

Racionalan dizajn niskotemperaturnih eutektskih otapala za enantioselektivnu bioredukciju halogeniranog acetofenona

Šimunčić, Ida

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:011786>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Ida Šimunčić,
1388/MB

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Ida Šimunčić,
1388/MB

**RACIONALAN DIZAJN
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA
ENANTIOSELEKTIVNU
BIOREDUKCIJU
HALOGENIRANOG
ACETOFENONA**

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 doc. dr. sc. Marine Cvjetko Bubalo te uz pomoć dr. sc. Manuele Panić i mag. ing. biotechn. Mije Radović.

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

Halogenirani acetofenon korišten u radu osigurala je tvrtka VIO chemicals AG (Zurich, Švicarska).

Posebno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na razumijevanju, uloženom trudu, pomoći, vodstvu, strpljenju te korisnim savjetima i prenesenom znanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala i mag. ing. biotechn. Miji Radović te ostalim djelatnicima Laboratorija na susretljivosti, nesebičnoj pomoći, strpljenju i ustupljenim materijalima i savjetima.

Neizmjernu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji, treneru i prijateljima na beskonačnoj podršci i motivaciji tijekom studiranja.

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

RACIONALAN DIZAJN NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA ENANTIOSELEKTIVNU BIOREDUKCIJU HALOGENIRANOG ACETOFENONA

Ida Šimunčić, 1388/MB

Sažetak: Potreba za dizajniranjem kemijskih, farmaceutskih i biotehničkih proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju primjenu i stvaranje škodljivih i opasnih tvari s jedinstvenim ciljem zaštite okoliša doveli su do razvoja koncepta *zelene* kemije koji je sve učestaliji industrijski pristup današnjice. Spomenuti pristup podrazumijeva korištenje alternativnih otapala i ekološki prihvatljivih i obnovljivih sirovina, ali i primjenu alternativnih oblika energije te provođenje organskih reakcija primjenom biokatalizatora. Shodno tome, sve je veći interes za primjenom eutektičkih otapala kao medija za biokemijsku pripravu kiralnih biološki aktivnih komponenti. U ovom je radu provedena reakcija enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona u kiralni halogenirani alkohol, a spomenuta reakcija katalizirana je kvascem *Saccharomyces cerevisiae*, inače idealnim biokatalizatorom za industrijsku primjenu. Enantioselektivna redukcija provedena je u tri različita niskotemperaturna eutektička otapala s različitim udjelima vode. Biokatalitička reakcija redukcije u eutektičkom otapalu rezultirala je većim iskorištenjem u otapalu kolin klorid : etilen glikol s 10 %-tnim masenim udjelom vode odnosu na bioredukcije provedene u ostalim otapalima i puferu.

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

Rad sadrži: 41 stranica, 16 slika, 2 tablice, 29 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo*

Pomoć pri izradi: Dr.sc. *Manuela Panić*, Mag.ing.biotechn. *Mia Radović*

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*

Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo*

Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*

Doc.dr.sc. *Anamarija Šatafa* (zamjena)

Datum obrane: 27.9.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

RATIONAL DESIGN OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR ENANTIOSELECTIVE BIOREDUCTION OF HALOGENATED ACETOPHENONE

Ida Šimunčić, 1388/MB

Abstract: Designing non-polluting processes and the need to design chemical, pharmaceutical and biotechnical products and processes that reduce or completely eliminate the use and production of harmful and hazardous substances, with the unique goal of environmental protection, have led to the development of green chemistry, which is an increasingly common industrial approach today. This approach involves the use of alternative solvents and environmentally friendly and renewable raw materials, but also the use of alternative forms of energy and the implementation of organic reactions using biocatalysts. Consequently, there is a growing interest in the use of eutectic solvents as a medium for the biochemical preparation of chiral biologically active components. In this work, the reaction of enantioselective reduction of halogenated acetophenone to chiral halogenated alcohol was performed, and the mentioned reaction was catalyzed by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, otherwise and ideal biocatalysts for industrial application. Enantioselective reduction was performed in three different deep eutectic solvents with different water contents. The biocatalytic reduction in deep eutectic solvents choline chloride : ethylene glycol with 10 % of water resulted in a higher yield compared to the bioreduction performed in the other solvents and buffer.

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

Thesis contains: 41 pages, 16 figures, 2 tables, 29 references, 1 supplement

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. Marina Cvjetko Bubalo, Associate professor*

Technical support and assistance: *PhD. Manuela Panić, MSc. Mia Radović*

Reviewers:

PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor

PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Associate professor

PhD. Ana Jurinjak Tušek, Associate professor

PhD. Anamarija Šatafa, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 27, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BIOTRANSFORMACIJE	2
2.1.1. Biokatalizatori	4
2.1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kao biokatalizator	6
2.2. ZELENA KEMIJA.....	7
2.2.1. Načela <i>zelene</i> kemije.....	7
2.2.2. Zelena otapala.....	8
2.2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala	9
2.2.2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biotransformacijama	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Kemikalije.....	12
3.1.2. Biokatalizatori	12
3.1.3. Otopine.....	12
3.1.4. Oprema i uređaji	13
3.2. METODE RADA.....	14
3.2.1. Računalno predviđanje topljivosti halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	14
3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	16
3.2.3. Eksperimentalno određivanje topljivosti halogeniranog acetofenona u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	17
3.2.4. Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona pomoću kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
3.2.4.1. Uzgoj i priprema stanica kvasca.....	19
3.2.4.2. Provođenje enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona	19
3.2.5. Određivanje koncentracije (<i>R,S</i>)-halogeniranog alkohola	21
3.2.5.1. Izrada baždarnog dijagrama	22
3.2.6. Određivanje vijabilnosti kulture kvasca	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. RAČUNALNO PREDVIĐANJE TOPLJIVOSTI HALOGENIRANOG ACETOFENONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	26
4.2. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI HALOGENIRANOG ACETOFENONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA.....	29
4.3. ENANTIOSELEKTIVNA REDUKCIJA HALOGENIRANOG ACETOFENONA POMOĆU KVASCA <i>S. cerevisiae</i>	30
4.4. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI KULTURE KVASCA	33
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	38
7. PRILOZI	41
7.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA	41

1. UVOD

Zbog negativnog utjecaja industrije na zdravlje ljudi i okoliš, početkom 90-ih godina prošlog stoljeća, na inicijativu Američke agencije za zaštitu okoliša (engl. Environmental Protection Agency, EPA), razvijen je koncept „Zelena kemija“. Prezentiran je kao novi pristup kemiji koji teži proizvodnji i upotrebi „boljih“ kemikalija uz stvaranje manje otpada, smanjenju štetnih učinaka na okoliš te povećanju energetske učinkovitosti proizvodnog procesa. U skladu s načelima *zelene* kemije, najširu primjenu zauzeli su biotransformacijski postupci, tj. enzimski katalizirane pretvorbe organskih spojeva u definirane konačne produkte. Biotransformacije podrazumijevaju interdisciplinarni pristup pripravi organskih spojeva što znači da u navedenim pretvorbama dolazi do sjedinjenja znanosti poput biokemije, molekularne biologije i mikrobiologije te inženjerstva, a njihova primjena je karakteristična u farmaceutskoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji. U biokatalitičkim reakcijama se kao biokatalizatori koriste cijele stanice i izolirani enzimi, a prednosti njihove primjene uključuju: provođenje reakcija pri blagim uvjetima, kemo-, regio- i stereoselektivnost enzima, postizanje visoke čistoće produkata te ekonomska učinkovitost.

Uz primjenu biokatalizatora u biotransformacijskim postupcima, kao zamjena za organska otapala koriste se prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, tj. *zelena* otapala čija su svojstva: neznatna hlapljivost, nezapaljivost, niska toksičnost, biorazgradivost te velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost. Ova alternativa organskim otapala dakako pridonosi manjoj šteti za okoliš te prati jedno od načela *zelene* kemije koje upućuje na potrebu za primjenom netoksičnih, kemijski i fizički stabilnih otapala, niske hlapljivosti uz mogućnost višekratne uporabe istog.

S obzirom na navedeno, cilj rada je dizajnirati niskotemperaturna prirodna eutektička otapala za enantioselektivnu redukciju halogeniranog acetofenona u kiralni halogenirani alkohol primjenom *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizatora.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOTRANSFORMACIJE

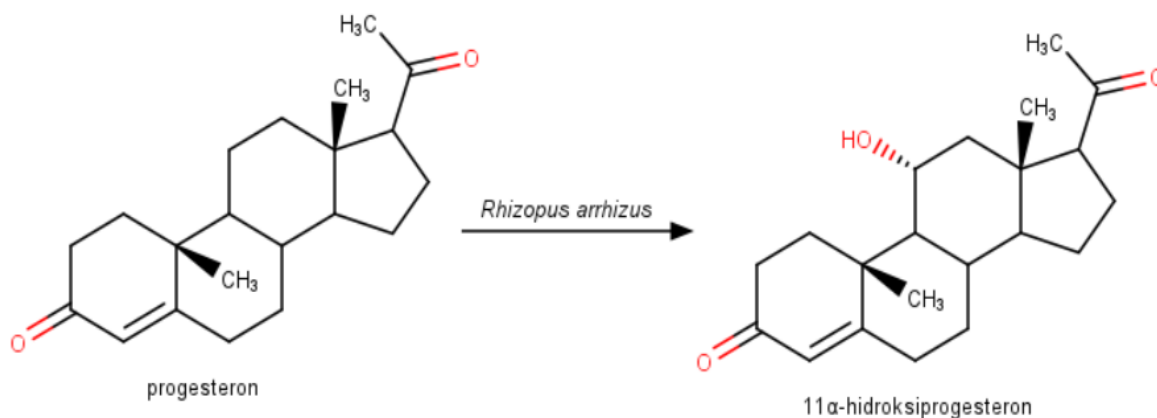
Biotransformacije su biokatalitičke reakcije koje karakterizira uporaba bioloških sustava poput enzima, čiste kulture mikroorganizama, biljnih i životinjskih stanica i tkiva te sintetskih i polusintetskih enzima kako bi nastali spojevi koji se koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj i agrokemijskoj industriji (Sheldon i Brady, 2013). Navedene reakcije temelje se na činjenici da biokatalizatori djeluju izvan svoje prirodne okoline te prihvaćaju „neprirodne“ supstrate kako bi se iz čistih reaktanata sintetizirali komercijalno prihvatljivi produkti. Za razliku od fermentacijskih procesa, u kojima se proizvodi sintetiziraju uz pomoć supstrata za rast putem metabolizma stanica domaćina, u biotransformacijama se rast stanica (faza proizvodnje enzima) i faza proizvodnje razdvajaju, a supstrati se pretvaraju u željene proizvode u stanicama koje se nalaze u fazi mirovanja.

Procesi kemijske sinteze uglavnom daju visoke prinose, no često su ekološki škodljivi i povezani su s proizvodnjom neželjenih nusproizvoda, smanjujući tako učinkovitost i povećavajući troškove izolacije i pročišćavanja. U usporedbi s kemijskom katalizom, biokataliza cijelih stanica nudi neke jedinstvene prednosti (Tablica 1) te pruža učinkovitu i ekološki prihvatljivu alternativu tradicionalnoj kemijskoj sintezi za proizvodnju finih kemikalija. Vrlo je bitno spomenuti kako je najvažnija prednost biokatalitičkih procesa visoka selektivnost biokatalizatora. Navedeno svojstvo, uključujući regio-, kemo- i enantioselektivnost, vrlo je poželjno u kemijskoj sintezi i donosi koristi kao što su smanjena upotreba zaštitnih skupina, minimalizirane nuspojave, lakše odvajanje proizvoda te manje ekoloških problema. Ostale prednosti poput reakcija u više koraka s regeneracijom kofaktora, visoka katalitička učinkovitost i blagi uvjeti također su vrlo atraktivni u komercijalnoj primjeni. U nekim slučajevima, kao što je asimetrična sinteza kiralnih spojeva ili sinteza određenih sofisticiranih kemikalija, stvaranje željenih proizvoda tradicionalnim kemijskim sredstvima predstavlja izazov, a upravo se biotransformacijama takav izazov može prevladati (Lin i Tao, 2017).

Tablica 1. Prednosti i nedostaci biokatalize u usporedbi s kemijskom katalizom

PREDNOSTI	NEDOSTACI
<ul style="list-style-type: none">▪ visoka selektivnost▪ visoka katalitička učinkovitost▪ reakcije u više koraka s regeneracijom kofaktora▪ blagi reakcijski uvjeti▪ mogućnost recikliranja▪ ekološki prihvatljivi postupci	<ul style="list-style-type: none">▪ katalitička stabilnost; biokatalizator je osjetljiv na inhibiciju supstrata ili produkta; inaktivacija se može dogoditi pri visokim temperaturama, ekstremnim pH ili u organskim otapalima▪ stanična membrana može biti prepreka▪ neželjeni nusproizvodi iz metabolizma

Prvi postupci koji se mogu smatrati biotransformacijama su oksidacija alkohola u octenu kiselinu uz pomoć mikroorganizma *Bacterium xylinum*, oksidacija D-glukoze u D-glukonsku kiselinu s *Acetobacter aceti* ili oksidacija D-sorbitola u L-sorbozu uz *Acetobacter suboxydans* (Vasić-Rački, 2006). Biotransformacije su sadašnje značenje dobile tek otkrićem mikrobnih transformacija steroida 1952. godine kada su Peterson i Murray proveli 11 α -hidroksilaciju progesterona s *Rhizopus arrhizus* u kojoj su kao konačni produkt dobili steroidni hormon kortizon (Slika 1) (Walaa i sur., 2009). Primjena biokatalize u industriji započela je 1984. godine revolucionarnom publikacijom u kojoj su Zaks i Klibanov opisali djelovanje lipaza u organskim otapalima pri povišenoj temperaturi. Većina organskih kemičara je do tada vjerovala da enzimi pokazuju učinkovito djelovanje samo u vodi. Time se zapravo došlo do zaključka da biokataliza ima puno veću ulogu u organskoj sintezi nego što se mislilo.

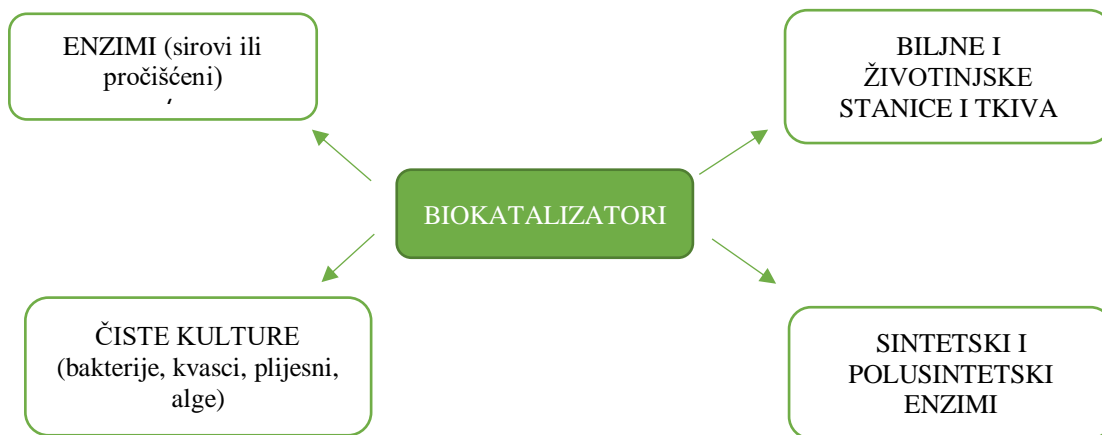


Slika 1. 11 α -hidroksilacija progesterona s *Rhizopus arrhizus* (prema Walaa i sur., 2009).

Općenito, biotransformacije podrazumijevaju interdisciplinarni pristup pripremi organskih spojeva što znači da prilikom provođenja biokatalitičkih reakcija dolazi do sjedinjenja znanstvenih grana poput biokemije, mikrobiologije, molekularne biologije te proteinskog i metaboličkog inženjerstva. Njihova primjena u industrijskom mjerilu većinom se odnosi na dobivanje visokovrijednih proizvoda u manjim količinama kao što su farmaceutici, prehrambeni proizvodi, agrokemikalije, stočna hrana, kozmetički proizvodi te polimeri (Carballeira i sur., 2009). Radi dobivanja kvalitetnijeg proizvoda i ekonomičnije proizvodnje, dizajniranja kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju primjenu i stvaranje škodljivih i opasnih supstanci, između biotransformacija i zelene kemije postoji vrlo čvrsta poveznica.

2.1.1. Biokatalizatori

Nakon definiranja željene biokatalitičke reakcije, slijedi potraga za najboljim biokatalizatorom. Svi živi organizmi sastoje se od jedne ili više stanica koje mogu sintetizirati različite enzime. Poželjna svojstva biokatalizatora za sudjelovanje u određenoj reakciji su: visoka supstratna specifičnost, visoka aktivnost pri različitim uvjetima te stabilnost. Najkorisniji oblik mikrobnog staničnog biokatalizatora je čista kultura mikroorganizma koja sadrži visoku razinu jednog ili više enzima koji će izvesti biotransformaciju (Schauer i Borriss, 2004). Osim čiste kulture, kao biokatalizatori mogu se koristiti izolirani enzimi (sirovi ili pročišćeni), biljne i životinjske stanice i tkiva ili sintetski i polusintetski enzimi (Slika 2). Do danas je identificirano 4000 enzima od kojih je 15 % dostupno na tržištu.



Slika 2. Biokatalizatori u biotransformacijama (Schauer i Borriss, 2004).

Općenito, proces biokatalize odvija se u aktivnom mjestu enzima. Aktivno mjesto je mali dio enzima koje ima trodimenzionalnu strukturu na koje se supstrat može vezati razmjerno slabim nekovalentnim ili snažim kovalentnim vezama. Specifičnost vezanja supstrata ovisi o precizno određenom rasporedu atoma u aktivnom mjestu koje je smješteno u procjepima enzimske molekule. Poput ostalih biokatalizatora, enzimi ubrzavaju reakciju i smanjuju energiju aktivacije, ali ne utječu na položaj termodinamičke ravnoteže reakcije. Kako bi se supstrat uspješno transformirao u produkt, mora prijeći energetska barijeru prijelaznog stanja, a upravo enzim olakšava nastajanje navedenog stanja. Faktori koji utječu da enzimski kataliziranu reakciju su: koncentracija enzima i supstrata, pH, temperatura, atmosferski tlak te inhibitori (Berg i sur., 2013). Najčešći enzimi koji se koriste u biotransformacijama su: lipaze, esteraze, lijaze, transferaze, izomeraze, oksigenaze, oksidoreduktaze, proteaze, nitrilaze, itd.

Biokatalizatori u obliku cijelih stanica mogu biti mikrobnog, biljnog i životinjskog podrijetla, a funkciju biokatalizatora obavljaju u obliku kulture u fazi rasta, stacionarnoj fazi, u obliku spora ili se primjenjuju kao imobilizirana kultura. Najučinkovitiji oblik mikrobnog staničnog biokatalizatora je čista kultura mikroorganizma koja sadrži visoku koncentraciju jednog ili više enzima koji kataliziraju željene reakcije biotransformacije. Prednosti korištenja cijelih stanica kao biokatalizatora svakako su njihova učinkovitost, stereoselektivnost i regioselektivnost, jeftina biomasa, regeneracija koenzima vlastitim mehanizmima, prirodno okruženje stanica te zaštićenost od vanjskih utjecaja pa time i stabilniji postupak provođenja biokatalize. Međutim, njihova primjena zahtijeva kompleksnije postupke pročišćavanje produkta iz reakcijske smjese. S obzirom da stanice posjeduju niz različitih enzima koji mogu transformirati supstrat, prisustvo nusprodukata je često, a ponekad je potrebno i permeabilizirati staničnu stjenku ili provesti lizu stanica ukoliko se enzim ne ispušta ekstracelularno (Abdelraheem i sur., 2019). Vrlo je bitno

da se cijele stanice u potpunosti smatraju katalizatorima, a ne se usredotočiti na pojedinačne aktivne enzime kako bi se u potpunosti iskoristio sintetski potencijal mikrobnih biokatalizatora.

2.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* kao biokatalizator

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* biokatalizator je koji ima vrlo široku primjenu u redukciji prokiralnih spojeva jer je lako dostupan, a i relativno jeftin u usporedbi s ostalim biokatalizatorima koji se koriste u stereoselektivnim biotransformacijama. Osim toga, netoksičan je i biorazgradiv, sadrži oksido-redukcijske enzime te je sposoban za regeneraciju koenzima prisutnih u stanicama. Biokataliza koja uključuje kvasac kao katalizator ne zahtijeva složen postupak obrade niti teške reakcijske uvjete (Panić i sur., 2019).

Općenito, mikroorganizam *Saccharomyces cerevisiae* široko se koristi kao modelni organizam za proučavanje bioloških procesa u stanicama te je komercijalno značajan u prehrambenoj industriji. To je nepatogeni, jednostanični organizam koji se lako uzgaja te ima kratko generacijsko vrijeme (1,25 - 2 sata pri 30 °C). Osim toga, vrlo je jednostavan za manipulaciju što omogućuje adiciju novih gena ili deleciju postojećih gena raznim tehnikama homologne rekombinacije. Prvi je eukariotski organizam čiji je genom u potpunosti sekvencioniran, a i danas se redovito ažurira. Trenutno se smatra da genom kvasca sadrži 12 156 677 parova baza i 6275 gena organiziranih u 16 kromosoma. Jedan je od ključnih organizama za genomska istraživanja uključujući široku upotrebu DNA mikročipova u ispitivanju transkriptoma kao i u genomskoj analizi funkcija gena, ekspresije gena, lokalizaciju proteina, dvodimenzionalne proteinske mape, enzimske aktivnosti te protein-protein interakcije metodom dva hibrida. Osim toga, najčešće je korišten za posredovanje enantioselektivnih redukcija zbog svoje visoke kemo-, regio- i enantioselektivnosti, visoke bioraspodivnosti i lake manipulacije pri blagim reakcijskim uvjetima (Stewart, 2014).

Sojevi *S. cerevisiae*, za razliku od većine drugih mikroorganizama, imaju stabilno haploidno i diploidno stanje te su održivi s velikim brojem markera. Prema tome, recesivne mutacije očituju se u haploidnim sojevima, dok se testovi komplementacije mogu provesti s diploidnim sojevima. Razvoj transformacije DNA omogućio je kvasac dostupnim za kloniranje gena i korištenje tehnika genetičkog inženjerstva. Za razliku od drugih organizama, rekombinacija integracije transformirajuće DNA u kvascu odvija se isključivo homolognom rekombinacijom (Sherman, 2002).

2.2. ZELENA KEMIJA

Zbog negativnog utjecaja industrije na zdravlje ljudi i okoliš, početkom 90-ih godina prošlog stoljeća razvijen je koncept „zelene kemije“, novi pristup kemiji koji proučava i osmišljava procese za smanjuje ili u potpunosti uklanjanje upotrebu štetnih tvari. Osim toga, proučava sintezu i analizu kemijskih proizvoda bez štetnih posljedica na zdravlje ljudi, ali i okoliš. Za razliku od konvencionalnog pristupa temeljenog na zakonskim restrikcijama, *zelena* ili *održiva* kemija nudi pristup u kojem znanstvenici i inženjeri od samog početka osmišljavaju ekološki prihvatljive procese te primjenjuju kemijske proizvode i procese koji reduciraju uporabu i/ili proizvodnju supstancija opasnih za ljudsko zdravlje i okoliš.

Važnost usvajanja *zelene* politike, primjene ekoloških proizvoda i procesa, korištenje obnovljivih izvora te obrazovanje, ključ su napretka *zelene* kemije kao jednog od budućih faktora kemijske industrije. Radi promicanja *zelenog* inženjeringa te znanja, iskustava i sposobnosti, u okviru programa *održive* kemije, 1997. godine otvoren je Institut za Zelenu kemiju sa sjedištem u Washingtonu, SAD. Kako bi se olakšao kontakt vladinih udruga i industrijskih korporacija sa sveučilištima i istraživačkim institutima, otvorene su i podružnice diljem 20 zemalja kako bi institut, zajedno s američkim kemijskim društvom, istraživao program navedenog područja kemije i njenu primjenu u industriji i obrazovanju.

2.2.1. Načela *zelene* kemije

Počecima programa *zelene* kemije smatraju se 1990.-te godine kada su Paul Anastas i John C. Warner izdali knjigu „*Zelena kemija: Teorija i praksa*“. U toj knjizi detaljno su opisali dvanaest načela *održive* kemije koja promiču važnost zaštite okoliša i zdravlje čovjeka, zagovaraju nekorištenje otrovnih otapala u kemijskim sintezama i analizama te podupiru smanjeno stvaranje štetnih nuspojava u tim procesima. Načela *zelene* kemije su (Jukić i sur., 2004):

1. Bolje je spriječiti nastajanje otpada nego ga čistiti ili zbrinjavati nakon što je već nastao.
2. Sintetski postupak treba osmisliti tako da se ulazne sirovine potpuno ugrade u proizvod.
3. Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se koriste ili proizvode tvari manje toksične za ljude i okoliš.
4. Kemijske proizvode treba osmisliti tako da im je željena djelotvornost postignuta uz minimalnu toksičnost.

5. Uporabu pomoćnih kemijskih tvari treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće.
6. Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
7. Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to tehnički i ekonomski prihvatljivo.
8. Ako je moguće, treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa budući da ona podrazumijevaju upotrebu dodatnih reagensa koji stvaraju otpad.
9. Katalitički reagensi, selektivni koliko je to moguće, prihvatljivi su od stehiometrijskih reagensa.
10. Kemijski produkti, nakon prestanka njihovog djelovanja, moraju imati mogućnost pretvorbe u neškodljive produkte koji ne zaostaju u prirodi.
11. Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.
12. U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

Naravno, u osmišljavanju zelenog procesa, nije moguće ispuniti svih 12 načela, ali se teži primijeniti što veći broj istih prilikom svakog pojedinog koraka biosinteze. Na taj način uspijeva se uspostaviti ravnoteža između prirodnih izvora, očuvanja okoliša i zdravlja ljudi te ekonomskog rasta. Primjena gore navedenih načela, zbrinjavanje otpada, očuvanje energije, proizvodnja alternativnih goriva te korištenje zamjenskih tvari za opasne kemikalije, unaprjeđuje održivi razvoj (Jukić i sur., 2004).

2.2.2. Zelena otapala

U mnogim industrijskim procesima, reakcijskim sustavima i koracima odvajanja koji definiraju glavni dio ekološke i ekonomske izvedbe biotehnološkog postupka, koriste se velike količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala. S obzirom da klasična organska otapala uzrokuju brojne negativne učinke na okoliš i zdravlje ljudi, a neizbježni su za korištenje u kemijskoj i biotehnološkoj industriji, rastuće područje istraživanja u razvoju zelene tehnologije posvećeno je dizajniranju novih, okolišu prihvatljivih i prilagodljivih otapala. Među predloženim otapalima, ionske tekućine sobne temperature, superkritične tekućine te otapala iz prirodnih i obnovljivih izvora ističu se kao najperspektivniji pristup trenutnim inovacijama otapala (Bubalo i sur., 2015).

Najjednostavniji način primjene načela *zelene* kemije za dobivanje konačnih proizvoda je korištenje ekološki prihvatljivih zelenih otapala koja bi zamijenila opasna organska otapala sveprisutnih u industriji. Takvo otapalo trebalo bi biti jednostavno za upotrebu, kemijski i fizički stabilno, niske hlapljivosti te jednostavno za recikliranje uz mogućnost ponovne uporabe.

2.2.2.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

U posljednja dva desetljeća, ionske tekućine (engl. Ionic Liquids, ILs) pokazale su se vrlo interesantnima za mnoge biotehnoške procese, a radi se o organskim solima čija je temperatura tališta niža od 100 °C. Nova generacija tekućih soli na osnovi ILs, koja se uglavnom temelje na smjesama dobivenih kombinacijom između akceptora vodika te prirodno izvedenog nenabijenog donora vodikove veze u određenom molarnom omjeru, nazivaju se niskotemperaturna eutektička otapala (engl. Deep Eutectic Solvents, DES). Ova otapala karakteriziraju povoljna fizikalno-kemijska i biološka svojstva te jednostavna i ekonomična priprava, ubrajaju se u četvrtu generaciju ionskih tekućina iako se ne mogu u potpunosti smatrati ionskim spojevima jer se mogu pripremiti i iz neionskih spojeva. Generalno, priprema ovih otapala je relativno jednostavna, međutim, u određenim uvjetima se može prolongirati ili rezultirati „karameliziranjem“ produkta zbog slabe kontrole temperature tijekom pripreme (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

Niskotemperaturna eutektička otapala definiraju se kao smjesa dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koja u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese. Kada su komponente kojima se dobiva eutektičko otapalo primarni metaboliti, takva se otapala nazivaju prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalom (eng. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). Pripravljena zelena otapala obično su stabilna, biorazgradiva, nisu hlapljiva, manje su toksična prema okolišu i ljudima te je njihova upotreba u proizvodnji moguća bez dodatnog pročišćavanja. Imaju veliku toplinsku, kemijsku i elektrokemijsku stabilnost te su odlična otapala za veliki broj organskih spojeva. Osim toga, cijena spomenutih otapala je usporediva s organskim otapalima što ih čini interesantnima i sa ekonomskog aspekta.

Kemijska struktura vodik donora i akceptora znatno utječe na formiranje i stabilnost eutektičkog otapala. Novonastale vodikove veze u ovim otapalima uzrokuju mjestimičnu delokalizaciju naboja, što uzrokuje snižavanje tališta smjese u odnosu na tališta pojedinačnih komponenti, a snižavanje tališta ovisi o simetriji prisutnog kationa i o kemijskoj prirodi

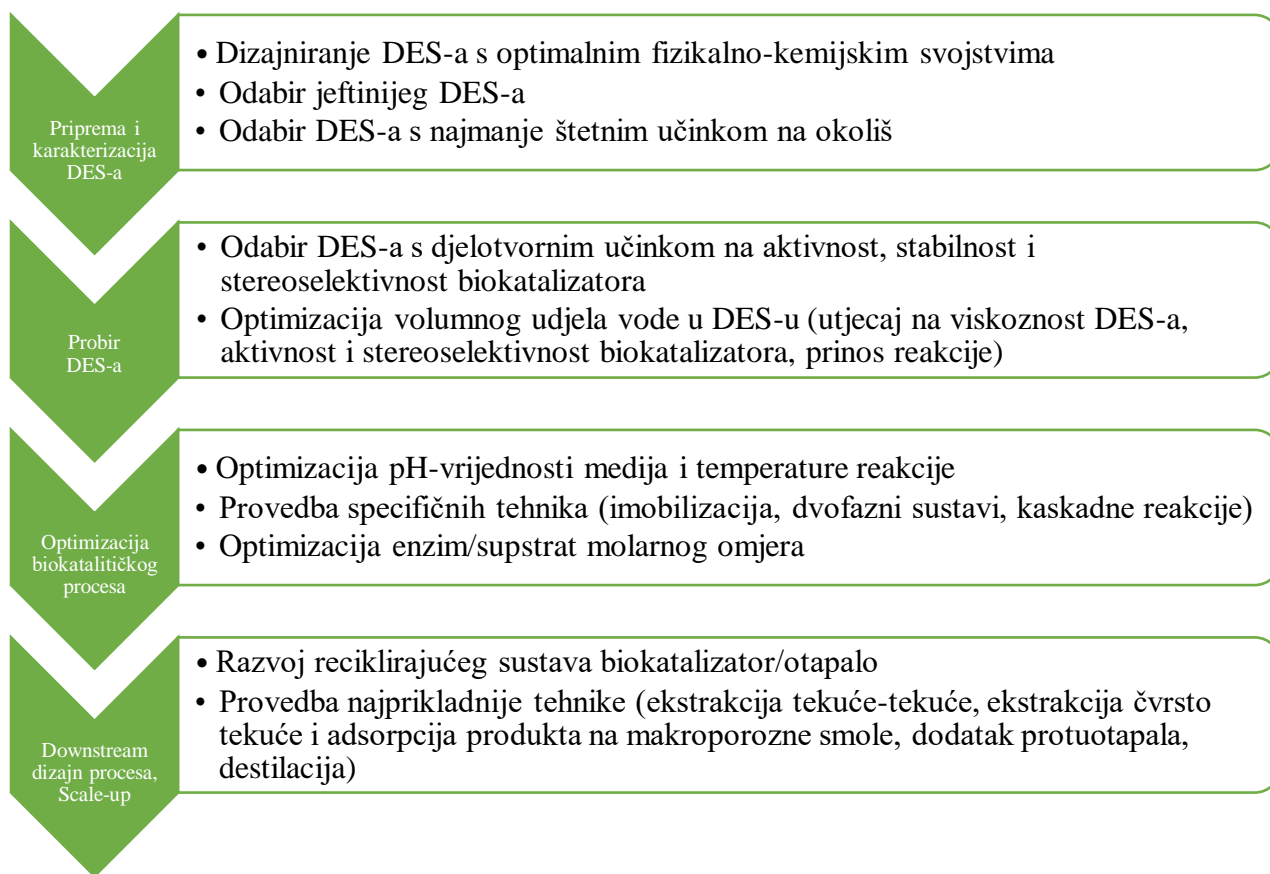
funkcionalnog bočnog lanca. Stabilnost ovakvog otapala smatra se mogućnost pripremljenih istih da ostanu u tekućoj fazi određeno vrijeme, odnosno, da ne dođe do pojave kristalnog taloga. Spomenuta je jednostavnost i ekonomičnost njihove pripreme, a neki od načina su: iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijevaju do unaprijed određene temperature (Paiva i sur., 2014). Molarni omjer komponenata i temperatura taljenja ovisi o kemijskoj prirodi komponenata niskotemperaturnog eutektičkog otapala, a vrijeme potrebno za dobivanje tekućeg otapala iz krutih i tekućih komponenata također varira te se ono mijenja s obzirom na tip komponente i udio vode unutar otapala.

2.2.2.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biotransformacijama

S ekološkog i tehnološkog aspekta, niskotemperaturna eutektička otapala itekako su obećavajuća alternativa korištenju organskih otapala u biokatalitičkim procesima, a sinergija DES-ova i biokatalize u biotehnologiji može pridonijeti učinkovitoj i održivoj proizvodnji komercijalno značajnih proizvoda. S obzirom da je za biotransformacije karakteristična visoka selektivnost biokatalizatora, niskotemperaturna eutektička otapala mogu se iskoristiti u modulaciji i/ili usmjeravanju reakcijskog puta do željenog konačnog proizvoda, a glavni razlog jest mogućnost dizajniranja optimalnog DES-a za svaki određeni enzimski reakcijski sustav. Broj strukturnih kombinacija obuhvaćenih navedenim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima je ogroman, a to može pozitivno utjecati na povećanje enzimske aktivnosti i stabilnosti, reakcijskog prinosa, poboljšanju ili modifikaciji stereospecifičnosti biokatalizatora te pridonijeti sveukupnoj zelenosti procesa (uključujući recikliranje ili ponovno upotrebu).

U biokatalitičkim procesima, niskotemperaturna eutektičko otapalo može poslužiti kao otapalo/su-otapalo, ekstrakti reagens za enzimski produkt ili kao otapalo za obradu enzimske biomase. Vrlo je važno razumijeti mehanizam kako DES utječe na aktivnost, stabilnost i enantioselektivnost enzima, ali i na interakcije otapala s drugim sudionicima reakcije. Prilikom dizajniranja biotransformacijskog procesa, najviše pažnje posvećuje se čistoći i prinosu konačnog produkta pa je tako presudno odabrati povoljan put reakcije, odgovarajući biokatalizator i medij u kojem će se reakcija odvijati te parametre i uvjete za odgovarajući sustav. Međutim, bitno je voditi računa i o efikasnosti te održivosti resursa, a to se odnosi na smanjenje pomoćnih reagensa i otapala za svaki korak reakcije, pročišćavanje zbog smanjenja količine otpada po jedinici produkta te na odabir pomoćnih reagensa i otapala koji imaju povoljan utjecaj na okoliš. Shodno tome, ali neovisno o vrsti reakcije i biokatalizatoru, biokatalitički postupak koji uključuje niskotemperaturna eutektička otapala mora sadržavati: pripremu i karakterizaciju DES-a, probir DES-a radi optimalne učinkovitosti enzima, razvoj

biokatalitičkog procesa te downstream dizajn procesa s mogućim proširivanjem (Slika 3) (Panić i sur., 2020).



Slika 3. Dizajn biokatalitičkog procesa koji uključuje korištenje eutektičkih otapala (Panić i sur., 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril, Riedel-de Haën, Njemačka
- Betain, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etil-acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen-glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Halogenirani acetofenon, Apollo scientific, Manchester, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Halogenirani alkohol, Apollo scientific, Manchester, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Destilirana voda
- Heksanon, Lach-Ner, Češka
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Metilensko modri (praškasti oblik), Kemika, Jugoslavija
- Saharoza, Gram-mol, Hrvatska

3.1.2. Biokatalizatori

- kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soj Y00000 BY4741, EUROSCARF, Oberursel, Njemačka
- instant suhi pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, Kvasac d.o.o., Hrvatska

3.1.3. Otopine

Sve otopine i podloge pripremaju se uz pomoć sterilnih matičnih otopina i sterilne deionizirane vode ili se steriliziraju u autoklavu 20 minuta pri 121 °C i čuvaju pri sobnoj temperaturi.

Kalij-fosfatni pufer ($c=0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=7,4$), pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF (K_2HPO_4 , Fischer Scientific UK)

- | | |
|--------------------------|----------|
| ▪ Kalij hidrogenfosfat | 4,7 g |
| ▪ Kalij dihidrogenfosfat | 3,2 g |
| ▪ Destilirana voda | do 0,5 L |

YPD podloga (engl. Yeast Peptone Dextrose), pripravljena u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF

- | | |
|--------------------|-----------|
| ▪ Bakto-pepton | 4 g |
| ▪ Kvaščev ekstrakt | 2 g |
| ▪ Glukoza | 4 g |
| ▪ Destilirana voda | do 200 mL |

Sve korištene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

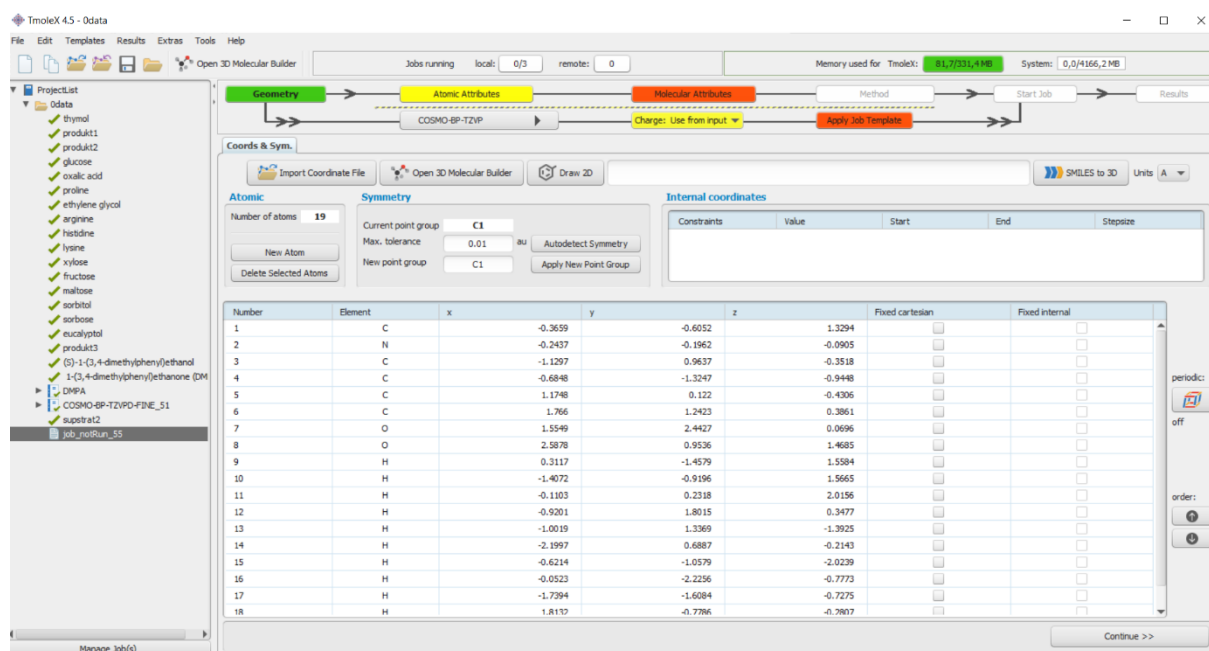
3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Automatski autoklav, A-63C, Kambič, Slovenija
- Digitalna magnetna mješalica, Nahita/Blue 692/1
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator s regulacijom temperature, EppendorfThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator-IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, ST. Louis, SAD
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure)
- Laminar LFV 12, Iskra PIO, Slovenija
- Univerzalni uređaj za mjerenje pH, mV/ORP i iona, Mettler Toledo/S220
- Plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan
- Rotacioni vakuum uparivač, Buchi Rotavapor R124
- UV-Vis spektrofotometar, ThermoFisher Scientific, Madison, WI, SAD; Genesys™ 10S UV-Vis
- Transmisijski svjetlosni mikroskop, Axiostar, Zeiss, Njemačka
- Računalni program TmoleX, Verzija 4.5, COSMOlogic GmbH & Co
- Računalni program BOVIA COSMOtherm 2020, Verzija 20.0.0 (Revision 5273M), Dessault Systems

3.2. METODE RADA

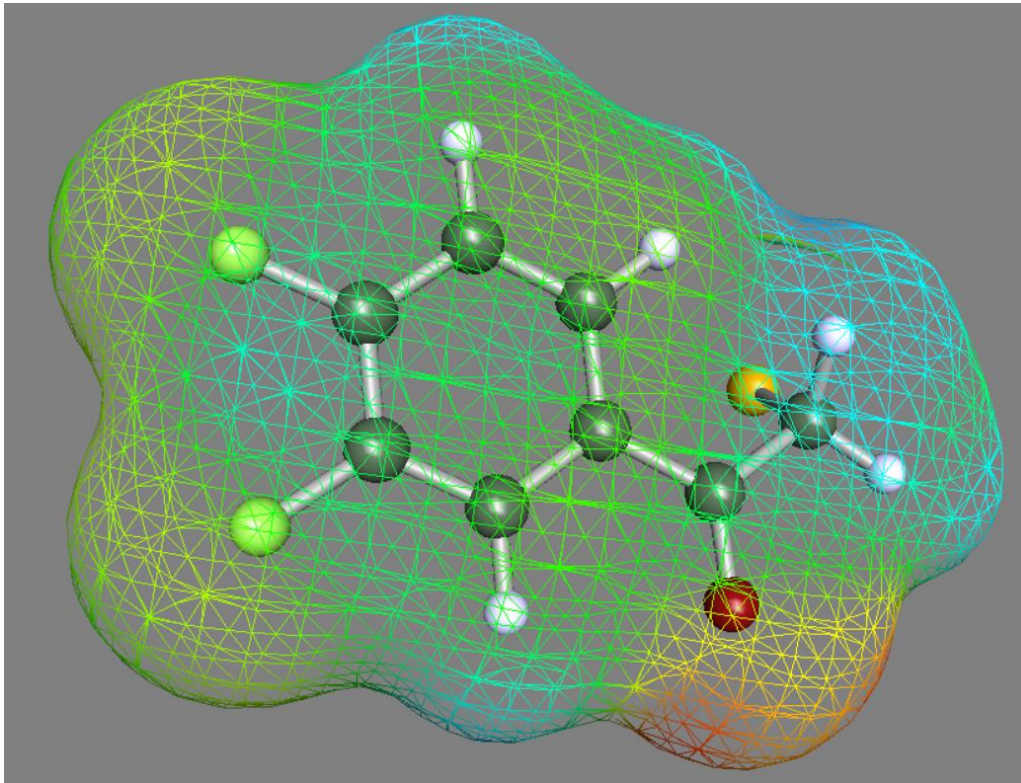
3.2.1. Računalno predviđanje topljivosti halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Za izračunavanje optimalne geometrije molekule korišten je računalni program TmoleX (Slika 4). 3D strukture halogeniranog acetofenona i pripadajućeg alkohola te komponente prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala unesene su ručno iz *PubChem* baze podataka (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) u SDF formatu (engl. Spatial Data File, SDF).



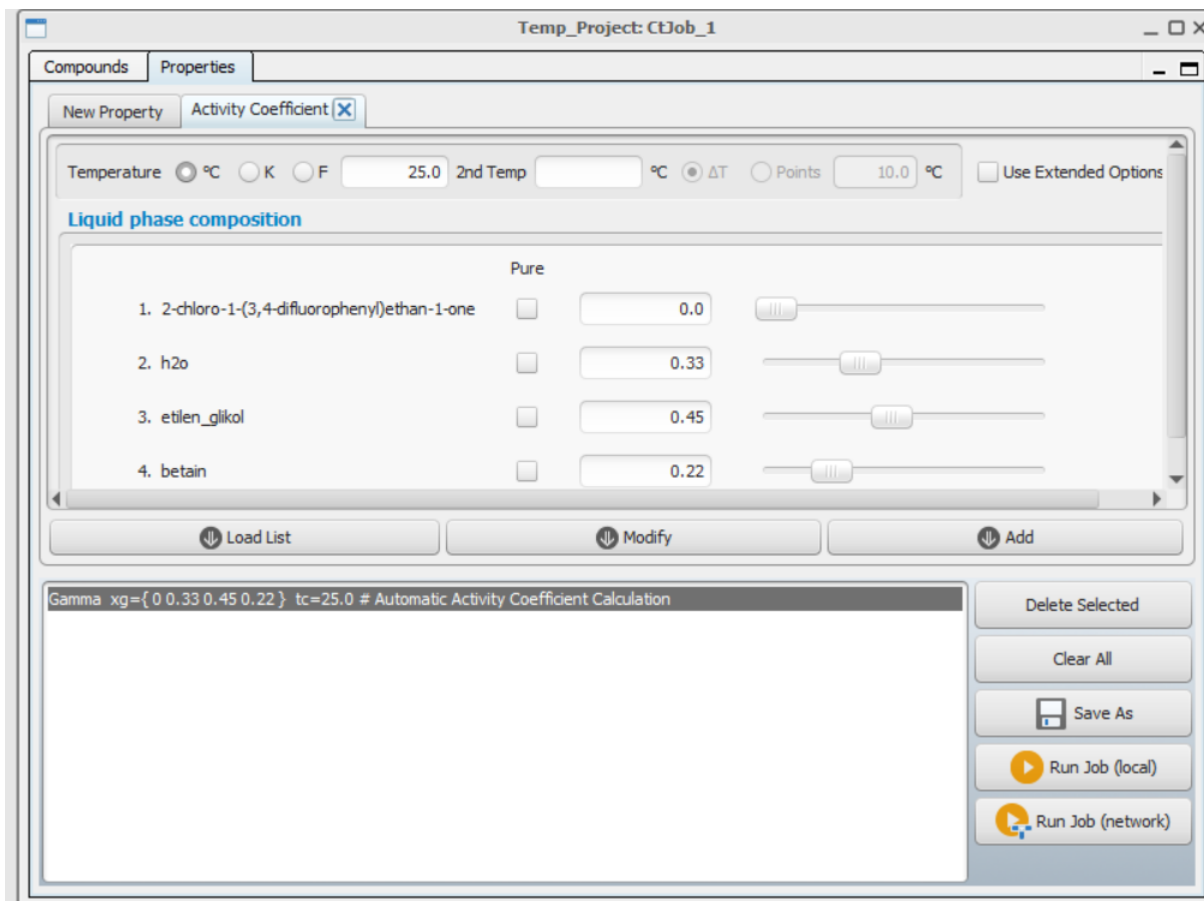
Slika 4. Sučelje TmoleX programa

Nakon optimiranja molekula, tj. računalnog pronalaženja određene geometrije u kojoj njihove strukture imaju minimalnu energiju (Slika 5), cijeli proračun je pohranjen kao izlazna COSMO datoteka radi brzog i računski jednostavnog termodinamičkog proračuna u programskom paketu *COSMOtherm* te kako bi se izračunali logaritmi koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$. Inače, $\ln(\gamma)$ vrijednost govori o topljivosti ispitivanog spoja, u ovom slučaju supstrata halogeniranog acetofenona (S), u ispitivanom otapalu, odnosno u različitim eutektičkim otapalima. Što je koeficijent aktivnosti viši i pozitivniji od 1 znači da spoj posjeduje manju topljivost u promatranom otapalu (Klamt i sur., 1998).



Slika 5. Energetsko i geometrijsko optimiranje na primjeru molekule halogeniranog acetofenona (Ukupna energija= -1043.2625523484).

Za računalno predviđanje topljivosti halogeniranog acetofenona u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, u *COSMOtherm* programu unesene su postojeće COSMO datoteke za akceptora vodikove veze (engl. Hydrogen Bond Acceptor, HBA), donora vodikove veze (engl. Hydrogen Bond Donor, HBD), halogeniranog acetofenona i vode prema prethodno zadanim udjelima čija suma mora biti jednaka 1 (Slika 6).



Slika 6. Sučelje *COSMOtherm* programa za izračunavanje logaritma koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$ – definiranje sastava smjese za određivanje koeficijenta aktivnosti halogeniranog acetofenona pri beskonačnom razrjeđenju u eutektičkom otapalu betain : etilen glikol (1:2) i 10 % vode (w/w).

3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

U ovom su radu eksperimentalno pripremljena tri prirodna niskotemperaturna eutektička otapala korištenjem betaina, etilen glikola, kolin klorida, saharoze te demineralizirane vode kao ishodnih sirovina. Način pripreme isti je za svako otapalo, a količina komponenata prethodno je izračunata prema zadanim molarnim omjerima prikazanih u Tablici 2.

U tikvicama s okruglim dnom pomiješaju se prethodno izračunate mase donora odnosno akceptora vodikove veze prema zadanom molarnom omjeru. Zatim se u svaku smjesu doda određena količina vode, kako bi se u konačnici dobila niskotemperaturna eutektička otapala s 10 % odnosno 30 % vode (w/w). Reakcijska smjesa se zatim miješa i grije na magnetnoj miješalici pri temperaturi 50 °C tijekom 2 sata, sve dok ne nastane homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Ovako pripremljena niskotemperaturna eutektička otapala čuvana su na sobnoj temperaturi i dnevnom svjetlu prije daljnje primjene. Pripremljenim otapalima određena je pH-vrijednost pri temperaturi od 25 °C (Tablica 2).

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala pripremljena prema Tablici 2 korištena su za određivanje topljivosti halogeniranog acetofenona (poglavlje 3.2.3.), reakciju enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona kataliziranu kvascem *Saccharomyces cerevisiae* soj YOOOOO BY4741 i suhim pekarskim kvascem (poglavlje 3.2.4.) te za određivanje vijabilnosti stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj YOOOOO BY4741 (poglavlje 3.2.6.).

Tablica 2. Pripravljena prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (DES).

Prirodno eutektičko otapalo (DES)	Kratica	Molarni omjer komponenata	Udio vode [% , w/w]	pH
Betain : etilen glikol : voda	BEG10%	1 : 2	10	6,60
Betain : saharoza : voda	BSuc30%	4 : 1	30	7,85
Kolin klorid : etilen glikol : voda	ChCIEG10%	1 : 2	10	6,19

3.2.3. Eksperimentalno određivanje topljivosti halogeniranog acetofenona u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Postupak određivanja topljivosti supstrata vrši se postupnim dodavanjem i otapanjem supstrata halogeniranog acetofenona u odgovarajućim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%). Nakon dodatka 5 mg navedenog supstrata u 1 mL eutektičkog otapala, suspenzija se homogenizira na tresilici (pri 25 °C i 1400 min⁻¹) do potpunog otapanja. Postupak dodavanja supstrata uzastopno se ponavlja do pojave kristala u uzorku (Slika 7). Analiza uzoraka provodi se pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 40x).

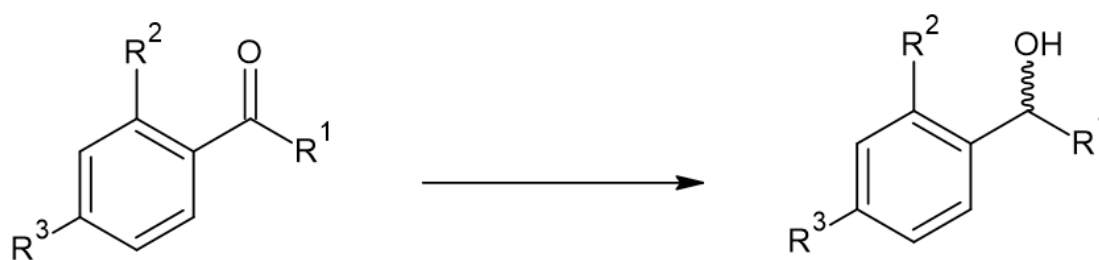


Slika 7. Pojava kristala u uzorku niskotemperaturnog eutektičkog otapala prilikom otapanja halogeniranog acetofenona.

Uređaj: svjetlosni mikroskop, povećanje 40x

3.2.4. Enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za reakciju enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona u kiralni halogenirani alkohol kao biokatalizator korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soj YOOOOO BY4741 te suhi liofilizirani pekarski kvasac (Slika 8).



R^1, R^2, R^3 - atom halogena

Slika 8. Reakcija redukcije halogeniranog acetofenona.

3.2.4.1. Uzgoj i priprema stanica kvasca

Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soja YOOOOO BY4741 najprije su precijepljene sa krute agarozne hranjive podloge u 10 mL tekuće kompletne kompleksne hranjive podloge YPD. Pripremljene su tri prekonoćne kulture stanica koje su rasle pri temperaturi od 28 °C uz trešnju na 200 min⁻¹ te svakodnevno precijepljivanje u sterilnim uvjetima. Stanice su uzgojene do ekspanzionalne faze rasta u duplikatu, a uspješnost uzgoja praćena je spektrofotometrijskom analizom pri 600 nm te mikroskopiranjem uzoraka pri povećanju 10 x. Inače, pri 600 nm (OD₆₀₀) spektrofotometrijski se procjenjuje koncentracija stanica kako bi se dobila informacija o fazi rasta uzgojenih stanica (lag faza, log faza ili stacionarna faza).

Nakon uzgoja stanica kvasca u kompletnoj kompleksnoj podlozi YPD, izdvojene su stanice u ekspanzionalnoj fazi rasta iz 5-10 mL kulture centrifugiranjem na sobnoj temperaturi pri 3000 okretaja tijekom 5 minuta. Supernatant je uklonjen, a preostali talog je resuspendiran u 10 mL demineralizirane vode. Suspenzija stanica ponovno je centrifugirana pri 3000 okretaja tijekom 5 minuta, nakon čega je supernatant ponovno uklonjen, a talog resuspendiran u 1 mL demineralizirane vode. Uslijedilo je ponovno centrifugiranje pod istim uvjetima, izdvajanje taloga te vaganje dobivene mase stanica za biokatalizu.

Za pripremu i uzgoj stanica suhog pekarskog kvasca, isti se resuspendira u 0,1 mol L⁻¹ kalij-fosfatnom puferu (pH = 7,4) prema sljedećem izrazu:

$$\frac{m(\text{kvasac}) [\text{g}]}{V(\text{pufer}) [\text{mL}]} = \frac{1}{40}$$

Otopina kvasca inkubira se pri sobnoj temperaturi tijekom jednog sata u homogenizatoru (50 min⁻¹). Nakon pripreme, suspenzija kvasca centrifugirana je pri 3000 okretaja tijekom 5 minuta, supernatant je uklonjen, a talog ispran s 10 mL demineralizirane vode. Centrifugiranje je ponovljeno prema istim uvjetima (3000 min⁻¹, 5 minuta) nakon čega se ukloni supernatant, a talog resuspendira u kalij-fosfatnom puferu. Smjesa se potom centrifugira 3000 min⁻¹ tijekom 5 minuta, supernatant se ukloni, a istaložena kvašćeva biomasa koristi se u daljnjem postupku asimetrične redukcije halogeniranog acetofenona.

3.2.4.2. Provođenje enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona

Za postavljanje biokatalitičke reakcije (Slika 8), dobivenoj masi stanica YOOOOO BY4741 (m = 0,05 g) odnosno vlažnoj biomasi pekarskog kvasca (m = 0,5 g) dodano je 19,61 μL matične

otopine halogeniranog acetofenona u acetonitrilu ($c=51 \text{ mg mL}^{-1}$) i 1,5 mL odabranog otapala (pufer, BE10%G, BSuc30%, ChCIEG10%). Reakcijska se provodi na tresilici tijekom 7 dana pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i 1400 min^{-1} . Izuzimanje uzoraka iz reakcijske smjese i praćenje reakcije na plinskom kromatografu s masenim spektrofotometrom vrši se nakon prvog, drugog, petog i sedmog dana tako što se iz reakcijske smjese izuzme $100 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka i resuspendira u $100 \text{ }\mu\text{L}$ demineralizirane vode. Tako pripremljeni uzorak se centrifugira tijekom 5 minuta (3000 min^{-1}) nakon čega se izdvojeno $145 \text{ }\mu\text{L}$ supernatanta kojem je dodano $855 \text{ }\mu\text{L}$ etil-acetata. Otopina se ekstrahira tijekom 3 minute pri sobnoj temperaturi, a za analizu na plinskom kromatografu s masenim spektrofotometrom izuzme se $70 \text{ }\mu\text{L}$ gornje organske faze. Provođenje biokatalitičke reakcije te analiza svih uzoraka napravljene su u duplikatu.

Nakon 7 dana, uslijedila je priprema uzoraka za analizu na plinskom kromatografu s masenim spektrofotometrom. Svakoj reakcijskoj smjesi dodano je 1,5 mL demineralizirane vode nakon čega su uzorci stavljeni na centrifugiranje pri 3000 okretaja tijekom 5 minuta. 3 mL supernatanta je izdvojeno u nove epruvete te je dodano 27 mL etil-acetata za ekstrakciju uz intenzivno miješanje tijekom 1 minute. Nakon razdvajanja slojeva, organska faza je ponovno izdvojena, dodan je natrijev sulfat uz homogenizaciju reakcijske smjese koja je potom ostavljena pri sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta. Nakon toga, uslijedilo je uparavanje uzoraka do suha nakon čega je svaki uzorak resuspendiran u $100 \text{ }\mu\text{L}$ etil-acetata te je provedena analiza na plinskom kromatografu s masenim spektrofotometrom. Analiza svih uzoraka napravljena je u triplikatu.

Radi usporedbe uspješnosti redukcije supstrata u različitim otapalima, za svaku pojedinu reakciju računa se iskorištenje reakcije te enantiomerni višak prema jednadžbama [1] i [2].

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

$$\eta = \frac{c_p}{c_t} \times 100 \quad [1]$$

gdje c_p predstavlja izmjerenu koncentraciju produkta (mol L^{-1}), a c_t teoretski moguću koncentraciju produkta (mol L^{-1}).

Enantiomerni višak, ee (%) izračuna se prema jednadžbi:

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

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

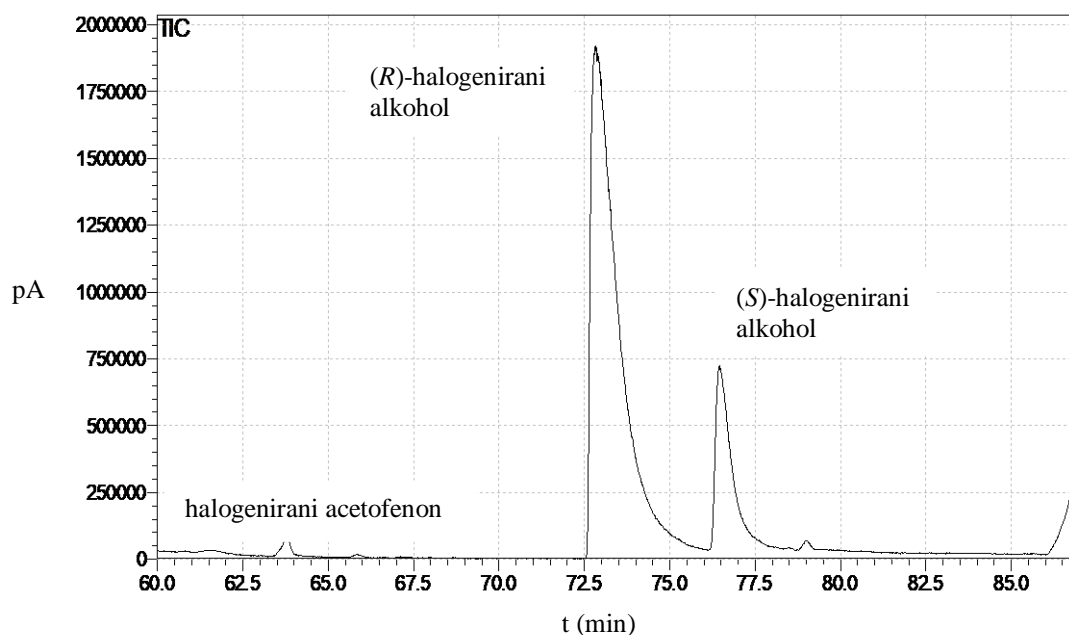
3.2.5. Određivanje koncentracije (*R,S*)-halogeniranog alkohola

Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije halogeniranog acetofenona i nastajanje produkta reakcije redukcije (*R,S*)-halogeniranog alkohola provedena je pomoću plinskog kromatografa s masenim spektrofotometrom (GC-MS).

Za analizu halogeniranog acetofenona i (*R,S*)-halogeniranog alkohola korišteni su sljedeći kromatografski uvjeti:

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

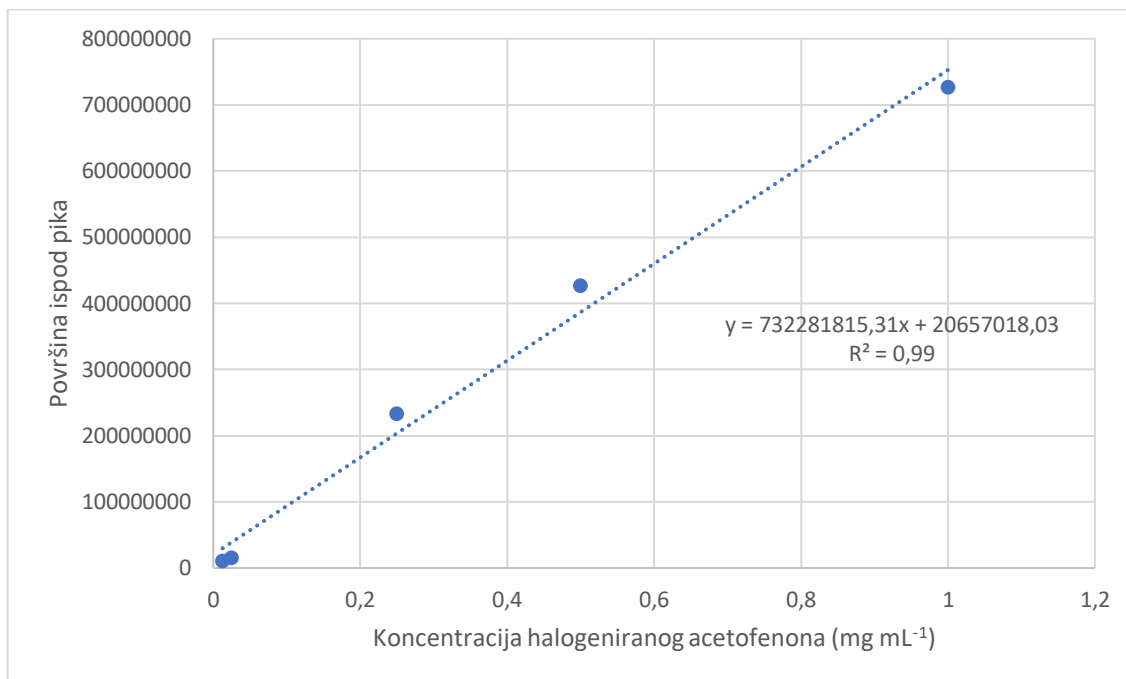
Identifikacija halogeniranog acetofenona, (*R*)-halogeniranog alkohola i (*S*)-halogeniranog alkohola provedena je s obzirom na vrijeme izlaska razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi sa kiralne kromatografske kolone, a potvrda navedenih spojeva dobivena je usporedbom masenih spektara iz baze podataka. Retencijsko vrijeme (R_t) za halogenirani acetofenon iznosi $63,06$ min, R_t za (*R*)-halogenirani alkohol $73,1$ min i R_t za (*S*)-halogenirani alkohol $76,30$ min što je prikazano na Slici 9.



Slika 9. Plinski kromatogram nakon analize reakcijske smjese za reakciju enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona katalizirane kvascem *S. cerevisiae*.

3.2.5.1. Izrada baždarnog dijagrama

Ishodna otopina halogeniranog acetofenona ($c=1 \text{ mg mL}^{-1}$) pripravljena je u etil acetatu (EA) radi izrade baždarnog dijagrama. Potom su pripravljena i razrjeđenja ishodne otopine navedenog supstrata na način da množinske koncentracije iznose 1 mg mL^{-1} ; $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ te $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$. Na grafičkom prikazu su izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika stavljene na ordinatu, dok se na apscisi nalaze pripadajuće vrijednosti množinskih koncentracija (Slika 10). Baždarni dijagram ovisnosti množinske koncentracije halogeniranog acetofenona o površini ispod pika konstruiran je pomoću računala. Nepoznate koncentracije (*R*)-halogeniranog alkohola i (*S*)-halogeniranog alkohola tijekom reakcije redukcije halogeniranog acetofenona u prirodnom eutektičkom otapalu, puferu ili vodi izračunate su izravno iz jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama.



Slika 10. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije halogeniranog acetofenona.

3.2.6. Određivanje vijabilnosti kulture kvasca

Određivanje vijabilnosti stanica je najčešća i najzastupljenija metoda za analizu utjecaja kemijskih i fizikalnih faktora na mikroorganizame, a definira se kao postotak živih stanica u populaciji. Vijabilnost se može određivati praćenjem rasta stanica u tekućem ili na čvrstom hranjivom mediju, ali i diferencijalnim bojanjem pojedinačnih stanica s obzirom na propusnost stanične stijenke i funkciju stanične membrane (Gilliland, 1959).

Stanice kvasca *S. cerevisiae* bojane su komercijalno dostupnim metilenskim modrilom (tetrametiljonin klorid), kristalnim spojem metalno plavozelenog sjaja i molekulske formule $C_{16}H_{18}ClN_3S$. Nevijabilne stanice boji plavo, a vijabilne postaju bezbojne zbog metaboličke redukcije boje. Vizualizacija i brojanje stanica vršeno je pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 10x) u Fuchs-Rosenthalovoj komorici.

Za određivanje vijabilnosti, izuzeto je 200 μ L uzorka stanica kvasca *S. cerevisiae* YOOOOO BY4741 prije i 7 dana nakon postavljanja biokatalitičke reakcije. Navedeni volumen stanica kvasca resuspendiran je u 1800 μ L demineralizirane vode.

Za brojanje stanica pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 10x) u duplikatu korištena je suspenzija 1 μ L metilenske boje ($c = 2 \text{ mg mL}^{-1}$), 20 μ L demineralizirane vode te 20 μ L uzorka stanica kvasca *S. cerevisiae* YOOOOO BY4741. U jednu Fuchs-Rosenthalovu komoricu

otpipetirano je 20 μL pripremljenog uzorka, brojanje stanica je vršeno u 4 kvadratića, a vijabilnost stanica kvasca *S. cerevisiae* YOOOOO BY4741 određena je prema prikazu [3] tako što su izuzeti uzorci živih stanica iz kulture prije početka biokatalitičke reakcije te 7 dana nakon provođenja reakcije.

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

U današnje vrijeme, kemijska i farmaceutska industrija zahtijevaju enantiomernu čistoću biološki aktivnih kiralnih spojeva u proizvodnji lijekova, poljoprivrednih kemikalija i drugih proizvoda koji se primjenjuju u biološkim sustavima. Interakcija enantiomera s enzimima i receptorima u njihovim prirodnim okolišima može rezultirati različitim, a ponekad i suprotnim biološkim učincima. Stoga je proizvodnja enantiomerno čistih spojeva u posljednjih nekoliko godina privukla veliku pozornost kako akademske, tako i industrijske zajednice (Panić i sur., 2019).

Osim visokoučinkovite pripreme i formulacije kiralnih lijekova, sve je značajnija potreba za dizajnom kemijskih, farmaceutskih i biotehnoloških proizvoda i procesa koji smanjuju ili potpuno uklanjaju primjenu i stvaranje škodljivih i opasnih tvari s jedinstvenim ciljem zaštite okoliša. Spomenuti pristup, definiran kao *zelena* kemija, temelji se ne samo na uklanjanju onečišćenja, već osmišljavanjem procesa koji ne uzrokuju onečišćenje. Trenutno se proučava velik broj različitih principa *zelene* kemije, poput alternativnih otapala i ekološki prihvatljivih (i obnovljivih) sirovina, primjena alternativnih oblika energije te provođenje organskih reakcija primjenom biokatalizatora. U skladu sa time, neke od velikih farmaceutskih tvrtki diljem svijeta, poput Amgen-a, Merck grupacije, Abbott, Eli Lilly, Johnson & Johnson i Roche, usredotočile su se na primjenu procesa *zelene* kemije u razvoju i proizvodnji lijekova (Tucker and Faul, 2016). Sukladno navedenom, očituje se sve veći interes za primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala kao medija za (bio)kemijsku pripravu kiralnih biološki aktivnih komponenti. Sinergistička primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala i biotehnologije u pripravi složenih organskih molekula primjenom izoliranih enzima ili mikrobnih stanica (biokataliza) vrlo je zanimljiv pristup za učinkovitu i održivu proizvodnju enantiomerno čistih spojeva. Naime, biotehnološkim pristupom omogućuje se kataliziranje reakcija teško izvedivih kemijskom katalizom uz visoku regio-, kemo- i enantioselektivnost pri blagim i ekonomičnim uvjetima, dok eutektička otapala služe kao ekološki prihvatljiva potpora u oblikovanju/usmjeravanju reakcijskog puta (Panić i sur., 2019).

U ovome je radu provedena reakcija enantioselektivne redukcije supstrata halogeniranog acetofenona u kiralni halogenirani alkohol, građevni blok u sintezi tikagrelora koji je aktivna djelatna tvar antitrombotika Brilique koji ima ulogu smanjiti mogućnost nastajanja krvnog ugruška te posljedično spriječiti srčani, moždani udar i/ili smrt prilikom bolesti povezanih sa srcem ili krvnim žilama (Guo i sur., 2017). Kao biokatalizator korišten je *Saccharomyces*

cerevisiae (soj Y00000 BY4741 i suhi pekarski kvasac), budući da primjenom istog nije potrebno dodavati koenzime nužne za redukciju karbonilne grupe budući ih stanice kvasca već posjeduju, kao i mehanizme njihove reciklacije kroz metaboličku aktivnost stanice. Također, *S. cerevisiae* idealan je biokatalizator za industrijsku primjenu budući je jeftin, lako dostupan i dobro proučen mikroorganizam, ima GRAS status, a karakterizira ga netoksičnost, biološka razgradivost i jednostavnost u rukovanju (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Najprije, primjenom računalnog programa COSMO $_{therm}$ proveden je probir niskotemperaturnih eutektičkih otapala za navedenu redukciju temeljem procjene topljivosti halogeniranog acetofenona kao supstrata. U odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima provedena je redukcija odabranog halogeniranog acetofenona te je praćen učinak istih na stanice kvasca kako bi se prikupila temeljna saznanja o ponašanju *S. cerevisiae* u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.

4.1. RAČUNALNO PREDVIĐANJE TOPLJIVOSTI HALOGENIRANOG ACETOFENONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

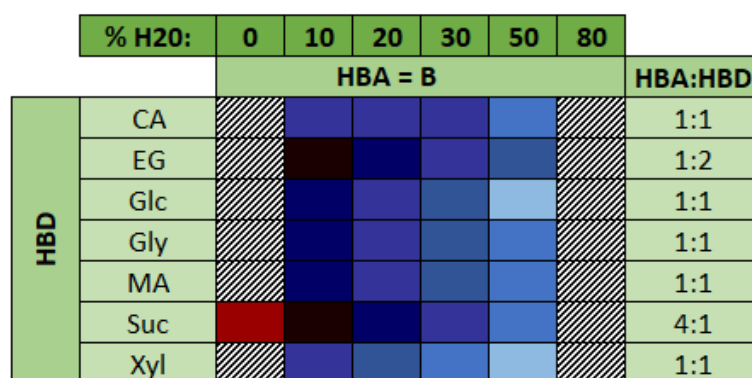
Računalno predviđanje topljivosti supstrata halogenirani acetofenon u prirodnom niskotemperaturnom eutektičnom otapalu može zamijeniti ili umanjiti potrebu za eksperimentalnim radom i potrošnjom laboratorijskih kemikalija. COSMO-RS jedan je od računalnih programa koji se danas često primjenjuje za tu svrhu jer razmatra interakcije vodikovih veza između molekula otopljene tvari i otapala radi izračunavanja kemijskog potencijala, ali i procjenu topljivosti otopljene tvari u otapalu. Osim za navedeno, ovaj računalni programski paket može se primjenjivati za predviđanje termodinamičkih svojstava otapala, eutektičke točke te drugih fizikalno-kemijskih svojstava otapala i otopljene tvari (Palmelund i sur., 2019).

Kolin klorid je često korištena komponenta kao akceptor vodikove veze u pripremi prirodnih eutektičkih otapala zbog svoje visoke biorazgradivosti i biokompatibilnosti, niske toksičnosti te široke dostupnosti, a niskotemperaturna eutektička otapala koja koriste šećerne alkohole poput etilen glikola, intenzivno se primjenjuju u industriji. Otapala na osnovi kolin klorida sa šećernim alkoholom kao donorom vodikove veze, zelena su alternativa uobičajenim otapalima (Wang i sur., 2020).

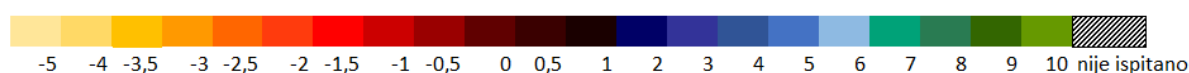
Odabir odgovarajućeg niskotemperaturnog eutektičkog otapala temeljio se i na netoksičnim hidrofилnim eutektičkim otapalima čija je cijena usporediva s najčešće korištenim organskim otapalima, a da pritom pH-vrijednost navedenih eutektičkih otapala odgovara rastu stanica kvasca. Što je veća topljivost željenog supstrata u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu,

veća je učinkovitost bioredukcije u tim otapalima, a već je i poznato da niskotemperaturna eutektička otapala induciraju propusnost stanične membrane čime se povećava prijenos supstrata kroz membranu i tako dovodi do veće konverzije supstrata (Panić i sur., 2019).

Prema navedenom protokolu u poglavlju 3.2.1., prije eksperimentalnog rada u laboratoriju, u računalnom programu COSMOtherm ispitana je topljivost supstrata halogeniranog acetofenona s obzirom na definirani sastav otapala, odnosno udio akceptora (HBA), donora vodikove veze (HBD) i vode. Kao rezultat proračuna dobiveni su logaritmi koeficijenta aktivnosti ($\ln(\gamma)$) prema kojima je određena topljivost supstrata u određenom otapalu (Slika 11 i Slika 12). Vrijednost koeficijenta aktivnosti ($\ln(\gamma)$) veća od 1 za navedeni halogenirani supstrata znači njegovu manju topljivost u promatranom otapalu. Na slikama 11 i 12 prikazana je topljivost halogeniranog supstrata na primjeru betaina ili kolin klorida kao akceptora vodikove veze, nekoliko ostalih spojeva kao donora vodikove veze (HBD) uz dodatak određenog masenog udjela vode (% H₂O).

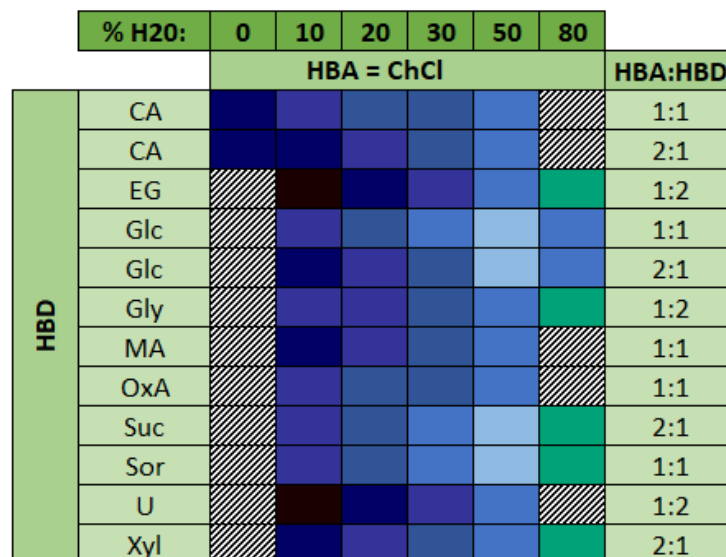


Legenda ($\ln(\gamma)$):

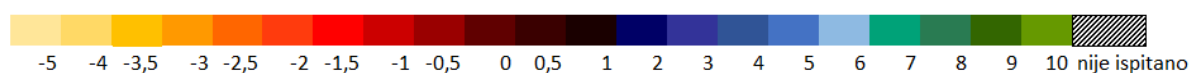


Slika 11. Topljivost halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi betaina kao akceptora vodikove veze (HBA). Ispitani različiti molarni omjeri i vrste donora vodikove veze (HBD) te maseni udjeli vode (% H₂O) prema COSMOthermX software-u.

*HBD: limunska kiselina (CA), etilen glikol (EG), glukoza (Glc), glicerol (Gly), malična kiselina (MA), saharoza (Suc), ksiloza (Xyl)



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



Slika 12. Topljivost halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi kolin klorida kao akceptora vodikove veze (HBA). Ispitani različiti molarni omjeri i vrste donora vodikove veze (HBD) te maseni udjeli vode (% H₂O) prema COSMOthermX software-u.

*HBD: limunska kiselina (CA), etilen glikol (EG), glukoza (Glc), glicerol (Gly), malična kiselina (MA), oksalna kiselina (OxA), saharoza (Suc), sorboza (Sor), urea (U), ksiloza (Xyl)

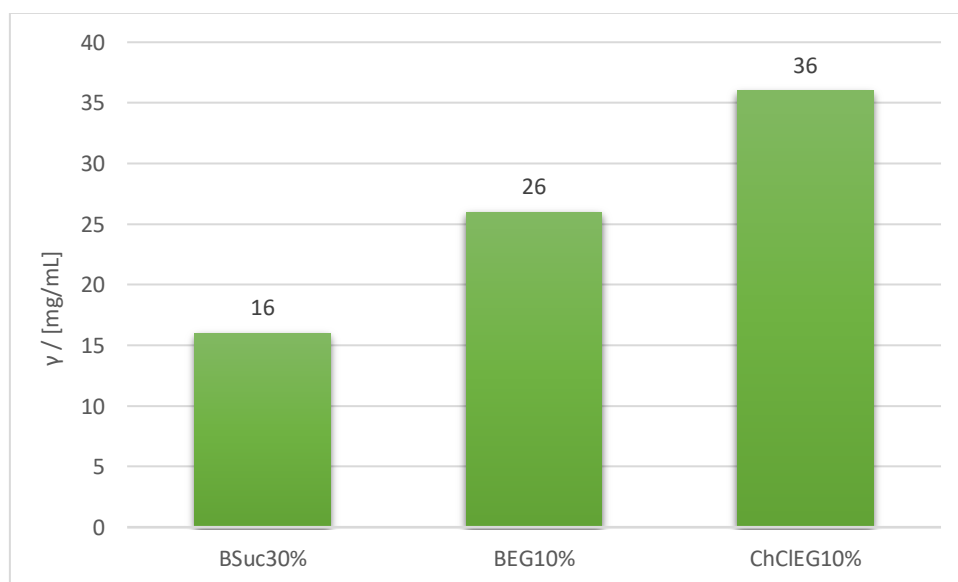
Prema rezultatima prikazanim na Slikama 11 i 12, moguće je zaključiti kako ispitana niskotemperaturna eutektička otapala umjereno do slabo otapaju halogenirani acetofenon, bez jasno vidljivog utjecaja donora i akceptora vodikove veze na topljivost istog. Međutim, maseni udio vode u eutektičkom otapalu pokazuje značajan utjecaj na topljivost acetofenona. Primjerice, za otapalo ChCl dodatkom vode vrijednost $\ln(\gamma)$ raste od 1 (za 10 % vode) do 7 (80 % vode). Eutektičko otapalo betain : saharoza (4:1) najbolje otapa halogenirani acetofenon bez dodatka vode. Međutim, radi se o vrlo viskoznom sustavu koji bi potencijalno mogao ograničavati primjenjivost u biokatalizi. Dodatkom manje količine vode, smanjuje se viskoznost otapala što može rezultirati većim prinosima reakcije te mu se povećava katalitička aktivnost jer je voda potrebna cijelim stanicama kvasca kako bi se ta aktivnost i izazvala. S druge strane, bitno je naglasiti da veći maseni udio vode može dovesti do prekida vodikovih veza između komponenata niskotemperaturnog eutektičkog otapala i tako izgubiti njegovo eutektičko svojstvo. Shodno tome, odabrane kombinacije niskotemperaturnih eutektičkih otapala za provođenje reakcije redukcije prema računalnom programu COSMOtherm bili su betain : etilen glikol (1:2) uz maseni udio vode od 10% (BEG10%) te betain : saharoza (4:1) uz dodatak 30% vode (BSuc30%). Također, šećeri u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

pokazuju vrlo dobru biokompatibilnost sa stanicama kvasca, a osim šećera, i alkoholi kao donori vodikove veze (HBD) mogu imati vrlo važnu ulogu kao ko-supstrati za regeneraciju kofaktora ili kao izvor hrane u stanicama kvasca (Silva i sur., 2018).

S obzirom na navedene karakteristike i dobivenu $\ln(\gamma)$ vrijednost, kolin klorid : etilen glikol (1:2) uz 10%-tni maseni udio vode (Slika 12), isti je izabran kao pogodno otapalo za reakciju enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona. Naime, prema COSMO $therm$ računalnom programu, $\ln(\gamma)$ vrijednost iznosi oko 1 što ukazuje na dobru topljivost navedenog supstrata u otapalu kolin klorid : etilen glikol sa 10 % masenog udjela vode (ChCIEG10%).

4.2. EKSPERIMENTALNO ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI HALOGENIRANOG ACETOFENONA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Osim u računalnom programu COSMO $therm$, topljivost halogeniranog acetofenona ispitana je i eksperimentalno. Naime, određivanje topljivosti supstrata izvršeno je postupnim dodavanjem 5 mg halogeniranog acetofenona u 1 mL prirodnog eutektičkog otapala (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%) uz tresenje na 1400 min^{-1} pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ do njegova otapanja. Analiza uzorka provedena je pod svjetlosnim mikroskopom (povećanje 40x), a završetak otapanja je potvrđen pojavom kristalića u uzorku. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 13.



Slika 13. Topljivost halogeniranog acetofenona u različitim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.

Reakcijski uvjeti: 5 mg halogeniranog supstrata; 1 mL DES-a; $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Kratice: betain : saharoza (BSuc30%), betain : etilen glikol (BEG10%), kolin klorid : etilen glikol (ChCIEG10%)

U 1 mL otapala ChCIEG10% otopljeno je 36 mg mL⁻¹ supstrata, u otapalu BSuc30% 16 mg mL⁻¹ te u otapalu BEG10% 26 mg mL⁻¹. S obzirom na rezultate na Slici 13., topljivost halogeniranog acetofenona najbolja je u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu kolin klorid : etilen glikol (1:2) uz 10%-tni maseni udio vode, dok je najmanja u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu betain : saharoza (4:1) uz 30%-tni maseni udio vode. Zanimljivo, računalno predviđanje topljivosti halogeniranog acetofenona u programu COSMO $therm$ potvrđeno je i eksperimentalno jer je za otapalo ChCIEG10% izračunat najmanji koeficijent aktivnosti ($\ln(\gamma)$) što znači bolju topljivost supstrata, a za otapalo BSuc30% najveći $\ln(\gamma)$ što znači njegovu manju topljivost (poglavlje 4.1.). Iz navedenog, software COSMO $therm$ pokazao se dobrim računalnim alatom za predviđanje topljivosti ispitivanog supstrata halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.

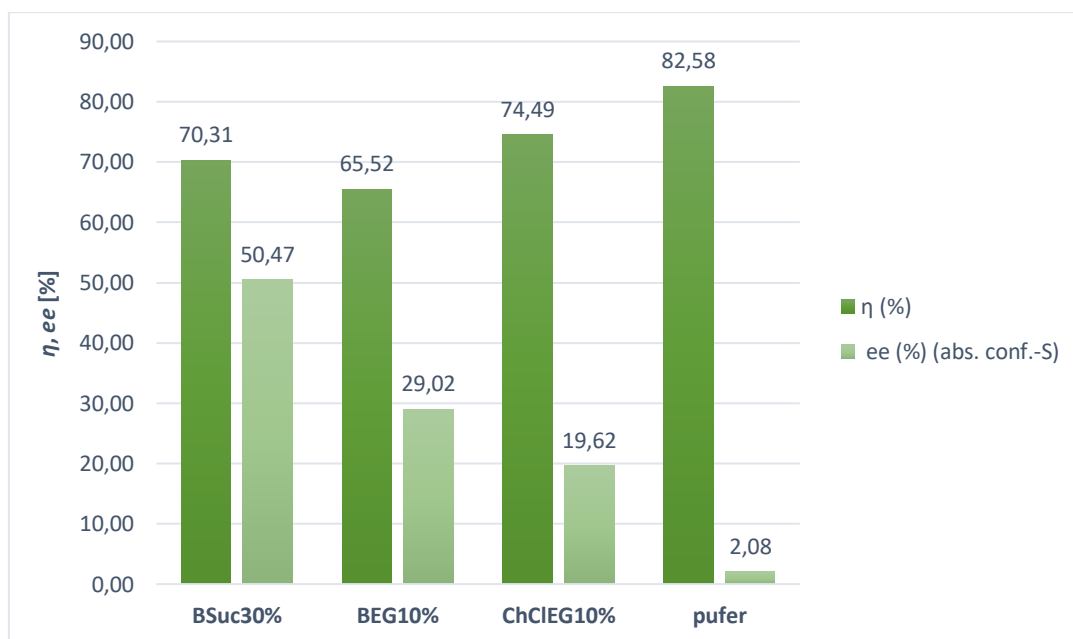
4.3. ENANTIOSELEKTIVNA REDUKCIJA HALOGENIRANOG ACETOFENONA POMOĆU KVASCA *S. cerevisiae*

Sinteza kiralnih sekundarnih alkohola redukcijom prokiralnih aromatskih ketona vrlo je važan način pripreme čistih enantiomera. Tradicionalno se kiralni sekundarni alkoholi proizvode organskom sintezom u kojoj se metalni hidrati koriste kao katalizatori što rezultira stvaranjem racemične smjese alkohola (Panić i sur, 2019). Ketoni su prokiralni supstrati jer karbonilni ugljik može postati asimetričan centar molekule kada se ligand veže na ugljikov atom karbonilne skupine, a stereokemijski tijek redukcijske reakcije općenito se odvija prema Prelogovom pravilu asimetrične redukcije ketona. Naime, struktura supstrata uvjetuje odvijanje reakcije, a ketoni s velikom i malom skupinom vezanom na karbonilni ugljik reducirat će se u *S*-alkohole uz uvjet da veća skupina ima viši stupanj prioriteta od manje skupine prema CIP-nomenklaturi (Ashenurst, 2020). Uvođenjem kemo-, regio- i enantioselektivnih biokatalizatora (npr. izolirani enzimi, mikroorganizmi, biljne i životinjske stanice i tkiva) u redukciju aromatskih ketona, moguće je proizvesti čisti pojedinačni enantiomer u blagim redukcijskim uvjetima, a ovakav pristup je vrlo važan sa stajališta zaštite okoliša jer je u skladu s principima *zelene* kemije (Panić i sur., 2019).

U ovom je radu sposobnost enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona u kiralni halogenirani alkohol u ekološki prihvatljivim otapalima (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%) ispitana korištenjem kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj YOOOOO BY4741 te instant suhog pekarskog kvasca *S. cerevisiae* kao biokatalizatora. Redukcija je provedena i u puferu kao referentnoj točki za usporedbu uspješnosti provedenih reakcija. Pozitivni rezultati enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona dobiveni su uz pomoć liofiliziranog

suhog pekarskog kvasca (Slika 14), dok u stanicama kvasca soja YOOOOO BY4741 ipak nije došlo do konverzije supstrata u željeni produkt (rezultati nisu prikazani). Razlozi neuspješne pretvorbe mogu biti različiti, a neke od pretpostavki su: nedostatak određenih kvašćevih enzima uz pomoć kojih se postiže konverzija supstrata u produkt, pogrešan odabir prirodnih eutektičkih otapala u kojima se odvijala reakcija i/ili greške u koracima prilikom pripreme stanica za reakciju.

Nakon provedene enantioselektivne redukcije halogeniranog acetofenona pomoću liofiliziranog suhog pekarskog kvasca *S. cerevisiae* te analize na plinskom kromatografu spregnutom s masenim detektorom, izračunata su iskorištenja procesa redukcije (η) i enantiomerni višak reakcije (ee) prema formulama [1] i [2]. Dobivene vrijednosti koristile su za procjenu uspješnosti reakcije redukcije u puferu i niskotemperaturnim eutektičkim otapalima s različitim masenim udjelima vode (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%). Na Slici 14 prikazani su iskorištenje procesa (η) i enantiomerni višak reakcije (ee) redukcije katalizirane suhim pekarskim kvascem u odabranim zelenim otapalima (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%) i puferu.



Slika 14. Iskorištenje reakcije (η) i enantiomerni višak (ee) redukcije halogeniranog acetofenona katalizirane liofiliziranim suhim pekarskim kvascem *S. cerevisiae*.

Reakcijski uvjeti: 2 mg mL⁻¹ halogeniranog acetofenona; 0,5 g pekarskog kvasca; 1,5 mL niskotemperaturnog eutektičkog otapala; 7 dana; 30 °C.

Kratice: betain : saharoza (BSuc30%), betain : etilen glikol (BEG10%), kolin klorid : etilen glikol (ChCIEG10%)

Iz rezultata na Slici 14 može se zaključiti visoka enantioselektivnost biokatalizatora prema (*S*)-alkoholu što i potvrđuje Prelogovo pravilo asimetrične redukcije ketona (Prelog, 1964). Iskorištenja reakcije redukcije halogeniranog acetofenona katalizirane liofiliziranim suhim pekarskim kvascem *S. cerevisiae* nakon 7 dana vrlo su slična u svim korištenim prirodnim eutektskim otapalima, a najveće iskorištenje postignuto je u otapalu ChCIEG s 10% masenim udjelom vode. Ovakav rezultat je u skladu s očekivanjima obzirom da se radi o vrlo često korištenom eutektskom otapalu u industriji zbog svoje visoke biorazgradivosti i biokompatibilnosti te niske toksičnosti. Navedeno otapalo najviše pogoduje stanicama kvasca za konverziju halogeniranog acetofenona u (*S*)-kiralni alkohol, međutim, iz priloženih rezultata, eutektska otapala BSuc30% i BEG10% također pogoduju enantioselektivnoj redukciji navedenog supstrata. Nadalje, bitno je spomenuti i dodatak vode pripravljenim eutektskim otapalima jer se radi o vrlo viskozim otapalima, a određeni udio vode omogućava bolji prijenos reaktanta i produkta u reakcijskoj smjesi. Uspoređujući iskorištenje i enantiomerni višak u reakciji redukcije u niskotemperaturnom eutektskom otapalu BSuc30%, BEG10%, ChCIEG10% i puferu, može se zaključiti kako se BSuc30% ipak pokazao kao najučinkovitije eutektsko otapalo za enantioselektivnu redukciju halogeniranog acetofenona nakon 7 dana u kojem je ostvareno iskorištenje od 70,31 % te enantiomerni višak od 50,47 %. Enantiomerni višak u ostala dva navedena eutektska otapala (BEG10%, ChCIEG10%) nije zadovoljavajući pa bi se upotrebom drugog katalizatora mogla povećati specifičnost supstrata, ali i postići veći enantiomerni višak (>99%). Ono što je još moguće napraviti u svrhu poboljšanja katalitičke sposobnosti enzima jest regulacija koncentracije supstrata (Guo i sur., 2017). S obzirom na izmjerene pH-vrijednosti pripremljenih niskotemperaturnih eutektskih otapala (Tablica 1) i rezultate na Slici 14, vidljivo je kako suhom pekarskom kvascu pogoduje blago lužnato otapalo (BSuc30 %, pH=7,85) za konverziju navedenog supstrata u određeni (*S*)-alkohol. Naime, pH-vrijednost utječe na regeneraciju koenzima i jedno je od vrlo važnih pitanja u biokatalitičkoj redukciji. Šećeri imaju vrlo važnu ulogu kao ko-supstrati za regeneraciju kofaktora te bi kao donori vodikove veze u niskotemperaturnom eutektskom otapalu svakako mogli doprinijeti povećanju prinosa reakcije.

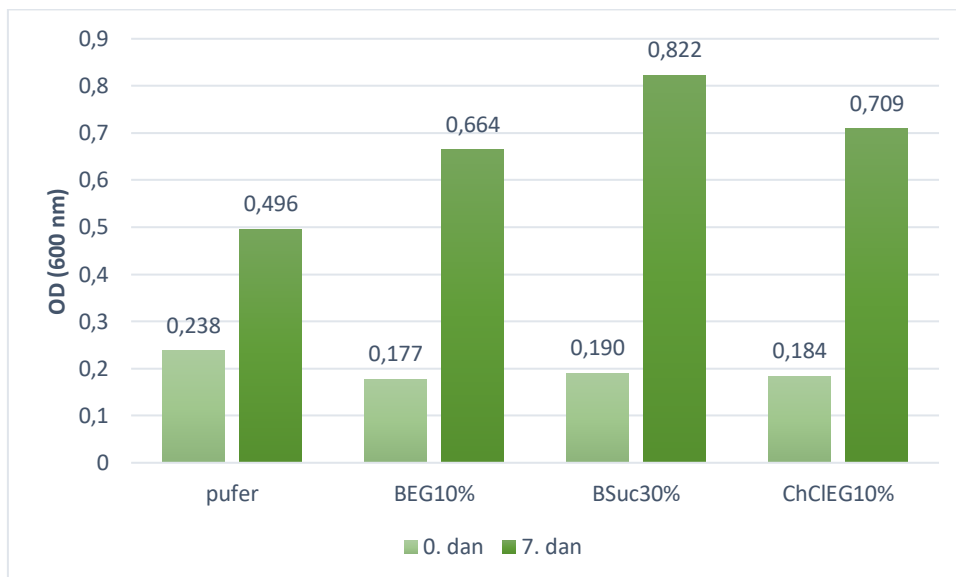
Različiti prinosi reakcije redukcije direktno su povezani sa: enzimskom razgradnjom supstrata i/ili produkta, pH-vrijednosti reakcijske smjese, sposobnosti regeneracije koenzima ili održivosti stanica kvasca te vijabilnosti kulture stanica.

4.4. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI KULTURE KVASCA

Određivanje vijabilnosti kulture definira se kao postotak živih stanica u populaciji, a radi se najzastupljenijoj metodi kojom se analizira utjecaj kemijskih i fizikalnih faktora na njihov rast (Gilliland, 1959). U ovom radu, vijabilnost je određena brojanjem preživjelih stanica u kulturi obojanih metilenskim modrilom u tekućem mediju, odnosno prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%) i puferu. Niskotemperaturna eutektička otapala inhibiraju rast stanica u kulturi u odnosu na pufer.

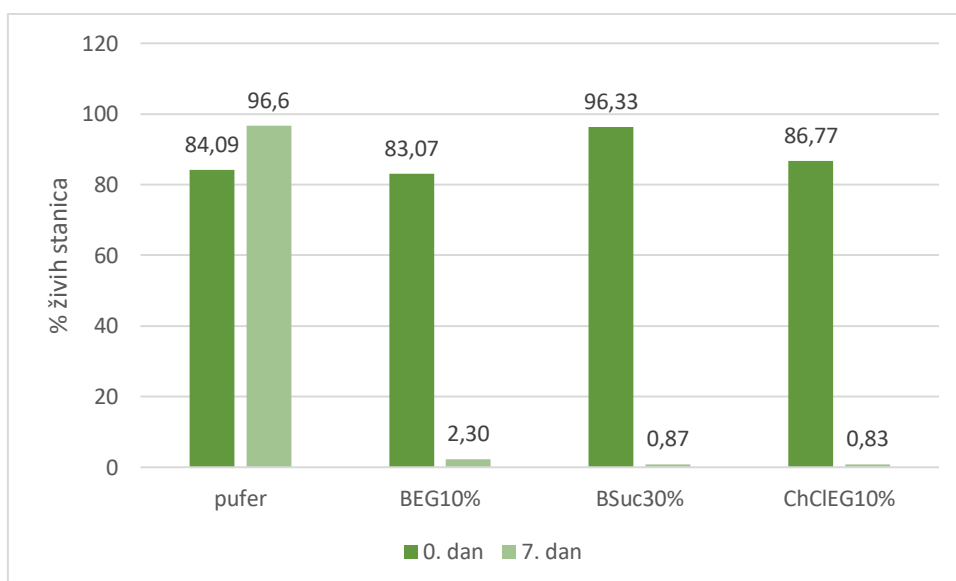
Jedan od načina kako niskotemperaturno eutektičko otapalo utječe na vijabilnost stanica kvasca može se objasniti različitim pH-vrijednostima otapala (Tablica 1). Naime, optimalan pH za rast *Saccharomyces cerevisiae* je između 4 i 6, a prema Tablici 1, pripremljena niskotemperaturna eutektička otapala imaju višu pH-vrijednost što je jedan od pokazatelja da stanicama kvasca navedena otapala ne odgovaraju za preživljenje. Osim toga, utvrđeno je i da se šećeri mogu koristiti kao izvor hrane za mnoge mikroorganizme, pa tako i za kvasce. Stoga, postoji povezanost prinosa reakcije i vijabilnosti stanica, što bi značilo da određena eutektička otapala potpuno inhibiraju rast stanica, moguće narušavanjem stanične membrane ili denaturacijom enzima unutar stanice (Kwolek i Zadrage, 2014).

Mjerenje optičke gustoće (engl. Optical Density, OD) uz pomoć spektrofotometra pri 600 nm vrlo je jednostavna i široko korištena metoda za praćenje rasta mikroorganizama i njihovu metaboličku aktivnost, ali i određivanja broja stanica u tekućoj kulturi. Svjetlost koja prodiere kroz suspenziju stanica ne apsorbira se, već raspršuje prilikom čega detektor bilježi različite OD-vrijednosti. Jedan od problema ove metode je što se mjerenjem OD-vrijednosti detektiraju i mrtve stanice kao žive. Naime, ako je u kulturi prisutno mnogo mrtvih stanica, metabolička aktivnost koja je izmjerena može biti pogrešna. Također, postoji mogućnost od pojave malih mjehurića zraka u uzorcima pa se oni mjere i računaju kao žive stanice (Weiß, 2020). S obzirom na Sliku 14, OD-vrijednosti uzoraka stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj YOOOOO BY474 u različitim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%) i puferu su nakon 7 dana porasle što bi značilo da se i njihov broj povećao, odnosno, da je došlo do porasta broja stanica. Iako je porasla OD-vrijednost uzoraka, to ne znači da je došlo do preživljenja stanica s obzirom da ovakav rezultat nije potvrđen analizom na svjetlosnom mikroskopu (Slika 15). Razlozi koji upućuju da je došlo do povećanja OD-vrijednosti mogu biti i neprecizno manipuliranje uzorcima tijekom pripreme za analizu, otpuštanje staničnog otpada, ali i raspad umrlih stanica.



Slika 15. Rezultati spektrofotometrijske analize vijabilnosti kulture stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj YOOOOO BY474.

Uvjeti: 2 mL suspenzije stanica, 0. dan, 7. dan. Kratice: betain : saharoza (BSuc30%), betain : etilen glikol (BEG10%), kolin klorid : etilen glikol (ChCIEG10%)



Slika 16. Vijabilnost kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj YOOOOO BY474.

Uvjeti: svjetlosni mikroskop (povećanje 10x), 20 μ suspenzije stanica ($c = 2 \text{ mg mL}^{-1}$), 25 $^{\circ}\text{C}$, 0. dan, 7. dan. Kratice: betain : saharoza (BSuc30%), betain : etilen glikol (BEG10%), kolin klorid : etilen glikol (ChCIEG10%)

Vijabilnost kvasca izuzetno ovisi o otapalu u kojem stanice rastu tijekom 7 dana. Naime, udio živih stanica u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (BEG10%, BSuc30%, ChCIEG10%) nakon 7 dana izrazito je nizak, dok je za pufer visok (Slika 16). Iako je prethodno spomenuto kako šećer može koristiti kvascu kao izvor hrane, ovdje to ipak nije potvrđeno. Generalno,

smanjena vijabilnost kvasca u bilo kojem mediju s visokim udjelom niskotemperaturnog eutektičkog otapala može se objasniti kao posljedica visokog osmotskog tlaka što posljedično rezultira difuzijom vode iz stanica. Na slici dobivenoj prilikom mikroskopiranja opaženo je kako su stanice izgledale smežurano i nepravilnog oblika, morfološki drastično različitije nego prilikom mikroskopiranja nulti dan, kada stanice nisu rasle u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu. Osim navedenog, spomenuto je i kako stanicama kvasca za njihov rast odgovara pH-vrijednost između 4 i 6. Prema Tablici 1, pH-vrijednosti korištenih niskotemperaturnih eutektičkih otapala u ovom radu bila su iznad 6 jedinica pa bi i to mogao biti jedan od razloga vrlo niskog postotka preživljenja stanica nakon 7 dana.

Glavni cilj eksperimentalnog određivanja vijabilnosti stanica kvasca bilo je utvrditi utječe li niskotemperaturno eutektičko otapalo na preživljenje kulture stanica. S obzirom na prikazane rezultate na Slikama 15 i 16, nije moguće sa sigurnošću definirati pretpostavku da utječe. Činjenica je da je spektrofotometrijsko određivanje optičke gustoće stanica vrlo jednostavna metoda kojom se brzo može doći do informacije o rastu mikroorganizama i njihovoj metaboličkoj aktivnosti, međutim, ako je već u početku eksperimenta u kulturi bilo prisutno mnogo mrtvih stanica, metabolička aktivnost koja je izmjerena može biti pogrešna. S druge strane, pH-vrijednosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala ne odgovaraju idealnim vrijednostima za rast stanica kvasca pa se iz rezultata na Slici 16 može pretpostaviti kako niskotemperaturna eutektička otapala korištena u ovom eksperimentu nisu pogodna za preživljenje stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj Y00000 BY474. Ovaj rezultat potvrđuje i neuspješna reakcija redukcije supstrata halogeniranog supstrata u (*R*)-halogenirani alkohol i (*S*)-halogenirani alkohol. S obzirom da mjerenje OD-vrijednosti i nije zahvalna metoda za određivanje vijabilnosti stanica, već koristi za procjenu faze rasta stanica u kulturi, bojanjem stanica metilenskim modrilom i mikroskopiranjem moguće je odrediti udio preživjelih stanica pa se može zaključiti kako niskotemperaturno eutektičko otapalo ne mora nužno negativno utjecati na preživljenje stanica, ali može utjecati na inhibiciju rasta stanica narušavajući staničnu membranu ili denaturaciju enzima unutar stanica.

Generalno, u ovom je radu pokazano da se probirom niskotemperaturnih eutektičkih otapala različitih struktura može značajno utjecati na iskorištenje i enantioselektivnost bioredukcije derivata acetofenona, pri čemu je primjenom računalnih metoda moguće predvidjeti topljivost istog u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, odnosno racionalno dizajnirati otapalo za navedenu svrhu. Također, primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u biokatalitičkim reakcijama predstavlja doprinos razvoju novih zelenih procesa.

5. ZAKLJUČCI

U ovom je radu primjenom računalnog programa COSMO proveden probir eutektičkih otapala za enantioselektivnu redukciju temeljem procjene topljivosti supstrata halogeniranog acetofenona. U odabranim eutektičkim otapalima provedena je redukcija odabranog halogeniranog acetofenona te je praćen učinak istih na stanice kvasca kako bi se prikupila temeljna saznanja o ponašanju *Saccharomyces cerevisiae* u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.

Na osnovu provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. U programu COSMO $therm$ moguće je računalno predvidjeti topljivost komponenata u odgovarajućem niskotemperaturnom eutektičkom otapalu kako bi se zamijenile ili umanjile potrebe za eksperimentalnim radom i posljedično potrošnjom laboratorijskih kemikalija, što je potvrđeno eksperimentalnim određivanjem topljivosti supstrata halogeniranog acetofenona u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Najmanji koeficijent aktivnosti ($\ln(\gamma)$) u software-u COSMO $therm$ izračunat je za otapalo ChCIEG10%, također eksperimentalno potvrđeno kao otapalo koje najbolje otapa ispitivani supstrat halogenirani acetofenon.
2. Topljivost halogeniranog acetofenona najbolja je u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu kolin-klorid : etilen-glikol (1:2) uz 10%-tni maseni udio vode, a najmanja u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu betain : saharoza (4:1) uz 30%-tni maseni udio vode. Udio vode u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu utječe na topljivost ispitivanog supstrata.
3. Uspoređujući enantiomerni višak i iskorištenje reakcije u odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (BEG10%, BSuc30% i ChCIEG10%) i puferu, enantioselektivna redukcija halogeniranog acetofenona u (*S*)-kiralni alkohol pomoću liofiliziranog pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* najuspješnija je u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu BSuc30% u kojem je ostvareno iskorištenje od 70,31 % te enantiomerni višak u korist (*S*)-enantiomera od 50,47 %.
4. Potvrđena je prednost uporabe ispitivanih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (BEG10%, BSuc30% i ChCIEG10%) u proizvodnji (*S*)-halogeniranog kiralnog alkohola redukcijom halogeniranog acetofenona kataliziranom enzimima pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* obzirom da su konverzije supstrata u *S*-produkt rezultirale većim postotkom nego u puferu.

5. Niskotemperaturna euteksička otapala mogu utjecati na vijabilnost stanica u kulturi s obzirom na svoju pH-vrijednost. Ne uzrokuju direktno umiranje stanica, ali mogu inhibirati njihov rast narušavajući im staničnu membranu ili denaturaciju enzima unutar stanica.

6. LITERATURA

- Abdelraheem, E., M., M., Busch, H., Hanefeld, U., Tonin, F. (2019) Biocatalysis Explained: From Pharmaceutical to Bulk Chemical Production. *React. Chem. Eng.*, **4**, 1878-1894.
- Berg, J., M., Tymoczko, J., L., Stryer, L. (2013) Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, str. 205-241.
- Ashenhurst, J. (2020) Assigning Cahn-Ingold-Prelog (CIP) Priorities (2) – The Method of Dots. *Mater Organic Chemistry* <<https://www.masterorganicchemistry.com/2017/01/17/determining-rs-2-the-method-of-dots/>>. Pristupljeno 12. srpnja 2021.
- Carballeira, J., D., Fernandez-Lucas, J., Quezada, M., A., Hernaiz, M., J., Alcantara, A., R., Simeo, Y., Sinisterra, J., V. (2009) Biotransformations. Encyclopedia of Microbiology, 3. izd., Academic Press, Madrid, str. 212-251.
- Cvjetko-Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić-Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green Solvents for Green Technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **90**, 1631-1639.
- Cvjetko-Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić-Redovniković, I. (2016) Methods for Deep Eutectics Solvents Preparation. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **11**, 164-168.
- Gilliland, R., B. (1959) Determination of Yeast Viability. *J. Inst. Brew.* **65**, 424-428.
- Guo, X., Tang, J.-W., Yang, J.-T., Ni, G.-W., Zhang, F.-L., Chen, S.-X. (2017) Development of a Practical Enzymatic Process for Preparation of (S)-2-Chloro-1-(3,4-difluorophenyl)ethanol. *Org. Proc. Res. Dev.* **21**, 1595-1601.
- Gutierrez, A., Atilhan, M., Aparicio, S. (2018) A Theoretical Study on Lidocaine Solubility in Deep Eutectic Solvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 27464-27473.
- Jelinski, T., Przybyłek, M., Cysewski, P. (2019) Natural Deep Eutectic Solvents as Agents for Improving Solubility, Stability and Delivery of Curcumin. *Pharm. Res.* **36**, 116.
- Jukić, M., Đaković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Vorkapić-Furač, J. (2004) Green Chemistry Opens the Way for Clean, Ecologically Acceptable Chemical Processes, *KEM. Ind.*, **53**, 217-224
- Klamt, A., Eckert, F. (2000) COSMO-RS: A Novel and Efficient Method for the a priori Prediction of Thermophysical Data of Liquids. *Fluid Ph. Equilibria.* **122**, 43-72.
- Klamt, A., Jonas, V., Burger, T., Lohrenz, J.C.W. (1998) Refinement and parametrization of COSMO-RS. *J. Phys. Chem. A* **102**, 5074-5085.
- Kwolek, M., M., Zadrag, T., R. (2014) Comparison of Methods Used for Assessing the Viability and Vitality of Yeast Cells. *FEMS Yeast Research*, **14**, 1068-1079.

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

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 Sus. Chem. Eng.*, **2** (5) 1063-1071.

Palmelund, H., Andersson, M., P., Asgreen, C., J., Boyd, B., J., Rantanen, J., Lobmann, K. (2019) Tailor-made solvents for pharmaceutical use? Experimental and computational approach for determining solubility in deep eutectic solvents (DES). *Int. J. Pharm.* **1**, 2590-1567.

Panić, M., Delač, D., Roje, M., Radojčić-Redovniković, I., Cvjetko-Bubalo, M. (2019) Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives: *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. *Biotechnol. Lett.* **41**, 253-262.

Panić, M., Cvjetko-Bubalo, M., Radojčić-Redovniković, I. (2020) Designing a biocatalytic process involving deep autectic solvents, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **96**, 14-30.

Schauer, F., Borriss, R. (2004) Biocatalysis and Biotransformation, Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. Springer, Boston, MA, str. 237-306.

Sheldon, R., A., Brady, D. (2013) The Limits to Biocatalysis: Pushing the Envelope. *Chem. Commun.*, **00**, 1-3.

Sherman, F. (2002) Getting Started with Yeast. *Methods Enzymol.*, **350**, 3-41.

Silva, P., L., Fernandez, L., Conceicao, J., H., F., Rodrigues-Martins, M., A., Sosa, A., Ortega, J., Pinho, S., P., Coutinho, J., A., P. (2018) Design and Characterization of Sugar-Based Deep Eutectic Solvents Using COSMO-RS. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 1-30.

Stewart, G., G. (2014) *Saccharomyces cerevisiae*. Encyclopedia of Food Microbiology, 2. izd., Academic Press, Engleska, str. 309-315.

Tucker, J., L., Faul, M., M. (2016) Industrial Research: Drug Companies Must Adopt Green Chemistry. *Nature*, 534 (7605):27-9. doi: 10.1038/534027a.

Walaa, A., F., Abbas, I., H., Elwan, K., M., Swellum, M., A., El-DougDoug, Kh., A (2009) Biotransformation of Progesterone by Microbial Steroids. *J. appl. Sci. res*, **5**, 137-143.

Wang, Y., Ma, C., Liu, C., Lu, X., Feng, X., Ji, X. (2020) Thermodynamic Study of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents with Water and Methanol. *J. Chem. Eng.*, **65** (5), 2446-2457.

Weiß, N. (2020) OD600 Measurements: Tips for Implementation. Eppendorf Handling Solutions.

<<https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/photometry/applications/detailview-applications/news/od600-measurements-tips-for-implementation-1/>>. Pristupljeno 17.8.2021.

Vasić-Rački, Đ. (2006) History of Industrial Biotransformations – Dreams and Realities, 2. izd, Wiley Online Library, Zagreb, str. 1-36.

7. PRILOZI

7.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA

- B= betain
- CA= limunska kiselina
- ChCl= kolin klorid
- COSMO-RS (engl. Conductor-like Screening Model for Real Solvents)
- DES= niskotemperaturna eutektička otapala (engl. Deep Eutectic Solvents)
- EA= etil acetat
- EG= etilen glikol
- EPA= Američka agencija za zaštitu okoliša (engl. Environmental Protection Agency)
- GC-MS= plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom
- Glc= glukoza
- Gly= glicerol
- GRAS (engl. Generally Regarded As Safe)
- HBA= akceptor vodikove veze (engl. Hydrogen Bond Acceptor)
- HBD= donor vodikove veze (engl. Hydrogen Bond Donor)
- ILs= ionske tekućine (engl. *Ionic Liquids*)
- K₂HPO₄= kalijev hidrogenfosfat
- ln(γ)= logaritam koeficijenta aktivnostiž
- MA= malična kiselina
- NADES= prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo (*engl. Natural Deep Eutectic Solvents*)
- OD= optička gustoća (engl. Optical Density)
- OxA= oksalna kiselina
- R_t= retencijsko vrijeme
- Sor= sorboza
- Suc= saharoza
- Xyl= ksiloza
- YPD= kompletna kompleksna hranjiva podloga (engl. Yeast Peptone Dextrose)
- U= urea

IZJAVA O ODGOVORNOSTI

Izjavljujem pod moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ida Šimunčić