

Enantioselektivne biotransformacije katalizirane cijelim stanicama biljaka u prirodnim eutektičkim otapalima

Košpić, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:536177>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Karla Košpić

872/ MB

**ENANTIOSELEKTIVNE
BIOTRANSFORMACIJE
KATALIZIRANE CIJELIM
STANICAMA BILJAKA U
PRIRODNIM 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 prof.dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Manuele Panić mag.ing.

Dio rada izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Dubravka Pavokovića.

Rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta : Zelena otapala za zelene tehnologije (HRZZ, 9550).

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

ENANTIOSELEKTIVNE BIOTRANSFORMACIJE KATALIZIRANE CIJELIM STANICAMA BILJAKA U PRIRODNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Karla Košpić, 872/MB

Sažetak: U skladu s principima zelene kemije, provedena je ekološki prihvatljiva, enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)-etanona (DMPA) u 1-(*R,S*)-(3,4-dimetilfenil)-etanol u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida s različitim udjelima vode, primjenom dvije biljne kulture- šećerne repe i kaktusa, kao biokatalizatora. Dobiveni rezultati pokazali su da su konverzija i enantiomerni suvišak, korelirani s udjelom vode i tipom vodikove veze u prirodnom eutektičkom otapalu, dok se (*R*)-enantiomer alkohola pokazao dominantnim u reakcijama provedenim u većini ispitanih prirodnih eutektičkih otapala. Nadalje, moguće je uspješno provesti tri ciklusa reakcije s istom biljnom biomasom koja se nakon svakog ciklusa reciklira, dok se dobivene konverzije susprata u produkt neznatno smanjuju svakim ciklusom. Ispitivanjem biokompatibilnosti prirodnih eutektičkih otapala s biljnim kulturama, pokazalo se da ova otapala uzrokuju permeabilizaciju staničnih membrana, uslijed čega se događaju promjene u metabolizmu biljnih stanica.

Ključne riječi: *Biokataliza, zelena tehnologija, NADES, biljne kulture, enantioselektivnost*

Rad sadrži: 55 stranica, 21 slika, 6 tablica, 37 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković*

Pomoć pri izradi: *doc.dr.sc. Dubravko Pavoković*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo
2. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. Doc.dr.sc. Dubravko Pavoković
4. Prof.dr.sc. Anita Slavica

Datum obrane: 24. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis
University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of
Laboratory for biochemical engineering

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ENANTIOSELECTIVE BIOTRANSFORMATIONS BY WHOLE PLANT CELLS IN NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Karla Košpić, 872/ MB

Abstract: In accordance to green chemistry principles, an eco-friendly enantioselective reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanon (DMPA) into 1-(*R,S*)-(3,4-dimethylphenyl)-ethanol was performed in choline chloride-based natural deep eutectic solvents (NADES) with different amounts of water, using two plant callus cultures - sugar beet and cactus as biocatalysts.

The obtained results showed that both conversion and enantiomeric excess were found to be correlated with water content and the type of hydrogen bond donor in NADES, with (*R*)-alcohol configuration being predominate in the reactions conducted in most NADES solutions. Furthermore, it is possible to successfully conduct three cycles of reaction using the same plant biomass that is being recycled after every cycle, with slight decreases in the obtained conversions of substrate into product. In addition, when testing biocompatibility of NADES with plant cells, it was found that NADES are causing permeabilization of the cell membranes, leading to changes in the plant metabolism.

Keywords: *Biocatalysis, green technology, NADES, plant cultures, enantioselectivity*

Thesis contains: 55 pages, 21 figures, 6 tables, 37 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *.PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Dubravko Pavoković, Associate professor*

Reviewers:

1. PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Associate professor
2. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
3. PhD. Dubravko Pavoković, Associate professor
4. PhD. Anita Slavica, Full professor

Thesis defended: September 24th, 2018.

Sadržaj:

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	Principi zelene kemije.....	2
2.2.	Biotransformacije.....	4
2.2.1.	Biokataliza kao zelena tehnologija.....	6
2.2.2.	Enantioselektivne biotransformacije.....	7
2.2.3.	Biokatalizatori.....	9
2.2.3.1.	Biljne stanice kao biokatalizatori.....	9
2.2.3.2.	Oksidoreduktaze.....	10
2.3.	Zelena otapala.....	11
2.3.1.	Prirodna eutektička otapala.....	12
2.3.1.1.	Citotoksičnost prirodnih eutektičkih otapala.....	14
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1.	Materijali.....	16
3.1.1.	Kemikalije.....	16
3.1.2.	Oprema i uređaji.....	16
3.2.	Metode.....	17
3.2.1.	Priprema biokatalizatora.....	17
3.2.1.1.	Priprema hranjivih podloga za uzgoj biljnih kultura.....	18
3.2.1.2.	Uzgoj biljnih kultura i presađivanje.....	20
3.2.2.	Priprava prirodnih eutektičkih otapala.....	22
3.2.3.	Enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana biljnim stanicama 23	
3.2.3.1.	Određivanje koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona.....	27
3.2.3.2.	Izrada baždarnog dijagrama.....	28
3.2.4.	Reakcija enantioselektivne redukcije DMPA uz reciklaciju biljne biomase.....	28
3.2.5.	Ispitivanje biokompatibilnosti prirodnih eutektičkih otapala s biljnim stanicama.....	30
3.2.5.1.	Ispitivanje promjene mase biomase kroz vrijeme.....	30
3.2.5.2.	Ispitivanje vijabilnosti i morfologije.....	30
3.2.5.3.	Ekstrakcija staničnih metabolita iz biljne biomase.....	31
3.2.5.4.	Mjerenje lipidne peroksidacije.....	31
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	33
4.1.	Enantioselektivna redukcija 1-(3,4 dimetilfenil)etanona katalizirana biljnim stanicama.....	34
4.2.	Enantioselektivna redukcija 1-(3,4 dimetilfenil)-etanona uz reciklaciju biljne biomase.....	40
4.3.	Biokompatibilnost prirodnih eutektičkih otapala s biljnim stanicama.....	41
4.3.1.	Ispitivanje promjene mase biomase kroz vrijeme.....	43

4.3.2. Ispitivanje vijabilnosti i morfologije	44
4.3.3. Ispitivanje lipidne peroksidacije	45
5. ZAKLJUČCI.....	49
6. LITERATURA.....	51

1. UVOD

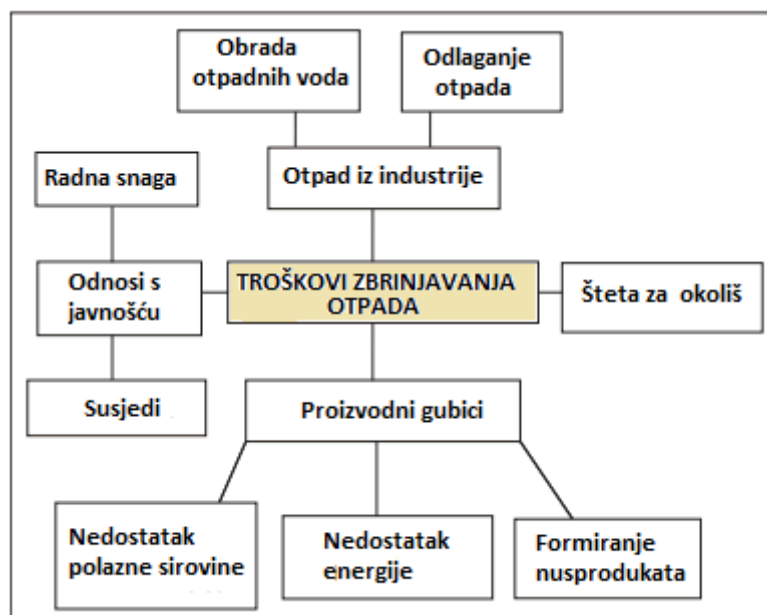
Optički aktivne tvari uvelike se koriste kao intermedijeri u proizvodnji lijekova, raznih organskih kemikalija, te agrokemikalija poput pesticida ili herbicida. Obzirom da su konvencionalne metode uglavnom skupe i štetne za okoliš, posljednjih desetljeća javila se rastuća potreba za uvođenjem ekološki prihvatljivih pristupa u proizvodnji raznih komercijalnih proizvoda (Panić i sur., 2018). Akademska zajednica, u suradnji s industrijom nastoji sve više implementirati načela zelene kemije u razvoj novih ili poboljšavanje postojećih proizvodnih procesa, a sve u cilju održivog razvoja i smanjenja štetnih tvari i otpada. Stoga se kemijski procesi sinteze sve više pokušavaju zamijeniti biokatalitičkim postupcima, a štetna organska otapala, alternativnim zelenim otapalima. Do sada su najveći potencijal pokazivale ionske kapljevine, no zbog visoke cijene i upitne toksičnosti i biorazgradivosti, rasla je potreba za pronalaskom bolje alternative (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Prirodna eutektička otapala- NADES (*eng. Natural deep eutectic solvents*), predstavljaju četvrtu generaciju otapala, čije su prednosti niske cijene, laka dostupnost, jednostavna sinteza i biorazgradivost (Zhang i sur., 2012). Do sada je provedeno nekoliko toksikoloških studija o utjecaju NADES-a na mikroorganizme, te je otkriveno da primjerice kolin-klorid oksalna kiselina pokazuje toksični učinak na *E.coli* (Wen i sur., 2015), kolin-klorid glicerol na *A.niger* (Juneidi i sur. 2015), a kolin-klorid fruktoza na stanične tumorske linije kao što je HeLaS3 (Mbous i sur., 2017). Međutim pokazalo se da većina NADES-a ipak pokazuje nisku toksičnost i biorazgradivost kao poželjne karakteristike otapala za primjenu u industriji. Međutim, još uvijek nije razjašnjen sam mehanizam djelovanja na stanične strukture i metabolizam živih stanica, u prvom redu biljnih stanica iz kojih se smatra da NADES izvorno potječu čineći treći sustav tekućina (Choi i sur., 2011).

U ovom radu koristili su se sljedeći principi zelene kemije: (i) primjena procesa biokatalize za dobivanje produkta, (ii) upotreba alternativnih zelenih otapala, te (iii) reciklacija biokatalizatora nakon provedene reakcije biokatalize. Dvije kalusne kulture biljaka šećerne repe i kaktusa, koristile su se kao biokatalizatori u reakciji asimetrične redukcije prokiralnog 1-(3,4-dimetilfenil)-etanona (DMPA) u 1-(*R,S*)-(3,4-dimetilfenil)etanol, u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin klorida s određenim volumnim postotcima vode (30 %, 50 % i 80 %), pri čemu dominantno nastaje *R*-enantiomer alkohola. Osim toga, ispitana je biokompatibilnost biljnih kultura s eutektičkim otapalima, praćenjem rasta i vijabilnosti, te stupnja degradacije staničnih membrana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Principi zelene kemije

Članice EU početkom 21.st. usklađivanje s propisima zakona o okolišu stajalo je ≈ 10 milijardi eura, a toliko se otprilike godišnje potroši u SAD-u na tretiranje i odlaganje otpada. Zbog poticanja na reciklaciju i smanjenje proizvodnje otpada uvođenjem produkata s većim životnim vijekom, vlade diljem svijeta uvode trend sve većeg povećavanja troškova odlaganja otpada. Troškovi obrade otpada iz industrijskih i kemijskih procesa mogu biti izuzetno visoki i predstavljaju velik izazov za industriju (Slika 1.) uključujući i obradu otpadne vode koja nastaje u industrijskim i drugim procesima a neobrađena ima predstavlja veliku štetu za okoliš ali i za resurse pitke vode. Osim direktnih troškova kod zbrinjavanja samog otpada, važno je napomenuti i troškove radne snage, te troškove koji predstavljaju proizvodni gubici zbog nedostataka energije, polaznih sirovina ili zbog zbrinjavanja nusproizvoda procesa. Stoga umjesto rješavanja problema otpada i štete na okoliš nakon što je nastala, vlade, industrija i javnost prihvatili su politiku održivog razvoja, a na znanstvenu zajednicu je stavljen pritisak dizajniranja novih procesa i proizvoda koji djeluju u skladu s tim. Novi pristup oslanja se u prvom redu na maksimiziranje efikasnosti procesa u smislu što manje uloženog materijala i energije za dobivanje što više proizvoda (Clark i Macquirre, 2002).



Slika 1. Troškovi zbrinjavanja otpada iz industrijskih kemijskih procesa (Clark i Macquirre, 2002).

Prema Jukić i sur. (2004), napredak znanosti i tehnologije uzrokovao je narušavanje prirodne okoline, što se očituje u klimatskim promjenama, nastajanju ozonskih rupa i nakupljanju nerazgradivih organskih onečišćivača u svim dijelovima biosfere – atmosferi, vodi i zemlji i tlu. Da bismo održali mogućnost življenja i djelovanja, potrebno je pronaći ravnotežu između primjene prirodnih resursa, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša (Jukić i sur., 2004).

Pristup koji se razvio iz ideje održivog razvoja naziva se zelena kemija. Principi zelene kemije osmišljeni su kao prevencija nastanka štete, a fokusirani su na smanjenje, odnosno uklanjanje opasnih ili štetnih tvari koje nastaju iz sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih produkata, a prikazani su u tablici 3. Time bi se smanjila ili eliminirala upotreba supstancija opasnih za ljudsko zdravlje i okoliš (Tao i Kazlauskas, 2011). Nije moguće u jednom procesu udovoljiti zahtjevima svih 12 načela zelenog procesa, ali se nastoji zadovoljiti što veći broj (Jukić i sur., 2004).

Tablica 1. Načela Zelene kemije (Anastas i Warner, 1998).

<ol style="list-style-type: none"> 1. Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je već nastao 2. Tijek kemijske sinteze treba osmisliti tako da se ulazne sirovine maksimalno uključe u konačni proizvod 3. Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i za okoliš 4. Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost 5. Upotrebu pomodnih kemijskih tvari (otapala, sredstva za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće 6. Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum 	<ol style="list-style-type: none"> 7. Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo 8. Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštita funkcijskih skupina) 9. Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama 10. Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja 11. Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari 12. U kemijskim procesima potrebno je smanjiti upotrebu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje)
--	--

Zelena kemija nastoji pronaći način za integracijom održivosti i reciklacije u industrijsku proizvodnu praksu (Tao i Kazlauskas, 2011). Industrijsko procesiranje fokusira se na smanjenje koraka u procesu proizvodnje, povećanje prinosa nakon svakog koraka te uštedu sirovina i energije. U pogledu troškova usklađivanja s zakonima o okolišu, primjenom principa zelene kemije u industriji, troškovi odlaganja otpada se znatno smanjuju, a osim toga generira se manje otpada (Bommarius i Riebel, 2004).

2.2. Biotransformacije

U novije vrijeme, brojni kemijski procesi za dobivanje određenih proizvoda bilo u farmaceutskoj, prehrambenoj industriji ili za dobivanje tzv. "bulk" kemikalija, zamijenjeni su biotransformacijskim procesima, koji imaju određene prednosti u odnosu na kemijsku sintezu (Grogan, 2009). Svaka reakcija pretvorbe supstrata u određeni produkt primjenom cijelih stanica ili enzima kao biokatalizatora po definiciji se smatra biokatalizom (Milner i Maguire, 2012). Postupci biokatalize poznati su već tisućama godina, čemu svjedoči činjenica da su ljudi provodili procese fermentacije za dobivanje piva, vina, octa ili sireva, ne znajući tada da su za te procese zaslužni živi organizmi. Do prve velike prekretnice dolazi 1858., kada je Louis Pasteur tretirao vodenu otopinu racemične smjese soli amonijevog tartarata kulturom plijesni *Penicillium glaucum*, čime je sintetiziran samo jedan enantiomer spoja. Ova reakcija smatra se pretečom enzimski katalizirane kinetičke rezolucije i danas se uvelike koristi u industriji i akademskoj zajednici. Biokataliza može zamijeniti mnoge tradicionalne metode kemijske katalize, uključujući reakcije u kojima se koriste toksični katalizatori (poput iona teških metala) ili u kojima nastaju spojevi štetni za okoliš (Reetz, 2013). Biokatalitičke reakcije mogu obuhvaćati širok spektar procesa koji ovise o broju potrebnih procesnih koraka i kompleksnosti supstrata. Pa tako razlikujemo procese fermentacije, biodegradacije i biotransformacije, koje u novije doba imaju sve veću industrijsku primjenu (Bommarius i Riebel, 2004). Biotransformacije su postupci pretvorbe definiranih kemijskih spojeva u definirane konačne produkte u jednom ili nizu (nekad nepoznatih) koraka, upotrebom cijelih stanica ili izoliranih enzima kao biokatalizatora (Bommarius i Riebel, 2004).

Biotehnološki postupci katalize se ne razlikuju od kemijskih samo prema korištenom katalizatoru, nego koriste i različite tehnološke osnove, pa su tako polazne sirovine konvencionalnih kemijskih procesa masti ili sirovi ugljen, dok su s polazne sirovine

biotehnoloških procesa šećeri, biljni ili animalni otpad, lignin i sl. Dok kod konvencionalnih procesa dominiraju operacije poput destilacije pri visokim temperaturama i tlakovima kod procesa pročišćavanja; u biotehnološkim procesima uglavnom se koriste membranski procesi pročišćavanja i kromatografske tehnike. Usporedbom s kemijskom katalizom, bilo homogenom kod koje su ligandi odgovorni za selektivnost ili heterogenom kod koje su katalitički aktiva mjesta vezana na čvrste nosače, enzimski katalizirane reakcije imaju brojne prednosti ali i nedostatke, što je prikazano detaljnije u Tablici 2. (Bommarius i Riebel, 2004). Zbog blagih reakcijskih uvjeta (neutralni pH i relativno niske temperature) i ekološke prihvatljivosti enzima, biokataliza uvelike djeluje u skladu s principima zelene kemije, te se smatra zelenom tehnologijom. Jedna od najvećih prednosti enzimski kataliziranih reakcija su velika brzina reakcije u odnosu na neenzimske reakcije, koja može narasti do 10^8 pa čak i do 10^{12} (Milner i Maguire, 2012). Jedna od najvećih odlika enzima jest njihova selektivnost, no s druge strane nedovoljna stabilnost enzima može predstavljati problem. Nedostatak upotrebe enzima kao biokatalizatora je u prvom redu osjetljivost enzima na ekstremne uvjete (temperatura, tlak ili pH), te limitiran broj supstrata s kojima mogu reagirati. Osim toga, neki enzimi su skupi i procesi njihovog izdvajanja i pročišćavanja mogu predstavljati velik udio ukupnog troška procesa. Mogućnosti napretka u biokatalitičkim procesima većinom se odnose na dizajniranje novih i ekonomičnijih procesa pronalaskom novih ili poboljšanjem postojećih biokatalizatora (Milner i Maguire, 2012, Bommarius i Riebel, 2004).

Tablica 2. Prednosti i nedostaci primjene biokatalizatora (Bommarius i Riebel, 2004, Milner i Maguire, 2012).

PREDNOSTI	NEDOSTACI
-Visoka supstratna, regio- i stereoselektivnost	- Limitirana dostupnost enzima za određene reakcije pretvorbe
-Blagi reakcijski uvjeti (pH, T, tlak)	-Stabilnost katalizatora u određenom mediju često nedovoljna
-Mogućnosti reciklacije	- Potreba za kofaktorima ili kosupstratima
-Otpad koji nastaje je uglavnom biorazgradiv	-Moguća inaktivacija enzima pri visokim temperaturama i ekstremnim pH i u organskim otapalima
-Mogućnosti vođenja procesa u velikom mjerilu	- Razvoj procesa sa novim ili poboljšanim biokatalizatorima je često dugotrajan

2.2.1. Biokataliza kao zelena tehnologija

Pod pritiskom pronalaska ekološki prihvatljivih metoda kemijske sinteze, industrija i akademska zajednica počinje se sve više okretati implementaciji biokatalitičkih metoda sinteze primjenom cijelih stanica ili izoliranih enzima. Zamjenom kemijske katalize biokatalizom, moguće je u velikoj mjeri zadovoljiti principe zelene kemije. Biokataliza se ubraja u zelene tehnologije zbog mogućnosti izolacije biokatalizatora iz prirodnih izvora i njegove reciklacije, biorazgradivosti i mogućnosti vođenja reakcije pri blagim uvjetima (Grogan, 2009). Zbog selektivnosti enzima, reakcije pretvorbe supstrata u produkt su jednostavnije i nema potrebe za dodatnim koracima poput zaštite funkcionalnih skupina prilikom kemijske katalize a smanjuje se i količina potrebnog reagensa i otapala, te količina nastalog otpada. Korištenjem sigurnih kemikalija smanjena je mogućnost nastanka toksičnih produkata, samim time nastaje sigurniji proizvod. Primjenom biokatalizatora, sam proces proizvodnje je sigurniji jer su kemijski katalizatori uglavnom toksični. Zanimljivo je da i sami biokatalizatori mogu biti konačan proizvod nekog procesa a ne samo posrednici u reakciji. Primjer za to je enzimski pripravak sredstva za čišćenje odvoda, koji zamjenjuje korodirajuća

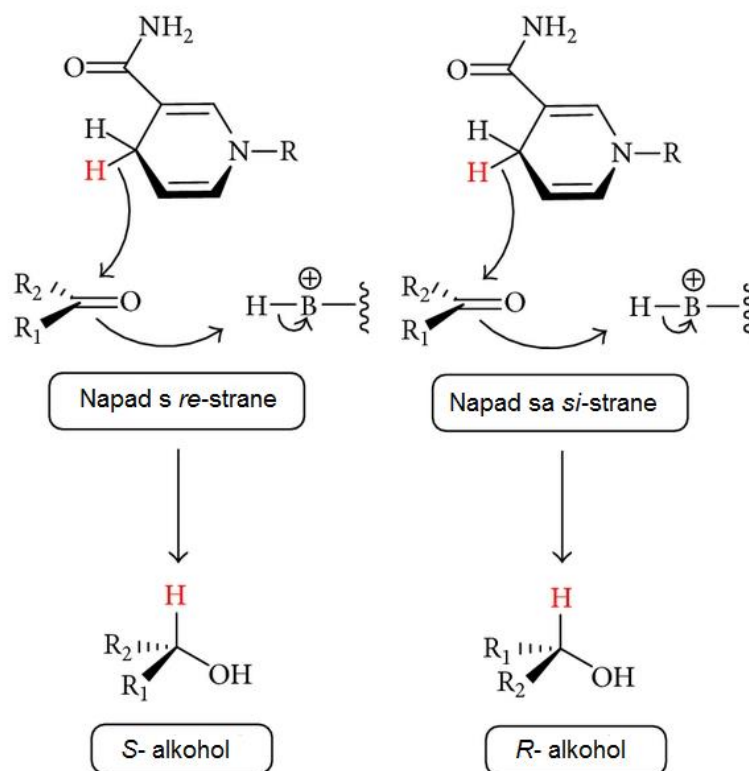
sredstva na bazi jakih kiselina ili baza, kao što je solna kiselina. Primjenom biokatalize moguće je proizvesti biorazgradive polimere, što nije moguće ili je otežano primjenom kemijske katalize. Veliku prednost primjene imaju organizmi koji izlučuju željene enzime u medij u kojem se uzgajaju, što pojednostavljuje cijeli postupak. Biokataliza se uglavnom provodi u vodi ili u organskim otapalima koji su sigurniji za okoliš od anorganskih otapala. Velike su i mogućnost uštede energije kod samog procesa jer uglavnom nema potrebe za utroškom energije na grijanje reakcijske smjese kao što je slučaj kod kemijske katalize, ali nema potrebe niti za hlađenjem, budući da je dovoljno samo pažljivo optimirati količinu dodanog biokatalizatora. Blagi uvjeti pri kojima se provodi većina reakcija biokatalize uglavnom se odnose na sobnu temperaturu, atmosferski tlak, neutralna pH-vrijednost i upotrebu nehlapljivih i nezapaljivih otapala a smanjuju rizik od požara, eksplozija i slučajnog otpuštanja kemikalija u okoliš (Tao i Kazlauskas, 2011).

2.2.2. Enantioselektivne biotransformacije

Optički aktivne tvari uvelike se koriste kao intermedijeri za proizvodnju lijekova, agrokemikalija i slično (Panić i sur., 2018). Molekule koje posjeduju svojstvo kiralnosti zakreću ravninu polarizirane svjetlosti pa ovisno o smjeru zakretanja razlikujemo *S* i *R* enantiomer nekog spoja, koji se međusobno ponašaju kao zrcalna slika. Različiti enantiomeri istog spoja imaju različitu biološku aktivnost, zbog čega je mogućnost proizvodnje enantiomerno čistih spojeva izuzetno važna u proizvodnji biološki aktivnih tvari. Sve veći je interes za pronalaskom reakcija koje mogu povećati enantiomernu čistoću kiralnih produkata (Anonymous, BASF, Milner i Maguire, 2012).

Sredinom 20-tog stoljeća, trojica kemičara Cahn, Ingold i Prelog uveli su sustav prioriteta, odnosno standardni proces imenovanja stereoizomera. Prelog ide i korak dalje, pa prilikom svojih studija o upotrebi mikrobnih sojeva kao biokatalizatora za stereoselektivnu redukciju ketona, primjećuje jedan fenomen koji dovodi do nastanka empirijskog pravila, koje određuje konformacijske odnose reaktanata i produkata i služi kao tehnika predviđanja stereokemijskog ishoda reakcija (Reetz, 2013). Prema Prelogovom pravilu, iz prokiralnog spoja asimetričnom sintezom može nastati kiralni spoj, pri čemu strana čiji ligandi imaju prioritet u smjeru kazaljke na satu naziva se *re*-strana, a obrnuto od smjera kazaljke na satu je *si*-strana. Ovisno s koje strane dolazi do napada na dvostruku vezu karbonilne skupine ketona, predviđa se koji enantiomer produkta će nastati.

Pa je tako ustanovljeno da do napada na dvostruku vezu, dominantno dolazi s *re*-strane, prilikom čega nastaje *S*-enantiomer, dok kada do napada dođe sa *si*-strane, nastaje *R*-enantiomer spoja, kako je prikazano na slici 1. (Yadav i sur., 2002, Bugg, 2009).



Slika 2. Primjer asimetrične redukcije prokiralnog ketona prema Prelogovom pravilu (Nguyen i sur., 2014)

Do sada se u industrijskoj primjeni najviše nalazi metoda kinetičke rezolucije racemične smjese, međutim konačan teoretski prinos samo jednog enantiomera spoja ne može premašiti 50%. Neke od reakcija kojima se može postići prinos veći od 50% su asimetrična sinteza, dinamička kiralna rezolucija i deracemizacija (Parales i sur. 2002). Stoga je danas jedan od najvećih izazova kemičara dizajnirati proces sinteze kojim bi se postigla enantiomerna čistoća produkta od čak 99,5%, slijedeći regulatorne odredbe koje je propisala FDA (Milner i Maguire, 2012).

2.2.3. Biokatalizatori

U biotransformacijama se kao biokatalizatori koriste enzimi (sirovi ili pročišćeni), biljne i životinjske stanice i tkiva, čiste kulture mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni, alge) te umjetni enzimi (abzimi) (Grogan, 2009).

Prednosti upotrebe cijelih stanica kao biokatalizatora su jeftina i jednostavna upotreba, jednostavno izdvajanje i uklanjanje stanica nakon provedene reakcije (filtracijom ili centrifugom), te vođenje procesa u vodenom mediju. Osim toga, cijele stanice su složeni sustavi i nema potrebe za dodavanjem koenzima ili kofaktora potrebnih za provođenje reakcije, a uz to posjeduju i mehanizme za regeneraciju koenzima, što smanjuje broj koraka i cijenu samog procesa. Najveći nedostatak cijelih stanica jest mogućnost nastajanja više od jednog nusprodukta bilo kompeticijskim reakcijama ili nusreakcijama kojima se supstrata umjesto u željeni produkt, može prevesti u neki kemijski entitet. Osim toga, važno je pravilno rukovanje sa stanicama u smislu pripreme odgovarajućih hranjivih podloga, optimiranja uvjeta rasta i sl. kako bi stanice održale vijabilnost i aktivnost, pri čemu se koriste odgovarajuće tehnike i procedure. Također je važno prije izdvajanja produkta, inaktivirati stanice bilo tretmanom kemijskim dezinficijensom ili autoklaviranjem, te ih ukloniti iz podloge. Najveća prednost upotrebe izoliranih enzima za procese biokatalize jest veća produktivnost i dobivanje čistog produkta, bez onečišćenja nusproduktima. Osim toga, jednom kad je enzim izoliran i pročišćen, aparatura za ovakav tip reakcije jest jeftinija i jednostavnija a jednostavnija je i izolacija produkta. Međutim, izolacija i pročišćavanje enzima može biti zahtjevno i skupo, a čisti enzimski pripravci mogu se kupiti ali također po relativno visokim cijenama. Osim toga, enzimi su najstabilniji u svom prirodnom okruženju, dakle unutar stanice, a kada se izoliraju iz stanice mogu izgubiti stabilnost i može doći do denaturacije. Velik broj izoliranih enzima za aktivnost zahtjeva dodatak kofaktora, koji se nakon reakcije moraju regenerirati što predstavlja dodatan korak u procesu (Grogan, 2009).

2.2.3.1. *Biljne stanice kao biokatalizatori*

Biljne stanice mogu katalizirati velik broj supstrata, a same su izvori velikog broja vrijednih spojeva poput antibiotika, antitumorskih spojeva, flavonoida i sl. Neke od reakcija koje se odvijaju u biljkama toliko su kompleksne da se do sad nisu uspješno provele sintetskim putem. Poznato je i da su metabolički putevi u biljkama puno kompliciraniji od

onih u mikroorganizama, zbog čega su biljke još uvijek nedovoljno istražene. U kontekstu zelene tehnologije, kroz posljednjih 20 godina opisano je nekolicina primjera redukcije prokiralnih ketona pomoću biljnih stanica u rastu ili imobiliziranih kultura biljnih stanica (Grogan, 2009, Gašo-Sokač i sur., 2014). Biljne stanice posjeduju stereo- i regioselektivne enzime, baš poput mikroorganizama, te su sposobne katalizirati nastajanje optički aktivnih spojeva (Grogan, 2009). Jedna od reakcija koja je do sada uspješno katalizirana biljkama je asimetrična redukcija prokiralnih ketona. Tako je reakcija uspješno provedena jabukom (*Malu pumila*), mrkvom (*Daucus carota*), krastavcem (*Cucumis sativus*), lukom (*Allium cepa*), krumpirom (*Solanum tuberosum*), rotkvicom (*Raphanus sativus*) i batatom (*Ipomoea batatas*) (Yang et al., 2008).

S druge strane, problemi kod primjene biljnih stanica u biokatalizi su teškoće sa uzgojem i praćenjem faza rasta biljaka, no jedna od mogućnosti nadilaženja tog problema jest eksploatacija biljnih enzima tehnikom rekombinantne DNA u bakterije ili kvasce (Grogan, 2009). Biljke sporije transformiraju supstrate, osjetljivije su na oštećenja i kontaminacije mikroorganizmima i uvjete uzgoja, dok neki supstrati i/ili produkti mogu djelovati toksično na biljne stanice, a pojedina organska otapala mogu inhibirati njihovu vijabilnost (Gašo-Sokač i sur., 2014).

2.2.3.2. Oksidoreduktaze

Porodica enzima koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije, odnosno prijenosa elektrona s jednog na drugi spoj nazivaju se oksidoreduktaze. Enzimi koji su dio ove porodice, mogu se klasificirati u tri kategorije: oksigenaze, oksidaze i dehidrogenaze. Neke od reakcije koje provode oksidoreduktaze su npr. reakcije hidroksilacije, redukcije ketona u alkohole, redukcija dvostrukih ugljik-ugljik veza, te oksidacija amina. Oksidoreduktaze za svoju aktivnost zahtijevaju prisutnost kofaktora kao što su nikotinamidni kofaktori (NADH, NADPH), flavini (FAD ili FMN), te željezo. Nakon provedene biokatalitičke reakcije, potrebno je regenerirati koenzime kako bi se ponovno mogla voditi reakcija, a što predstavlja dodatan korak u industrijskom procesu, a time i povećanje troškova ukupnog procesa. Stoga je s industrijskog gledišta poželjnije vođenje reakcije oksidoredukcije sa cijelim stanicama kao katalizatorima, zbog prirodne regeneracije koenzima (Grogan, 2009).

Velik broj ketona može se reducirati primjenom stereoselektivnih dehidrogenaza, prilikom čega nastaju kiralni sekundarni alkoholi. Ovom metodom može se postići jako visoka optička čistoća konačnog produkta, što je od velike važnosti za industrijsku primjenu (Bawa i sur.,

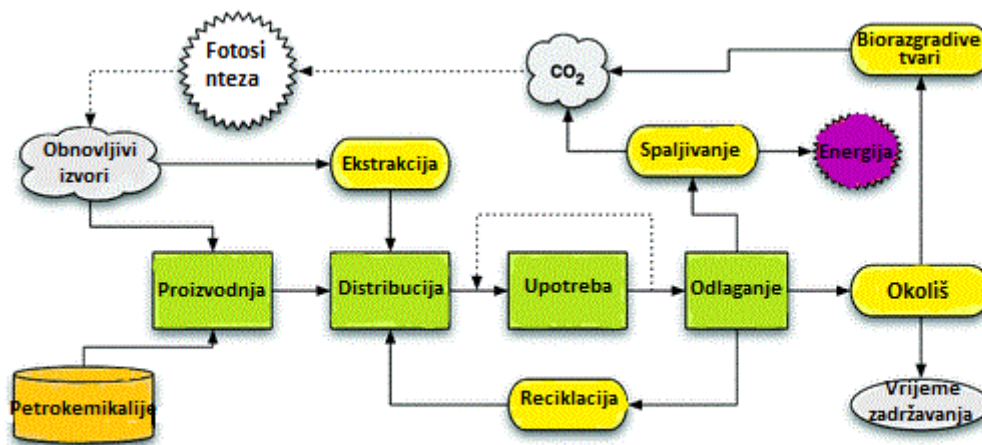
2008). Ketoni sa supstituiranim arilnim skupinama, te ketoesteri koji sadrže fenilne skupine reduciraju u odgovarajuće kiralne alkohole sa visokom razinom enantiomerne čistoće, dok redukcijom alifatskih ketona uglavnom nastaju racemične smjese, što ukazuje na to da fenilna skupina kada se nalazi u neposrednoj blizini karbonilne skupine, utječe na visoke razine enantioselektivnosti prilikom nastajanja konačnog produkta (Zhu i sur., 2006).

2.3. Zelena otapala

Odabir odgovarajućeg otapala presudan je za reakcije katalize. Otapalo omogućuje kontakt između katalizatora i supstrata, ali osim toga određuje broj procesnih koraka, mogućnost reciklacije te strategije odlaganja otpadnih tvari procesa (Zhang i sur., 2012). Stoga otapala čine sastavni dio svakog proizvodnog procesa, a procijenjeno je da čine čak 60% industrijskog otpada i 30% emisije hlapivih organskih tvari potječe iz organskih otapala. Organska otapala imaju široku upotrebu u industrijskim procesima, međutim osim što onečišćuju okoliš, nedostatak njihove primjene je velika hlapivost. Međutim, unatoč dobro poznatoj toksičnosti organskih otapala, ista se još uvijek koriste u industriji i istraživačkim laboratorijima jer često ne postoji bolja alternativa. S druge strane sve se više razmatra upotreba ekološki prihvatljivih, pametnih otapala, s mogućom prilagodbom svojstava (Cvjetko Bubalo i sur. 2015).

Karakteristike idealnog otapala za procese tehnologije su niska toksičnost, nezapaljivost, mogućnost reciklacije, inertnost i lako izdvajanje od konačnog produkta. Prema principima zelene tehnologije najidealnije bi bilo provođenje reakcije bez prisustva otapala, međutim to najčešće nije moguće, pogotovo jer neki od reaktanta mogu biti i u čvrstoj fazi. Nadalje, prvi odabir zelenog otapala je voda, s brojnim prednostima kao medij za provođenje reakcija, te kao jeftino i lako dostupno otapalo. S druge strane, u vodi često dolazi do nepoželjnih nusreakcija, a osim toga velik broj organskih spojeva nije topljiv u vodi (Clark i Macquarre, 2002). Također, troši se velika količina energije pri izolaciji konačnog produkta otparavanjem vode, što povećava cijenu proizvodnog procesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Prilikom odabira zelenog otapala, potrebno sagledati i ostale procesne parametre kao što su atomsko iskorištenje, zahtjevi za neobnovljivim sirovinama, upotreba energije, te transportni troškovi. Zbog toga treba uzeti u obzir životni ciklus otapala koji je prikazan na Slici 2., a koji obuhvaća procese od proizvodnje otapala, preko distribucije, do same upotrebe i naposljetku odlaganja (Clark i Tavenger, 2007).



Slika 3. Životni ciklus zelenih otapala (Clark i Tavenger, 2007)

Alternativna otapala koja se mogu koristiti kao zamjena konvencionalnim otapalima u reakcijama biotransformacija su ionske tekućine, superkritični fluidi, voda, eutektička otapala ili provođenje reakcije bez otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

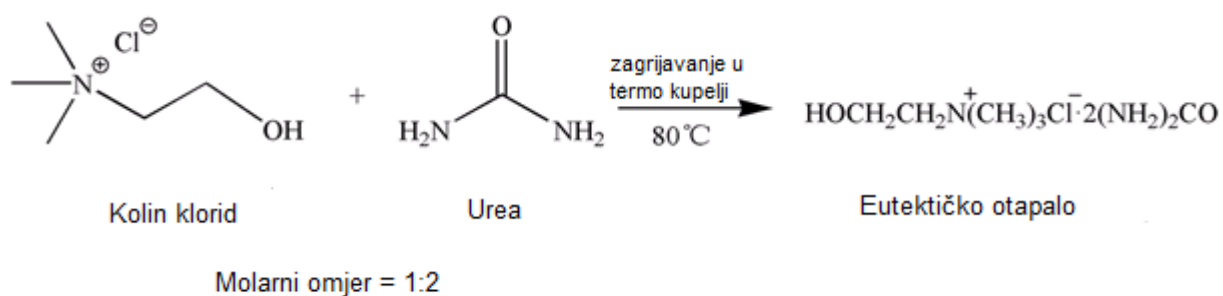
2.3.1. Prirodna eutektička otapala

Po definiciji, prirodna eutektička otapala- NADES (*eng. Natural deep eutectic solvents*) su smjesa dvije ili više različitih prirodnih spojeva, uglavnom primarnih metabolita poput šećera, aminokiselina, organskih kiselina ili derivata kolina, koji se mogu povezivati, uglavnom vodikom vezama tvoreći spoj koji je pri sobnoj temperaturi tekućina a temperatura tališta mu je niža od svake od pojedinačnih komponenti. (Paiva i sur., 2014).

Do nedavno, ionske kapljevine su se pokazivale kao najbolje alternativa otapalo, pogodno za provođenje zelenih procesa. Zelene karakteristike ionskih kapljevina su nizak tlak para, visoka temperatura vrelišta i mogućnost reciklacije. Budući da postoji neizmjereno velik broj kombinacija kationa i aniona koje mogu tvoriti ionske kapljevine, moguće je dizajnirati ionske kapljevine s željenim fizikalno-kemijskim svojstvima, kao što su temperatura tališta, viskoznost, gustoća, provodljivost i sl. Međutim, ionske kapljevine su toksične, slabo biorazgradive i visoka im je cijena sinteze. Zbog toga se pažnja znanstvene zajednice za

pronalaženje idealnog zelenog otapala u 21. st. okreće k prirodnim eutektičkim otapalima i eutektičkim otapalima, koja su do sada pokazala najveći potencijal u području zelene kemije. Eutektička otapala- DES (*eng. Deep eutectic solvents*) smatraju se četvrtom generacijom ionskih otapala zbog sličnih fizikalno-kemijskih svojstva ionskih kapljevina. Međutim, eutektička otapala ne moraju biti izgrađena isključivo od ionskih komponentni. Eutektička otapala su tekućine u širokom temperaturnom spektru od -150°C do $+70^{\circ}\text{C}$, biorazgradiva su i jeftina. Jedna od najčešćih kombinacija koja se koristi za sintezu eutektičkih otapala jest kvaternarna amonijeva sol kolin klorid (ChCl), pomiješana sa nekim spojem koji je donor vodikove veze, poput uree (Slika 4), glukoze, oksalne kiseline i sl. Kolin klorid je jeftina sirovina, netoksična i biorazgradiva a budući da je prirodnog podrijetla, moguće ju je jednostavno izolirati iz biomase. Eutektička otapala na bazi kolin klorida posjeduju sljedeća svojstva: kemijski su inertna, jednostavna je priprema, niska cijena, većina je biorazgradiva, biokompatibilna i netoksična, stoga predstavljaju pogodna otapala za biokatalitičke reakcije, slijedeći pritom zelene principe (Zhang i sur., 2012).

Ne samo da eutektička otapala mogu biti građena iz primarnih metabolita stanica, nego je otkriveno da sama otapala zapravo potječu iz živih sustava, gdje imaju specifične funkcije. Velik broj primarnih metabolita mogu stupati u interakcije te tvoriti intracelularne eutektičke smjese u stanicama biljaka, a koje se pokazalo da imaju važne funkcije u biljnim stanicama, stoga se smatra da su NADES treći sustav tekućina u biljkama, potpuno drugačiji od vode i lipida (Choi i sur., 2011). Jedan od najvećih misterija iz živog svijeta jest kako biljke preživljavaju sušu, odnosno stanje anhidrobioze. Jedno od objašnjenja može ležati u formaciji prirodnih eutektičkih smjesa, budući da se pokazalo da su neki šećeri i aminokiseline poput prolina, glutamina i glicin-betaina povezani s tolerancijom na sušu (Hoekstra i sur. 2001). Istraživanjem metaboloma NMR-om, pokazalo se da u stanju suše dolazi do tzv. "staklene tvorevine" za koju se isprva mislilo da su šećeri a onda se ustanovilo da se radi o NADES-u sastavljenom od šećera, kolina, prolina i organskih kiselina. Kasnije je donesen zaključak da prilikom stanja dehidracije pri jako niskim ili jako visokim temperaturama, u živim stanicama dolazi do formiranja NADES-a, koji stabilizira membrane, enzime i metabolite, te zadržava posljednju vodu preostalu u stanici. Osim toga, zbog svojstva NADES-a da ostaje tekućina pri jako niskim temperaturama, sprječava se smrzavanje biljaka (krioprezervacija). Smatra se da NADES igra ulogu i u germinaciji sjemena biljaka (Choi i sur., 2011).



Slika 4. Primjer sinteze DES-a koji se sastoji od ChCl i uree (Zeng i sur., 2014).

Prirodna eutektička otapala mogu se koristiti kao medij za enzimske reakcije, budući da enzimi zadržavaju svoju aktivnost kad su otopljeni u NADES, što ova otapala čini boljim izborom od konvencionalnih organskih otapala (Xu i sur., 2017). Iako komponente NADES mogu biti neki denaturirajući agensi poput limunske kiseline ili uree, dokazano je da većina lipaza, primjerice lipaza izolirana iz *Candida antartica*, zadržavaju visoku stabilnost i aktivnost u DES-u na bazi kolin klorida (Paiva i sur., 2014).

2.3.1.1. Citotoksičnost prirodnih eutektičkih otapala

Nadalje, netoksičnost DES-ova a priori proizlazi iz činjenice da su početne tvari koje se koriste za sintezu DES-a netoksične. Dosadašnja istraživanja su pokazala da DES-ovi bazirani na Ch-u nemaju citotoksični utjecaj na bakterijske kulture, dok su DES-ovi temeljeni na fosfonijevom anionu pokazali laganu antibakterijsku aktivnost (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). Citotoksični učinak je zapažen na staničnoj kulturi larva račića (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). U navedenim istraživanjima Hayyana i sur. (2013a, 2013b) zapaženo je da je citotoksičnost DES-ova bila veća nego citotoksičnost svake tvari zasebno, što ukazuje na mogući sinergistički učinak tih tvari u DESu. Razlog tome može biti sama kemijska priroda DES-a (nastala kao posljedica interakcije donora vodikove veze i organske soli), ali i loš prijenos kisika u kulturi stanica u hranjivoj podlozi zbog povećane viskoznosti DES-a (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). Citotoksičnost kolinijevih prirodnih eutektičkih otapala s glicerolom, glukozom ili oksalnom kiselinom kao donorom vodika ispitana je *in vitro* u kulturi stanica (Radošević i sur., 2015). Kolin klorid:glukoza i kolin klorid:glicerol pokazali su se netoksičnima ($EC_{50} > 10$ mM) dok je kolin klorid:oksalna (ChOA) pokazala blagu citotoksičnost (EC_{50} vrijednosti su bile 1,64 mM i 4,19 mM za CCO, odnosno MCF-7

staničnu liniju). Zapažena blaga citotoksičnost ChOA može se objasniti oštećenjem stanice kao posljedica nastanka kristala kalcijevog-oksalata, što je zapaženo u kulturi. Također, nakon dodatka DES-a u medij za uzgoj zapažen je i pad pH vrijednosti medija, zbog kiselosti ChOA. Iako je broj istraživanja usmjerenih k DES-ovima i NADES-ovima posljednjih godina u porastu, još uvijek nema dovoljno podataka o njihovoj toksičnosti, zbog čega je važno provoditi daljnja ispitivanja (cito)toksičnosti kako bi se proširila znanja o učinku DES-ova na živi svijet i okoliš te spoznali mehanizmi njihovog djelovanja (Hayyan i sur., 2016).

Danas eutektička otapala imaju moguće primjene u organskoj sintezi, biokatalizi, proizvodnji polimera, elektrokemiji, separacijskim procesima (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- 1-(3,4-dimetilfenil)etanon, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- D-(+)-Glukoza, p.a. Sigma-Aldrich, SAD
- Destilirana i redestilirana voda
- Etanol, Acros Organics, New Jersey, USA
- Etilen- glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Gvajakol
- Kalij- fosfatni pufer, pH 7
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, SAD
- *n*-heptan, Acros Organics, New Jersey, USA
- Polivinilpirolidon (PVPP)
- Sigma Aldrich M0404 pripravak
- Trypan Blue
- Vodikov peroksid

3.1.2. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Autoklav
- Centrifuga
- Homogenizator s podešavanjem temperature, Eppendorf Thermomixer comfort, Njemačka
- Laminar
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica Železniki, Slovenija
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Rotacioni vakuum uparivač, BüchiLaboratechnik AG, Švicarska
- Tresilica, Fisher Bioblock Scientific, Francuska

- Uobičajeno laboratorijsko posuđe i pribor (Erlenmeyerove tikvice, tikvice s okruglim dnom, pipetman, nastavci za pipetman, ependorf epruvete, epruvete, falconice (15ml), laboratorijske čaše, kivete, lijevak, filter papir, staničevina, parafilm itd.)
- Uparivač, Automatic Environmental SpeedVac, AES 1000, Savant
- UV/ Vis spektrofotometar, UNICAM, UV4
- Vortex miješalica, Stuart SA7

3.2. Metode

3.2.1. Priprema biokatalizatora

Primarne kalusne kulture šećerne repe (*Beta vulgaris* L.var. *altissima*) i kaktusa (*Mammillaria gracillis*) uzete su iz zbirke radnih kultura koje se uzgajaju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (Odsjek Biologija). Nediferencirane stanice kulture kaktusa dobivene su na način da se diferencirano biljno tkivo propagiralo *in vitro* u uvjetima izmjene fotoperioda dana i noć 16h-8h (intenzitet svjetlost $90 \text{ IE s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) pri 24°C na čvrstoj Murashige i Skoog (MS) hranjivoj podlozi (0.9% agar, 3% sukroza), bez dodataka faktora rasta. U navedenim uvjetima većina tkiva kaktusa je proizvodila kaluse. Spontano formirani kalusi se odvoje od ostatka tkiva i subkultiviraju na istom hranjivom mediju uz presađivanje svaka 4 tjedna (Balen i sur., 2008). Normalna kalusna linija šećerne repe potječe iz ishodišne diferencirane kulture tkiva, kultivirane *in vitro* uz dodatak faktora rasta (0,45 mM 2,4-diklorfenoksi octene kiseline i 0,44 mM 6-benziladenina). Morfološki, tkivo je djelomično formiralo kaluse koji se odvoje od ostatka tkiva i uzgajaju na hranjivom mediju PGH uz presađivanje svaka dva tjedna (Pavoković i sur., 2017).

Da bi se uzgojile do odgovarajuće mase potrebne za provođenje pokusa, prvo je potrebno sintetizirati hranjive podloge za uzgoj svake od kultura.

3.2.1.1. Priprema hranjivih podloga za uzgoj biljnih kultura

Hranjiva podloga za uzgoj kalusne kulture kaktusa je Murashige i Skoog hranjiva podloga za koju se koristi MS Sigma Aldrich M0404 pripravak koji već sadrži gotovo sve potrebne sastojke za rast biljke u odgovarajućim količinama (saharozu, mio-inozitol, makroelemente, mikroelemente, vitamine B1 i B6, nikotinsku kiselinu). Za pripremu 1L MS hranjive podloge potrebno je izvagati i u veliku laboratorijsku čašu dodati sastojke prema Tablici 3. Sve se komponente zajedno miješaju pomoću magneta na magnetskoj miješalici, sve dok se ne dobije homogena, bezbojna otopina, pH 5,8, koji se regulira dodatkom kiseline HCl ili lužine KOH. Dobivena hranjiva podloga se pretoči u tamnu staklenu bocu od 1L, sterilizira u autoklavu, 30 min na 121°C, te se nakon hlađenja sprema u ormar na hladno i mračno mjesto do upotrebe.

Tablica 3. Sastojci za pripremu hranjive podloge za uzgoj kalusne kulture kaktusa.

Sastojak:	Količina:
Saharoza	30 g
MS pripravak	4,4 g
Glicin	0,5 mL
Destilirana voda	Nadopuna do ukupnog volumena 1L

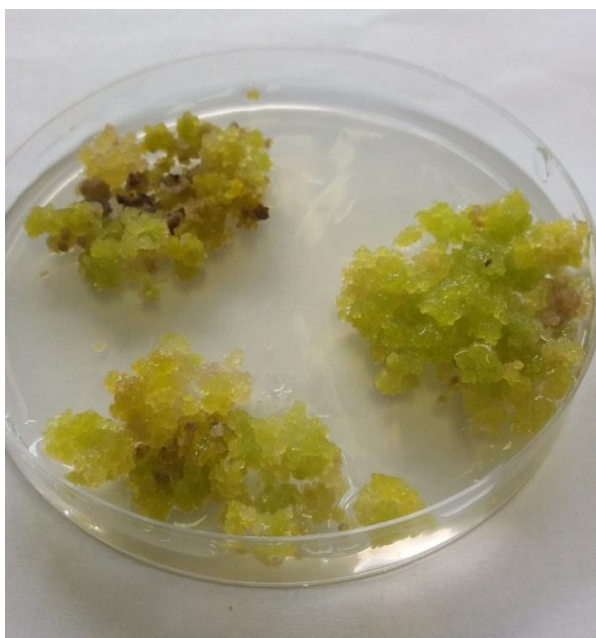
Za uzgoj kalusne kulture šećerne repe koristi se PG hranjiva podloga s dodatkom hormona rasta (PGH). Za pripremu jedne litre čvrste hranjive podloge PGH, potrebno je izvagati i u staklenu čašu od 1L dodati sastojke prema Tablici 4. Sve komponente se pomiješaju na magnetskoj miješalici, te se doda destilirana voda do ukupno 1 L. Nakon toga se mjeri i regulira pH otopine, koji mora biti oko 6. Zatim se otopina prebaci u staklenu bocu i tek onda se dodaje agar kako ne bi zaostajao po stjenkama čaše i kako ne bi interferirao s pH elektrodom. Hranjiva podloga se potom sterilizira u autoklavu 30min, na 121 °C. Nakon što se podloga ohladi do nekih 50°C, sterilno se u laminaru pretače po oko 25 mL podloge u sterilne, plastične Petrijeve zdjelice, gdje se onda pušta da se ohladi i stvrdne.

Tablica 4. Sastojci za pripremu hranjive podloge za uzgoj kalusne kulture šećerne repe.

Sastojak	Količina
Saharoza	30 g
Agar	7,5 g
Otopina A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ($2,5\text{g L}^{-1}$), KCl (6g L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (5g L^{-1}), KNO_3 (20g L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (3g L^{-1}))	100 mL
Otopina B ($\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (168mg L^{-1}) H_3BO_3 (62mg L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (106mg L^{-1}), KI (198mg L^{-1}), $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ($2,5\text{mg L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,25\text{mg L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ($0,25\text{mg L}^{-1}$)	100 mL
Otopina C ($\text{Na}_2 \text{EDTA}$ ($932,5 \text{ mg L}^{-1}$) i $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	10 mL
Otopina D (m.inozitola (100 mg L^{-1}), vitamina B6(1mg L^{-1}) i B1 (10 mg L^{-1}) i nikotinske kiseline (1 mg L^{-1})	5 mL
Otopina E (H_3BO_3 1 g L^{-1})	5 mL
Hormoni rasta 2,4-D i BAP (1 mg mL^{-1})	5 mL
Destilirana voda	nadopuna do ukupnog volumena 1 L

3.2.1.2. Uzgoj biljnih kultura i presađivanje

Prethodno se sterilizira radna ploha laminara i sav potreban pribor za presađivanje biljne kulture na nove, pripravljene hranjive podloge. Pincete se steriliziraju umakanjem u 96 %-tni alkohol etanol, nakon čega se spaljuju desetak sekundi. Postupak se ponavlja tri puta. Nakon što se PGH podloga u Petrijevim zdjelicama ohladi i skruti, spremna je za upotrebu. Prilikom presađivanja, važno je uzimati što zdravije tkivo koje se prepoznaje po rahloj strukturi i jarko zelenoj boji. Smeđa boja tkiva ukazuje na nekrozu i te dijelove tkiva je poželjno ukloniti. Kultura tkiva se uzima sterilnom pincetom i slaže na tri hrpice. Između svake hrpice se mora ostaviti dovoljno mjesta kako bi tkivo moglo nesmetano rasti. Hrpice moraju biti dovoljno male da se imaju prostora širiti, a opet dovoljno velike da se omogući brži rast zbog kooperativnog efekta stanica. Petrijeve zdjelice se omotaju parafilmom oko rubova kako bi se kultura tkiva bolje zaštitila od kontaminacije, te se polože pod laganim nagibom, kako bi se voda koja se kondenzira prilikom staničnog disanja, cijedila na dno petrijevke. Biljna kultura se uzgaja u uvjetima: sobna temperatura (cca. 23 °C) i izmjena dana i noći pri čemu period osvjetljenja traje 16h (80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a period mraka 8 h. Kulture se u pravilu presađuju jednom tjedno istim postupkom, a iznimno svaka dva tjedna.



Slika 5. Kalusna kultura šećerne repe (*Beta vulgaris*, L.var *altissima*) (vlastita fotografija).

Tekući hranjivi medij MS za uzgoj kalusne kulture kaktusa, pretoči se u prethodno sterilizirane Erlenmeyerove tikvice od 100 mL i to po 25 mL podloge u svaku tikvicu. Kalusna kultura kaktusa uzgojena prethodno na čvrstoj podlozi, sterilno se prebacuje u Erlenmeyerove tikvice sa tekućom hranjivom podlogom. Prebačeno tkivo se dodatno usitni pincetom kako bi se dobila suspenzijska kultura stanica. Tikvice se potom stave na tresilicu i uzgajaju na 23 °C, uz izmjenu dana i noći kao kod šećerne repe. Kalusna kultura kaktusa uzgaja se kao suspenzijska kultura radi boljeg rasta nego kad se uzgaja u čvrstoj MS podlozi. Presađivanje ovako uzgojene kulture poželjno je raditi jednom tjedno, a iznimno jednom u dva tjedna na sljedeći način: Iz već uzgojene suspenzijske kulture kaktusa se prvo pažljivo iscijedi iskorišteni medij, zatim se zapali grlo tikvice i naglo se prebaci sadržaj biljne kulture u tikvicu sa novom hranjivom podlogom.



Slika 6. Kalusna kultura kaktusa (*Mammillaria gracillis*) (vlastita fotografija).

Za pokuse su se uzimale biljne kulture koje su bile otprilike jednake starosti i to između 10 i 15 dana, kada se smatra da se još nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta.

3.2.2. Priprava prirodnih eutektičkih otapala

Prirodna eutektička otapala pripremala su se u tikvicama s okruglim dnom miješajući donor i akceptor vodikove veze prema određenom molarnom omjeru navedenom u tablici 3, te uz dodatak 30 %, 50 % ili 80 % (v/v) vode. Sva eutektička otapala pripremala su se kolin-kloridom, kao akceptorom vodikove veze, koji je prethodno osušen u vakuum sušari, a kao donori vodikove veze za sintezu eutektičkih otapala koristili su se D-glukoza, glicerol i etilen-glikol. Nakon što su se komponente pomiješale u odgovarajućim omjerima, (Tablica 5) reakcijska smjesa se je zagrijavala na 50°C kroz dva sata uz miješanje. Nakon toga, pripremljena eutektička otapala su sterilizirana u autoklavu na 121°C, kroz 15 min.

Tablica 5. Prirodna eutektička otapala koja su korištena u ovom radu.

Prirodno eutektičko otapalo	Kratica	Molarni omjer komponenata	Udio vode (% v/v)	Kratica
Kolin-klorid: glukoza	ChGlc	1: 1	30	ChGlc _{30%}
			50	ChGlc _{50%}
			80	ChGlc _{80%}
Kolin-klorid: glicerol	ChGly	1:2	30	ChGly _{30%}
			50	ChGly _{50%}
			80	ChGly _{80%}
Kolin-klorid: etilen-glikol	ChEG	1:2	30	ChEG _{30%}
			50	ChEG _{50%}
			80	ChEG _{80%}

3.2.3. Enantioselektivna redukcija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirana biljnim stanicama

Biljne kulture koje su se nakon presađivanja uzgajale između 10 i 15 dana. Svi koraci u postavljanju reakcije provodili su se u laminaru u aseptičnim uvjetima, kako bi se spriječila kontaminacija. Najprije je izvagana biljna biomasa. Suspenzijska kultura kalusa kaktusa prvo se preko sterilnog cijedila i filter papira ocijedi, a zatim se istim postupkom važe biomasa u svaku tikvicu. Probrano je zdravije tkivo iste starosti. U svaku se tikvicu potom dodaje odgovarajući volumen prirodnog eutektičkog otapala (ChGlc 30 %, 50 % i 80 %; ChGly 30 %, 50 % i 80 %; ChEG 30 %, 50 % i 80 %) ili destilirane vode, tako da masena koncentracija biljne biomase bude $0,25 \text{ g mL}^{-1}$. Na kraju se dodaje supstrat. Reakcijski uvjeti navedeni su u tablici 6. Sve se tikvice začepu sterilnim vatenim čepovima i aluminijskom folijom i postavljaju na tresalicu na 85 rpm, 23°C.

Tablica 6. Reakcijski uvjeti.

	Kalusna kultura šećerne repe	Kalusna kultura kaktusa
Masa biokatalizatora [g]	2,5	5
Volumen reakcijske smjese [mL]	10	20
c (supstrata) [mM]	0,169	0,675
Vrijeme reakcije [h]	72	48

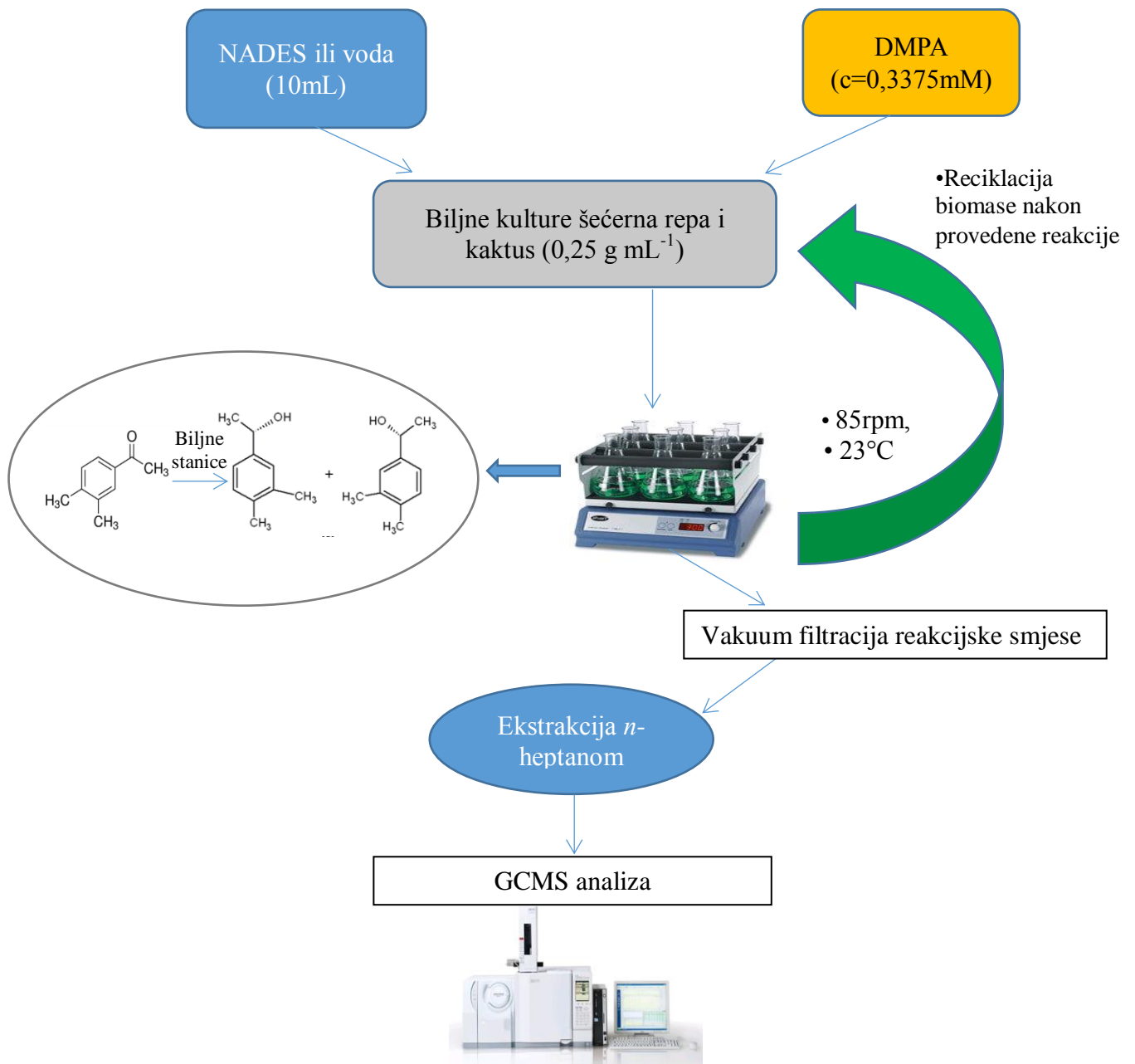


Slika 7. Tikvice sa reakcijskom smjesom nakon provedene reakcije biotransformacije DMPA u trajanju 2 dana s kalusnom kulturom šećerne repe kao biokatalizatorom (vlastita fotografija).



Slika 8. Tikvice sa reakcijskom smjesom nakon provedene reakcije biotransformacije DMPA u trajanju od 2 dana, s kalusnom kulturom kaktusa kao biokatalizatorom (vlastita fotografija).

Nakon provedene reakcije (Slike 7 i 8), medij u kojem je provedena reakcija odvoji se od biljne biomase filtracijom. Profiltrirani supernatant se ekstrahira *n*-heptanom (3 x 5 mL), uz snažno miješanje na vrtložnoj miješalici (5 min, 25°C). Heptanski sloj u kojem se nalazi produkt i zaostali supstrat se zatim upari do suha na rotacionom vakuum uparivaču i resuspendira u 50 μ L *n*-heptana te se analizira plinskom kromatografijom. Tijek svih opisanih radnji shematski je prikazan na Slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz vođenja redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)-etanona u optički aktivan alkohol (*R,S*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol s biljnim stanicama kao biokatalizatorom.

Kako bi se međusobno usporedila uspješnost redukcije u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se iskorištenje, enantiomerni suvišak, volumetrijska produktivnost i specifična produktivnost enzima.

Iskorištenje procesa asimetrične redukcije η (%) izračuna se prema jednadžbi:

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

gdje c_A predstavlja izmjerenu koncentraciju (*R,S*)-1-(3,4 dimetilfenil)-etanola (mmol L^{-1}), a c_{AT} teoretski moguću koncentraciju (*R,S*)-1-(3,4 dimetilfenil)-etanola (mmol L^{-1}).

Enantiomerni suvišak (eng. enantiomeric excess) ee (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$ee = \frac{(S\text{-}1\text{-}(3,4 \text{ dimetilfenil)etanol} - R\text{-}1\text{-}(3,4 \text{ dimetilfenil)etanol})}{(S\text{-}1\text{-}(3,4 \text{ dimetilfenil)etanol} + R\text{-}1\text{-}(3,4 \text{ dimetilfenil)etanol})} \times 100 \quad [2]$$

gdje $R\text{-}1\text{-}(3,4 \text{ dimetilfenil)etanol}$ predstavlja površinu ispod pika (*R*)-1-(3,4 dimetil)fenil-etanola, a $S\text{-}1\text{-}(3,4 \text{ dimetilfenil)etanol}$ površinu ispod pika (*S*)-1-(3,4 dimetilfenil)etanola

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

$$V_P = \frac{c_A - c_{A1}}{t} \quad [3]$$

gdje c_A predstavlja početnu molarnu koncentraciju (*R, S*)-1-(3,4 dimetilfenil)etanola ($\mu\text{mol L}^{-1}$), c_{A1} molarnu koncentraciju (*R,S*)-1-(3,4 dimetilfenil)etanola na kraju procesa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a t vrijeme trajanja procesa (h).

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

$$V_E = \frac{(np_2 - np_1)}{(m_B * t)} \quad [4]$$

gdje np_1 predstavlja početnu množinu (*R, S*)-1-(3,4 dimetilfenil)etanola (μmol), np_2 množinu (*R, S*)-1-(3,4 dimetilfenil)etanola na kraju procesa (μmol), m_B masu biljne biomase (g), a t vrijeme trajanja procesa (h).

Koncentracija nastalog alkohola c_A (mmol L^{-1}) računa se prema jednadžbi:

$$c_A = c_E - c_{E2} \quad [5]$$

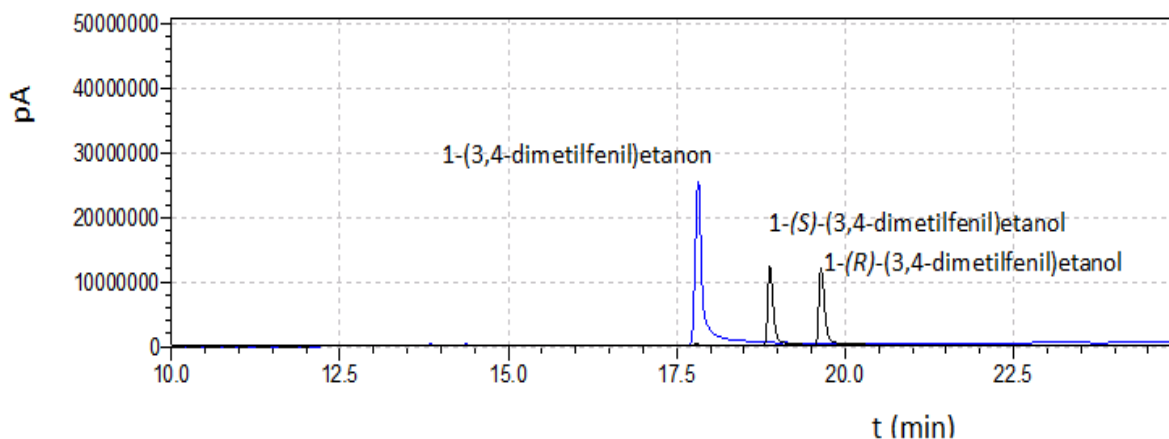
gdje je c_E početna molarna koncentracija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona (mmol L^{-1}), a c_E molarna koncentracija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona (mmol L^{-1}) na kraju procesa.

3.2.3.1. Određivanje koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona

Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom na uređaju Shimadzu QP2010PLUS.

Kromatografski uvjeti kolone za plinsku kromatografiju

- Kromatografska kolona: β DEX 225 (30mx0,25mmx0,25 μm)
- Pokretna faza: He
- Tlak: 46,2 kPa
- Ukupan protok: 6,7 ml/ min
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone: $T_1 = 105\text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), $T_2 = 155\text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta t = 2\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$)
- Temperatura injektora $220\text{ }^\circ\text{C}$; temperatura detektora $200\text{ }^\circ\text{C}$
- Vrijeme trajanja analize: 26 minuta



Slika 10. Tipičan GC kromatogram analize reakcijske smjese enantioselektivne redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona

Identifikacija 1-(3,4-dimetilfenil)etanona, 1-(*R*)-(3,4-dimetilfenil)etanola i 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanola provedena je na temelju razlike u retencijskim vremenima pojedinih komponenata smjese koje prolaze kroz kiralnu kromatografsku kolonu te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka (slika 8). Retencijsko vrijeme (R_t) za 1-(3,4-dimetilfenil)etanona iznosi 17,82 min, R_t za 1-(*R*)-(3,4-dimetilfenil)etanol 19,06 min i R_t za 1-(*S*)-(3,4-dimetilfenil)etanol 19,53 min (Slika 10).

3.2.3.2. Izrada baždarnog dijagrama

Pripreme se otopine 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,68; 0,34; 0,17; 0,08; 0,04; 0,02 mmol L⁻³. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanese se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrtala dijagram ovisnosti množinske koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona o površini ispod pika te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u uzorcima. Molarna koncentracija zaostalog supstrata računa se izravno prema jednadžbi pravca dobivene iz baždarnog dijagrama. Pretpostavka je da u reakciji nastaje samo jedan produkt, pa se stoga koncentracija nastalog produkta jednostavno izračuna tako da se od početne koncentracije supstrata oduzme koncentracija supstrata izmjerena na kraju reakcije.

3.2.4. Reakcija enantioselektivne redukcije DMPA uz reciklaciju biljne biomase

Za ovaj pokus koristila se kalusna kultura šećerne repe i prirodno eutektičko otapalo ChGlc 30 %, 50 % i 80 %, te voda kao kontrola. Na isti način kako je prethodno opisano, postavi se reakcija tako da je masena koncentracija biljne biomase iznosila 0,25 g mL⁻¹, a koncentracija dodanog supstrata DMPA u 1mL reakcijske smjese iznosi 6,75 mmol L⁻¹. Postave se po dvije paralele svake reakcijske smjese. Reakcija se vodi ukupno 21 dan, a 7. i 14. dan iskorišteni medij se izvlači sterilnim nastavkom i zamjenjuje se s novim medijem u istoj koncentraciji, te se dodaje ista početna koncentracija supstrata kao i na početku procesa. Na taj način biljna biomasa se reciklira nakon provedenog ciklusa reakcije enantioselektivne redukcije u trajanju od 7 dana, te se ponovno upotrebljava za novi ciklus reakcije. Uzorkovanje se provodi 2.,3.,4.,7.,8.,10.,14.,17. i 21. dan u aseptičnim uvjetima na sljedeći način:

Reakcijska smjesa se prvo promiješa radi homogenizacije, zatim se uzorkuje alikvot od 1 mL, prebaci u čiste epice i centrifugira (10 000 rpm, 10 min). Supernatant se dekantira u čiste falconice. U supernatant se dodaje interni standard (IS) 1-(3-metilfenil)etanon (MPA) u koncentraciji 14,7 mmol L⁻¹. Ekstrakcija se provodi dodatkom *n*-heptana (4,5 mL), te snažnim miješanjem na vrtložnoj miješalici (10 min), pri čemu zaostali supstrat DMPA, produkt i interni standard prelaze u heptanski sloj. Ukoliko se nakon miješanja formira emulzija između dva razdvojena sloja, provede se centrifugiranje (6000 rpm, 5 min). Nakon toga se oprezno pipetom izdvoji gornji heptanski sloj i prebaci se u čiste epruvete. Uzorak se otpari do suha u SpeedVac-u, resuspendira u 20 μL *n*-heptana i analizira na GCMS.

Koncentracija zaostalog supstrata DMPA, izračuna se preko koncentracije internog standarda prema sljedećoj formuli:

$$c(DMPA) = \frac{pA(DMPA) * c(IS)}{p(IS)} \quad [6]$$

gdje $c(DMPA)$ predstavlja izmjerenu koncentraciju 1-(3,4-dimetilfenil)etanona (mmol L⁻¹), pA površinu ispod pika DMPA, $c(IS)$ koncentraciju internog standarda (mmol L⁻¹), a $p(IS)$ površinu ispod pika internog standarda.

Budući da se analiza provodila u alikvotu reakcijske smjese od 1 mL a ne u cijelom mediju, rezultati se prikazuju kao konverzija (%), a izračunavaju se prema istoj formuli kao iskorištenje reakcije [1]. Rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [7]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama S_x :

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [8]$$

gdje N predstavlja ukupan broj uzoraka u skupini a x_i pojedinačne vrijednosti uzoraka.

3.2.5. Ispitivanje biokompatibilnosti prirodnih eutektičkih otapala s biljnim stanicama

Kako bi se ispitao utjecaj NADES-a na rast i metabolizam biljnih stanicama, koristila se kalusna kultura šećerne repe (uzgojena prethodno opisanim postupkom) i prirodno eutektično otapalo ChGlc 30 %, 50 % i 80 %. Kao kontrole koristile su se destilirana voda i tekući hranjivi medij za uzgoj šećerne repe (PGH). Masena koncentracija biljne biomase bila je $0,25 \text{ g mL}^{-1}$ kao i u prethodnim pokusima, a uzgoj se provodio ukupno 20 dana, prilikom čega se 0., 3., 7., 10., 14. i 20. dan uzgoj zaustavljao a biljna biomasa odvojila od medija vakuum filtracijom, te se provela analiza vijabilnosti, promjene mase biomase kroz vrijeme, određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorku, te određivanje koncentracije produkta lipidne peroksidacije (MDA) u mediju i u biomasi.

3.2.5.1. Ispitivanje promjene mase biomase kroz vrijeme

Masa biljne kulture na početku uzgoja u svim tikvicama je $\approx 2,5 \text{ g}$. Biljna se biomasa se nakon uzgoja određen broj dana, odvaja od medija vakuum filtracijom nakon čega se važe na analitičkoj vagi i dobivena masa se uspoređuje s početnom masom. Budući da je biomasa na početku pokusa relativno vlažna, a nakon postupka vakuum filtracije dobije se gotovo potpuno osušena biomasa, potrebno je uvesti faktor korekcije za relativan postotak vode u početnom uzorku biomase. To se provede na način da se prije nego se doda medij, odvaže $\approx 2,5 \text{ g}$ biomase direktno iz Petrijeve zdjelice gdje je uzgojena i osuši se istim postupkom vakuum filtracije kao što se radi sa suspenzijom stanica. Početna masa biomase se zatim umanji za određeni postotak kako bismo odredili početnu masu suhe tvari biljne biomase. Izmjerene vrijednosti mase s uračunatom korekcijom za postotak vode, prikazuju se grafički u odnosu na vrijeme uzgoja.

3.2.5.2. Ispitivanje vijabilnosti i morfologije

Nakon provedene vakuum filtracije, odvaže se $0,15 \text{ g}$ osušene biljne biomase te se resuspendira u 1 mL destilirane vode na vrtložnoj miješalici. Odreže se vrh nastavka i otpipetira $50 \mu\text{L}$ suspenzije biljnih stanica i prebaci u suhu tubicu. Doda se jednak volumen ($50 \mu\text{L}$) boje *Trypan Blue*, te se promiješa. Zatim se otpipetira $80 \mu\text{L}$ ovako priređene smjese i

prebaci na predmetnicu, te se poklopi pokrovnicom. Mikroskopiranje se provodi na svjetlosnom mikroskopu (povećanje 10x). Traži se minimalno 5 slika gdje se broje žive i mrtve stanice, a rezultat se prikazuje kao postotak mrtvih stanica. Prate se i vidljive morfološke promjene stanica. Ostatak biljne biomase zapakira se u aluminijsku foliju, zamrzne se u tekućem dušiku te se spremi u zamrzivač na -80 °C, do ponovnog korištenja. Iskorišteni medij se nakon vakuum filtracije također spremi u zamrzivač na -20 °C.

$$vijabilnost = \frac{\text{broj mrtvih stanica}}{\text{broj živih stanica}} * 100 \quad [9]$$

3.2.5.3. Ekstrakcija staničnih metabolita iz biljne biomase

Uzorci biljne biomase se izvade iz zamrzivača i prebace na zaleđeni podložak gdje se osigura da im temperatura ostaje relativno niska tijekom rada, što je važno za održavanje native strukture i aktivnosti enzima koja će se mjeriti.

Ekstrakti se pripremaju na sljedeći način: iz svakog od uzoraka izvaže se po 0,5 g biomase i prebaci se u zaleđeni tarionik koji se cijelo vrijeme dok postupak traje drži na ledenom podlošku, radi održavanja temperature. Pospe se (na vrh žlice) PVPP, te se postepeno u obrocima dodaje po 0,5 mL kalij-fosfatnog pufera (KP), pH 7 i dobro se izdubi. KP pufer se prethodno pripremi u odmjerne tikvici na način da se pomiješa 1,925 mL 1M KH₂PO₄ i 3,07 5mL 1M K₂HPO₄, te se nadopuni do oznake redestiliranom vodom i čuva na +4°C. Smjesa se potom kvantitativno prebaci u suhu tubicu i stavi na centrifugiranje (20 000 rcf, 10 min). Nakon centrifugiranja, bistri se supernatant prebaci u nove tubice i ponovno se centrifugira (20 000 rcf, 30 min). Bistri supernatant se izdvoji u nove tubice koje se tijekom rada čuvaju u mrvljenom ledu.

3.2.5.4. Mjerenje lipidne peroksidacije

Prvo se pripremi ekstrakcijska smjesa koja se sastoji od 0, 3 %- tne tiobarbituratne kiseline (TBA) u 10 %- tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA). Zatim se 200 µL prethodno pripremljenih ekstrakata u KP puferu ili iskorištenog medija pomiješa s 1300 µL ekstrakcijske smjese u tubici i stavi zagrijavati u termomikseru (95 °C, 30 min). U termomikser se stave i dvije slijepa probe koje se sastoje od 200 µL KP pufera i 1300 µL ekstrakcijske smjese. Nakon 30 min, tubice se prvo kratko ohlade u ledenoj kupelji a zatim se stave na centrifugu

(20 000 rcf, 30 min, +4 °C). Nakon toga se supernatant prelije u čiste kivete i spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija na 532 nm i na 600 nm. Od vrijednosti apsorbancije očitane na 532 nm, oduzme se vrijednost očitana na 600 nm (korekcija za nespecifično zamućenje). Izmjerene apsorbancije u direktnoj su korelaciji s koncentracijom produkta lipidne peroksidacije- malondialdehidom (MDA).

- Specifični molarni apsorpcijski koeficijent kod 532nm iznosi $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Koncentracija MDA (mM) u 200 μL uzorka izračuna se prema formuli:

$$c(MDA) = \frac{(A_{532} - A_{600})}{\epsilon} \quad [10]$$

gdje $c(MDA)$ predstavlja molarnu koncentraciju MDA (mM), A_{532} i A_{600} , apsorbancije pri 532 i 600 nm, a ϵ molarni apsorpcijski koeficijent ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Koncentracija MDA (mM) po gramu suhe tvari biljne biomase izračuna se prema formuli:

$$c_u(MDA) = \frac{\left(\frac{(c(MDA)*100)}{1,56}\right)*V_u}{(m_{BM}*1000)} \quad [11]$$

gdje je $c_u(MDA)$ masa MDA (mM) po gramu suhe tvari biljne biomase, V_u je ukupan volumen ekstrakcijske smjese (mL), a m_{BM} je masa suhe tvari biljne biomase (g).

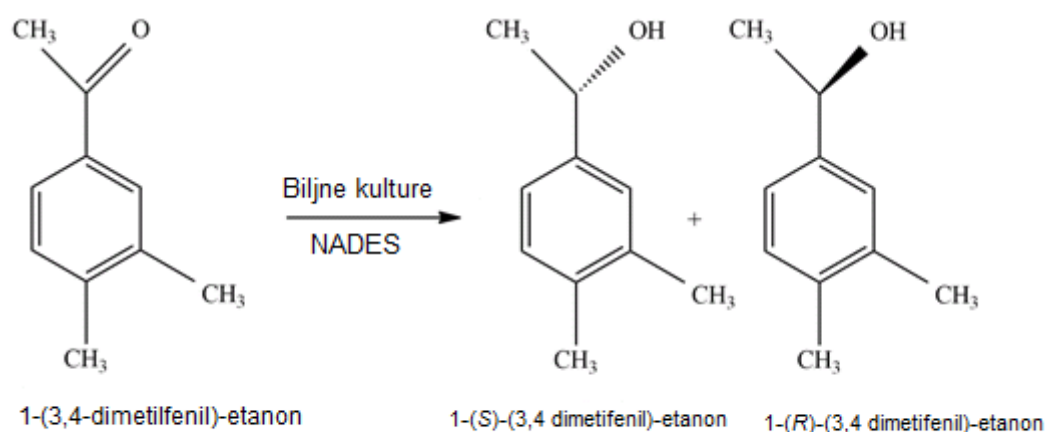
4. REZULTATI I RASPRAVA

Kiralni spojevi posjeduju različitu biološku aktivnost, a dva enantiomera istog spoja mogu imati različito, čak i oprečno djelovanje u interakciji s biološkim sustavima. Zbog sigurnosti i regulatornih propisa, moderna farmaceutska i kemijska industrija našle su se pred izazovom proizvodnje biološki aktivnih kiralnih spojeva ili kiralnih sintona visoke enantiomerne čistoće koji se u sve većem broju koriste u pripravi lijekova, agrokemikalija te drugih kemikalija koje imaju primjenu u biološkim sustavima (Pavoković i sur., 2017). Posljednjih nekoliko desetljeća sve više raste svijest o ugroženosti okoliša pred rastućom industrijalizacijom i urbanizacijom, zbog čega se aktivno pokušavaju pronaći ekološki prihvatljive alternative (Panić i sur., 2018). U kontekstu zelene tehnologije, kroz posljednjih 20 godina opisana je nekolicina primjera redukcije prokiralnih ketona pomoću biljnih stanica u rastu ili imobiliziranih kultura biljnih stanica (Grogan, 2009). Jedna od reakcija koja je do sada uspješno katalizirana biljkama je asimetrična redukcija prokiralnih ketona. Pavoković i sur. (2017) uspješno su proveli reakciju stereoselektivne biotransformacije 1-(3,4 dimetilfenil)etanona u vodi, koristeći diferencirane stanice korijenja 9 različitih biljaka kao biokatalizatora, pri čemu su dobili iskorištenje procesa od čak 88,2 %, a enantiomerni suvišak 97,1 % u korist *S*-enantiomera, u skladu s Prelogovim pravilom (Pavoković i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je dizajnirati i optimirati ekološki prihvatljiv proces enantioselektivne redukcije prokiralnog ketona 1-(3,4 dimetilfenil)etanona u kiralni alkohol (*S*)-1-(3,4 dimetilfenil)etanol, pomoću dvije kalusne biljne kulture šećerne repe i kaktusa, u prirodnim eutektičkim otapalima kolin-klorid:glicerol, kolin-klorid:glukoza i kolin-klorid:etilen-glikol s različitim udjelima vode. Kako bi se usporedila uspješnost enantioselektivne redukcije u NADES-ovima s konvencionalnim otapalima, reakcija je provedena i u vodi. Redukcijski potencijal biljaka ispitan je kroz tri uzastopna ciklusa reakcije primjenom iste reciklirane biljne kulture. Cilj eksperimenata bio je zadovoljiti što veći broj načela zelene kemije, te prema izmjerenim parametrima reakcije donijeti zaključke o uspješnosti procesa. Budući da se radi o biološkim katalizatorima, bitno je provjeriti utjecaj odabranog otapala na vijabilnost i metabolizam živih stanica. Izbor NADES-a kao alternativnog otapala u biokatalizi dodatno se razmotrio ispitivanjem biokompatibilnosti s biljnim stanicama, s ciljem boljeg razumijevanja dinamike same reakcije te mogućnosti napretka u dizajniranju što ekonomičnijeg procesa.

4.1. Enantioselektivna redukcija 1-(3,4 dimetilfenil)etanona katalizirana biljnim stanicama

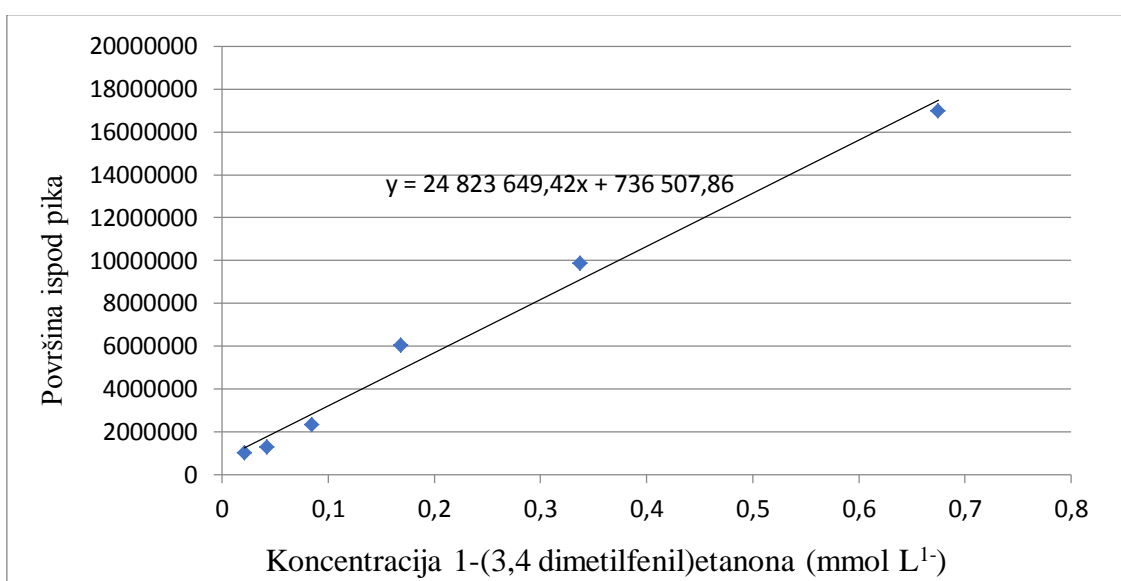
Biljke posjeduju odgovarajuću oksidoreduktazu koja u blagim uvjetima katalizira asimetričnu redukciju karbonilne skupine prokiralnog aromatskog ketona 1-(3,4 dimetilfenil)etanona u hidroksilnu skupinu optički aktivnog alkohola (*R,S*)-1-(3,4 dimetilfenil)etanola (Pavoković i sur., 2017) (Slika 11.), pri čemu dominantno nastaje *S*-enantiomer alkohola, u skladu s Prelogovim pravilom (Nguyen i sur., 2014).



Slika 11. Reakcija asimetrične redukcija DMPA katalizirana biljnim stanicama (Pavoković i sur., 2017).

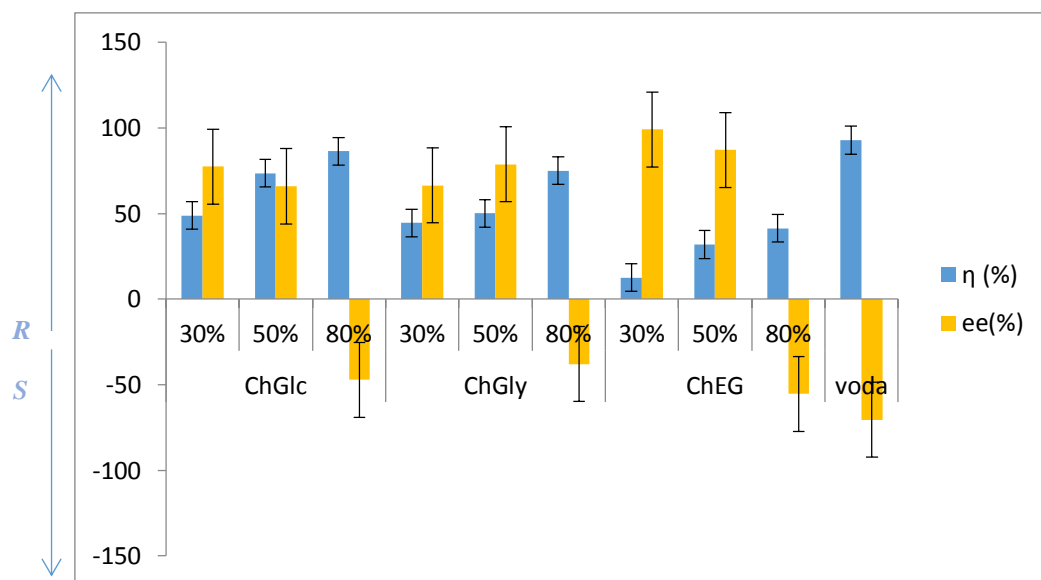
Preliminarni pokusi ovog rada uključivali su ispitivanja optimalnog omjera biomase, supstrata i medija, te praćenje tijekom reakcije kroz vrijeme, kako bi se odredilo u kojem vremenu se dostigne maksimalno iskorištenje i enantiomerni višak. Reakcija se provodila s obje kalusne kulture, u prirodnim eutektičkim otapalima i u vodi. Budući da se pokazalo da enantiomerni višak može u nekim slučajevima opadati s vremenom (vjerojatno zbog spontanog prelaska jednog u drugi enantiomer), a iskorištenje reakcije se uglavnom povećava s vremenom trajanja reakcije, odlučeno je da se za pokus uzimaju omjeri reaktanata i vrijeme pri kojima se dostigne optimalna vrijednost oba parametra (*ee* i η) umjesto maksimalna vrijednost svakog pojedinačnog. Na temelju rezultata preliminarnog testiranja kod masene koncentracije šećerne repe $0,25 \text{ g mL}^{-1}$, te molarne koncentracije DMPA $0,1687 \text{ mM}$ i nakon 72h reakcije, dobivene su najveće vrijednosti enantiomernog suviška i iskorištenja. Kod kaktusa se pokazalo da koncentracija DMPA $0,675 \text{ mM}$, prilikom 48h te ista koncentracija biomase $0,25 \text{ g mL}^{-1}$, daju najbolje rezultate.

Nadalje, proveden je probir 3 različita prirodna eutektička otapala (ChGlc, ChGly i ChEG) otapala u tri različite koncentracije, ovisno o udjelu vode (30 %, 50 %, 80 % (v/v)), s ciljem odabira najučinkovitijeg otapala za sintezu industrijski važnog kiralnog spoja (*S*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanola. Idealno otapalo za reakciju biokatalize trebalo bi osigurati visoku stabilnost i aktivnost biokatalizatora, veliku dodirnu površinu između biokatalizatora i supstrata i jednostavnu izolaciju konačnog produkta smjese. Priprema svih 9 korištenih otapala relativno je jednostavna, uz dobivena iskorištenja 100 %. Mali problem prilikom vaganja može predstavljati velika gustoća i viskoznost etilen-glikola i glicerola, dok s kolin kloridom treba brzo i precizno rukovati jer se kristalići soli mogu relativno lako rastaliti u viskoznu tekućinu. Čista prirodna eutektička otapala, sastavljena od dviju komponenti u odgovarajućim molarnim omjerima (ChGlc, ChGly i ChEG) uglavnom su jako viskozna, međutim dodatkom vode u odgovarajućim molarnim omjerima, smanjuje se viskoznost proporcionalno udjelu vode, te se postiže bolji prijenos mase između biokatalizatora i supstrata. Osim toga, određena koncentracija vode potrebna je za stabilnost i aktivnost enzima (Xu i sur., 2017). Reakcija započinje dodavanjem supstrata DMPA (0,169 i 0,675 mM) u suspenziju biljne biomase i otapala. Reakcijska smjesa se postavi na tresilicu (temperatura) i reakcija se provodi 48h (kaktus) i 72h (repa). Reakcijska smjesa se analizira plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom, a koncentracija zaostalog supstrata odredi se iz jednadžbe pravca dobivene iz prethodno izrađenog baždarnog dijagrama (Slika 12). Koncentracija dobivenog produkta u reakcijskoj smjesi odredi se prema formuli [5].



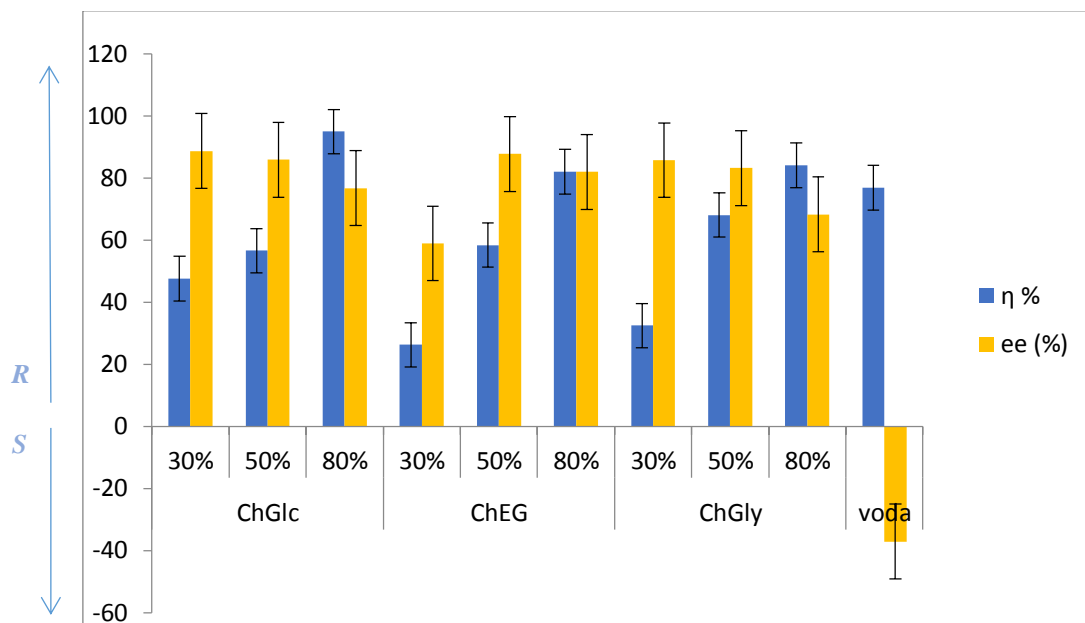
Slika 12. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije 1-(3,4 dimetilfenil)etanona.

Zbog bolje interpretacije rezultata, prema jednađbama [1], [2], [3] i [4] izračunata su iskorištenja, enantiomerni višak hidrolize, volumetrijska produktivnost te specifična produktivnost enzima u pojedinom otapalu, a rezultati su prikazani na slikama 11-14.



Slika 13. Dobivene vrijednosti enantiomernog suviška (*ee*) i iskorištenja (η) reakcije katalizirane kalusnom kulturom kaktusa u različitim prirodnim eutektičkim otapalima s udjelom vode 30, 50 i 80 %, te u vodi. Reakcijski uvjeti: 5 g biomase, koncentracija biomase 0,25 g mL⁻¹, koncentracija supstrata 0,675 mM, 23°C, 48h.

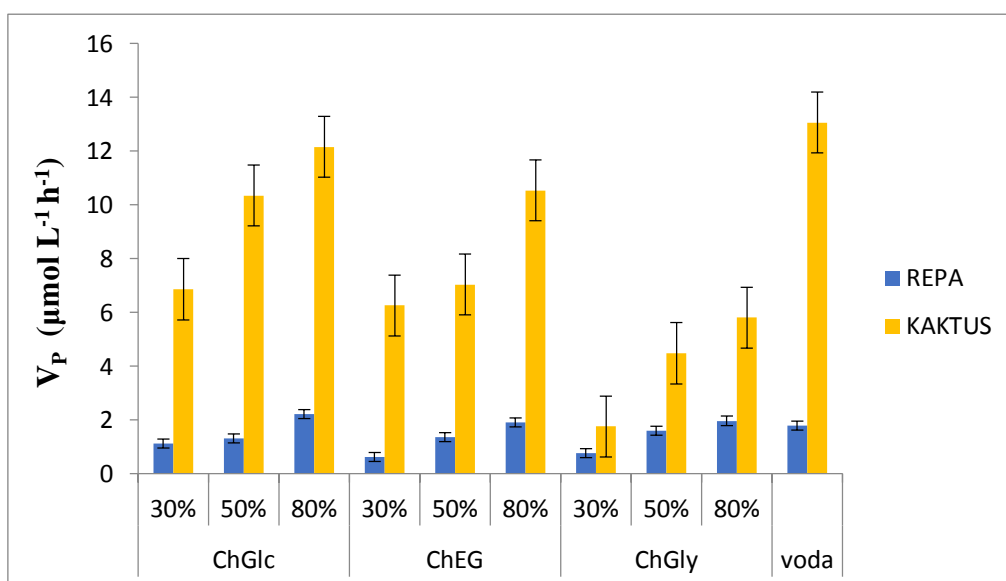
Iskorištenja (η) kaktusom katalizirane enantioselektivne redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona (Slika 13.) u prirodnim eutektičkim otapalima su u rasponu od 12,5 % do 74,9 %, dok je najveće iskorištenje dobiveno u vodi i iznosilo je 92,9 %. Dobiveni rezultati pokazuju kako se promjenom udjela vode može znatno utjecati na pomak ravnoteže ispitivane reakcije prema nastanku produkta. Pa tako promjenom udjela vode u ChGlc od 30 % do 80 % (v/v), iskorištenje raste od 48,8 % do 86,5 %. Najveće dobiveno iskorištenje u prirodnom eutektičkom otapalu postignuto je s ChGly 80 % i iznosi 74,9 %, a vrlo blizu je i iskorištenje postignuto s ChGlc 50 % koje iznosi 73,6 %. U reakciji provedenoj u većini NADES, dominantno nastaje (*R*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol, dok u vodi i 80 %-tnim NADES dolazi do inverzije enantioselektivnosti, gdje dominantno nastaje (*S*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol. Promjenom udjela vode u NADES-u od 30 % do 50 %, opada enantiomerni suvišak dok je kod 80 %-tnih dobiven najmanji enantiomerni suvišak ali u korist drugog enantiomera. Najveći (*ee*) dobiven je u ChEG 30 % i iznosi 99,1 %.



Slika 14. Dobivene vrijednosti enantiomernog suviška (*ee*) i iskorištenja (η) reakcije katalizirane kalusnom kulturom šećerne repe u različitim prirodnim eutektičkim otapalima s udjelom vode 30, 50 i 80 %, te u vodi. Reakcijski uvjeti: koncentracija biomase $0,25 \text{ g mL}^{-1}$, koncentracija supstrata $0,1687 \text{ mM}$, 23°C , 48h.

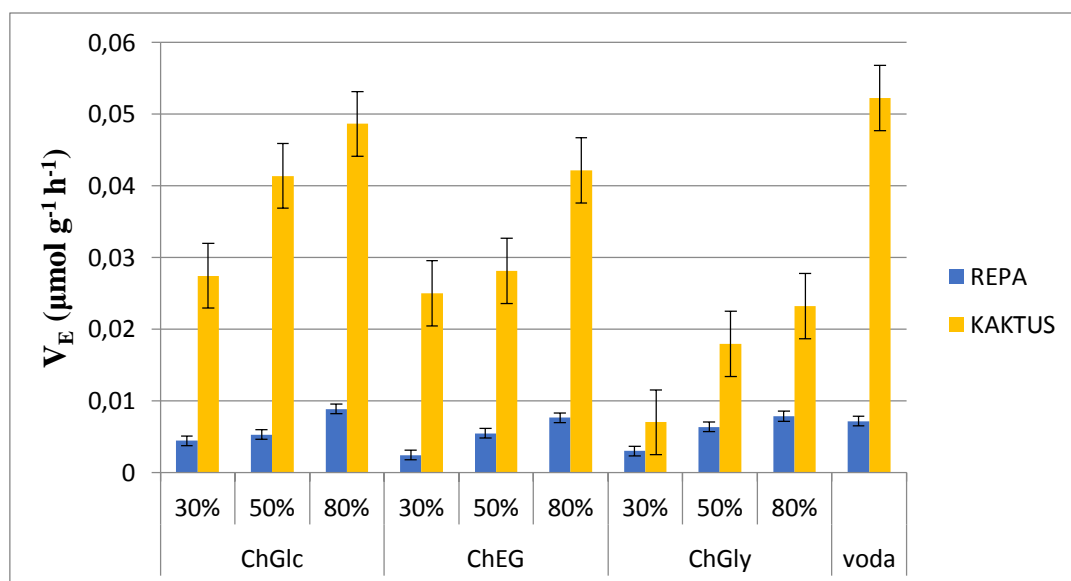
Iskorištenja (η) šećernom repom katalizirane enantioselektivne redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u prirodnim eutektičkim otapalima (Slika 14.) u rasponu su od 26,3 % do 95 %. Najveće iskorištenje dobiveno je u ChGlc 80 % i iznosilo je 95 %. Dobiveni rezultati pokazuju kao i kod pokusa s kaktusom, da povećanjem udjela vode u NADES-u, raste iskorištenje reakcije. Pa tako promjenom udjela vode u ChGlc od 30 % do 80 %, iskorištenje raste od 32,5 % do 84,1 %. U reakciji provedenoj u svim NADES, dominantno nastaje (*R*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol, dok u vodi dolazi do inverzije enantioselektivnosti, gdje dominantno nastaje (*S*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol. Promjenom udjela vode u ChGlc i ChEG od 30 % do 50 %, opada enantiomerni suvišak, što nije slučaj kod ChGly. Najveći (*ee*) dobiven je u ChGlc 30 % i iznosi 88,7 %.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je osim udjela vode u NADES-u, za optimalno iskorištenje i enantiomerni suvišak bitan i tip donora vodikove veze u NADES-u, pa se tako kao najbolje otapalo prema tim parametrima pokazao ChGly 80 %, kod kojeg je dobiveno iskorištenje iznosilo 95 % a enantiomerni suvišak 76,7 % u korist (*R*)-enantiomera.



Slika 15. Volumetrijska produktivnost (V_p) reakcije redukcije 1-(3,4 dimetilfenil)etanona katalizirane kalusnom kulturom šećerne repe i kalusnom kulturom kaktusa u prirodnim eutektičkim otapalima s 30, 50 i 80 % vode, te u vodi.

Vrijednosti volumetrijske produktivnosti (V_p) reakcije redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirane šećernom repom (Slika 15) u rasponu su od 0,62 do 2,23 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, a najveća vrijednost dobivena je u ChGlc 80 %. Kod reakcije katalizirane kaktusom, dobivene vrijednosti volumetrijske produktivnosti u rasponu su od 1,76 do 13,06 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, a najveća vrijednost dobivena je u vodi, dok je u prirodnim eutektičkim otapalima najveća vrijednost dobivena u ChGlc 80 % i iznosila je 12,16 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Iz dobivenih rezultata, kod obje biljne kulture volumetrijska produktivnost povećava se s povećanjem udjela vode u prirodnom eutektičkom otapalu.



Slika 16. Specifična produktivnost (V_E) reakcije redukcije 1-(3,4 dimetilfenil)etanona katalizirane kalusnom kulturom šećerne repe i kalusnom kulturom kaktusa u prirodnim eutektičkim otapalima s 30, 50 i 80 % vode, te u vodi.

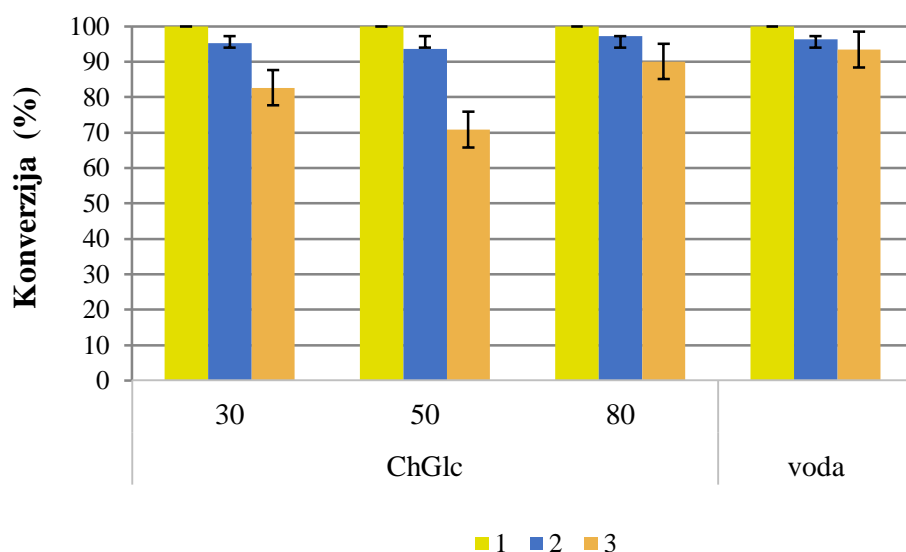
Vrijednosti specifične produktivnosti (V_E) reakcije redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona katalizirane šećernom repom (Slika 16.) u rasponu su od 0,0024 do 0,0089 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$, a najveća vrijednost dobivena je u ChGlc 80 %. Kod reakcije katalizirane kaktusom, dobivene vrijednosti specifične produktivnosti u rasponu su od 0,007 do 0,050 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$, a najveća vrijednost dobivena je u vodi, dok je u prirodnim eutektičkim otapalima najveća vrijednost dobivena u ChGlc 80 % i iznosila je 0,048 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Iz dobivenih rezultata, kod obje biljne kulture specifična produktivnost povećava se s povećanjem udjela vode u prirodnom eutektičkom otapalu.

Na temelju dobivenih vrijednosti pokazatelja uspješnosti reakcije, možemo zaključiti da je reakcija enantioselektivne redukcije 1-(3,4-dimetilfenil)etanona uspješno provedena, te da su se prirodna eutektička otapala pokazala kao dobar medij za provedbu reakcije biokatalize.

4.2. Enantioselektivna redukcija 1-(3,4 dimetilfenil)-etanona uz reciklaciju biljne biomase

Pokus je proveden s kalusnom kulturom šećerne repe i otapalom ChGlc s 30, 50 i 80 % (v/v) vode. Masena koncentracija biomase iznosila je $0,25 \text{ g mL}^{-1}$, a molarna koncentracija supstrata (DMPA) u 1 mL reakcijske smjese iznosila je $6,75 \text{ mmol L}^{-1}$. Provedena su tri uzastopna ciklusa reakcije asimetrične redukcije DMPA svaki u trajanju 7 dana (ukupno 21 dan). Nakon prvog i drugog ciklusa, točnije 7. i 14. dan, iskorišteni medij se izvojio od biomase, a biomasa se reciklirala i ponovno koristila za novi ciklus reakcije. Izračunate su vrijednosti konverzije (%) supstrata u produkt (*R*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol na kraju svakog ciklusa reakcije u svakom od korištenih otapala.

Kako bi se usporedila uspješnost reakcije u svakom otapalu na kraju svakog ciklusa reakcije, rezultati su grafički prikazani kao postotak konverzije s recikliranom biomasom na kraju 2. i 3. ciklusa, u odnosu na maksimalnu konverziju (%) dobivenu na kraju 1.ciklusa sa svježom biomasom (Slika 17.)



Slika 17. Dobivene konverzije (%) supstrata 1-(3,4-dimetilfenil)etanona u produkt (*R*)-1-(3,4-dimetilfenil)etanol s biljnom biomasom recikliranom 1 i 2 puta u otapalu ChGlc s 30, 50 i 80 % v/v vode i vodi, u odnosu na konverzije (%) dobivene sa svježom biomasom.

Dobivene vrijednosti konverzije supstrata u produkt u prvom ciklusu reakcije sa svježom biomasom bile su u rasponu od 78,9 do 83,6 % u prirodnim eutektičkim otapalima a najveća vrijednost dobivena je u vodi i iznosila je 94,3 %. Nakon prve reciklacije biomase, tj. u 2. ciklusu reakcije dobivene vrijednosti konverzije supstrata u produkte bile su u rasponu od 75,1 do 81,3 % u NADES, odnosno 90,9 % u vodi. Vrijednosti konverzija dobivenih s recikliranom biomasom opale su za 2,68 do maksimalno 6,32 % u odnosu na reakciju sa svježom biomasom. Nakon druge reciklacije biomase, u 3. ciklusu reakcije dobivene vrijednosti konverzije bile su u rasponu od 64,7 do 86,9 % u NADES i dalje najveća vrijednost konverzije dobivena je u vodi i iznosila je 90,2 %. Vrijednosti konverzija dobivenih s biomasom recikliranom 2 puta, odnosno u 3. ciklusu reakcije opale su za maksimalno 29,15 % u ChGlc 50 %, ali su u ChGlc 30 i 80 % opala za 10,0 i 17,3 %. Vrijednost konverzije u vodi nakon 3. ciklusa reakcije iznosila je 93,4 % od konverzije dobivene sa svježom biomasom. Kao najbolje prirodno eutektičko otapalo prema dobivenim vrijednostima konverzije pokazao se ChGlc 80 %, kod kojeg je konverzija na kraju reakcije sa svježom biomasom iznosila 83,8 %, nakon prve reciklacije biomase 81,3 % a nakon druge reciklacije biomase 75,3 %.

Na temelju dobivenih vrijednosti konverzije supstrata u produkt u reakciji sa svježom biomasom, te u reakcijama s jedan i dvaput recikliranom biomasom, možemo zaključiti da se biljke nakon provedene reakcije mogu reciklirati i ponovno koristiti za novi ciklus reakcije, pri čemu dolazi do relativno malog smanjenja produktivnosti reakcije u smislu konverzije supstrata u produkt. Moguće povećanje konverzije moglo bi se postići imobilizacijom biomase.

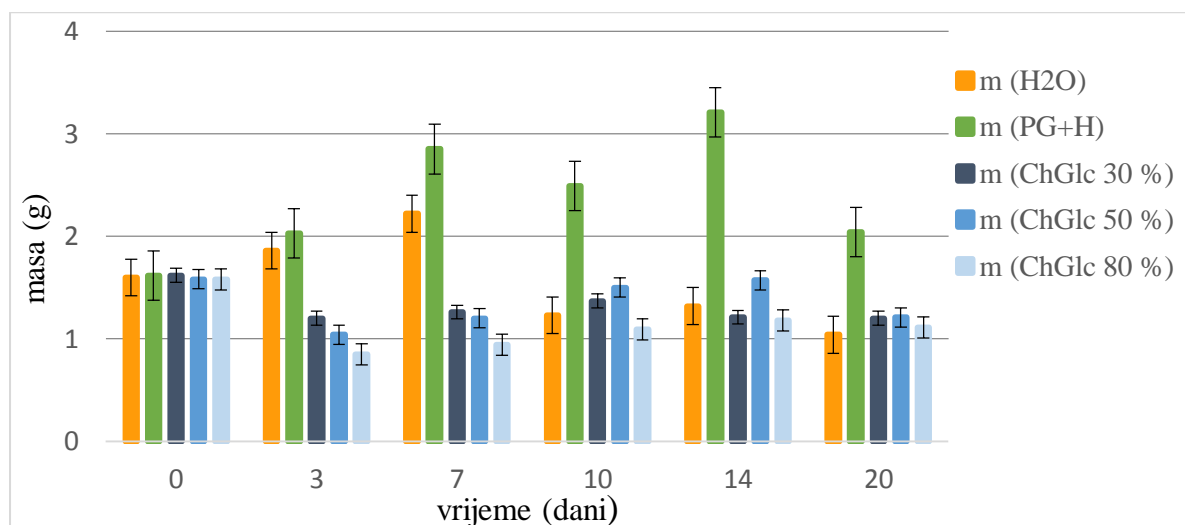
4.3. Biokompatibilnost prirodnih eutektičkih otapala s biljnim stanicama

Iako se za većinu ispitanih prirodnih eutektičkih otapala ustanovilo da su malo i gotovo nikako toksična za žive stanice, jedan od mehanizama citotoksičnosti koji se osobito ističe je mogućnost induciranja oštećenja plazma membrane stanica, koja rezultiraju povećanom poroznošću membrana. Posljedica toga je povećanje oksidativnog stresa stanica, koji se očituje kroz povećane koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta (*eng.* ROS, reactive oxygen species) (Hayyan i sur., 2016). Međutim, prema dosadašnjim istraživanjima pokazalo se da su prirodna eutektička otapala puno sigurnija i većina ih pokazuju malu i gotovo nikakvu citotoksičnost u usporedbi s DES. Jedno od temeljnih zakonitosti koje se nadovezuju na tu

tvrdnju je činjenica da bi citotoksičnost NADES trebala biti minimalna, budući da se izvorno sintetiziraju *in vivo* u biljnim stanicama (Paiva i sur., 2014). Pokazalo se da nekolicina faktora može utjecati na razinu citotoksičnosti NADES, a to su polazne sirovine te njihove interakcije s različitim funkcionalnim grupama, zatim fizikalna svojstva (u prvom redu viskoznost), te dodatak vode u određenoj koncentraciji. Kao najpogodnija polazna sirovina za sintezu NADES iskazao se kolin klorid, građevna jedinica fosfolipida (fosfatidilkolina i sfingomijelina) od kojih su građene stanične membrane (Hayyan i sur., 2016).

Kako bi se ispitaio utjecaj NADES na rast i metabolizam biljnih stanica proveden je pokus sa kalusnom kulturom šećerne repe i ChGlc u 3 koncentracije (30, 50 i 80 %) v/v vode. Biljne kulture su postavljene na uzgoj na treslicu (23°C, 16 h dan, 8 h noć) određen broj dana u svakom od otapala, a za kontrolu se koristila voda i u hranjivi medij PGH. Svaka tri dana uzimala se po jedna tikvica sa svakim od različitih medija u kojima su se uzgajale biljke i uzgoj bi se u njoj zaustavio. Biljna biomasa se potom vakuum filtracijom odvajala od medija i vagala, a iskorišteni medij i biomasa su se dalje obrađivali. Biomasa se bojala s *Trypan Blue* koja selektivno boja samo mrtve stanice, kako bi se odredila vijabilnost i morfologija stanica uzgajanih u NADES-u, te se usporedila s onom u kontrolama. Mehaničkim razbijanjem stanica u tarioniku izdvojen je stanični sadržaj, te se spektrofotometrijski određivala koncentracija proteina te koncentracija produkta lipidne peroksidacije (MDA). Koncentracije ukupnih proteina i MDA određivale su se i u iskorištenom mediju. Cilj pokusa bio je odrediti razlike u rastu i vijabilnosti biljnih stanica u NADES-u u odnosu na kontrole, ispitati potencijalne morfološke promjene stanica, ispitati ukupnu koncentraciju proteina u stanicama i u iskorištenom mediju, te ispitati razinu očuvanosti staničnih membrana i razinu stresa.

4.3.1. Ispitivanje promjene mase biomase kroz vrijeme



Slika 18. Dijagram rasta kalusne kulture šećerne repe u različitim medijima praćen kroz promjenu mase (g) kroz vrijeme (dani).

Biljna kultura šećerne repe uzgajana 3, 7, 10, 14 i 20 dana u različitim medijima, vakuum filtracijom se izdvojila od iskorištenog medija i vagala na analitičkoj vagi. Kako je prethodno opisano, odredio se faktor korekcije za relativan udio vode (%) u biomasi i taj faktor je iznosio 0,368. Sve dobivene vrijednosti mase množile su se s 0,632 kako bi se dobila masa suhe tvari biomase.

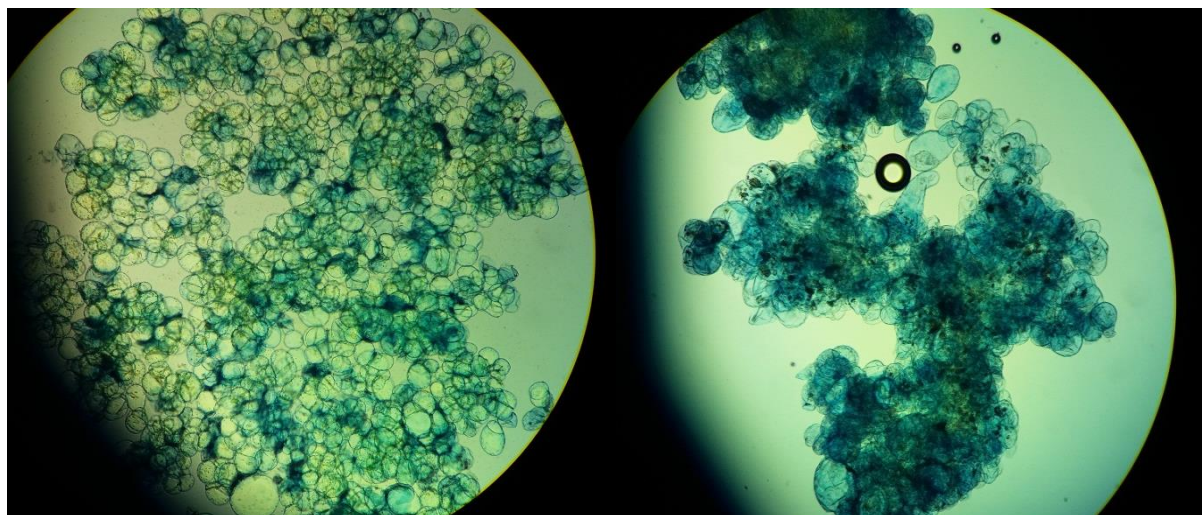
Na slici 18 možemo vidjeti tijek rasta biljnih stanica u različitim medijima kroz 20 dana. Najveći rast očekivano je postignut u hranjivom mediju (PG+H), uz blage oscilacije oko 10. dana uzgoja, dok u vodi vidimo relativno velik rast u prvih 7 dana, nakon čega nastupa velik pad kojeg slijedi stagnacija do kraja ispitivanog perioda. Pretpostavka je da biljka prilagođava metabolizam te da neko vrijeme može opstati bez izvora nutrijenata koristeći zalihe, međutim nakon toga počinje opadati u masi i nastupa period slabog ili nikakvog rasta- stagnacija.

Međutim, u prirodnom eutektičkim otapalima biljke pokazuju drugačiji trend, nakon prva tri dana opada masa, vjerojatno zbog gubitka vode iz stanice, budući da su se biljke stavile u hipertoničnu otopinu. Nakon toga ponovno blago raste do 10. dana nakon čega se održava na sličnoj razini do kraja eksperimenta. Najmanje opadanje mase u NADES, pokazalo se u ChGlc 50 %. Stabilnost NADES tijekom pokusa nije se provjeravala, pa se kao mogućnost uzima cijepanje vodikovih veza između komponenata, te njihovo korištenje kao izvor nutrijenata, posebice glukoze.

4.3.2. Ispitivanje vijabilnosti i morfologije

Trypan Blue boja koristi se za određivanje broja mrtvih stanica u nekom uzorku, budući da boja uslijed gubitka naboja na membrani mrtvih stanica, ulazi i selektivno bojanja samo mrtvih stanica. Međutim, jedno istraživanje pokazalo je da stanice ne moraju nužno biti mrtve kako bi boja mogla ući u stanicu, nego je nagoviješteno kako boja može ući i u živu stanicu kroz pore na membrani stanice, a nastanak pora može se inducirati djelovanjem nekih agenasa. Tran i sur. (2011) u svom su radu pokazali da toksin HIyII iz bakterije *Bacillus cereus* porodira membranu i omogućuje *Trypan Blue* boji ulazak u stanice makrofaga, koji pritom zadržava vijabilnost i metaboličku aktivnost. Stoga, plavo obojenje može indicirati povećanu permeabilnost membrane i formiranje pora na staničnim membranama, odnosno ne mora nužno značiti smrt stanice (Tran i sur., 2011).

Suspenzija biljnih stanica uzgajanih u ChGlc (30, 50 i 80 %), te u vodi i PG+H, 3,7,10, 14 i 20 dana, bojana je dodatkom ekvivalentnog volumena *Trypan Blue* boje. Budući da biljne stanice rastu u aglomeratima, prevelikim za mikroskopiranje, suspenzija biljnih stanice se prvo mehanički usitnila miješanjem pomoću nastavka za pipete, te miješanjem na vrtložnoj miješalici.



Slika 19. Mikroskopska slika (10x) biljnih stanica obojanih s *Trypan Blue*, nakon 3 dana uzgoja u a) PG+H; b) prirodnom eutektičkom otapalu

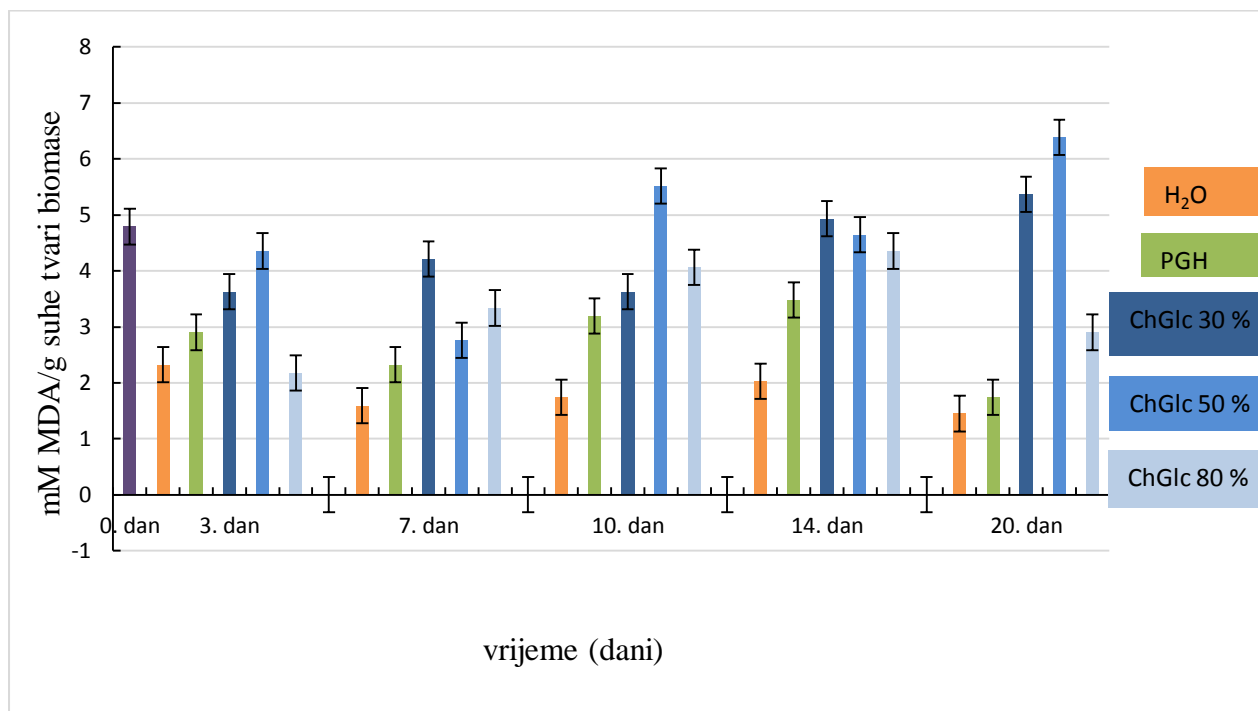
Prije postavljanja biljne kulture na uzgoj (0 dan), uzet je uzorak stanica koji je obojan *Trypan Blue* kako bi se odredio postotak živih stanica (prema formuli 9) na početku uzgoja i on je iznosio je oko 90 %. Mikroskopiranjem obojanih preparata biljnih stanica ustanovljeno je da su sve stanice uzgajane u prirodnim eutektičkim otapalima, obojane plavo već nakon 3 dana uzgoja, što implicira na to da su sve mrtve. Međutim, obzirom na to da je iz ranijih istraživanja poznato da NADES uzrokuju permeabilizaciju bioloških membrana (Hayyan i sur., 2016), a Tran i sur. (2011) smatraju da plavo obojenje ne mora nužno značiti smrt stanice, nego može ukazivati na formiranje pora na membrani stanice, moguće je da biljne stanice uzgajane u NADES-u nisu nužno mrtve već nakon 3 dana uzgoja, nego NADES uzrokuju permeabilizaciju bioloških membrana, što omogućuje boji nesmetan ulazak u stanice. S druge strane postotak živih stanica nakon tri dana uzgoja u PG+H iznosio je preko 85 %, dok je vijabilnosti u vodi bila oko 58 %.

Osim obojanosti stanica uzgojenih u NADES-u, iz mikroskopskih fotografija (Slika 19), vidljive su i morfološke promjene stanica koje su rasle u NADES-u, pa tako vidimo da su stanice koje su rasle u NADES-u formirale velike aglomerate i djeluju slijepljeno, vjerojatno zbog fizikalnih svojstava ChGlc u prvom redu viskoznosti i. Osim toga, pri većim povećanjima (slike nisu prikazane) vidi se da stanice uzgojene u PG+H imaju kompaktni sferičan oblik, dok je velik dio stanica u NADES-u nepravilnog oblika, a membrane su deformirane i vidljivo razorene.

4.3.3. Ispitivanje lipidne peroksidacije

Promjene u metabolizmu, fizički stres, upala, karcinogeneza, sve su stanja koja mogu biti pokretač oksidativnog stresa stanica. Oksidativni stres rezultira povećanjem razine reaktivnih oksidativnih vrsta (ROS) koje se u normalnom metabolizmu stalno proizvode u malim količinama, ali kada dođe do poremećaja i prekomjerne proizvodnje ROS, ovi spojevi mogu izazivati ozbiljna oštećenja makromolekula u stanici. Jedan od supstrata peroksidacije koju provode ROS su polinezasićene masne kiseline koje su sastavni dio bioloških membrana. Reakcija koju ROS izazivaju na biomembranama naziva se lipidna peroksidacija i rezultira degradacijom i razaranjem biomembrana. Kao konačan produkt lipidne peroksidacije nastaje reaktivan malonaldehid (MDA), čija se koncentracija može odrediti spektrofotometrijski. (Gašparović i sur., 2013).

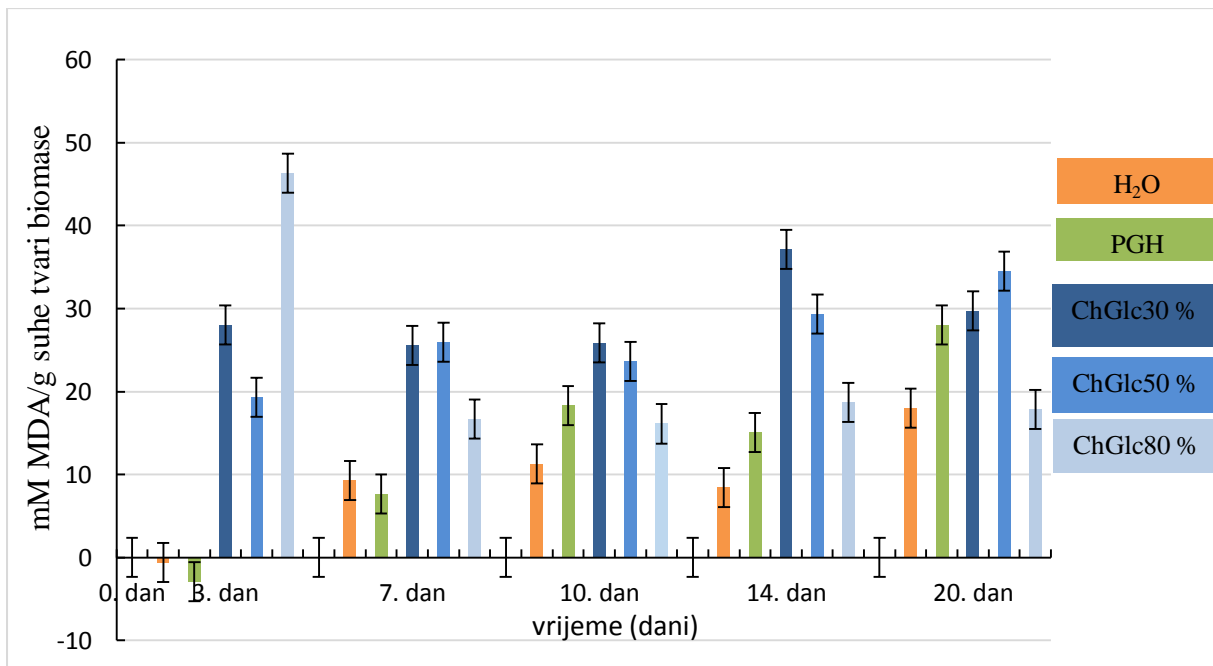
Kako bi se odredila koncentracija bilo kojeg staničnog metabolita, biljne stanice su se prvo morale razbiti, kako bi se oslobodio stanični sadržaj. Stanični ekstrakti su se obradili i spektrofotometrijski se mjerila apsorbancija produkta lipidne peroksidacije (MDA). Koncentracija MDA (mM) proporcionalna je izmjerenoj apsorbanciji, a izračuna se prema formulama [10], [11].



Slika 20. Dijagram koncentracija MDA (mM) po gramu suhe tvari biomase izmjerene u ekstraktima biljnog tkiva biljaka uzgojenih u različitim medijima.

Usporedbom vrijednosti koncentracije MDA (mM/ g s.tv.) dobivenih iz biljnog tkiva u različitim otapalima (Slika 20.), možemo zaključiti da najviše osciliraju vrijednosti dobivene u ChGlc 50 %, a najveća vrijednost izmjerena je 20.-tog dana, dok vrijednost u ChGlc 80 % blago raste do 14. dana i zatim opada. Vrijednosti dobivene u ChGlc 30 % osciliraju ali u manjoj mjeri, a najveća vrijednost izmjerena je 20.-tog dana. Sve vrijednosti izmjerene u NADES veće su od onih izmjerenih u vodi i u PG+H. Pretpostavka je da se biljke u inicijalnom dodiru s NADES nalaze u stanju stresa, prilikom čega dolazi do promjena u staničnom metabolizmu. Mijenja se osmotski tlak u stanici, aktivitet vode, a budući da su se našle u hipertoničnim otopinama, dolazi do otpuštanja vode iz stanica. Biljke neko vrijeme prolaze prilagodbu na nove uvjete i s vremenom sintetiziraju sve manje produkata enzima

stresa lipidne peroksidaze, što se prema dijagramu na slici 18. odvija do otprilike 14.dana, nakon čega je 20.-tog dana koncentracija MDA ponovno narasla što može biti indikator da su se biljke nisu u potpunosti uspjele prilagoditi, a osim toga iscrpile su većinu nutrijenata iz podloge, te potrošile rezerve i ponovno ulaze u stanje stresa.



Slika 21. Dijagram koncentracija MDA (mM) po gramu suhe tvari biomase izmjerene u različitim iskorištenim medijima u kojima su se uzgajale biljke.

Na slici 21. prikazane su koncentracije MDA (mM / g s.tv.) u iskorištenom mediju u kojem su se uzgajale biljke. Najveća izmjerena vrijednost koncentracije MDA je u ChGlc 80 %, 3. dan, nakon čega je opala više nego duplo i ostala pri sličnim razinama do kraja eksperimenta. S druge strane vrijednosti izmjerene u ChGlc 50 % osciliraju kroz dane a najveća izmjerena vrijednost je 20.-tog dana. Vrijednosti izmjerene u ChGlc 30 % su slične do 10.-tog dana, zatim su najviše 14.-tog dana i ponovno padaju 20.-tog dana. Vrijednosti koncentracije MDA u vodi i PG+H 3. dan su vrlo niske i zatim kontinuirano rastu do kraja eksperimenta.

Vrijednosti svih koncentracija MDA izmjerenih u iskorištenom mediju barem su deseterostruko više od onih izmjerenih iz biomase biljaka, što ponovno potvrđuje činjenicu da NADES uzrokuju permeabilizaciju bioloških membrana, uslijed čega dolazi do otpuštanja staničnih metabolita u medij. NADES vjerojatno uzrokuju formiranje pora na staničnim membranama, dovoljno velikih da metaboliti mogu slobodno migrirati između unutrašnjosti stanice i njezine okoline, što dodaje skroz novu prednost primjene ovih otapala u biokatalizi. Kada bi se uzelo u obzir da NADES omogućuju metabolitima jednostavnu sekreciju u medij, izdvajanje proizvoda nakon bioprocasa bilo bi brže, jednostavnije i u konačnici ekonomičnije, čime bi i čitav proces u industrijskom smislu bio isplativiji. Stoga NADES imaju velik potencijal u industrijskoj primjeni u procesima biokatalize, međutim trebalo bi dodatno ispitati utjecaj na stanične membrane, mehanizme difundiranja NADES u stanicu, stabilnost NADES u stanici, potencijalne interakcije sa staničnim metabolitima te utjecaj na metabolizam živih stanica. Osim toga, za sad je nejasno ostaju li stanice žive unatoč degradaciji bioloških membrana djelovanjem NADES, te postoji li mogućnost regeneracije membrana. Osim toga, trebalo bi ispitati vrijeme potrebno da NADES uzrokuje degradaciju membrana u toj mjeri da stanični sadržaj izađe u medij, te na temelju tog vremena moglo bi se kombinirano provoditi biokataliza u NADES, izdvajanje medija sa željenim metabolitom, zatim povratak žive biomase u hranjivi medij gdje se membrane potencijalno regeneriraju, te ponovno biokataliza u NADES-u. Ukoliko bi se otkrilo da NADES ne uzrokuju smrt stanice, mogli bi se koristiti kao neinvazivna metoda insertiranja plazmida u stanicu, kao tehnika genetičkog inženjerstva.

Potencijal industrijske primjene biljaka kao biokatalizatora u reakciji redukcije DMPA u 1-(3,4-dimetilfenil)etanol, potrebno je dodatno ispitati, budući da zbog jednostavnijeg uzgoja i manjeg generacijskog vremena, mikroorganizmi i dalje predstavljaju logičniji izbor. Jedan od potencijala predstavlja moguća imobilizacija biljne biomase, budući da smo ustanovili da se biljke mogu uspješno reciklirati i koristiti za više ciklusa reakcije, a imobilizacija bi ujedno omogućila vođenje procesa kontinuirano uz potencijalno veće prinose.

5. ZAKLJUČCI

1. Kalusne kulture biljnih stanica mogu se uspješno koristiti kao biokatalizatori u reakcijama redukcije DMPA u 1-(3,4-dimetilfenil)etanol, jer posjeduju odgovarajuće enantioselektivne enzime, koji provode reakciju u blagim uvjetima.
2. Prirodna eutektička otapala na bazi kolin klorida, pokazala su se kao pogodan medij za provedbu ekološki prihvatljive enantioselektivne biokatalize.
3. Dobiveni enantiomerni višak, iskorištenje reakcije te volumetrijska i specifična produktivnost ovise o udjelu vode te o vrsti donora vodikove veze u NADES-u i stoga predstavljaju ključne parametre za optimizaciju procesa.
4. Kao produkt reakcije biotransformacije DMPA, dominantno nastaje (*R*)-enantiomer alkohola, međutim povećanjem udjela vode u NADES-u do 80% v/v, te u samoj vodi, dolazi do inverzije enantioselektivnosti.
5. Kada se kao biokatalizator koristila kalusna kultura kaktusa, najveće dobiveno iskorištenje u NADES-u bilo je 86,48%, dok je najveći postotak enantiomernog suviška iznosio 99,13% u korist (*R*)-enantiomera alkohola. S druge strane, kod šećerne repe najveće dobiveno iskorištenje bilo je u ChGlc 30% i iznosilo 95%, dok je najveći dobiveni enantiomerni suvišak bio 85% u korist (*R*)-enantiomera.
6. Ispitivanjem ključnih parametara utjecaja NADES-a na biljni metabolizam, dolazimo do zaključaka da NADES uzrokuju permeabilizaciju bioloških membrana biljaka, uslijed čega dolazi do ekstrakcije staničnog sadržaja uključujući i velike molekule proteina, u medij.
7. Degradacija stanične membrane biljne stanice uzrokuje stanje stresa, prilikom kojeg dolazi do promjena u staničnom metabolizmu, što se očituje u povišenim koncentracijama produkta enzima stresa izmjerenim u NADES-u u kojem su uzgajane biljke.

8. Nije u potpunosti jasno ostaju li biljne stanice žive nakon degradacije membrana, ali možemo tvrditi da još neko vrijeme zadržavaju metaboličku aktivnost, na što ukazuje uspješna reciklacija biljne biomase nakon provedene reakcije biokatalize u NADES-u, te ponovno korištenje iste biomase za novu reakciju biokatalize.

9. Uspješno su provedena tri ciklusa asimetrične redukcije DMPA s recikliranom biomasom pri čemu dolazi do relativno malog pada konverzije od 2,68 do 6,32 % nakon prve reciklacije, odnosno od 10 do 29,15 % nakon druge reciklacije biomase.

6. LITERATURA

Anastas, P. T., Warner, J. C. (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York.

Anonymous, www.intermediates.basf.com,
<http://www.intermediates.basf.com/chemicals/chiral-intermediates/index>, pristupljeno 07. kolovoza 2018.

Balen, B., Tkalec, M., Pavoković, D., Pevalek-Kozlina, B., & Krsnik-Rasol, M. (2008). Growth Conditions in In Vitro Culture Can Induce Oxidative Stress in *Mammillaria gracilis* Tissues. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(1), 36–45. doi:10.1007/s00344-008-9072-5

Bawa, R. A., Ajjabou, F., Shalfooh, E. (2008) Enzymatic Reduction of Ketones to Optically Active Secondary Alcohols. *Journal of Physical Science*. 19(2) 1–5.

Bommarius, A. S., Riebel, B. R. (2004) *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 3-5,7,8. doi:10.1002/3527602364

Bugg, T. (2009) Appendix 1: Cahn–Ingold–Prelog Rule for Stereochemical Nomenclature u: *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. 2.izd. [online], Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444305364.app1>

Choi, Y. H, Van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M.,Hollmann, F., Arends, I. W. C. E. , Geert-Jan Witkamp, G-J., Verpoorte, R. (2011) Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *American Society of Plant Biologists* doi: <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>. <http://www.plantphysiol.org/content/156/4/1701>, pristupljeno 04. kolovoza 2018.

Clark, J., Macquarrie, D. (2002) *Handbook of Green chemistry and technology*, Blackwell science, Cornwall. str. 3,4,25

Clark, J. K., Tavenger, S. J. (2007) Alternative Solvents: Shades of Green, *Org. Process Res. Dev.* 11 (1)149–155. DOI: 10.1021/op060160g

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J.Chem.Technol. Biotechnol.* (90) 1631–1639.

Gašo-Sokač, D., Nujić, M., Bušić, V., Habuda-Stanić, M. (2014) Biocatalytic reductions by plant tissue - Green alternative to alcohol production. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 6 (1) 51-60.

Gašparović, A.,C., Jaganjac, M., Mihaljević, B., Šunjić, Š.,B., Žarković, N. (2013) Assays for the measurement of lipid peroxidation. *Methods Mol Biol.* (965) 283-96. doi: 10.1007/978-1-62703-239-1_19

Grogan, G. (2009) Practical Biotransformations.[online] A John Wiley and Sons, Ltd. str.5-8, 38-40.

<https://www.wiley.com/enus/Practical+Biotransformations%3A+A+Beginner%27s+Guide-p-9781405171250>, pristupljeno 01.kolovoza, 2018.

Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013a): Are deep eutectic solvents benign or toxic?, *Chemosphere* (90) 2193-2195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.004>.

Hayyan, M., Hashim, M. A., Al-Saadi, M. A., Hayyan, A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E. (2013b): Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents, *Chemosphere* (93) 455-459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.013>.

Hayyan, M., Mbous, Y. P., Looi, C. Y., Wong, W. F., Hayyan, A., Salleh, Z., Mohd-Ali, O. (2016) Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile. *Springerplus* 5(1) 913. doi: 10.1186/s40064-016-2575-9

Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* (6) 431–438.

Jukić, M., Đaković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Vorkapić-Surać, J. (2004) “Zelena” kemija – ekološki prihvatljivi procesi. *Kem. Ind.* 53 (5) 217–224.

Juneidi, I., Hayyan, M., Hashim, M.A. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability for cholinium-based deep eutectic solvents. *RSC Adv.* 5(102) 83636–83647. doi:10.1039/C5RA12425E.

Mbous, Y.P., Hayyan, M., Wong, W.F., Looi, C.Y., Hashim, M.A. (2017) Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci Rep.* (7) 41257. doi: 10.1038/srep41257.

Milner, E., Maguire, R. (2012) Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. ARKAT-USA, Inc. 321-382, doi: <http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.109>

Nguyen, P.-H., West, M., Feske, B., Padgett, C. (2014). Enantioselectivity and Enzyme-Substrate Docking Studies of a Ketoreductase from *Sporobolomyces salmonicolor* (SSCR) and *Saccharomyces cerevisiae* (YOL151w). *International Scholarly Research Notices.* 1-8. doi: 10.1155/2014/124289.

Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014) Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS. Sustain. Chem. Eng.* 2 (5) 1063–1071.

Panić, M., Majerić Elenkov, M., Roje, M., Cvjetko Bubalo M., Radojčić Redovniković, I. (2018) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry* (6) 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.12.010>

Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A., Wackett, L.P. (2002) Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Applied and Environmental Microbiology.* 68(10) 4699-4709. doi:10.1128/AEM.68.10.4699-4709.2002.

Pavoković, D., Buđa, R., Andrašec F., Roje, M., Cvjetko-Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2017) Plant-mediated asymmetric reduction of 1-(3,4-dimethylphenyl)ethanone. *Tetrahedron: Asymmetry* (28) 730-733. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.04.003>

Radošević, K., Cvjetko Bubalo M.C., Srček, V.G., Grgas, D., Dragičević, T.L., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf.* (112) 46-53. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.

Reetz, M. T. (2013) Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (34), pp 12480–12496, DOI: 10.1021/ja405051f

Tao, J., Kazlauskas, R. J. (2011) Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, str. 3-7.

Tran, S.-L., Puhar, A., Ngo-Camus, M., Ramarao, N. (2011) Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 6(9) doi:10.1371/journal.pone.0022876

Wen, Q., Chen, J.X., Tang, Y.L., Wang, J., Yang, Z. (2015) Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere*. (132) 63–69. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.061.

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(1), 34. <http://doi.org/10.1186/s40643-017-0165-5>

Yadav, J. S., Nanda, S., Thirupathi Reddi, P., Bhaskar Rao, A. (2002) Efficient Enantioselective Reduction of Ketones with *Daucus carota* Root. *J. Org. Chem* 67 (11) 3900-3903. doi: 10.1021/jo010399

Yang, Z.-H., Zeng, R., Yang, G., Wang, Y., Li, Li.-Z., Lv, Z.-S., Yao, M., Lai, B. (2008): Assymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (35)1047- 1051.

Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Xu, J. C. i K. (2014) Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. *Analyst*, (139) 2565.

Zhang Q, De Oliviera Vigier K., Royer S., Jerome F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev.* 41(21): 7108–7146. doi: 10.1039/c2cs35178a

Zhu, D., Malik, H.T., Hua, L. (2006). Asymmetric ketone reduction by a hyperthermophilic alcohol dehydrogenase. The substrate specificity, enantioselectivity and tolerance of organic solvents. *Tet. Asymm.*, 17(21), 3010–3014.



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

Zagreb, 14. rujna 2018.

Fakultetskom vijeću

putem Odbora za znanost PBF-a i
Zavoda za biokemijsko inženjerstvo

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da su svi moji radovi na koje se pozivam u postupku izbora u zvanje odnosno na radno mjesto izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istih radova nisam koristio drugim izvorima osim onih koji su u njima navedeni.