	2,480	5,260
Kolin klorid: etilen-glikol s 70 % vode	ChEG70	70	1,668	1,488	7,350
Kolin klorid: etilen-glikol s 90 % vode	ChEG90	90	0,665	0,496	9,468

3.2.2. Enantioselektivna asimetrična redukcija halogeniranog acetofenona katalizirana pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona provedena je u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, puferu te vodi za usporedbu pomoću pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji je biokatalizator reakcije. Korištena su niskotemperaturna eutektička otapala sa različitim masenim udjelom vode: ChEG10, ChEG50, ChEG70, ChEG90 (Tablica 5). Reakcijom redukcije halogeniranog acetofenona nastaje kiralni halogenirani alkohol (Slika 5).



Slika 5. Redukcija halogeniranog acetofenona u prokiralni alkohol

Prvobitno se 5 g kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pomiješa sa destiliranom vodom u epruveti koja se nadopuni do 40 mL te miješa na homogenizatoru dok se ne dobije homogena smjesa. Dobivena suspenzija se centrifugira na 4500 o min^{-1} tijekom 20 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se odlije, a talog (kvašćeva biomasa) se koristi dalje za reakciju asimetrične redukcije halogeniranog acetofenona.

Reakcija redukcije provodi se u puferu, vodi te niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (DES) sa različitim udjelom vode – 10, 50, 70 I 90 % (w/w) prema slijedećem protokolu. U epruvetu se doda 0,5 g pripremljenog kvasca, 1,5 mL odabranog otapala (voda, DES ili pufer) te 10 μL supstrata halogeniranog acetofenona koncentracije 2 mg mL^{-1} čime započinje reakcija redukcije acetofenona. Supstrat je pripremljen otapanjem 4 g halogeniranog acetofenona u 2 mL acetonitrila. Pripremljene epruvete se stavljaju na tresilicu na sobnu temperaturu kroz 7 dana.

Nakon 7 dana, uzorci se centrifugiraju na 6000 o min^{-1} tijekom 10 minuta i dekantiraju kako bi se uklonio kvasac koji zaostaje u talogu.

Poslije dekantiranja se zaostali produkt i supstrat iz supernatanta ekstrahiraju pomoću etil-acetata. Prije ekstrakcije se dodaje 1,5 mL destilirane vode u supernatant kako bi se struktura DES-a razbila te na taj način omogućila difuziju slobodnog supstrata i produkta u organsko otapalo. Ekstrakcija se provodi jednokratno etil-acetatom. Epruveta sa uzorkom se nadopuni etilacetatom do 30 mL te homogenizira na Vortexu. Nakon ekstrakcije vidljive su dvije faze, hidrofobna i hidrofilna. U gornji sloj, u kojem se nalazi organska faza, se dodaje natrijev sulfat kako bi vezao višak vode. Organska faza se uparava do suha na rotacionom vakuum uparivaču. Upareni uzorak se zatim resuspendira u etil-acetatu i analizira plinskom kromatografijom.

Kako bismo usporedili uspješnost redukcije različitih supstrata u različitim otapalima, za svaku pojedinu reakciju računa se konverzija reakcije te enantiomerni višak prema jednadžbama [1] i [2].

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

$$X = \frac{c_{Al}}{c_{Ac}} \times 100 \text{ [1]}$$

gdje c_{Al} predstavlja izmjerenu koncentraciju alkohola (mol L^{-1}), a c_{Ac} početnu koncentraciju acetofenona (mol L^{-1}).

Enantiomerni višak ee (%) izračuna se prema jednadžbi:

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

gdje R_{OH} predstavlja površinu ispod pika (R)-halogeniranog alkohola, a S_{OH} površinu ispod pika (S)-halogeniranog alkohola.

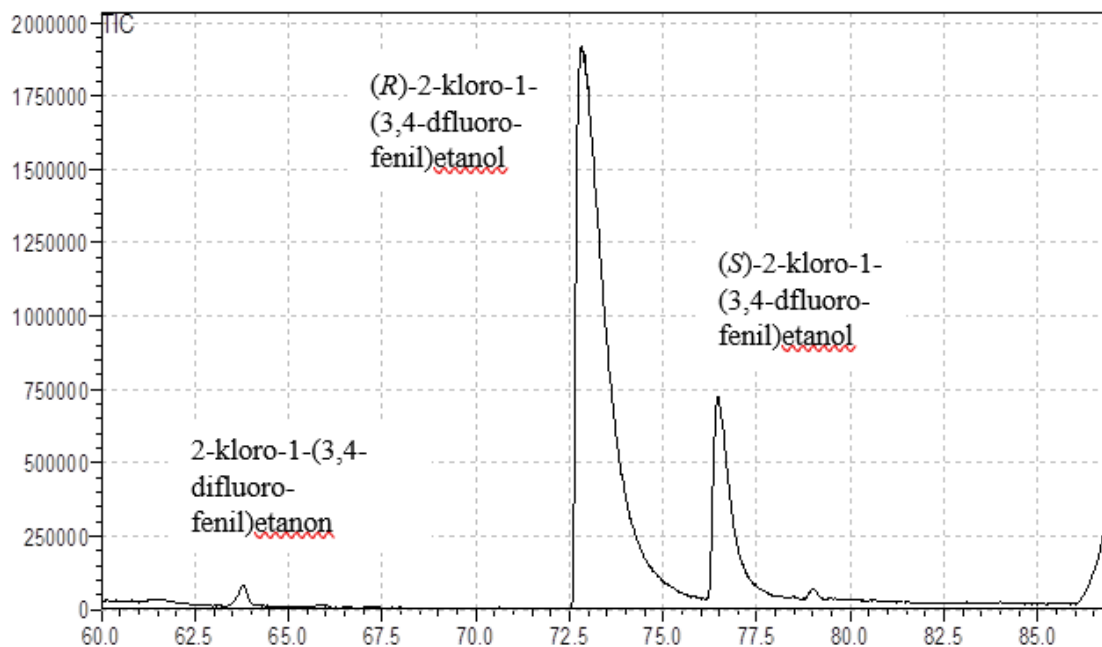
3.2.3. Identifikacija halogeniranog acetofenona

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

Kromatografski uvjeti za određivanje supstrata:

- Kromatografska kolona: kapilarna kiralna kolona β DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
- Pokretna faza: Helij
- Protok: 6,7 mL min⁻¹
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone: T1= 90 °C (1 min), T2 = 155 °C ($\Delta = 5$ °C min⁻¹), T3 = 220 °C ($\Delta = 0,5$ °C min⁻¹)
- Vrijeme trajanja analize: 133,30 min

Identifikacija halogeniranog acetofenona i (R,S)-halogeniranog alkohola provedena je na temelju njihovih retencijskih vremena, odnosno na temelju vremena izlaženja razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi s kiralne kromatografske kolone te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka.

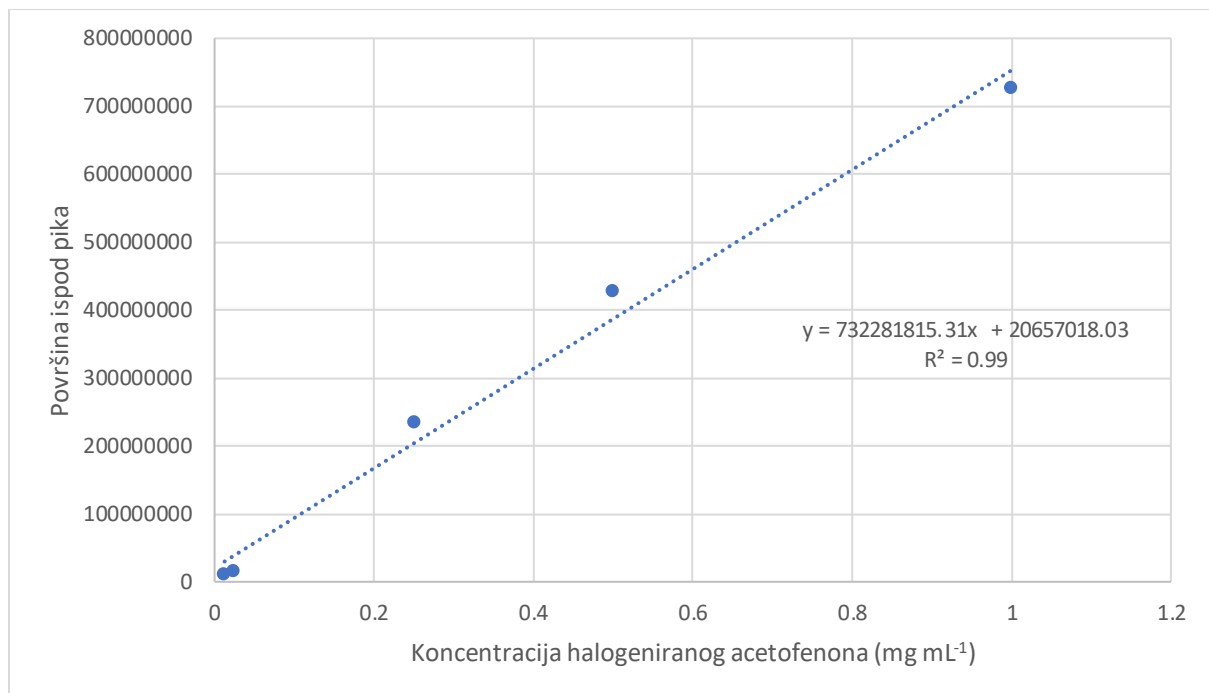


Slika 6. Tipičan prikaz plinskog kromatograma enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona katalizirane pekarskim kvascem

Izrada baždarnog dijagrama

Ishodna otopina halogeniranog acetofenona ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) pripravljena je u etil-acetatu radi izrade baždarnog dijagrama. Potom su pripravljena i razrjeđenja ishodne otopine navedenog supstrata na način da množinske koncentracije iznose 1 mg mL^{-1} , $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ te $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$. Na grafičkom prikazu su izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika stavljene na ordinatu, dok se na apscisi nalaze pripadajuće vrijednosti množinskih koncentracija (Slika 7). Baždarni dijagram ovisnosti množinske koncentracije halogeniranog acetofenona o površini ispod pika konstruiran je pomoću računala.

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



Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije halogeniranog acetofenona

3.2.4. Predtretman pekarskog kvasca *S. cerevisiae* lizom stanica pomoću kuglica

Prije tretmana se pripremaju suspenzije stanica kvasca. Stanice pekarskog kvasca *S. cerevisiae* resuspendiraju se u fosfatnom puferu pH=7 u omjeru 1:15 na sobnoj temperaturi tijekom 45 minuta. Dobivena suspenzija se centrifugira na 6000 o min⁻¹ tijekom 5 minuta. Kvasac je nakon centrifugiranja prvo ispran destiliranom vodom, a zatim ponovno podvrgnut centrifugiranju. Za lizu stanica pomoću kuglica 5 g vlažnih stanica kvasca pomiješa se sa 5 mL pufera, odnosno odabranog DES-a i kuglicama. DES koji se pokazao najpogodnijim za korištenje je ChEG70 sa 70 % udjela vode (w/w). Nakon predtretmana kuglicama u reakcijsku smjesu se dodaje 10 µL supstrata (halogeniranog acetofenona) čime započinje reakcija redukcije. Epruvete se potom stavljaju na termostatiranu tresilicu na 30 °C te se nakon 24 h analizira reakcijska smjesa iz koje se produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju s etil-acetatom, uz snažno miješanje na vrtložnoj miješalici. Takav ekstrakt se zatim analizira plinskom kromatografijom.

3.2.5. Vijabilnost *S. cerevisiae* u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Vijabilnost stanica jedan je od važnih proizvodnih parametara. Određivanje vijabilnosti stanica je najzastupljenija metoda za analizu utjecaja kemijskih i fizikalnih faktora na mikroorganizme. Definira se kao postotak živih stanica u populaciji. Vijabilnost stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* se može odrediti pomoću na više načina, mjerenjem optičke gustoće UV-Vis spektrofotometrom i brojanjem nevijabilnih stanica pod mikroskopom. Mjerenje se vrši na valnim duljinama od 260 i 280 nm. Pri tome apsorbancija otopine pri 280 nm odražava koncentraciju proteina u otopini, a apsorbancija pri 260 nm prisustvo određene količine nukleinskih kiselina. Druga metoda je diferencijalno bojanje kvašćevih stanica u suspenziji te brojanje vijabilnih, odnosno nevijabilnih stanica pod mikroskopom.

3.2.5.1. Mjerenje optičke gustoće kvašćevih stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Prije mjerenja apsorbancije pripremaju se suspenzije stanica kvasca. 0,5 g kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.2.4., resuspendira se u 10 mL zadanog niskotemperaturnog eutektičkog otapala (ChEG10, ChEG70), odnosno 10 mL vode.

Priprema uzoraka za mjerenje optičke gustoće pri 260, odnosno 280 nm vrši se po slijedećem protokolu: 750 μL zadane suspenzije pomiješa se sa 750 μL destilirane vode u Eppendorf epruvetu te se uzorak centrifugira na 10 000 rpm na 10 minuta. Supernatant se zatim prenese u kvarcnu kivetu kako bismo mogli izmjeriti apsorbanciju. Apsorbancija se očitava pomoću UV-Vis spektrofotometra pri valnim duljinama 260 i 280 nm.

3.2.5.2. Praćenje rasta stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Pripremljene suspenzije kvašćevih stanica spomenute u poglavlju 3.2.5.1. koriste se za mjerenje vijabilnosti pod mikroskopom tijekom 7 dana. Uzorak se priprema na sljedeći način: 2 μL suspenzije kvašćevih stanica resuspendira se u 1998 μL destilirane vode.

Uzorkovanje se vrši prvi, treći, peti i sedmi dan. Stanice kvasca boje se komercijalno dostupnim metilenskim modrilom (tetrametiljonin klorid). Nevijabilne stanice boji plavo, a vijabilne su bezbojne zbog metaboličke redukcije boje. Vizualizacija i brojanje stanica u duplikatu se vrši pod

svjetlosnim mikroskopom u Fuchs-Rosenthalovoj komorici. Korištena je suspenzija 1 μL metilenskog modrila koji se resuspendira u alikvot uzorka stanica kvasca koji iznosi 40 μL . 20 μL pripremljenog novog uzorka se postavlja na komoricu te se broje mrtve i žive stanice pod mikroskopom. Vijabilnost stanica određuje se slijedećom jednačbom [3].

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

4. RASPRAVA I REZULTATI

Jedno od 12 načela koja su osnova procesima zelene kemije odnosi se na uporabu sigurnijih otapala i pomoćnih tvari te se istim naglašava da uporabu pomoćnih kemijskih tvari treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće (Jukić i sur., 2004). Upravo zbog toga je primjena ekološki prihvatljivih otapala u proizvodnji industrijski važnih kemikalija predmet mnogih znanstvenih istraživanja u području biotehnologije. Niskotemperaturna eutektička otapala se zbog svojih svojstava posljednjih godina razmatraju kao zamjena za tradicionalna i škodljiva otapala u procesima organske sinteze i (bio)katalize. Neka poželjna svojstva ovih otapala su nehlapljivost, nezapaljivost, stabilnost, niska toksičnost i biorazgradljivost te su također ekonomski prihvatljive cijene. Velik interes u industriji primijećen je također kod enantioselektivne katalitičke redukcije prokiralnih ketona čime nastaju kiralni alkoholi koji se koriste u pripremi raznih lijekova i finih kemikalija.

Cilj ovog rada je vidjeti utjecaj DES-a na konverziju i enantiomerni višak reakcije asimetrične redukcije halogeniranog acetofenona u prokiralni halogenirani alkohol pekarskim kvacem *Saccharomyces cerevisiae* te odabrati najpogodnije otapalo.

Kako bi se uspješnost provedene redukcije acetofenona u eutektičnim otapalima usporedila s onim u klasičnim otapalima, sinteza je također provedena u kalij-fosfatnom puferu te vodi.

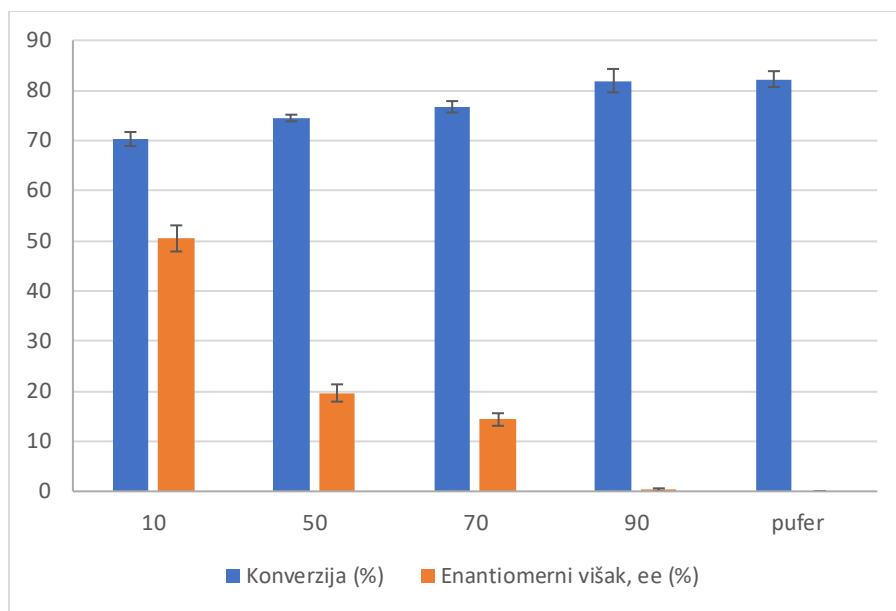
4.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala provela se jednostavnim miješanjem dviju komponenti u određenom masenom omjeru uz dodatak vode. Polazne komponente korištene u ovom radu su kolin klorid i etilen-glikol čije mase su prikazane u Tablici 1. Smjesa se miješa uz lagano zagrijavanje dok se ne dobije prozirna, bezbojna i homogena suspenzija. Iskorištenje pripreme ovih otapala je 100 %, što predstavlja veliku prednost u korištenju, ujedno i činjenica da ne nastaje otpad. Sirovine koje se koriste za njihovu pripravu lako su dostupne, relativno jeftine, sigurne i biorazgradive, što čini pripravljena otapala ekološki prihvatljivim i ekonomski održivim.

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

Asimetrična redukcija prokiralnih ketona jedna je od najvažnijih i najpraktičnijih reakcija za proizvodnju kiralnih alkohola, koji se koriste za sintezu industrijski važnih kemikalija kao što su lijekovi, pesticidi, feromoni, arome, mirisi i industrijske fine kemikalije. Biokataliza, koja uključuje izolirane oksidoreduktaze ili žive organizme, uvijek se smatra jednom od metoda koje najviše obećavaju zbog svoje izuzetne enantioselektivnosti i blagih reakcijskih uvjeta. Mikroorganizmi i enzimi biljnih stanica mogu katalizirati redukciju prokiralnih ketona s visokom regio- i stereospecifičnošću. Faber (2011) je naglasio da uporaba enzima kao biokatalizatora poboljšava stereokemijsku kvalitetu i pojednostavljuje korake odvajanja i odlaganja (Gašo Sokač, 2009).

Za reakcije redukcije kao biokatalizator se najčešće koristi pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zbog svoje pristupačnosti i prihvatljive cijene. Lako se rukuje s njim, netoksičan je i dobro proučen. Najznačajniju upotrebu ima u asimetričnim redukcijama karbonilnih skupina pri čemu nastaju optički aktivni alkoholi. U ovom radu je ispitana njegova sposobnost redukcije halogeniranog acetofenona u prokiralni halogenirani alkohol. Reakcija je provedena u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i puferu. Korišteni DES-ovi su kolin klorid:etilen-glikol (ChEG) sa masenim udjelom vode od 10, 50, 70 i 90 % (w/w). Dodatkom supstrata halogeniranog acetofenona u suspenziju kvašćevih stanica i DES-a započinje reakcija redukcije acetofenona. Reakcija se provodi na tresilici kroz 7 dana uz temperaturu od 30 °C. Nakon 7 dana uzorci se centrifugiraju, ekstrahiraju etil-acetatom, uparavaju do suha na rotacionom vakuum uparivaču te konačno analiziraju plinskom kromatografijom. Enantioselektivna redukcija uspješno je provedena u svim otapalima, a rezultati konverzije supstrata u produkt i enantiomerni višak prikazani su na Slici 8.



Slika 8. Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona sa biokatalizatorom *Saccharomyces cerevisiae* u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida koja sadrže 10, 50, 70 i 90 % vode (w/w) te puferu. Reakcijski uvjeti: 10 μ L halogeniranog acetofenona, 0,5 g pekarskog kvasca, 7 dana, 30 °C. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti \pm S.D. (n = 3).

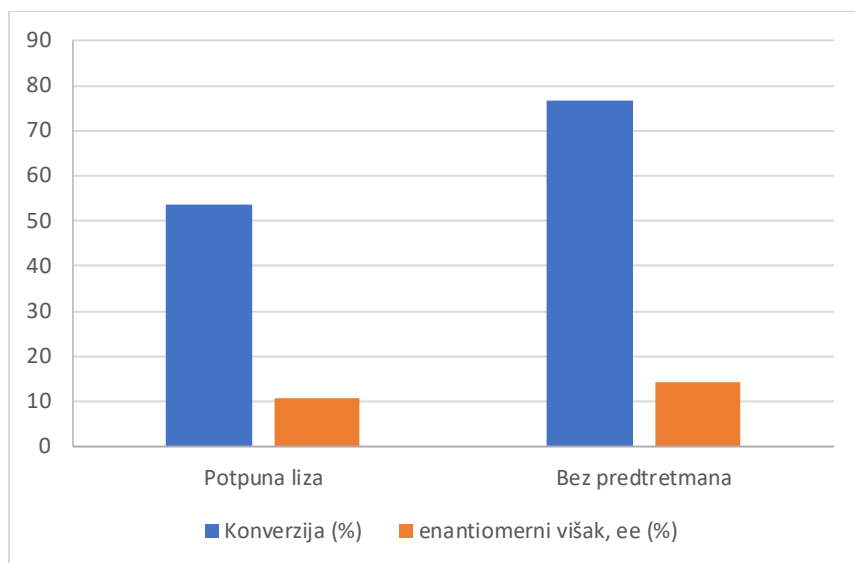
Vrijednosti konverzije supstrata u produkt reakcije redukcije halogeniranog acetofenona vrlo su sličnih vrijednosti u svim korištenim DES-ovima. Može se zaključiti da povećanje masenog udjela vode pozitivno utječe na konverziju reakcije jer su najveće vrijednosti postignute kod DES-a sa 90 %-tnim masenim udjelom vode (w/w). Konverzija supstrata u produkt uglavnom iznosi oko 75 % (Slika 8). U DES-u je zabilježena niža vrijednost konverzije supstrata u produkt u odnosu na pufer. Enantioselektivnost je značajno viša u DES-u u odnosu na pufer te raste smanjenjem udjela vode. Enantiomerni višak u DES-u sa 10 %-tnim masenim udjelom vode (w/w) postiže vrijednosti od 50 %, dok je ta vrijednost u puferu gotovo jednaka nuli, što ukazuje na racemičnu smjesu. Konverzija i enantioselektivnost su obrnuto proporcionalni u usporedbi sa masenim udjelom vode. Povećanje vode pozitivno utječe na konverziju supstrata u produkt, ali negativno na enantioselektivnost koja raste povećanjem udjela DES-a. Takav rezultat je očekivan s obzirom da dodatak vode u eutektičko otapalo smanjuje njegovu viskoznost te na taj način omogućuje bolji prijenos tvari i povećanje konverzije same reakcije (Zhang i sur., 2012). Ovi rezultati su u skladu sa dosadašnjim istraživanjima (Panić i sur., 2020; Cvjetko Bubalo i sur., 2015) koji su

ustanovili da DES značajno utječe na stereoselektivnost reakcije pri izvođenju biokatalize primjenom cijelih stanica. Proučavanjem redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona (DMPA) primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, Panić i suradnici primijetili su da korištenjem DES-a enantiomerni višak varira od 63,1 do 86,7 % u korist S-alkohola. Vrijednosti enantiomernog viška u usporedbi sa puferom također su bile su znatno više, kao što je primijećeno u ovom radu. Zaključili su da enantioselektivnost biokatalize primjenom cijelih stanica također ovisi o sadržaju vode u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, gdje povećanjem udjela DES-a raste i enantioselektivnost reakcije. Volumni udio vode u DES-u je značajan i kod konverzije. Povećanje volumnog udjela vode u DES-u pozitivno utječe na konverziju (Panić i sur., 2020; Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

4.2.1. Predtretman pekarskog kvasca *S. cerevisiae* lizom stanica pomoću kuglica

Konverzija i enantioselektivnost reakcije u nastavku se rada nastojalo poboljšati predtretmanom biokatalizatora primjenom staklenih kuglicama (potpunom lizom stanica). Kao modelni sustav za proučavanje utjecaja predtretmana odabrano je otapalo kolin klorid:etilen-glikol sa 70 % (w/w) vode.

Stanice kvasca u DES-u sa 70 %-tnim masenim udjelom vode (w/w) podvrgnute su predtretmanu kako bi se primijetio utjecaj na konverziju i enantioselektivnost reakcije. Potpuna liza stanica pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* postignuta je predtretmanom pomoću kuglica. Konverzija supstrata u produkt bez predtretmana iznosi 77 %, dok je vrijednost konverzije nakon predtretmana pala na 54 %. Vrijednosti enantiomernog viška su gotovo jednake i bez i nakon predtretmana (Slika 9). Zaključno, utjecaj predtretmana potpunom lizom stanica negativno utječe na konverziju, dok na enantioselektivnost nema značajan utjecaj. Pad vrijednosti konverzije moguće je povezan sa gubitkom aktivnosti enzima kada iz svog prirodnog okruženja (stanica) prijeđu u DES.



Slika 9. Vrijednosti konverzije i enantiomernog viška bez predtretmana i nakon predtretmana kuglicama

4.3. Vijabilnost *S. cerevisiae* u niskotemperaturnim eutektskim otapalima

Otkriće DES-a relativno je novija pojava, stoga su njihove interakcije s biosustavima još uvijek nedovoljno istražene, posebice za kulture biljnih stanica. Nekoliko studija o stanicama sisavaca i raznih mikroorganizmima pokazalo je da je DES na bazi kolin klorida i glicerola općenito netoksičan i biokompatibilan u primjeni s cijelim stanicama. Međutim, učinak DES-a na stanice u smislu rasta i metabolizma nije dovoljno proučen (Pavoković i sur., 2014). Rast stanica praćen je inkubacijom u niskotemperaturnim eutektskim otapalima sa različitim masenim omjerima vode.

4.3.1. Praćenje rasta stanica tijekom inkubacije

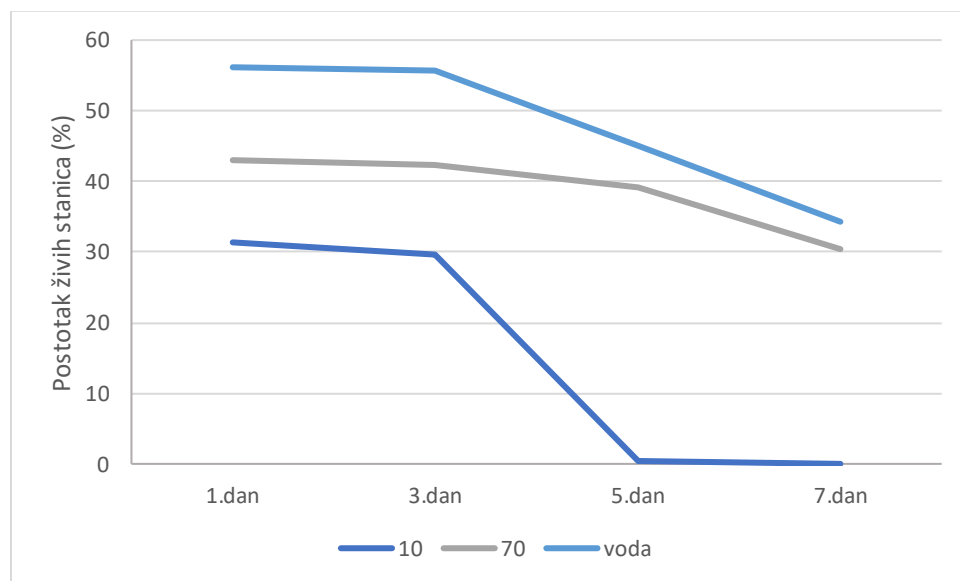
Vijabilnost se najčešće koristi za određivanje postotka živih, odnosno mrtvih stanica u nekoj populaciji, u ovom slučaju postotak vijabilnih kvašćevih stanica mjerenih tijekom 7 dana. U ovom radu vijabilnost je određena brojanjem preživjelih stanica u kulturi obojanih metilenskim modrilom. Stanice obojane u plavo su nevijabilne, a bezbojne su vijabilne (Slika 10).

Uzorci su mjereni tijekom prvog, trećeg, petog i sedmog dana. Pad živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u zadanim otapalima tijekom 7 dana prikazan je rezultatima u Tablici

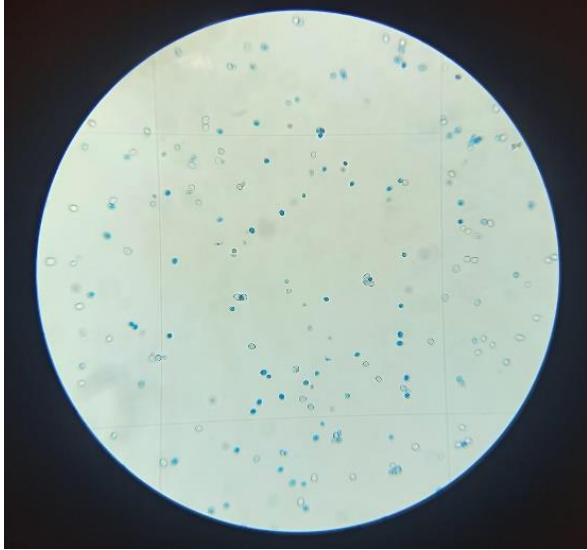
6. Otapala korištena za eksperiment su ChEG10, ChEG70 i voda. Najbrži pad živih stanica pojavljuje se kod niskotemperaturnih eutektičkih otapala sa malim masenim udjelom vode (ChEG10) (Slika 10). Smanjena vijabilnost kvasca u mediju s visokim udjelom DES-a može se objasniti kao posljedica visokog osmotskog tlaka što posljedično rezultira difuzijom vode iz stanica. Rezultati su u skladu sa očekivanjem zbog nastalog oštećenja stanice tijekom određenog razdoblja.

Tablica 6. Vijabilnost kvašćevih stanica. Uvjeti inkubacije: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

Udio vode u DES-u	Postotak živih stanica (%)			
	1.dan	3.dan	5.dan	7.dan
10	31,36	29,54	0,46	0,00
70	43,00	42,38	39,22	30,40
voda	56,15	55,70	45,05	34,28



Slika 10. Grafički prikaz pada rasta kvašćevih stanica. Uvjeti inkubacije: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

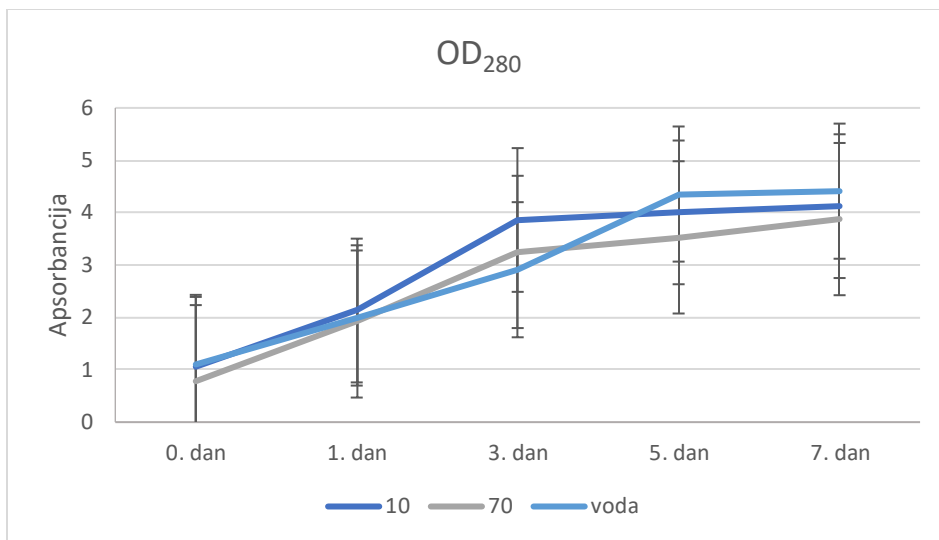


Slika 11. Stanice kvasca u 70 % DES-u pod mikroskopom nakon 3. dana. Uvjeti inkubacije: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL ChEG70, 3 dana, 30 °C.

4.3.2. Mehanizam djelovanja DES-a na stanice kvasca

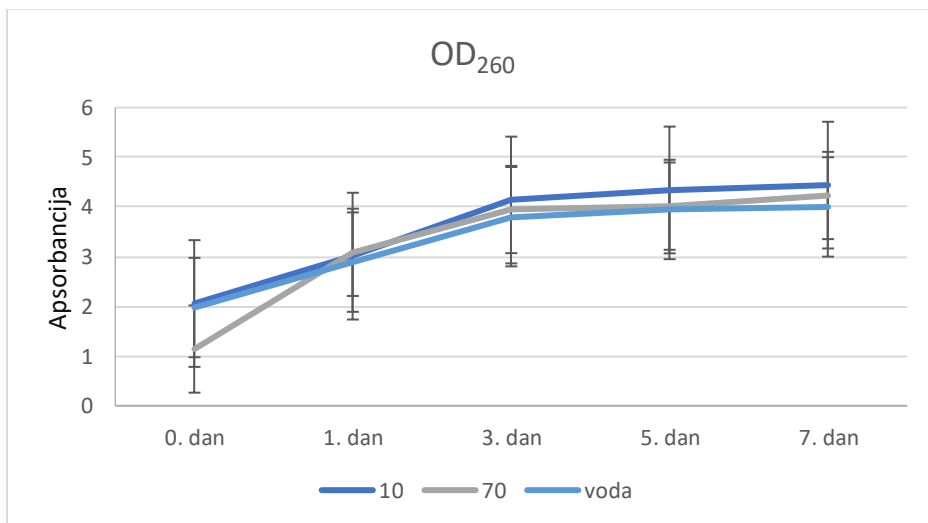
Najvjerojatniji mehanizam koji bi objasnio djelovanje DES-a na žive organizme uključuje interakcije sa staničnim membranama. Do sada sve ispitane eukariotske stanice pokazuju povećanje propusnosti lipidne membrane kao odgovor na izlaganje DES-ovima (Gašo Sokač, 2014). U našem slučaju, mogući poremećaj membrane određen je oslobađanjem DNA i proteina u medij za kulturu, određen mjerenjem apsorbancije na 260 nm odnosno 280 nm.

UV apsorpcija pri 280 nm rutinski se koristi za procjenu koncentracije proteina. Apsorbancija mjerena pri toj valnoj duljini označava prisutnost staničnih proteina. Povećanje propusnosti lipidne membrane potvrđeno je povećanjem mjerene apsorbancije tijekom sedam dana. Apsorbancija raste jer dolazi do oslobađanja proteina u medij koji se apsorbiraju na zadanoj valnoj duljini (Slika 12).



Slika 12. Apsorbancija kvašćevih stanica u različitim otapalima mjerena pri 280 nm. Reakcijski uvjeti: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

Mjerenjem apsorbancije pri 260nm na UV-Vis spektrofotometru također su dobiveni rezultati kojima možemo pretpostaviti da je nastalo oštećenje stanične membrane. DNA molekula apsorbira zračenje valne duljine 260 nm. Povećanje apsorbancije tijekom određenog perioda ukazuje na povećanu propusnost stanične membrane tijekom 7 dana, jer dolazi do istjecanja molekule DNA u medij kroz pore na membrani (Slika 13).



Slika 13. Apsorbancija kvašćevih stanica u različitim otapalima mjerena pri 260 nm. Reakcijski uvjeti: 0,5 g pekarskog kvasca, 10 mL otapala (DES, voda), 7 dana, 30 °C.

DES sa udjelom vode većim od 50 % (w/w) može se smatrati vodenom otopinom umjesto eutektičkom smjesom. Stoga disocirani kationski kation u DES-u može stupiti u interakciju s polisaharidnim lancima vodikovom vezom ili elektrostatskom interakcijom te na taj način uzrokovati poremećaj stanične stijenke. Međutim, povećana propusnost stanične membrane mogla bi biti povoljna za biokatalizu jer bi omogućila lakši prolaz supstrata/proizvoda kroz poremećenu membranu (Yang i sur., 2017).

Zaključno, u ovom radu pokazano je da se odabirom DES-a sa različitim masenim udjelima vode može značajno utjecati na konverziju i enantioselektivnost bioredukcije derivata acetofenona. Također je prikazan utjecaj DES-a na rast stanica i propusnost stanične membrane.

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biokatalitičkim reakcijama predstavlja doprinos razvoju novih *zelenih* procesa.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je upotreba i utjecaj eutektičkih prirodnih otapala na reakciju asimetrične redukcije halogeniranog acetofenona u kiralni alkohol uz biokatalizator *Saccharomyces cerevisiae*. Reakcija je ispitana u četiri otapala sa različitim udjelom vode. Na temelju provedenih istraživanja i rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Niskotemperaturna eutektička otapala pripravljena su zagrijavanjem i miješanjem kolin klorida i etilen-glikola u određenom masenom omjeru uz 100 % iskorištenje reakcije.
2. Vrijednosti konverzije supstrata u produkt zabilježene kod DES-a su niže od pufera. Vrijednosti enantiomernog viška ostvarenog u redukciji halogeniranog acetofenona pomoću stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u (*S*)-kiralni alkohol u svim ispitanim DES-ovima više su od vrijednosti dobivene u puferu.
3. Enantioselektivnost reakcije redukcije acetofenona primjenom kvasca *S. cerevisiae* raste smanjenjem udjela vode u DES-u.
4. Uspoređujući vrijednosti konverziju supstrata u produkt reakcija redukcije halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima sa različitim masenim udjelima vode zaključuje se da povećanjem masenog udjela niskotemperaturnog eutektičkog otapala pada konverzija reakcije, odnosno raste povećanjem masenog udjela vode.
5. Postotak živih stanica pada tijekom određenog razdoblja inkubacije stanica kvasca u DES-u, najbrže kod DES-ova sa malim masenim udjelom vode.

6. LITERATURA

Anastas P., Eghbali N. (2010) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**: 301 – 312.

Abbott A.P., Boothby D., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K. (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc.* **126**: 9142- 9147.

Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K., Tambyrajah V. (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun.* **1**: 70-71.

Bommarius A. S., Riebel B. R. (2004) Biocatalysis. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. str. 2; 7; 30-34; 159-162; 188-189; 334.

Buzzini P., Vaughan-Martini A. (2006) Yeast biodiversity and biotechnology, in: C.A. Rosa, G. Péter (Eds.), *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, SpringerVerlag, Berlin, str. 533–559.

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

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

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

Cvjetko Bubalo M., Panić M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. (2016) Metode pripreve eutektičkih otapala. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 164 – 168.

Dai Y., van Spronsenb J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y.H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta* **766**: 61– 68.

Durand E, Lecomte J, Villeneuve P (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **115**, 379–385.

Faber K. (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. izd., Springer. str. 1 - 268.

Fischer V. (2015) *Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents and Low-Melting Mixtures*, Dissertation, Universität Regensburg.

Gašo Sokač, D., Nujić, M., Bušić, V., Habuda Stanić, M. (2014) Biocatalytic reductions by plant tissue—Green alternative to alcohol production. *Croatian journal of food science and technology* **6**: 51-60.

Glieder, A., Pscheidt, B. (2008) Yeast cell factories for fine chemical and API production. *Microb. Cell Fact.* **7**:25

Goldberg K., Schroer K., Lütz S., Liese A. (2007) Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Applied microbiology and biotechnology* **76**: 237 – 248.

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

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

Gröger H., Hummel W., Borchert S., Krauß M. (2012) Reduction of Ketones and Aldehydes to Alcohols. U: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Volume 1, 3. izd., Drauz K., Gröger H., May O., ur., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. str. 1037 – 1039; 1049 – 1050.

Handy S. (2015) Deep eutectic solvents in organic synthesis. *InTech: Croatia* **10**: 59-92.

Harris, R. C. (2008) *Physical properties of alcohol based deep eutectic solvents*. Ph.D. Thesis, Department of Chemistry, University of Leicester.

Holland H. L. (2002) Biocatalysis. U: *Handbook of Green Chemistry and Technology*, 1. izd., Clark J., Macquarrie D., ur., Blackwell Science Ltd. str. 188.

Hou Y. C., Yao C. F., Wu W. Z. (2018) Deep eutectic solvents: Green solvents for separation applications. *Acta Phys. Chim. Sin.* **34**: 873 – 885.

- Huang C. H. (2017). Quantification of soil microtopography and surface roughness. U *Revival: Fractals in Soil Science (1998)* str. 161-176 CRC Press.
- Johannes T., Simurdiak M. R., Zhao H. (2006) Biocatalysis. U: *Encyclopedia of Chemical Processing*, 2. izd., Lee S., ur., Taylor & Francis. str. 101 – 110.
- Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2005) Dominantni trendovi "zelene" kemije, *Kem. Ind.* **54**, 255–272.
- Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2004) "Zelena" kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kem. Ind.* **53**: 217 – 224.
- Kometani T., Yoshii H., Matsuno R. (1996) Large-scale Production of Chiral Alcohols with Baker's yeast. *Mol. Cat. B: Enzym.* **1**: 45-52.
- Lancaster M. (2002) Principles of Sustainable and Green Chemistry. U: *Handbook of Green Chemistry and Technology*, 1. izd., Clark J., Macquarrie D., ur., Blackwell Science Ltd. str. 10 – 25.
- Liu P, Hao J, Mo L, Zhang Z. (2015) Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *RSC Adv.* **5**: 48675- 48704.
- Masel I. R. (2001) Chemical Kinetics and Catalysis. *Wiley-Interscience, New York*.
- Maugeri Z., Domínguez De María P. (2014) Whole-cell biocatalysis in deep-eutectic solvents/aqueous mixtures. *Chem. Cat. Chem.* **6**: 1535–1537.
- Milner S. E., Maguire A. R. (2012) Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. *Arkivoc* **2012**: 321 – 382.
- Muñoz Solano D., Hoyos P., Hernáiz M. J., Alcántara A. R., Sánchez-Montero J. M. (2012) Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology* **115**: 196 – 207.
- Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R.L., Duarte A.R.C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2**: 1063-1071.
- Panić, M., Delač, D., Roje, M., Radojčić, Redovniković, I., Cvjetko, Bubalo, M. (2018b) Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives: *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. *Biotechnol. Lett.* **41**: 253-262.

Panić, M., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2020) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. Prihvaćen za objavljivanje u *Journal of chemical technology and biotechnology* (1986).

Pavoković, D., Košpić, K., Panić, M., Radojčić Redovniković, I. and Cvjetko Bubalo, M. (2021) Natural deep eutectic solvents are viable solvents for plant cell culture-assisted stereoselective biocatalysis. *Process Biochemistry* **93**: 69-76.

Prelog V. (1964) Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure and Applied Chemistry* **9**: 119-130.

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

Sekhar S., Bhat N., Bhat S.G. (1999) Preparation of detergent permeabilized Bakers' yeast whole cell catalase. *Process Biochemistry* **34**: 349-350.

Sheldon, R. A. (2016) Biocatalysis and biomass conversion in alternative reaction media. *Chemistry*. **22**, 12984–12999.

Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews* **114**: 11060 – 11082.

Straathof A. J., Panke S., Schmid A. (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Current opinion in biotechnology* **13**: 548 – 556.

Šinko G. (2005) Enzimske i proteinske metode u pripravi enantiomerno čistih kiralnih spojeva i svojstva nekih biološki aktivnih enantiomera. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **56**: 351–361.

Wu B.-P., Wen Q., Xu H., Yang Z. (2014) Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **101**: 101-107.

Xiao, Z. J., Du, P. X., Lou, W. Y., Wu H., Zong, M. H. (2012) Using water-miscible ionic liquids to improve the biocatalytic anti-Prelog asymmetric reduction of prochiral ketones with whole cells of *Acetobacter* sp. CCTCC M209061, *Chem. Eng. Sci.* **84**: 695–705.

Xu P.,Zheng G. W., Zong M. H., Li N., Lou W. Y. (2017) Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresources and bioprocessing* **4**: 34.

Yang T. X., Zhao L. Q., Wang J., Song G. L., Liu H. M., Cheng H., Yang Z. (2017) Improving whole-cell biocatalysis by addition of deep eutectic solvents and natural deep eutectic solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**: 5713–5722.

Zhang Q., De Oliveira Vigier K., Royer S., Jérôme F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**: 7108-7146.

Izjava o izvornosti

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



ime i prezime studenta