

Utjecaj eutektičkih otapala na aktivnost alkohol dehidrogenaze i stabilnost nikotinamidnih koenzima

Ivković, Romana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:159:561674>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Biotehnologija

Romana Ivković

7328/BT

Utjecaj eutektičkih otapala na aktivnost alkohol dehidrogenaze i stabilnost nikotinamidnih koenzima

Završni rad

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova (HRZZ, br. 7712)

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj eutektičkih otapala na aktivnost alkohol dehidrogenaze i stabilnost nikotinamidnih koenzima Romana Ivković, 0058209265

Sažetak: Gotovo svaki industrijski proces proizvodnje uključuje primjenu organskih otapala čija je uporaba odgovorna za onečišćenje okoliša te nepovoljna za zdravlje radnika i sigurnost procesa zbog svojstva toksičnosti, lake hlapljivosti, zapaljivosti i eksplozivnosti. Stoga, kako bi se ispunili zahtjevi zelene kemije za ekološkom prihvatljivošću i održivošću, traže se alternativna otapala. Eutektička otapala istaknula su se svojstvima poput niske hlapljivosti, netoksičnosti, nezapaljivosti, biorazgradivosti te jednostavnim metodama pripreme. Nadalje, u polju biokatalize dehidrogenaze pokazuju veliki potencijal za dobivanje visoko vrijednih kiralnih spojeva koji se koriste u proizvodnji optički čistih lijekova. Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida kao medija za reakcije redukcije katalizirane dehidrogenazama. U pripremljenim otapalima određena je aktivnost alkohol dehidrogenaze te promjene u konformaciji iste. U istim otapalima također je ispitana stabilnost pripadajućih koenzima NADH/NAD⁺. Blago lužnata prirodna eutektička otapala koja su sadržavala etilen-glikol i ureu pokazala su stabilizirajući utjecaj na oba koenzima, no niti u jednom otapalu alkohol dehidrogenaza nije pokazala zadovoljavajuću aktivnost uz značajne promjene u konformaciji u odnosu na pufer kao referentno otapalo.

Ključne riječi: biokatalizatori, dehidrogenaze, eutektička otapala, nikotinamidni koenzimi, zelena kemija

Rad sadrži: 39 stranica, 13 slika, 6 tablica, 30 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: dr.sc. Manuela Panić, asistent

Datum obrane: 15. rujan 2020

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnic Sciences
Scientific field: Biotechnology

Effects of deep eutectic solvents on alcohol dehydrogenase activity and stability of nicotinamide coenzymes
Romana Ivković, 0058209265

Abstract: Almost every industrial production process involves the use of organic solvents whose use is responsible for environmental pollution and unfavorable to workers' health and process safety, due to the properties of toxicity, volatility, flammability and explosiveness. Therefore, in order to meet the requirements of green chemistry for environmental safety and sustainability, alternative solvents are sought. Eutectic solvents stood out with properties such as low volatility, non-toxicity, non-flammability, biodegradability and simple preparation methods. Furthermore, in the field of biocatalysis, dehydrogenases show great potential for obtaining high-value chiral compounds used in the production of optically pure drugs. The aim of this study was to investigate the possibility of using natural eutectic solvents based on choline chloride as a medium for dehydrogenase-catalyzed reduction reactions. The activity of alcohol dehydrogenase and changes in its conformation were determined in the prepared solvents. The stability of the corresponding NADH/NAD⁺ coenzymes was also tested in the same solvents. Slightly alkaline natural eutectic solvents containing ethylene glycol and urea showed a stabilizing effect on both coenzymes, but in neither solvent did alcohol dehydrogenase show satisfactory activity with significant changes in conformation relative to buffer as reference solvent.

Keywords: biocatalysts, deep eutectic solvents, dehydrogenases, green chemistry, nicotinamide coenzyme

Thesis contains: 39 pages, 13 figures, 6 tables, 30 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant Professor

Technical support and assistance: PhD. Manuela Panić

Defence date: September 15th 2020

Sadržaj

1.UVOD.....	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.Zelena kemija.....	2
2.2.Zelena otapala.....	3
2.2.1.Superkritični fluidi.....	4
2.2.2.Ionske kapljevine.....	6
2.2.3.Eutektička otapala.....	7
2.3.Biokataliza u organskoj sintezi.....	10
2.3.1.Prednosti primjene enzima u organskoj sintezi.....	11
2.3.2.Biokatalizatori u organskoj sintezi.....	12
3.EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1.Materijali.....	17
3.1.1.Enzimski pripravak.....	17
3.1.2.Kemikalije.....	17
3.1.3.Priprema matičnih otopina i pufera.....	17
3.1.4.Oprema i uređaji.....	18
3.2.Metode.....	18
3.2.1.Sinteza eutektičkih otapala.....	18
3.2.2.Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze.....	19
3.2.3.Spektrofluorimetrijsko praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenaze.....	21
3.2.4. Spektrofotometrijsko praćenje stabilnosti koenzima NAD ⁺ i NADH..	21
4.REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1.Pripravljena prirodna eutektička otapala.....	23
4.2.Aktivnost alkohol dehidrogenaze.....	24
4.3.Promjene u konformaciji alkohol dehidrogenaze.....	25
4.4.Stabilnost koenzima NAD⁺ i NADH u prirodnim eutektičkim otapalima....	28
4.4.1.Stabilnost NADH.....	29
4.4.2.Stabilnost NAD ⁺	33

5.ZAKLJUČCI.....	36
6.LITERATURA.....	37

1. Uvod

Posljednjih nekoliko godina dolazi do porasta svijesti o globalnom zatopljenju, utjecaju stakleničkih plinova i onečišćenju okoliša zbog čega koncept održivog razvoja i principi zelene kemije postaju središte političkih, gospodarskih i znanstvenih rasprava. Glavni ciljevi zelene kemije su smanjenje količine nastalog otpada uz maksimalno iskorištenje sirovine, povećanje sigurnosti radnika i okoliša, korištenje neopasnih i obnovljivih sirovina te proizvodnja netoksičnih produkata uz što manju količinu nusproizvoda (Anastas i Eghbali, 2009).

Gotovo svaki industrijski proces proizvodnje uključuje primjenu organskih otapala u nekom koraku. Međutim njihova uporaba je odgovorna za onečišćenje okoliša i nepovoljna je za zdravlje radnika i sigurnost procesa zbog svojstva toksičnosti, lake hlapljivosti, zapaljivosti i eksplozivnosti. Niz nedostataka konvencionalnih otapala potaknula su znanstvenu potragu za alternativnim otapalima koja bi ispunila principe zelene kemije uz istodobno zadovoljenje ekonomske dobiti. Najveći potencijal među zelenim otapalima pokazala su prirodna eutektička otapala zahvaljujući niskoj cijeni, lakoj dostupnosti, jednostavnoj sintezi, niskoj toksičnosti i hlapljivosti, stabilnosti i biorazgradivosti (Paiva i sur., 2014). Struktura ovih otapala omogućuje dizajniranje otapala točno određenih fizikalno-kemijskih svojstava i biološke aktivnosti zbog čega predstavljaju velik potencijal za primjenu u elektrokemiji, biomedicini, proizvodnji polimera, raznim analizama, postupcima separacije i ekstrakcije biološki aktivnih spojeva te kao katalitički i reakcijski medij u organskoj sintezi i biokatalizi za dobivanje visokovrijednih i optički čistih proizvoda (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Pored korištenja ekološki prihvatljivih zelenih otapala, jedno od vodećih polja zelene kemije je i provođenje pretvorbe organskih spojeva primjenom biokatalizatora, odnosno enzima ili cijelih stanica. Zbog prednosti poput visoke enantioselektivnosti biokatalizatora, biorazgradivosti, mogućnosti izolacije biokatalizatora iz prirodnih izvora i njegove reciklacije, sintetski putevi temeljeni na enzimskoj katalizi često su superiorni u usporedbi s klasičnim kemijskim sintetskim postupcima, što se posebno odnosi na proizvodnju kiralnih spojeva koji se koriste kao međuprodukti u proizvodnji lijekova (Grogan, 2009; Drauz i sur., 2012).

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida u oksidoredukcijskim reakcijama ispitivanjem aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze i praćenjem promjena u njegovoj konformaciji te istražiti stabilnost ovom enzimu pripadajućih koenzima NADH i NAD⁺ u istim prirodnim eutektičkim otapalima.

2. Teorijski dio

2.1. Zelena kemija

U današnje vrijeme svjedoci smo sve većem ekonomskom rastu koji predstavlja prijetnju okolišu, ljudskom zdravlju i kvaliteti života, zbog čega se sve više znanstvenika okreće istraživanjima iz polja zelene kemije i kemijskim inovacijama koja istodobno nude ispunjavanje okolišnih, socijalnih i ekonomskih ciljeva. Pojam zelena kemija prvi se puta pojavio unatrag 30 godina, a definiran je kao skup načela koji smanjuju ili eliminiraju upotrebu ili proizvodnju tvari opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš prilikom osmišljavanja, proizvodnje i primjene kemijskih proizvoda (Anastas i Eghbali, 2009). Uzimajući u obzir da samo farmaceutska industrija proizvodi otprilike 25-100 kg otpada na svaki kilogram proizvoda nastalog organskom sintezom (Gupta i Mahajan, 2015), važno je okrenuti se „zelenijim“ načinima proizvodnje, korištenja i zbrinjavanja kemikalija. Pristup zelene kemije temelji se na razvoju kemijskih proizvoda i procesa koji su učinkovitiji sa ekološkog stajališta u odnosu na postojeće tradicionalne procese proizvodnje, izbjegavanju korištenja opasnih tvari kao sirovina, reagensa, otapala, produkta i nusprodukta te smanjenju otpada nastalog prilikom proizvodnje kemikalija (Hjersen i sur., 2000). Suština zelene kemije obuhvaćena je u 12 načela koja predstavljaju vodeći okvir za dizajn novih kemijskih proizvoda i procesa te se dotiču svih aspekata životnog ciklusa procesa od korištenja sirovina i reagensa do učinkovitosti i sigurnosti transformacija, toksičnosti i biorazgradivosti proizvoda (Anastas i Eghbali, 2009), a to su:

- 1.) **Prevenција** – bolje je spriječiti nastanak otpada nego ga sanirati nakon što je nastao,
- 2.) **Ekonomija atoma (eng. Atom economy)** – proces sinteze treba osmisliti tako da je u konačni proizvod uključena maksimalna količina ulazne sirovine,
- 3.) **Sigurniji proces sinteze** - postupak sinteze treba dizajnirati s ciljem smanjene upotrebe spojeva štetnih za ljudsko zdravlje i okoliš,
- 4.) **Sigurniji kemijski proizvodi** – kemijske proizvode treba osmisliti da budu manje toksični, ali jednako učinkoviti,
- 5.) **Sigurnija pomoćna sredstva** – upotrebu pomoćnih sredstva treba svesti na minimum i kad god je moguće koristiti ona neškodljiva,
- 6.) **Energetska učinkovitost** – energetske zahtjeve treba svesti na minimum te ako je moguće sintetske procese voditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku,

- 7.) **Obnovljive sirovine** – obnovljive sirovine treba upotrebljavati gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo,
- 8.) **Minimizacija proširenja procesa** – nepotrebna proširenja procesa treba izbjegavati kako bi se smanjila dodatna upotreba reagensa i stvaranje otpada,
- 9.) **Kataliza** – katalitički reagensi, selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama,
- 10.) **Biorazgradivost proizvoda** – kemijski proizvodi moraju imati mogućnost pretvorbe u spojeve neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja,
- 11.) **Analitičke metode** – potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog proizvodnog procesa s ciljem sprečavanja nastanka opasnih tvari,
- 12.) **Sigurniji uvjeti rada** – potrebno je smanjiti upotrebu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (toksičnost, eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

Iako je prilikom osmišljavanja „zelenog“ procesa nemoguće ispuniti svih 12 načela, njihovom primjenom moguće je postići značajne rezultate u smanjenju otpada i očuvanju energije. Tvrtka Pfizer tako je za proizvodnju pregamalina, lijeka koji se koristi u liječenju poremećaja živčanog sustava, zamjenom kemijskog procesa biokatalitičkim procesom uspjela smanjiti E-faktor s početnih 86 na 17, uveliko umanjiti energetske potrošnje te eliminirati uporabu više od 37 milijuna litara štetnih organskih otapala i približno 2000 tona sirovina na razini godišnje proizvodnje (Gupta i Mahajan, 2015). Istraživanja iz polja zelene kemije stoga svakako zavređuju pozornost znanstvenog svijeta.

2.2. Zelena otapala

Jedno od vodećih polja razvoja zelene kemije odnosi se na osmišljavanje i sintezu otapala koja zadovoljavaju kriterije ekološke prihvatljivosti, ekonomske učinkovitosti te sigurnosti za ljude i okoliš. Mnoga tradicionalna otapala su hlapljiva, lako zapaljiva, korozivna, eksplozivna i toksična te imaju citotoksičan i inhibicijski učinak na biokatalizator (Ghanem, 2007). Otapala imaju veliki utjecaj na ljude i okoliš jer se u velikim količinama upotrebljavaju u brojnim industrijskim procesima te čine 60 % svih industrijskih emisija i 30 % emisija hlapljivih organskih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Organska otapala koriste se u raznim reakcijama, sintezama te procesima izdvajanja proizvoda te doprinose zagađenju vode, zraka i zemlje. Unatoč svojoj štetnosti i opasnosti koju predstavljaju za okoliš i ljudsko zdravlje nemoguće je u potpunosti eliminirati njihovo korištenje zbog presudne uloge koju imaju pri

otapanju krutih tvari, prijenosu tvari i topline, utjecaju na viskoznost te u fazama izdvajanja i pročišćavanja (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Namjera da se smanji njihova upotreba i pronađu alternativna rješenja vidljiva je i u odredbama EU koje se tiču zaštite okoliša za period 2010. – 2050. godine u kojima se redukcija štetnih otapala navodi kao jedan od prioriteta borbe za očuvanjem okoliša, a strategije za provedbu toga cilja su zamjena opasnih otapala i otapala dobivenih iz nafte s otapalima zadovoljavajućih ekoloških, zdravstvenih i sigurnosnih karakteristika i otapalima dobivenih iz obnovljivih sirovina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Idealno otapalo trebalo bi biti jednostavno za upotrebu, kemijski i fizički stabilno, slabo hlapljivo, netoksično, nezapaljivo, biorazgradivo, lako za skladištiti, te imati mogućnost ponovne upotrebe (Gu and Jérôme, 2013). S obzirom na navedene kriterije voda je prvi izbor jer osim što je jeftina i lako dostupna u njoj enzimi imaju najveću katalitičku aktivnost te nije zapaljiva niti toksična, no nije prikladna za reakcije koje uključuju nepolarne organske spojeve koji su u vodi većinom slabo topljivi. Nedostatak je i složeno i skupo uklanjanje vode nakon provedbe reakcije, a u sporednim reakcijama koje se odvijaju u vodi nastaju i neželjeni produkti što dodatno otežava izolaciju i pročišćavanje željenog produkta (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). S obzirom na nedostatke koje pokazuju voda i organska otapala razvila se potreba za pronalaskom novih alternativnih otapala koja se u skladu s principima zelene kemije temelje na sigurnosti radnika, očuvanju okoliša i održivosti procesa. Tako su posljednjih godina kao zamjena za konvencionalna otapala sve popularnija tzv. zelena otapala pod koja ubrajamo superkritične i subkritične fluide, ionske tekućine i eutektička otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.2.1. Superkritični fluidi

Superkritični fluidi definiraju se kao fluidi zagrijani iznad kritične točke temperature i komprimirani iznad kritične točke tlaka što im daje svojstva na granici tekućina i plinova. Zbog posebnih karakteristika poput niske viskoznosti i površinske napetosti, te visoke difuznosti koja pospješuje ekstrakciju prirodnih komponenti pokazuju se kao ekološki prihvatljiva i ekonomski učinkovita alternativa konvencionalnim otapalima. Glavni nedostatak pri uporabi supekritičnih fluida je potreba za skupom opremom specijaliziranom da podnosi visoke tlakove, što podiže troškove proizvodnje. Najvažniji predstavnici ove skupine su superkritični ugljikov dioksid (CO_2) te superkritična i subkritična voda.

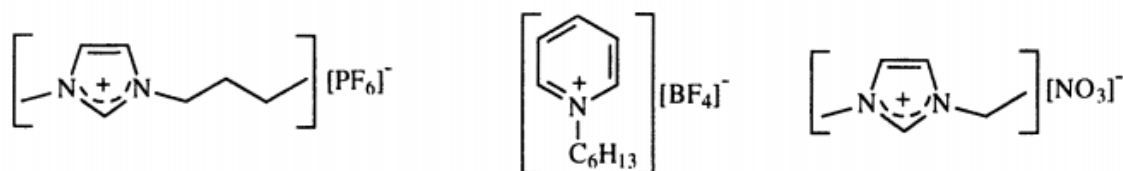
Supekritično stanje CO_2 moguće je postići vrlo lako zahvaljujući niskim kritičnim vrijednostima temperature i tlaka ($T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_c = 7,38 \text{ MPa}$) koje za to iziskuje zbog čega se najčešće primjenjuje za ekstrakcije, a budući je netoksičan, nezapaljiv, jeftin, lako

dostupan te ga je jednostavno izdvojiti iz proizvoda, superkritični CO₂ često se koristi i kao zamjena za toksične freone i organska otapala. Veličina i oblik molekule CO₂ omogućuju mu da brže difundira od konvencionalnih tekućih otapala, a kada se koristi u postupcima ekstrakcije ne dovodi do nastajanja sekundarnih produkata koji zagađuju okoliš. Nedostatak primjene superkritičnog CO₂ je što prilikom upotrebe dolazi do stvaranja ugljične kiseline koja uzrokuje promjenu pH vrijednosti što za posljedicu može imati denaturaciju i inaktivaciju enzima. Učinkovitost kao otapalo pokazuje za nepolarne i blago polarne molekule no nije pogodan za proteine, polisaharide, šećere i mineralne soli koji su u njemu netopljivi. Moć otapanja opada povećanjem molekularne mase tvari što ga također čini lošim otapalom za molekule veće molekulske mase. Superkritični CO₂ ima GRAS (eng. *Generally recognized as safe*) status te ne predstavlja prijetnju ljudskom zdravlju, a između ostalog nalazi primjenu u prehrambenoj industriji, kozmetici, farmaceutskoj industriji i obradi materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Voda je najvažnije otapalo u prirodi te je zbog svojih karakteristika (netoksična, nezapaljiva, ekološki prihvatljiva, lako dostupna, jeftina) favorizirana kao otapalo u brojnim kemijskim postupcima i reakcijama. Kao izrazito polarna molekula voda predstavlja nepogodno otapalo za ekstrakcije slabo polarnih i nepolarnih spojeva, no takav problem je moguće riješiti povećanjem temperature i tlaka vode. Iznad 374,2 °C i 22,1 MPa voda postiže superkritično stanje, dok se pri dovoljno visokom tlaku i vrijednosti temperature između točke vrelišta (100 °C) i kritične točke voda nalazi u subkritičnom stanju. Za razliku od vode pri standardnim uvjetima, super- i sub- kritična stanja bitno mjenjaju elektrokemijska svojstva vode čineći ju pogodnim otapalom za neionske spojeve. U superkritičnom i subkritičnom stanju voda pokazuje manju viskoznost, veću difuznost i značajno nižu dielektričnu konstantu zbog čega postaje vrlo uspješno otapalo za slabije polarne i nepolarne spojeve odnosno ponaša se kao nepolarno otapalo s visokom topljivošću za organske spojeve, plinove i soli. Subkritična voda već se pokazala učinkovitom u ekstrakciji antioksidansa, antocijana, fenola, aromatičnih spojeva, esencijalnih ulja i ostalih bioaktivnih sastojaka uz daleko kraće vrijeme ekstrakcije. Pri nižim temperaturama ostvaruje ekstrakciju polarnih komponenti, a pri višim temperaturama slabije polarnih i nepolarnih komponenti zbog čega uspjeva zamjeniti veći broj toksičnih otapala koja se redovno koriste za selektivnu ekstrakciju. Glavni nedostatak predstavlja činjenica da voda u superkritičnom stanju stvara izrazito reaktivne uvjete koji pogoduju reakcijama oksidacije, hidrolize i raspadanja spojeva što limitira njenu upotrebu za ekstrakciju samo vrlo stabilnih spojeva (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.2.2. Ionske kapljevine

Ionske su kapljevine organske soli koje se sastoje isključivo od iona, a nalaze se u tekućem stanju oko i ispod 100 °C, od kojih su od najvećeg interesa upravo one tekuće pri sobnoj temperaturi (Rogers i Seddon, 2003). Primjeri takvih ionskih kapljevina prikazani su na slici 1. Sastavljene od samo 2 komponente, aniona i kationa, ionske kapljevine predstavljaju novu klasu prilagodljivih otapala koja pokazuju jedinstvenu kombinaciju svojstava. Kao jedna od karakteristika koje ih čine zanimljivima s ekološkog ali i tehnološkog aspekta izdvaja se vrlo nizak i praktički zanemariv tlak para zbog kojeg su ionske kapljevine nehalapljive i ne pridonose zagađenju atmosfere niti predstavljaju opasnost pri njihovom izlaganju (Rauber i sur., 2019). Osim toga ionske su kapljevine nezapaljive, bezbojne, pokazuju vrlo dobru vodljivost, toplinski, kemijski i elektrokemijski su stabilne, tekuće su u širokom temperaturnom rasponu (često veći od 300 – 400 °C) te daju mogućnost ponovne upotrebe (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Iako im fizikalna svojstva ovise o veličini i simetriji iona, prisutnosti dugih alkilnih supstituenata u ionima, nukleofilnosti aniona te sposobnosti iona za stvaranje vodikovih veza, ionske tekućine su u pravilu viskoznije od konvencionalnih organskih otapala te imaju veću gustoću i manju površinsku napetost od vode (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Zbog prilagodljivosti i dvostruke organske i ionske prirode, ionske tekućine su istovremeno snažna otapala za širok raspon organskih, anorganskih i polimernih spojeva, a zahvaljujući ionskim interakcijama su ujedno i vrlo dobra otapala za polarne spojeve koji su teško topljivi u uobičajenim otapalima (Rauber i sur., 2019). Ono što ionske kapljevine čini posebno zanimljivima i široko primjenjivima jest njihova prilagodljivost željenim svojstvima ili funkcijama izborom kationa i aniona, vezanjem funkcijskih skupina itd. Zbog velikog broja kombinacija kationa i aniona ionske se tekućine ponekad nazivaju „dizajnerskim otapalima“, a procjenjuje se da postoji gotovo 10^{18} dostupnih ionskih tekućina dok je za usporedbu samo 600 molekularnih otapala u današnjoj uporabi (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).



Slika 1. Primjeri jednostavnih ionskih kapljevina koje su tekuće na sobnoj temperaturi (Earle i Seddon, 2002).

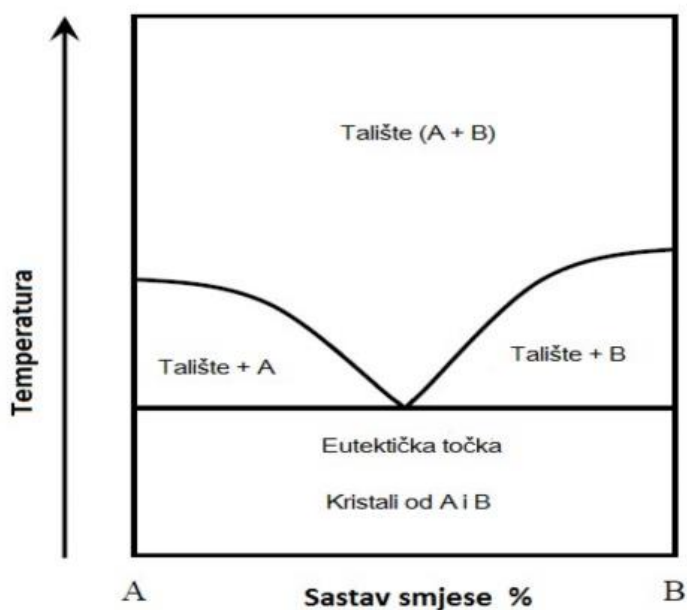
Tvore ih kationi koji mogu biti različito supstituirane organske molekule koje sadrže pozitivno nabijen dušikov, fosforov ili sumporov atom u kombinaciji s organskim ili anorganskim anionima. Do sada su najistraženiji kationi imidazolni, pridinijevi, amonijevi, fosforni i pirolidinijevi derivati, koji se najčešće koriste u kombinaciji s anorganskim anionima kao što su halogenidi, tetrafluoroborat $[BF_4]^-$, heksafluorofosfat $[PF_6]^-$ ili organskim anionima poput alkilsulfata i alkilsulfonata (Kärkkäinen, 2007). Struktura ionskih kapljevina također može biti kiralna ili sadržavati funkcijsku skupinu koja im daje dodatna posebna svojstva kao što je primjerice indukcija veće katalitičke aktivnosti i termostabilnosti enzima (Jia i sur., 2014). S razvojem širokog spektra strukturno različitih ionskih tekućina proširio se i interes za istraživanja s ciljem primjene u područjima kemijske tehnologije, biotehnologije, procesne tehnologije, analitike i farmaceutike (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Jednu od najuspješnijih primjena u industriji pokazala je tvrtka BASF koja je inkorporirala uporabu ionskih tekućina u tzv. BASIL procesu koristeći *N*-alkilimidazol za *in situ* uklanjanje kiseline iz smjese čime je prinos procesa povećan s 50 % na 98 %, a produktivnost s 8 na 690 000 kg m⁻³ h⁻¹. Ovim unaprijeđenim načinom separacije zadovoljeno je nekoliko kriterija zelene kemije kao što je eliminacija upotrebe otapala, smanjenje utroška energije i kemikalija, smanjenje količine nastalog otpada, primjena katalizatora i povećana sigurnost cjelokupnog procesa (Rauber i sur., 2019). No iako posjeduju zavidna svojstva te su se pokazale uspješne u mnogim primjerima, ionske kapljevine još uvijek nisu našle širu komercijalnu primjenu. Razlog tomu je niz parametara koji ne ispunjavaju načela zelene kemije kao što su slaba biokompatibilnost, toksičnost, visoka cijena sirovina i velika potrošnja energije potrebne za pripravu (ovisno o kompleksnosti strukture 5 – 20 puta skuplje od tradicionalnih organskih otapala), korištenje neobnovljivih sirovina i hlapljivih organskih otapala prilikom sinteze te problem razgradnje i odlaganja ionskih tekućina nakon provođenja procesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Zbog navedenih nedostataka razvoj alternativnih otapala posljednjih se godina usmjerio na prirodne ionske kapljevine i eutektička otapala koja su pokazala najveći potencijal u aspektu zelene kemije (Paiva i sur., 2014).

2.2.3. Eutektička otapala

Eutektična otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents, DES*) smatraju se novom generacijom zelenih otapala. Već 2003. godine Abbott i sur. ističu brojne prednosti pripreme eutektičkih otopina uree i raznih kvarternih amonijevih soli, kao što su stabilnost otopine, biorazgradivost te mogućnost prilagodbe otapala različitim primjenama (Abbott i sur., 2003), a od tada nadalje broj radova vezanih uz njihovu fizikalno-kemijsku karakterizaciju

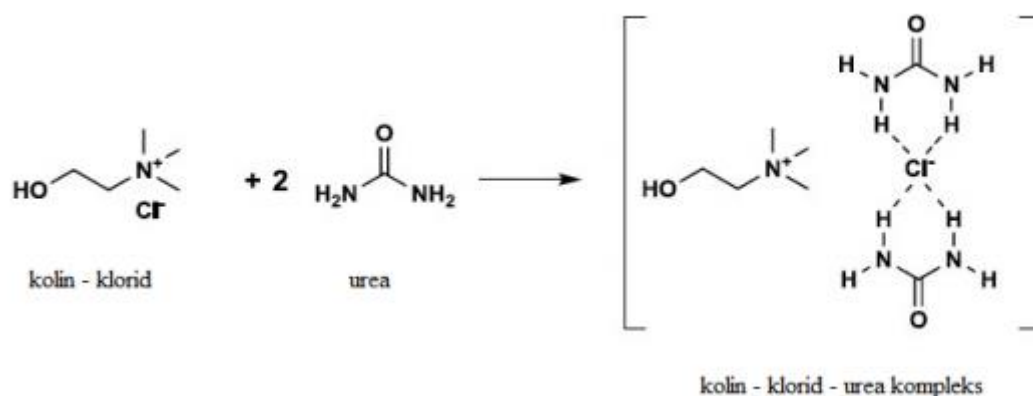
eksponencijalno se povećava, a mogućnost njihove primjene neprestano se širi (Paiva i sur., 2014).

Eutektička otapala općenito se temelje na mješavinama dobivenim kompleksiranjem između akceptora vodika, poput netoksične kvarterne amonijeve soli (npr. kolin-klorid) i donora vodikove veze (npr. amini, šećeri, alkoholi i karboksilne kiseline) koji u određenom molarnom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Cvjetko Bubalo i sur., 2015) (slika 2). Razlog tome je mjestimična delokalizacija naboja koju uzrokuju novonastale vodikove veze.



Slika 2. Fazni dijagram binarne smjese (Zhang i sur., 2012).

Iako se zbog sličnih fizikalno-kemijskih svojstava (nehalpljivost, nezapaljivost, visoka viskoznost, slični polazni materijali) često nazivaju 4-tom generacijom ionskih kapljevina i većina spojeva koji ih tvore su ionske prirode, eutektička se otapala ipak ne mogu u potpunosti smatrati ionskim spojevima budući se mogu pripremiti i iz neionskih spojeva (Zhang i sur., 2012). Primjer jednostavne eutektičke smjese je kombinacija dvije čiste krutine kao što su urea (temperatura taljenja = 133 °C) i kolin-klorid (temperatura taljenja = 302 °C) koji u molarnom omjeru 2:1 kao rezultat daju tekuću smjesu čija je temperatura taljenja 15 °C (Kudlak i sur., 2015) (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz reakcije nastajanja eutektičkog otapala $\text{ChCl}:\text{urea}$ (molarni omjer komponenata 1:2) (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

U pripravi eutektičkih otapala često se koristi kolin-klorid, organska sol, koja se kombinira s jeftinim i lako dostupnim donorima vodika poput uree, glicerola, poliola iz ugljikohidrata ili karboksilnih kiselina dobivenih iz različitih izvora. Kolin-klorid je vrlo lako dostupna kvarterna amonijeva sol koja se može ekstrahirati iz biomase ili sintetizirati iz fosilnih goriva, a zbog slabe toksičnosti i niske cijene zadovoljava karakteristike ekonomičnosti i biorazgradivosti (Cvjetko Bubalo i sur., 2016; Kudlak i sur., 2015). Kada su komponente koje izgrađuju eutektičko otapalo prirodni spojevi, naročito primarni metaboliti poput organskih kiselina, aminokiselina i šećera takva se otapala nazivaju prirodnim eutektičkim otapalima (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*) (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Zahtjevi koje većinom ispunjavaju sastojci tih smjesa su laka dostupnost, niska cijena, niska toksičnost te sigurnost pri rukovanju. Glavna prednost eutektičkih otapala u usporedbi s ionskim kapljevinama je jednostavnija i ekonomičnija priprava koja se može izvesti na više načina: 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 zagrijavaju do unaprijed određene vrijednosti temperature (Paiva i sur., 2014). Bitno je spomenuti da na formiranje i stabilnost eutektičkog otapala znatno utječe kemijska struktura donora i akceptora vodika, prostorni raspored skupina unutar molekule te različiti omjeri komponenata (Dai i sur., 2013). Pritom se pojam stabilnosti odnosi na mogućnost pripremljenih otapala da ostanu u tekućoj fazi dulje vrijeme bez nastanka kristalnog taloga. Najčešća metoda pripreme je miješanje točno određene mase komponenata sa ili bez dodatka vode koja se zatim zagrijava uz miješanje na temperaturi do 100 °C tijekom 30 do 240 minuta do formiranja bistre tekućine. Neki od novijih načina pripreme temelje se na primjeni vakuum uparivanja,

liofilizacije te ultrazvuka i/ili mikrovalnog zračenja. Jedan takav primjer je priprava eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza, u molarnom omjeru 1:1 s 10 % vode (w/w) u ultrazvučno – mikrovalnom reaktoru kojim je sintezu otapala dokazano moguće ubrzati i do 7 puta u odnosu na klasičnu metodu priprave (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

U usporedbi s ionskim kapljevinama eutektična su otapala biorazgradiva, stabilnija, nisu hlapljiva, manje su toksična prema okolišu i ljudima te je njihova upotreba u proizvodnji moguća bez dodatnog pročišćavanja. Pored toga cijena ovih otapala ne razlikuje se mnogo od cijene organskih otapala što ih čini zanimljivima i sa ekonomske točke gledišta (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). S obzirom da su eutektička otapala smjese dviju komponenti te prilikom priprave ne dolazi do kemijske reakcije, prinos i učinkovitost na razini atoma su 100 % što znači da tijekom proizvodnje ne dolazi do stvaranja otpada niti neželjenih nusprodukata (Paiva i sur., 2014). Još jedna prednost eutektičkih otapala je što velik broj različitih kemijskih struktura i mogućih kombinacija donora i akceptora vodika omogućuje dizajniranje otapala točno određenih fizikalno-kemijskih svojstava i biološke aktivnosti za željenu primjenu zbog čega se i ona, kao i ionske kapljevine, ponekad nazivaju „dizajnerskim otapalima“ (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Obzirom na sve ranije navedene pozitivne karakteristike, a osobito zbog mogućnosti dizajniranja otapala za određenu svrhu, eutektička otapala našla su široku primjenu u različitim industrijskim procesima. Znanstvena istraživanja eutektičkih otapala najviše se provode u područjima kemije, fizike, elektrokemije i znanosti o materijalima, a poznata je njihova uporaba u obradi metala, elektrokemiji, ekstrakciji glicerola iz biodizela te kao katalitički i reakcijski medij (Kudlak i sur., 2015). Nadalje eutektička pokazuju potencijal kao otapala u organskoj sintezi i (bio)katalizi, proizvodnji polimera, postupcima odvajanja, analizama, ekstrakciji biološki aktivnih spojeva te biomedicinskim primjenama (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.3. Biokataliza u organskoj sintezi

Već u ranim vremenima industrijske biotehnologije razvila se ideja upotrebe bioloških sustava za stvaranje učinkovitijih, selektivnijih i ekološki prihvatljivijih procesa pretvaranja sirovina u industrijske proizvode, zamjenjujući tako problematične kemijske transformacije (Ghisalpa i sur., 2010). 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). Biotransformacije su postupci pretvorbe definiranih čistih spojeva (prirodnih ili dobivenih kemijskom sintezom) u definirane konačne proizvode u jednom ili nizu koraka,

upotrebom cijelih stanica ili izoliranih enzima kao biokatalizatora (Bommarius i Riebel, 2004). Za sintezu kemikalija, lijekova ili različitih materijala u velikom mjerilu mogu se, osim biotransformacija, koristiti i isključivo kemijski procesi ili kombinacija kemijskih i biokatalitičkih procesa, pri čemu se biokatalitički procesi koriste za ključne reakcije koje zahtijevaju visoku selektivnost, specifičnost ili kao zamjena ekološki nepovoljnih reakcijskih koraka (Ghisalba i sur., 2010). Implementacijom biokatalitičkih metoda u proizvodnji organskih spojeva moguće je u velikoj mjeri zadovoljiti principe zelene kemije budući se primjenom biokatalize skraćuje vrijeme trajanja procesa, povećava se selektivnost i prinos, smanjuje se potrošnja metala i organskih otapala, nastaje manje otpada te se smanjuje potrošnja energije zahvaljujući blagim reakcijskim uvjetima (Bommarius i Riebel, 2004). Primjena biotransformacija u industriji je u zadnjih dvadeset godina značajno porasla, a neki od proizvoda koji se proizvode u velikom mjerilu su akrilamid, aspartam, nikotinamid, vitamin C, lizin, citratna kiselina i L-karnitin (Ghisalba, 2010). Glavne prednosti primjene biokatalizatora nad klasičnom kemijskom sintezom su visoka enantioselektivnost biokatalizatora, biorazgradivost, mogućnost izolacije biokatalizatora iz prirodnih izvora i njegove reciklacije te mogućnost modifikacije enzima za željenu primjenu. Kako bi se omogućila visoka produktivnost te zadovoljili ekonomski i ekološki zahtjevi nekog postupka, ključno je odabrati prikladno otapalo i biokatalizator koji može biti čista kultura mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni, alge), kulture biljnih i životinjskih stanica ili izolirani i umjetni enzimi (Grogan, 2009).

2.3.1. Prednosti primjene enzima u organskoj sintezi

Biokataliza je ključna disciplina u kemiji koja omogućuje čiste i ekonomski efikasne procese te predstavlja veliki potencijal temeljen na jedinstvenim svojstvima enzima, no do posljednjih nekoliko desetljeća nije dobivala značajniju pažnju u području organske sinteze zbog uočenih nedostataka enzima kao što je uzak raspon supstrata, ograničena stabilnost enzima u organskim reakcijskim uvjetima, niska učinkovitost kod sojeva mikroorganizama divljeg tipa, nezadovoljavajuća volumetrijska produktivnost te visoki troškovi proizvodnje (Strohmeier i sur., 2011; Drauz i sur., 2012). Uvođenje tehnologije rekombinantne DNA krajem 1980-tih te razvoj enzimskog inženjerstva olakšalo je pristup enzimima i njihovo prepoznavanje te omogućilo premošćivanje ograničenja za sintetsku primjenu enzima (Strohmeier i sur., 2011). Glavne prednosti, ali i nedostaci primjene enzima prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci enzima kao katalizatora (Bommarius i Riebel, 2004).

Prednosti	Nedostaci
Visoka enantioselektivnost	Niska specifična aktivnost
Visoka regioselektivnost	Nestabilni pri ekstremnim T i pH
Blagi reakcijski uvjeti	Dostupni samo za određene reakcije
Voda kao često otapalo	Dugo vrijeme razvoja novih enzima

Uporaba enzima kao katalizatora u reakcijama organske sinteze tehnologija je koja je danas u velikoj mjeri prepoznata u pripremi širokog spektra kemijskih spojeva, ne samo za akademske svrhe već i za primjenu u industrijskim razmjerima. Za brojne molekule pokazalo se da su sintetski putevi temeljeni na enzimskoj katalizi konkurentni i često superiorni u usporedbi s klasičnim kemijskim i kemokatalitičkim sintetskim pristupima, što se posebno odnosi na proizvodnju kiralnih spojeva koji se koriste kao međuprodukti u proizvodnji lijekova. Uz pomoć enzima moguće je katalizirati širok raspon transformacija važnih u organskoj kemiji, uključujući redoks reakcije, reakcije stvaranja veze ugljik-ugljik i hidrolitičke reakcije. Stoga, nije neobično da je enzimska kataliza postala sve atraktivnije sintetičko sredstvo pored tradicionalnih organskih disciplina kao što su klasična sinteza, metalna kataliza i organokataliza (Drauz i sur., 2012).

2.3.2. Biokatalizatori u organskoj sintezi

Enzimi su vrlo djelotvorni katalizatori, a za procese biokatalize mogu se koristiti u obliku cijelih stanica ili u izoliranom obliku. Najveće prednosti upotrebe izoliranih enzima su veća produktivnost i provođenje reakcije u blagim uvjetima što omogućuje izbjegavanje neželjenih nusreakcija i dobivanje čistog proizvoda (Grogan, 2009). Međutim, izolacija i pročišćavanje unutarstaničnih enzima može biti zahtjevno i skupo zbog čega su cijene enzima visoke, a broj komercijalno dostupnih enzima je mali. Enzimi imaju najveću katalitičku aktivnost u vodi koja je najmanje pogodno otapalo za većinu organskih reakcija, podložni su inhibiciji supstratom ili produktom te im je potrebno prilagoditi procesne parametre poput temperature i pH vrijednosti (Bommarius i Riebel, 2004). Izolacijom enzima iz stanice koja je njihovo prirodno okruženje, riskira se gubitak stabilnosti enzima te njegova denaturacija. Osim toga, veliki broj izoliranih enzima za katalitičku aktivnost zahtjeva dodatak kofaktora koji se nakon reakcije moraju regenerirati što nije uvijek lako izvedivo (Grogan, 2009). Prednosti upotrebe cijelih stanica kao biokatalizatora su jeftina i jednostavna upotreba, olakšano izdvajanje biokatalizatora i produkta iz reakcijske smjese te vođenje procesa u

vodenom mediju. Budući su stanice složeni sustavi nema potrebe za korištenjem enzimskih kofaktora (skupi i krhki) jer se isti većinom proizvode i recikliraju u samoj stanici (Grogan, 2009). Imobilizirane kulture se primjenjuju kod potrebe aktivnosti biokatalizatora kroz dulji vremenski period, te njihove ponovne upotrebe. Međutim, nedostaci upotrebe cijelih stanica kao biokatalizatora su difuzija supstrata i produkta kroz staničnu membranu, niža produktivnost zbog neotpornosti na veće koncentracije supstrata, teža kontrola procesa i odvijanje neželjenih sporednih reakcija zbog prisutnosti drugih enzima. Također, procesi s cijelim stanicama često su kompleksni i zahtjevaju pravilno rukovanje sa stanicama u smislu pripreme odgovarajućih hranjivih podloga, optimiranja uvjeta rasta i sl. (Faber, 2011). Biokatalizatori u obliku cijelih stanica mogu biti mikrobnog, biljnog ili životinjskog podrijetla.

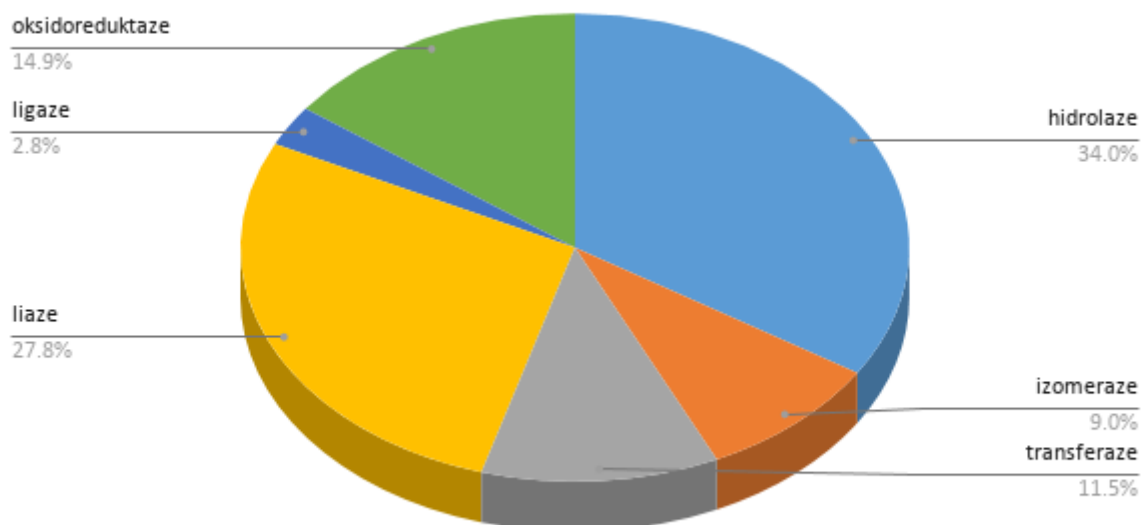
Mikrobne stanice se češće koriste kao biokatalizatori u odnosu na biljne i životinjske stanice jer se brže i jednostavnije uzgajaju u laboratorijskim uvjetima, brže provode biotransformacije zbog velike brzine staničnog metabolizma te mogu transformirati širok spektar proizvoda. Koriste se isključivo kao čiste kulture radi smanjene mogućnosti odvijanja neželjenih reakcija i nepovoljnih učinaka jedne kulture na drugu (Bommarius i Riebel, 2004). Biljne i životinjske stanice se u biotransformacijskim procesima upotrebljavaju u manjoj mjeri od mikroorganizama prvenstveno jer rastu sporije. Ono što biljne stanice čini zanimljivima je što mogu katalizirati velik broj supstrata, a same su izvori velikog broja vrijednih spojeva poput antibiotika, antitumorskih spojeva, flavonoida i sl., koji su od izuzetne važnosti u farmaceutskoj industriji. Jedna od mogućnosti nadilaženja problema sporog rasta koja obećaje jest eksploatacija biljnih ili životinjskih enzima tehnikom rekombinantne DNA u bakterije ili kvasce (Grogan, 2009).

Enzimi se obično klasificiraju prema vrstama reakcija koje kataliziraju te su podijeljeni i razvrstani u sedam glavnih enzimskih kategorija. Pregled ove klasifikacije, posebno glavnih enzimskih grupa daje tablica 2.

Tablica 2. Kategorizacija enzima prema tipu reakcija koje kataliziraju (BRENDA, 2020).

Klasa enzima	EC broj	Odabrane reakcije
Oksidoreduktaze	1	Redukcija C=O i C=C; reduksijska aminacija C=O; oksidacija C-H, C=C, C-N i C-O, redukcija/oksidacija uz kofaktor
Transferaze	2	Transfer funkcijskih skupina kao što su amino, acil, fosforil, metil, glikozil, nitro i sulfatne grupe
Hidrolaze	3	Hidroliza estera, amida, laktona, laktama, epoksida, nitrila, itd. kao i reverzne reakcije formiranja takvih spojeva
Liaze (sintaze)	4	Adicija malih molekula na dvostruku vezu kao što su C=C, C=O i C=N
Izomeraze	5	Transformacija izomera (izomerizacije) poput racemizacija, epimerizacija i intramolekulska preuređivanja
Ligaze (sintetaze)	6	Stvaranje kompleksnih spojeva (analogno liazama) ali enzimski aktivne samo uz cijepanje ATP-a
Translokaze	7	Translokacija iona ili molekula preko membrane ili njihovo odvajanje unutar membrane

Kao učinkoviti katalizatori za širok raspon organskih sintetskih transformacija pokazali su se enzimi iz gotovo svih klasa s iznimkom translokaza (E.C. 7.X.X.X.) te ligaza (E.C. 6.X.X.X.) čija je *in vitro* primjena ograničena budući je *in situ* regeneracija kofaktora ATP još uvijek izazov (Drauz i sur., 2012). Pregled objavljenih znanstvenih radova do 2020. Godine pokazuje da su od svih sedam klasa enzima hidrolaze (E.C. 3.X.X.X) pronašle najveću primjenu u organskoj sintezi, a razlog tome je što su jednostavne za uporabu, često stabilne, jeftine, lako dostupne iz različitih komercijalnih izvora te njihova aktivnost ovisi isključivo o vodi (Grogan, 2009) (slika 4.).



Slika 4. Grafički prikaz udjela upotrebe različitih klasa enzima u organskoj sintezi prema publikacijama u znanstvenim radovima do 2020. godine (izrađeno prema *Web of Science* bazi podataka, ukupan broj referenci = 853).

Reprezentativni primjeri hidrolaza koje se često koriste u organskoj sintezi su proteaze, lipaze i esterase, a tipične transformacije uključuju hidrolizu estera i amida te njihove reverzne reakcije, naročito esterifikaciju i amidiranje. Hidrolaze se često koriste u stereoselektivnim procesima razdvajanja i desimetrizacije, a zabilježene su i nestereoselektivne primjene primjerice u ekstrakciji lako dostupnih prirodnih spojeva kao što je 6-aminopenicilanska kiselina koja se koristi u sintezi antibiotika. Značajno je da su predstavnici ove skupine, lipaze, također prikladni za reakcije u organskim medijima i koriste se za proizvodnju estera masnih kiselina polazeći od masne kiseline i alkoholnog dijela (Drauz i sur., 2012).

Oksidoreduktaze su, pored hidrolaza, druga najčešće korištena klasa enzima u području organske sinteze. Enzimi iz ove klase kataliziraju reakcije hidroksilacije, međusobne konverzije ketona i alkohola, redukcije dvostruke ugljik-ugljik veze te oksidacije amina (Grogan, 2009). Ključne prednosti upotrebe enzima kao katalizatora u redoks procesima su (i) izvrsna selektivnost čak i kada se kao supstrati koriste nefunkcionalizirani spojevi, kao što su alkani i cikloalkani te (ii) uporaba molekularnog kisika kao jeftinog i održivog oksidirajućeg sredstva. Međutim nerazriješen izazov za enzimatske reakcije predstavlja ograničena

aktivnost nekih enzima, poput monooksigenaza, koja je često ispod 1 U mg^{-1} (Drauz i sur., 2012). Nadalje, veliki problem u primjeni oksidoreduktaza u organskoj sintezi predstavlja i zahtjev za regeneracijom kofaktora, poput nikotinamidnih kofaktora, flavina ili hema, o kojima su ti enzimi ovisni za ispoljavanje katalitičke aktivnosti i kao takvi, iz perspektive biokatalize, još uvijek se smatraju izazovima (Grogan, 2009). Od ostalih enzimskih skupina bitno je spomenuti transaminaze (podskupina transferaza) koje su pronašle industrijsku primjenu u sintezi aminokiselina i amina, zatim fumarazu (podskupina liaza) koja se u industriji koristi za proizvodnju jabučne kiseline te glukoza-6-fosfat izomerazu koja se primjenjuje u proizvodnji visoko fruktoznog kukuruznog sirupa čija proizvodnja prelazi 1 milijun tona (Drauz i sur., 2012; Grogan, 2009). Uz iznimku hidrolaza, pripadnici svih ostalih enzimskih klasa (ili barem njihov dio) pokazuju ovisnost o kofaktorima ili pomoćnim proteinima za prijenos elektrona, neproteinskim molekulama poput malih organskih molekula ili metalnih iona koji su u većini slučajeva ključni za katalizu (Grogan, 2009). Budući tijekom katalitičkog procesa dolazi do modifikacije kofaktora, njihova je regeneracija u kasnijoj reakciji ključno pitanje kako bi se mogli koristiti u katalitičkim količinama. U reakcijama biotransformacija gdje su uključene cijele stanice ti se kofaktori najčešće proizvode i recikliraju u organizmu, međutim u biotransformacijama s izoliranim enzimima dostupnost mogućnosti da se takvi kofaktori učinkovito regeneriraju nameće razmatranja o dodatnim troškovima i složenosti procesa te često odlučuje može li se određena metoda razviti kao uspješan sintetski proces (Drauz i sur., 2012; Grogan, 2009).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Enzimski pripravak

Liofilizirana alkohol dehidrogenaza (ADH) izolirana iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.2. Kemikalije

- Etanol (96 % v/v), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilen glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicin pirofosfatni pufer, PBF, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- NAD^+ , Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- NADH, Alfa Aesar, Ward Hill, SAD
- PBS pufer, PBF, Zagreb, Hrvatska
- Tris-HCl pufer, PBF, Zagreb, Hrvatska
- Urea, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve kemikalije upotrebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće, a voda korištena za pripremu eutektičkih otopala i otopina bila je destilirana voda PBF-a.

3.1.3. Priprema matičnih otopina i pufera

- Matične otopine NAD^+ ($\gamma_{\text{NAD}^+} = 15 \text{ mg mL}^{-1}$ i $\gamma_{\text{NAD}^+} = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$)
- Matične otopine NADH ($\gamma_{\text{NADH}} = 15 \text{ mg mL}^{-1}$)
- Matične otopine ADH ($\gamma_{\text{ADH}} = 30 \text{ mg mL}^{-1}$ i $\gamma_{\text{ADH}} = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$)

- Glicin pirofosfatni pufer (pH = 9)

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	8,34 g
Glicin	0,42 g
Destilirana voda	250 mL
1 M otopina HCl	do pH 9

- Tris-HCl pufer (pH = 7,4)

Tris baza	60,57 g
Destilirana voda	do 500 mL
12 M otopina HCl	32,5 mL
- PBS pufer (pH = 7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 1000 mL

3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Laboratorijska tresilica, Fisher Bioblock Scientific, tip KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, eppendorf epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete, špatule, stalak za epruvete)
- Magnetska mješalica s grijanjem, Technica, Železnik, Slovenija
- Mikropipete (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1 mL i 5 mL)
- Multimetar pH/ion metar, S220, Mettler Toledo, Columbus, SAD
- Spektrofluorimetar, Cary Eclipse, Varian, SAD
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYS™ 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

3.2. Metode

3.2.1. Priprava prirodnih eutektičkih otapala

Sinteza prirodnih eutektičnih otapala (eng. *Natural deep eutectic solvent, NADES*) za praćenje stabilnosti koenzima NADH i NAD⁺ odrađena je dodatkom prethodno izračunatih količina komponenata u plastične epruvete prema zadanim molarnim omjerima (tablica 3). U epruvete su prvo dodani kolin-klorid i glicerol/etilen-glikol/urea, a potom je dodavana voda u dva omjera. Na taj način pripremljeno je 3 NADES-a s po dva molarna udjela vode. Za

praćenje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) i promjena u njegovoj konformaciji, eutektička otapala pripremljena su na način da je ishodno bezvodno eutektičko otapalo razrijeđeno vodom do određenog masenog omjera od 20 i 60 % (w/v) (tablica 4). Zatim su epruvete s reakcijskom smjesom stavljene na laboratorijsku tresilicu i mješane dok se ne dobije homogeno, prozirno i bezbojno tekuće otapalo. Tako pripremljeni NADES-ovi su omotani parafilmom kako nebi došlo do gubitka volumena i skladišteni na sobnoj temperaturi do korištenja kao otapala za biokatalizu. Uz pomoć multimetra pH/ion metra S220, Mettler Toledo svakome od dobivenih NADES-ova izmjerena je pH vrijednost pri 25 °C.

Tablica 3. Pripravljena eutektička otapala za ispitivanje stabilnosti koenzima

Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Kratica
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda	1:2:4	ChEG4
	1:2:8	ChEG8
Kolin-klorid:glicerol:voda	1:2:4	ChGly4
	1:2:8	ChGly8
Kolin-klorid:urea:voda	1:2:4	ChU4
	1:2:8	ChU8

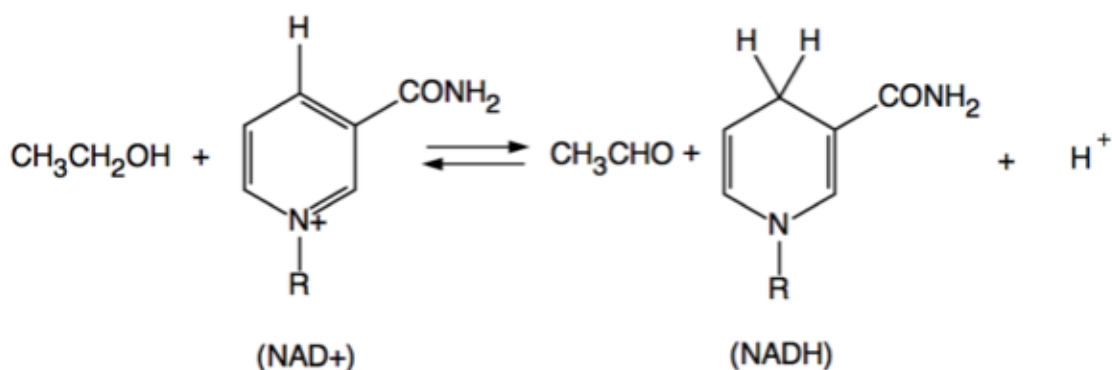
Tablica 4. Pripremljena eutektička otapala za praćenje aktivnosti alkohol dehidrogenaze

Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Kratica	Udio vode % (w/v)
Kolin-klorid:etilen-glikol	1:2	ChEG20%	20
	1:2	ChEG60%	60
Kolin-klorid:glicerol	1:2	ChGly20%	20
	1:2	ChGly60%	60
Kolin-klorid:urea	1:2	ChU20%	20
	1:2	ChU60%	60

3.2.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze

Za određivanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) korišten je spektrofotometrijski test temeljen na reakciji oksidacije etanola u acetaldehid u glicin-pirofosfatnom puferu pH vrijednosti 9 i NADES-ovima. Reakciju katalizira ADH uz

istovremenu redukciju NAD^+ u NADH (slika 5).



Slika 5. Shema reakcije oksidacije etanola u acetaldehid koju katalizira alkohol dehidrogenaza (Anonymous, 2017)

Spektrofotometrijsko mjerenje promjene apsorbancije NADH provodilo se pri $\lambda = 340 \text{ nm}$ budući toliko iznosi valna duljina pri kojoj NADH apsorbira maksimalnu količinu svjetlosti dok njegova oksidirana forma (NAD^+) u valnom području $300 - 400 \text{ nm}$ ne apsorbira svjetlost.

Za test je u kivetu od 1 mL potrebno otpipetirati:

- $19,8 \mu\text{L EtOH}$ (96% , v/v),
- $10 \mu\text{L}$ otopine NAD^+ ($\gamma_{\text{NAD}^+} = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$),
- $950,2 \mu\text{L}$ otapala (75 mmol dm^{-3} glicin pirofosfatni pufer pH 9, odnosno NADES),
- $20 \mu\text{L}$ suspenzije enzima ADH ($\gamma_{\text{ADH}} = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$).

Volumetrijska aktivnost enzima ADH izračuna se iz promjene apsorbancije u vremenu $\Delta\text{ABS}/\Delta t$ prema izrazu [1]:

$$A_v = \frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t} \cdot \frac{V_u}{V_r \cdot \epsilon_{340} \cdot d} \cdot f \quad [1]$$

Gdje je: f – faktor razrjeđenja; V_r – volumen uzorka (cm^3); V_u – ukupni volumen (cm^3); ϵ_{340} – ekstincijski koeficijent ($\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$), iznosi $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ za $\lambda = 340 \text{ nm}$; d – promjer kivete (cm), $d = 1 \text{ cm}$; $\Delta\text{ABS}/\Delta t$ – predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu (min^{-1}).

Pritom je volumetrijska aktivnost izražena u međunarodnim jedinicama enzimске aktivnosti U po jedinici volumena, a uzima se da je 1 U ekvivalentna $1 \mu\text{mol min}^{-1}$.

3.2.3. Spektrofluorimetrijsko praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenze

Promjene u konformaciji ADH praćene su mjerenjem intenziteta fluorescencije uz pomoć spektrofluorimetra Cary Eclipse. Pripremljena je matična otopina ADH masene koncentracije 30 mg mL^{-1} te je otpipetirano po $10 \text{ }\mu\text{L}$ otopine u 3 mL otapala, odnosno glicin pirofosfatnog pufera i 6 NADES-ova. Uzorci su prije snimanja temperirani na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 minuta, a mjerenja su provođena pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ uz valnu duljinu pobuđivanja $\lambda_{eks} = 293 \text{ nm}$ i valnu duljinu emisije $\lambda_{em} = 300 - 400 \text{ nm}$.

3.2.4. Spektrofotometrijsko praćenje stabilnosti koenzima NAD^+ i NADH

Praćenje stabilnosti koenzima NAD^+ i NADH temelji se na mjerenju apsorbancije (optičke gustoće) uzoraka pripremljenih u 6 različitih NADES-ova te prikladnim puferima kroz određeno vrijeme i na određenoj temperaturi. Matične otopine koenzima masene koncentracije 15 mg mL^{-1} pripravljene su u referentnim puferima, za NAD^+ to je PBS pufer, a za NADH glicin pirofosfatni pufer. Po $10 \text{ }\mu\text{L}$ matične otopine koenzima otpipetirano je u 5 mL otapala, tj. u svih 6 NADES-ova te PBS, glicin pirofosfatni i Tris-HCl pufer. Svaki od pripremljenih uzoraka čuvan je kroz 15 dana na sobnoj temperaturi ($22 \text{ }^\circ\text{C}$) te su uz pomoć UV/Vis spektrofotometra praćene promjene u apsorpcijskom spektru u rasponu od 250 do 400 nm . Apsorpcijski maksimumi očitavani su na 262 nm i 340 nm za NADH i na 262 nm za NAD^+ .

Kako bi se izračunala relativna stabilnost koenzima u različitim NADES-ovima i referentnim otapalima, izračunate su relativne vrijednosti apsorbancije pri 262 nm ($A_{262\text{Rel}}$) za NAD^+ , odnosno 262 nm ($A_{262\text{Rel}}$) i 340 nm ($A_{340\text{Rel}}$) za NADH prema izrazima [2] i [3]:

$$A_{262\text{Rel}} = \frac{A_{262n}}{A_{262p}} \quad [2]$$

gdje je:

A_{262n} - vrijednost apsorbancije izmjerene na 262 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$,

A_{262p} - vrijednost apsorbancije izmjerene u otopini koenzima koja nije bila prethodno inkubirana (svježe pripravljena otopina).

$$A_{340\text{Rel}} = \frac{A_{340n}}{A_{340p}} \quad [3]$$

gdje je:

A_{340n} - vrijednost apsorbancije izmjerene na 340 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 °C,

A_{340p} - vrijednost apsorbancije izmjerene u otopini koenzima koja nije bila prethodno inkubirana (svježe pripravljena otopina).

Zatim su izračunata odstupanja od početne relativne apsorbancije na 262 nm (Δ_{262}) i 340 nm (Δ_{340}) nakon inkubacije NADH, odnosno NAD^+ u različitim NADES-ovima prema formulama [4], odnosno [5]:

$$\Delta_{262} = (1 - A_{262;15}) \cdot (-100) \quad [4]$$

gdje $A_{262;15}$ predstavlja vrijednost apsorbancije izmjerene na 262 nm nakon 15 dana inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 °C.

$$\Delta_{340} = (1 - A_{340;15}) \cdot (-100) \quad [5]$$

gdje $A_{340;15}$ predstavlja predstavlja vrijednost apsorbancije izmjerene na 340 nm nakon 15 dana inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 °C.

4. Rezultati i rasprava

U posljednjih nekoliko desetljeća došlo je do značajnog porasta ekološke svijesti, a koncept održivog razvoja stavljen je u fokus suvremene kemijske industrije zbog čega se sve veći broj istraživanja provodi s ciljem implementacije principa zelene kemije u kemijskim procesima današnjice. Zelena su otapala tako u posljednjih nekoliko godina privukla ogromnu pozornost kao obećavajuća alternativa štetnim organskim otapalima i reagensima. Među njima novu generaciju predstavljaju prirodna eutektička otapala, koja su se zahvaljujući svojstvima poput nehlapljivosti, nezapaljivosti, niske toksičnosti, biorazgradljivosti te mogućnosti dizajniranja fizikalno-kemijskih svojstava istaknula s ekološkog ali i tehnološkog aspekta. Osim toga, primjenom biokatalizatora u organskoj sintezi moguće je zamjeniti ekološki nepovoljne reakcijske korake te povećati produktivnost procesa zahvaljujući blagim reakcijskim uvjetima, visokoj selektivnosti i manjoj štetnosti za okoliš. Implementacijom biokatalizatora (izoliranih enzima ili cijelih stanica) u sintezi osjetljivih proizvoda moguće je dobiti optički čiste spojeve visoke vrijednosti, kojima raste potražnja u farmaceutskoj industriji. Oksidoreducirajući enzimi poput dehidrogenaza i reduktaza pripadaju dominantnim biokatalizatorima u industriji koji se najčešće koriste u reakcijama dobivanja kiralnih alkohola, a za katalitičku aktivnost zahtijevaju prisutnost odgovarajućih koenzima.

Stoga je u ovom radu, u cilju pronalaska ekološki prihvatljivog procesa redukcije ispitano utjecaj prirodnih eutektičkih otapala na enzim alkohol dehidrogenazu (ADH) i njemu potrebne nikotinamidne koenzime NADH i NAD⁺. U prirodnim eutektičkim otapalima, pripremljenim prema tablicama 3 i 4, određena je aktivnost alkohol dehidrogenaze te je potom uz pomoć spektrofluorimetra ispitana potencijalna promjena u konformaciji enzima. Također je ispitana i stabilnost NADH i NAD⁺ u navedenim otapalima spektrofotometrijskom metodom praćenja promjena u apsorbanciji uzoraka.

4.1. Pripravljena prirodna eutektička otapala

Prema principima zelene kemije, proces sinteze potrebno je osmisлити tako da je u konačni proizvod uključena maksimalna količina ulazne sirovine te da pritom nastaje što manje otpada. Priprava prirodnih eutektičkih otapala provedena je jednostavnim postupkom mješanja dviju komponenti prema zadanim molarnim omjerima uz iskorištenje reakcije 100 %, što predstavlja veliku prednost kod sinteze zelenih otapala. Reakcijske smjese su zatim kontinuirano zagrijavane uz mješanje na laboratorijskoj tresilici dok nije postignuta bezbojna, bistra i homogena tekućina. Po završetku sinteze izmjerene su pH vrijednosti pripremljenih prirodnih eutektičkih otapala pri sobnoj temperaturi, prikazane u tablicama 5 i 6.

Tablica 5. Pripravljena prirodna eutektička otapala s izmjerenim pH vrijednostima

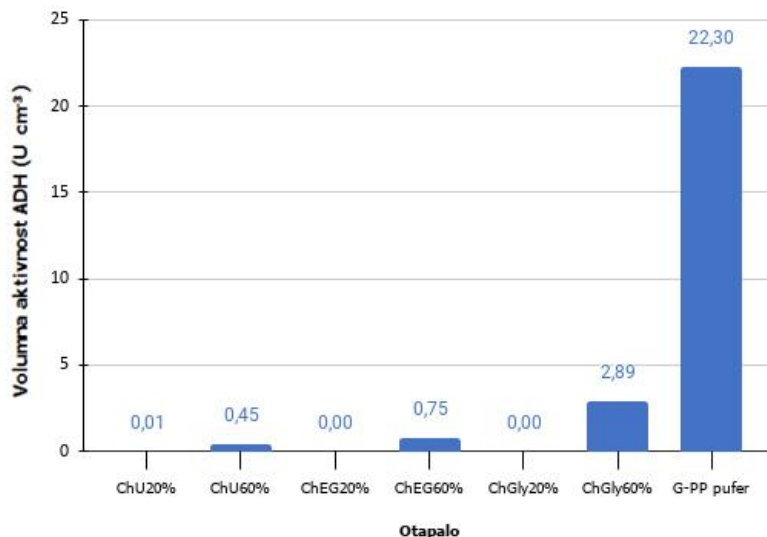
Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Kratica	pH
Kolin-klorid:etilen-glikol:voda	1:2:4	ChEG4	8,8
	1:2:8	ChEG8	8,2
Kolin-klorid:glicerol:voda	1:2:4	ChGly4	6,6
	1:2:8	ChGly8	6,5
Kolin-klorid:urea:voda	1:2:4	ChU4	8,4
	1:2:8	ChU8	8,1

Tablica 6. Pripravljena prirodna eutektička otapala s izmjerenim pH vrijednostima

Prirodno eutektičko otapalo	Molarni omjer komponenti	Kratica	Udio vode % (w/v)	pH
Kolin-klorid:etilen-glikol	1:2	ChEG20%	20	8,7
	1:2	ChEG60%	60	8,1
Kolin-klorid:glicerol	1:2	ChGly20%	20	6,0
	1:2	ChGly60%	60	6,5
Kolin-klorid:urea	1:2	ChU20%	20	8,7
	1:2	ChU60%	60	8,0

4.2. Aktivnost alkohol dehidrogenaze

Aktivnost enzima ADH određena je mjerenjem početne brzine reakcije oksidacije etanola u acetaldehid. Otapala u kojima je reakcija provedena su prethodno pripremljena prirodna eutektička otapala i glicin-pirofosfatni pufer (pH = 9). Prirodna eutektička otapala na bazi kolin-klorida pripremljena su s udjelom vode od 20 % i 60 % (w/v) prema tablici 6. Budući ADH za katalizu reakcije zahtjeva koenzim NAD⁺ koji se reducira u NADH, aktivnost enzima je izmjerena spektrofotometrijskom metodom praćenja koncentracije nastalog NADH pri 340 nm. Volumetrijska aktivnost ADH u prirodnim eutektičkim otapalima i glicin-pirofosfatnom puferu prikazana je u obliku dijagrama na slici 6.



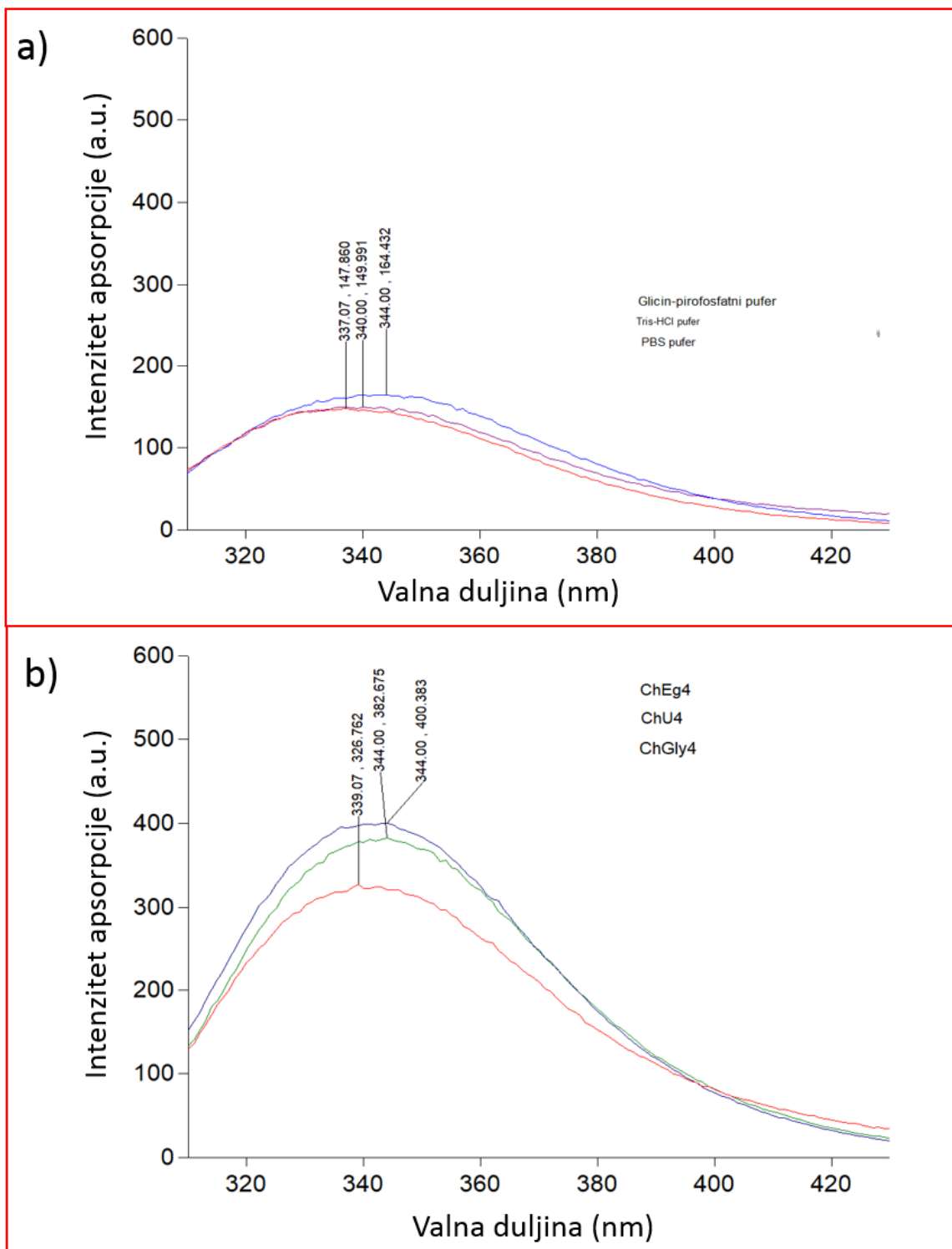
Slika 6. Volumetrijska aktivnost enzima ADH u različitim prirodnim eutektičkim otapalima s 20 % i 60 % vode i puferu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Iz rezultata prikazanih na slici 6 vidljivo je da su se aktivnosti ADH u prirodnim eutektičkim otapalima kretale od 0 do 2,89 U cm⁻³. Najveća aktivnost zabilježena je u puferu i iznosila je 22,30 U cm⁻³ što je daleko viša vrijednost u odnosu na sve ispitane uzorke prirodnih eutektičkih otapala. Nadalje, gledajući samo uzorke sa prirodnim eutektičkim otapalima vidljivo je da se kao najpogodnije otapalo istaknuo ChGly8 s aktivnošću 2,89 U cm⁻³. Izrazito niske aktivnosti koje su pokazala prirodna eutektička otapala mogle bi biti posljedica promjene u konformaciji ADH. Zamjećujemo da je aktivnost ADH veća u prirodnim eutektičkim otapalima s većim udjelom vode, što nalaže da povećanje udjela vode povoljno djeluje na aktivnost ADH te da je udio vode bitan faktor u dizajniranju prikladnog eutektičkog otapala.

4.3. Promjene u konformaciji alkohol dehidrogenze

Promjene u konformaciji alkohol dehidrogenaze praćene su mjerenjem intenziteta fluorescencije uz pomoć spektrofluorimetra. Pripremljena je matična otopina ADH te je otpipetirano po 10 μ L otopine u 3 mL otapala, odnosno glicin pirofosfatnog pufera i 6 uzoraka prirodnih eutektičkih otapala. Svi uzorci su prije snimanja termostatorirani na 25 °C tijekom 5 minuta, a mjerenja su provođena pri vanim duljinama $\lambda_{eks} = 293$ nm i $\lambda_{em} = 300 - 400$ nm kako bi se pratila konformacija ADH. Nativna fluorescencija ovog enzima potječe od aminokiselina tirozina i triptofana, a najveći doprinos ukupnoj fluorescenciji pridaje aminokiselina triptofan čiji je raspon valnih duljina emisijskog maksimuma od 308 nm do 355

nm i ovisi o stupnju izloženosti pobočnog ogranka. Promjene u konformaciji mogu se pokazati kao promjene u intenzitetu maksimalne fluorescencije (I_{\max}) ili promjene valne duljine emisijskog maksimuma (λ_{\max}) prema nižim (eng. *blue shift*) ili višim vrijednostima (eng. *red shift*), a oboje su posljedica promjene u polaritetu mikrokruženja (Jia i sur., 2014). U ovom radu ispitan je utjecaj 3 prirodna eutektička otapala na konformaciju ADH što ujedno utječe i na samu aktivnost enzima. Na slici 7 prikazani su fluorescentni spektri dobiveni spektrofluorimetrijskim praćenjem promjena u konformaciji ADH u različitim puferima (a) i prirodnim eutektičkim otapalima (b).



Slika 7. Spektri dobiveni mjerenjem na spektrofluorimetru pri valnim duljinama $\lambda_{\text{eks.}} = 293$ nm i $\lambda_{\text{em.}} = 300 - 400$ kako bi se pratila konformacija ADH u puferima (a) i prirodnim eutektskim otapalima (b)

Usporedbom fluorescentnih spektara za praćenje konformacije ADH u puferima (slika 7a) sa spektrima za praćenje konformacije ADH u prirodnim eutektskim otapalima (slika 7b) primjećujemo da nije došlo do značajne promjene valne duljine emisijskog maksimuma što ukazuje da nije došlo do promjena u sekundarnoj strukturi enzima (Nian i sur., 2019), no vidljiva je pozitivna promjena u intenzitetu maksimalne fluorescencije. Veći intenziteti fluorescencije zabilježeni u uzorcima koji su sadržavali prirodna eutektska otapala ukazuju da su otapala izazvala promjene u konformaciji ADH, što se dalje može povezati sa izrazito niskim aktivnostima enzima izmjerenim u tim otapalima (slika 6).

4.4. Stabilnost koenzima NADH i NAD⁺ u prirodnim eutektskim otapalima

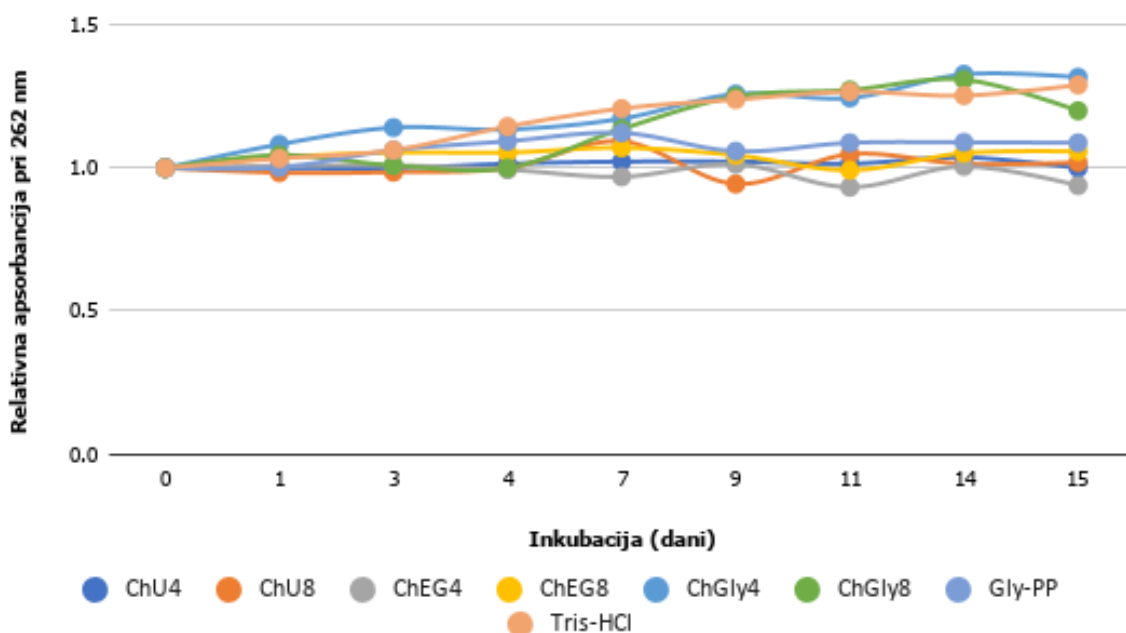
Činjenica je da određeni enzimi za svoju aktivnost zahtijevaju prisutnost kofaktora. Kofaktori su neproteinske molekule koje se na enzim mogu vezati kovalentno (prostetske skupine) ili nekovalentno (koenzimi). To mogu biti male organske molekule, metalni ioni ili neka druga jednostavna molekula. Koenzimi koji zahtijevaju najviše razmatranja u pogledu preparativne biokatalize su nikotinamidni koenzimi NAD⁺/NADH i NADP⁺/NADPH koji sudjeluju u reakcijama oksidacije i redukcije katalizirane dehidrogenazama. Nikotinamidni koenzimi djeluju kao donori ili akceptori kemijskih redukcijskih ekvivalenata, primjerice nikotinamidni prsten koenzima NAD⁺ je redoks aktivan, prima vodikov ion pri čemu se sam reducira u NADH. Ti koenzimi primjenjuju se u sintezi proizvoda visoke ekonomske vrijednosti kao što su različiti kiralni spojevi, prvenstveno hidroksi-kiseline, aminokiseline i alkoholi. U slučajevima kada se kao biokatalizator koriste cijele stanice, koenzimi se proizvode i regeneriraju u samom organizmu, no kod primjene izoliranih enzima kao biokatalizatora potrebno je dodati koenzime izravno u reakcijsku smjesu. S obzirom na vrlo visoku cijenu koenzima, posebice NAD(P)H, njihovo dodavanje u stehiometrijskim količinama nije ekonomski prihvatljivo. Stoga se u posljednje vrijeme razvijaju *in situ* sustavi za njihovu regeneraciju kako bi provođenje takvih biokatalitičkih redoks procesa bilo uspješno izvedivo s ekonomskog kao i ekološkog aspekta. Osim reciklacije, prilikom osmišljavanja biotransformacijskog procesa bitno je osigurati otapalo u kojemu su koenzimi stabilni kako nebi došlo do degradacije istih tijekom skladištenja. Istraživanja su pokazala da stabilnost NAD⁺/NADH ovisi o pH, temperaturi inkubacije i vrsti otapala u kojem se nalazi, a najvišu stabilnost postiže u neutralnim i bazičnim uvjetima, pri niskoj temperaturi i u zwitterionskom puferu (Rover Jr. i sur., 1998; Zhang i sur., 2018).

U ovom radu pripravljene su matične otopine koenzima NAD⁺ u PBS puferu pH 7,4 i NADH u glicin pirofosfatnom puferu pH 9. Zatim je u 5 mL svakog od prethodno pripremljenih

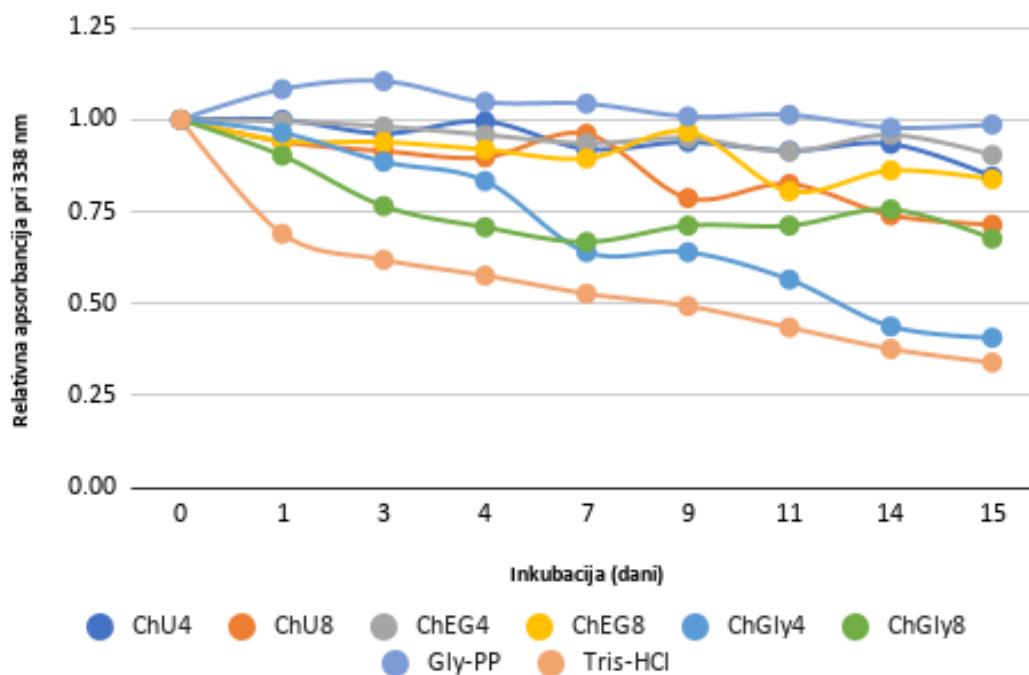
prirodnih eutektičkih otapala prikazanih u tablici 4. i pufera dodano po 10 μL matične otopine koenzima NAD^+ odnosno NADH . Dobivene otopine inkubirane su tijekom 15 dana na temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$. Stabilnost koenzima tijekom inkubacije praćena je bilježenjem promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm uz pomoć UV/Vis spektrofotometra. Ova metoda pogodna je za praćenje stabilnosti koenzima zahvaljujući tome što oba koenzima NAD^+ i NADH posjeduju skupinu adenozin monofosfat koja ima apsorpcijski maksimum na 262 nm, a NADH osim toga sadrži i dihidropiridinski prsten koji nastaje nakon redukcije zbog čega se u apsorpcijskom spektru NADH pojavljuje još jedan apsorpcijski maksimum na 340 nm (Rover Jr. i sur., 1998).

4.4.1. Stabilnost NADH

Na slikama 8 i 9 prikazan je tijek praćenja stabilnosti koenzima NADH praćenjem apsorpcije pri 262 nm i 338 nm tijekom 15 dana inkubacije u prirodnim eutektičkim otapalima s kolin-kloridom te referentnim otapalima, glicin-pirofosfatnom puferu i Tris-HCl puferu, na sobnoj temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$.



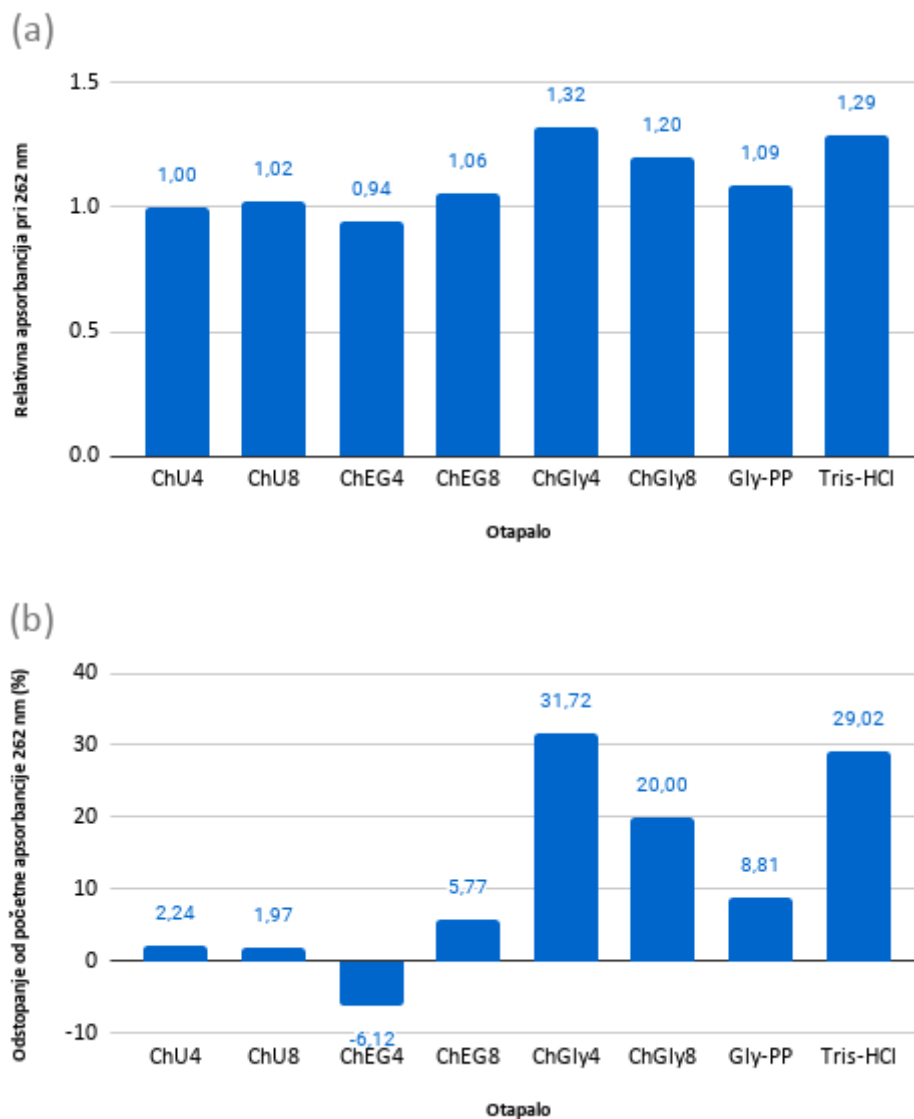
Slika 8. Tijek praćenja relativne stabilnosti NADH mjerenjem apsorpcije pri 262 nm tijekom 15 dana inkubacije u različitim prirodnim eutektičkim otapalima i referentnim puferima na sobnoj temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).



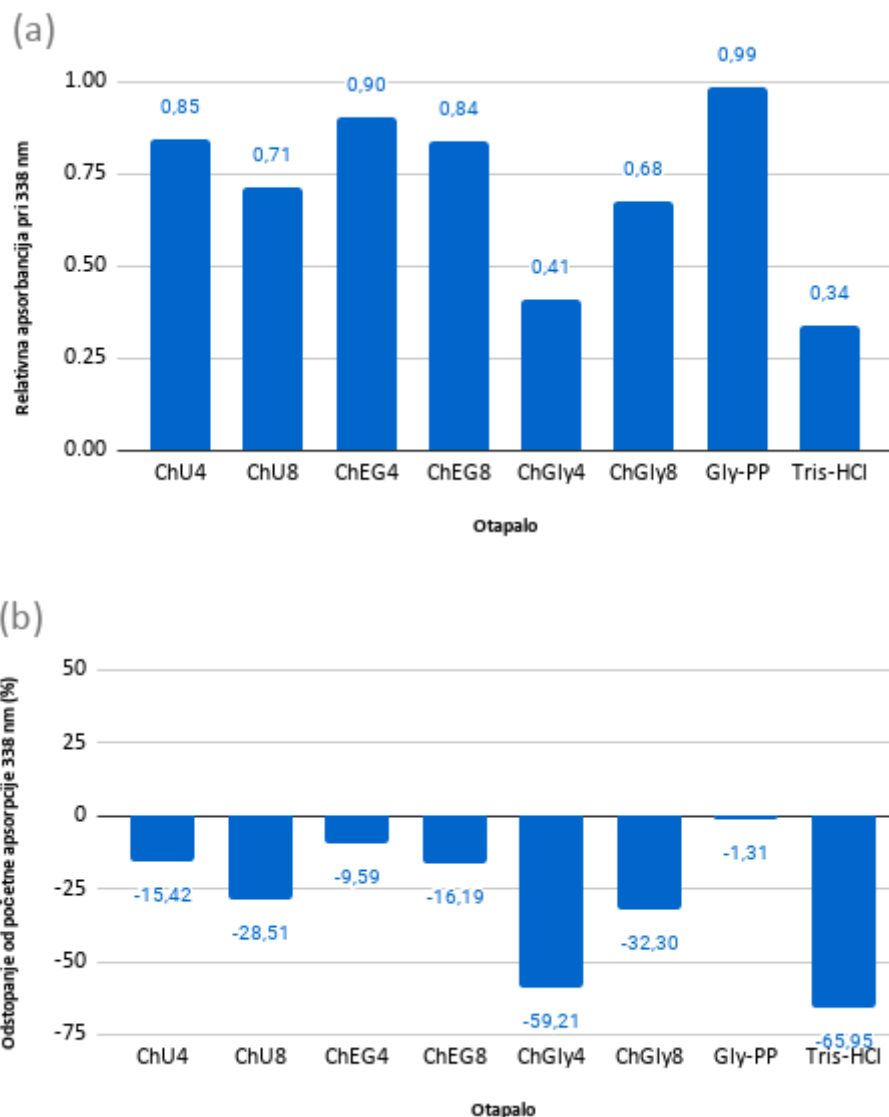
Slika 9. Tijek praćenja relativne stabilnosti NADH mjerenjem apsorbanacije pri 338 nm tijekom 15 dana inkubacije u različitim prirodnim eutektičkim otapalima i referentnim puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Iz rezultata praćenja promjena relativne apsorbanacije tijekom inkubacije, koji su prikazani na slikama 8 i 9, može se primjetiti značajan pad apsorbanacije na 338 nm kod uzoraka otopljenih u Tris-HCl puferu te u otapalu ChGly4 što ukazuje na degradaciju koenzima NADH. Osim toga, veće promjene apsorbanacije na 262 nm moguće je zamjetiti kod uzoraka otopljenih u Tris-HCl puferu te u otapalima ChGly4 i ChGly8. Na ovaj su fenomen ranije u svojem radu ukazali Fukazawa i Ishihara (2015) te opisali NADH kao spoj koji oksidira u NAD^+ zbog čega dolazi do smanjenja apsorbanacije na 338 nm i povećanja apsorbanacije na 262 nm. Promjene relativnih apsorbanacija u ostalim uzorcima otapala te glicin pirofosfatnom puferu vidno su manje i odvijaju se sporije što ukazuje na to da imaju povoljnije djelovanje na stabilnost NADH.

Zbog jednostavnije interpretacije rezultata prema jednadžbama [2] i [3] izračunate su relativne vrijednosti apsorbanacija pri 262 nm i 340 nm ($A_{262\text{Rel}}$ i $A_{340\text{Rel}}$) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u različitim prirodnim eutektičkim otapalima i referentnim puferima te odstupanja od početne vrijednosti pri 262 nm i 340 nm (Δ_{262} i Δ_{340}), a rezultati prikazani na slikama 10 i 11.



Slika 10. a) Relativna apsorbanija na 262 nm nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u različitim prirodnim eutektičkim otapalima i puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C; b) Odstupanje od početne apsorbanije na 262 nm nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).



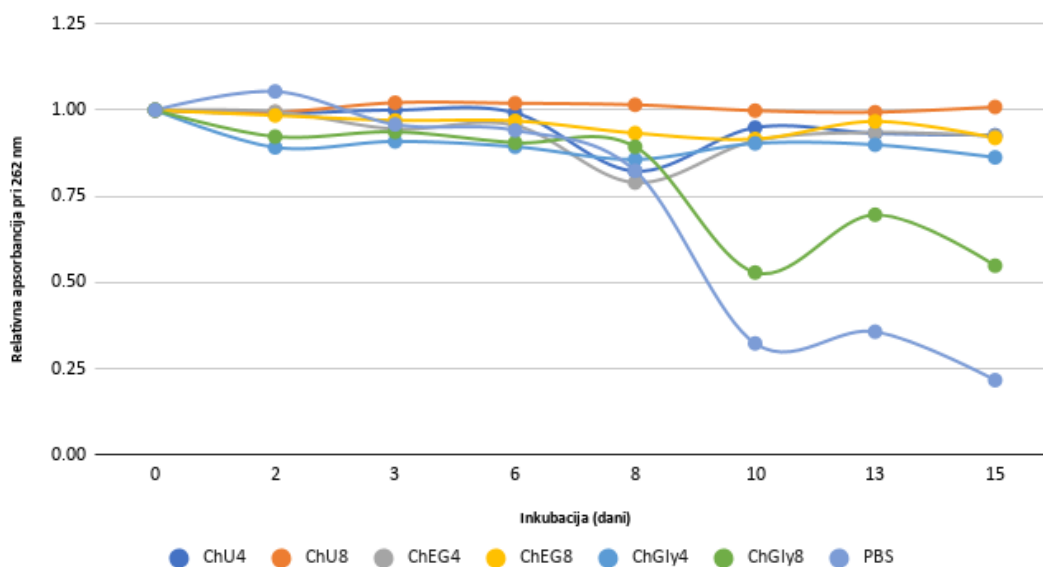
Slika 11. a) Relativna apsorbanca na 338 nm nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u različitim prirodnim eutektičkim otapalima i puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C; b) Odstupanje od početne apsorpcije na 338 nm nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Rezultati na slikama 10 i 11 pokazuju da su najveća odstupanja od početne vrijednosti apsorpcije na obje valne duljine (262 nm i 338 nm) zabilježena kod uzoraka otopljenih u Tris-HCl puferu i otapalu ChGly4, a iznosila su 29,02 % za Tris-HCl pufer i 31,72 % za ChGly4. Veoma visoka odstupanja u apsorpciji, također primjećena i u uzorku ChGly8, ukazuju da navedena otapala djeluju destabilizirajuće na koenzim. Bitno je primjetiti da su odstupanja od početne vrijednosti apsorpcije na 262 nm uglavnom pozitivna (slika 10b), dok su odstupanja na 338 nm negativna (slika 11b). Najmanja odstupanja apsorpcije pri valnoj duljini 262 nm pokazala su otapala na bazi uree, čiji su rezultati iznosili 2,24 % za

ChU4 i 1,9749 % za ChU8, te otapala na bazi etilen-glikola, -6,12 % za ChEG4 i 5,77 % za ChEG8. Pri 338 nm najmanje odstupanje apsorbancije zabilježeno je u glicin pirofosfatnom puferu, a iznosilo je -1,31 %, dok je među prirodnim eutektičkim otapalima najmanje odstupanje imalo otapalo ChEG4 s -9,59 %. Nadalje, s obzirom na rezultate relativnih apsorbancija i odstupanja od početne apsorbancije prikazanih na slikama 10 i 11 može se zaključiti da od svih otapala najpovoljniji utjecaj na stabilnost koenzima pokazuju glicin pirofosfatni pufer i ChEG4. Generalno veća stabilnost NADH u glicin pirofosfatnom puferu pH 9 i blago lužnatim prirodnim eutektičkim otapalima koja sadrže ureu i etilen-glikol u odnosu na Tris-HCl pufer pH 7,4 i blago kisela prirodna eutektička otapala koja sadrže glicerol u skladu je s podacima iz literature koji navode da NADH preferira blago lužnato okruženje (Rover Jr. I sur., 1998).

4.4.2. Stabilnost NAD⁺

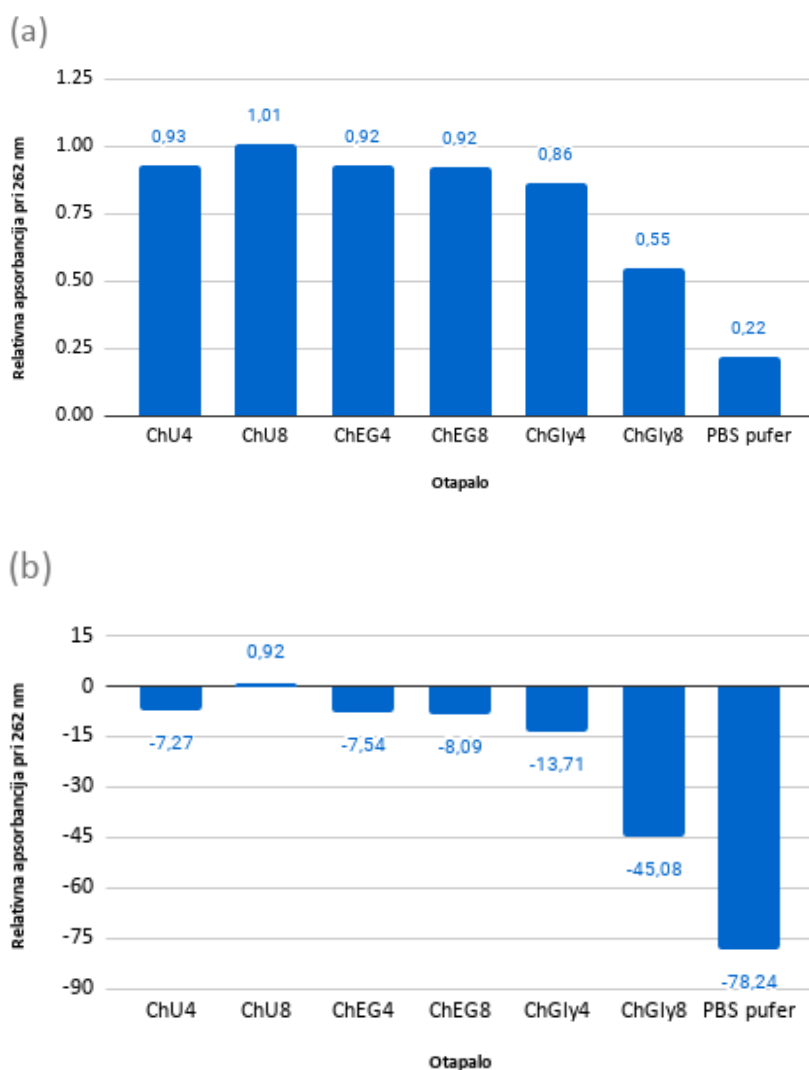
Na slici 12 prikazan je tijek praćenja stabilnosti oksidiranog oblika koenzima, NAD⁺, praćenjem apsorbancije pri 262 nm tijekom 15 dana inkubacije u prirodnim eutektičkim otapalima s kolin-kloridom te referentnom otapalu, PBS puferu pH 7,4 na sobnoj temperaturi od 25 °C.



Slika 12. Tijek praćenja relativne stabilnosti NAD⁺ mjerenjem apsorbancije pri 262 nm tijekom 15 dana inkubacije u različitim prirodnim eutektičkim otapalima i referentnim puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Na grafičkom prikazu praćenja relativne apsorbancije NAD^+ pri 262 nm vidljivo je da se tijekom 15 dana inkubacije u većini otapala vrijednosti relativnih apsorbancija uglavnom postupno mjenjaju te su pretežno konstantne. Iznimku čine uzorci koji sadrže ChGly8 i PBS pufer, u kojima dolazi do drastičnog pada vrijednosti relativne apsorbancije nakon 8. dana inkubacije.

Apsorbancije izmjerene pri 262 nm svedene su na relativne apsorbancije prema izrazima [2] i [3], te su izračunata odstupanja od početne apsorbancije pri 262 nm u različitim prirodnim eutektskim otapalima i referentnom puferu, a rezultati su prikazani na slici 13.



Slika 13. a) Relativna apsorbanca na 262 nm nakon inkubacije NAD^+ tijekom 15 dana u različitim prirodnim eutektskim otapalima i puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C; b) Odstupanje od početne apsorbancije na 262 nm nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Na slici 13 vidljivo je da je najveća vrijednost relativne apsorbancije zabilježena u uzorku ChU8 (1,01) u kojemu je također zabilježeno i najmanje odstupanje od početne apsorbancije (0,92 %), što nam govori da navedeno otapalo najpovoljnije djeluje na stabilnost koenzima NAD^+ . Do najvećeg pada vrijednosti relativne apsorbancije došlo je u uzorku ChGly8 i PBS puferu u kojima je zabilježeno i najveće odstupanje od početne apsorbancije, točnije došlo je do degradacije čak 45,08 % koenzima u uzorku ChGly8, odnosno 78,24 % u PBS puferu. Odstupanja od početne vrijednosti apsorbancije u ostalim otapalima su također relativno niska što ih čini pogodnim za stabilizaciju koenzima NAD^+ . Budući proizvođač koenzima (Sigma-Aldrich) u uputama za korištenje navodi da je NAD^+ stabilan najmanje 2 tjedna u neutralnim do blago kiselim uvjetima, izmjereni rezultati, koji pokazuju najveću stabilnost koenzima u blago lužnatim prirodnim eutektskim otapalima, nisu u skladu s očekivanjima te nalažu da pH nije primarni faktor koji utječe na stabilnost ovog koenzima.

Za uspješno provođenje oksidoredukcijskih reakcija i regeneracije pripadajućih nikotinamidnih koenzima bitna je stabilnost oba koenzima, NADH i NAD^+ , u primjenjenom otapalu. Uzimajući u obzir da je NADH stabilan u neutralnim do blago lužnatim uvjetima, a NAD^+ odgovaraju blago kiseli uvjeti, odabir prikladnog otapala koje bi zadovoljilo zahtjeve za stabilnošću oba koenzima predstavlja problem. Pronalazak otapala koje bi dobro stabiliziralo oba koenzima bio bi stoga značajan doprinos razvoju uspješnih biokatalitičkih procesa. Ispitivanje stabilnosti navedenih koenzima u prirodnim eutektskim otapalima na bazi kolin-klorida tijekom 15 dana inkubacije na sobnoj temperaturi od 25 °C pokazalo je da blago lužnata otapala koja sadrže ureu ili etilen-glikol u određenim slučajevima pogoduju stabilnosti NADH/NAD^+ koenzima u većoj mjeri od referentnih pufera te pokazuju obećavajuće rezultate koje je nužno detaljnije ispitati daljnjim istraživanjima.

5. Zaključci

U ovome radu ispitan je utjecaj ekološki prihvatljivijih prirodnih eutektičkih otapala na aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) promjene u njegovoj konformaciji te stabilnost koenzima NAD^+ i NADH potrebnih za odvijanje oksidoredukcijskih reakcija. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Tijekom pripreme prirodnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida iskorištenje atoma je 100% te ne dolazi do nastanka otpada.
2. Volumetrijska aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze viša je u prirodnim eutektičkim otapalima sa 60 % udjela vode (w/v) u odnosu na ista sa 20 % udjela vode. U svim prirodnim eutektičkim otapalima volumetrijska aktivnost je bitno niža nego u referentnom glicin pirofosfatnom puferu zbog čega ispitana otapala nisu povoljan medij za provođenje reakcije koju katalizira alkohol dehidrogenaza.
3. Ispitana prirodna eutektička otapala izazivaju promjene u konformaciji alkohol dehidrogenaze vidljive na fluorescentnim spektrima kao promjena u intenzitetu maksimalne fluorescencije, što se očituje u smanjenoj aktivnosti enzima.
4. Rezultati praćenja stabilnosti navedenih koenzima u prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida tijekom 15 dana inkubacije na sobnoj temperaturi od 25 °C pokazali su da blago lužnata otapala koja sadrže ureu ili etilen-glikol imaju povoljniji utjecaj na stabilnost NADH/NAD^+ koenzima od blago kiselih otapala koja sadrže glicerol.

6.Literatura

1. Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K., Tambyrajah V. (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications* **1**: 70-71.
2. Anastas P., Eghbali N. (2010) Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews* **39**: 301-312.
3. Anonymous (2017) School of Biomedical Sciences Wiki – Alcohol dehydrogenase, <https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/index.php/Alcohol_dehydrogenase> Pristupljeno 9. kolovoza 2020.
4. Bommarius A. S., Riebel B. R. (2004) Biocatalysis, 1. izd., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. str. 1-39.
5. BRENDA (2012) BRaunschweig ENzyme DAtabase - The comprehensive enzyme information system. <<https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer.php?browser=1>> Pristupljeno 4. rujna 2020.
6. Cvjetko Bubalo M., Panić M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. (2016) Metode pripreve eutektičkih otapala/Methods for deep eutectics solvents preparation. *Hrvatski Časopis za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam* **11**: 164.
7. Cvjetko Bubalo M., Vidović S., Radojčić Redovniković I., Jokić S. (2015) Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **90**: 1631-1639.
8. Dai Y., Spronsen J., Witkamp G. J., Verpoorte R., Choi Y. H. (2013) Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. *J. Nat. Prod.* **76**: 2162-2173.
9. Drauz K., Gröger H., May O. (2012) Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, 3. izd., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. str. 1-14.
10. Earle M. J., Seddon K. R. (2002) Ionic liquids: green solvents for the future. *Pure and Applied Chemistry* **72**: 1391-1398.
11. Faber K. (2011) Biotransformations in Organic Chemistry, 6. izd., Springer. str. 1 - 268.
12. Fukazawa K., Ishihara K. (2016) Enhanced stability of NADH/dehydrogenase mixture system by water-soluble phospholipid polymers. *Biomaterials and Biomechanics in Bioengineering* **3**: 37-46.
13. Ghanem A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**: 1721-1754.

14. Ghisalba O., Meyer H. P., Wohlgemuth R. (2009) Industrial biotransformation. U: *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*, Flickinger M. C., John Wiley & Sons, 1-18.
15. Grogan G. (2009) Practical biotransformations: a beginner's guide, John Wiley & Sons. str. 1-41, 167-178.
16. Gu Y., Jérôme F. (2013) Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chemical Society Reviews* **42**: 9550-9570.
17. Gupta P., Mahajan A. (2015) Green chemistry approaches as sustainable alternatives to conventional strategies in the pharmaceutical industry. *RSC Advances* **5**: 26686-26705.
18. Hjeresen D. L., Boese J. M., Schutt D. L. (2000) Green chemistry and education. *Journal of Chemical Education* **77**: 1543.
19. Jia R., Hu Y., Huang H. (2014) Improving the catalytic performance of porcine pancreatic lipase in the presence of [MMIm][MeSO₄] with the modification of functional ionic liquids. *Process Biochemistry* **49**: 668-672.
20. Kärkkäinen J. (2007) Preparation and characterization of some ionic liquids and their use in the dimerization reaction of 2-methylpropene, 1. izd., Acta University of Oulu, str. 15-21.
21. Kudłak B., Owczarek K., Namieśnik J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents - a review. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 11975 - 11992.
22. Nian B., Cao C., Liu Y. (2020) How Candida antarctica lipase B can be activated in natural deep eutectic solvents: experimental and molecular dynamics studies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **95**: 86-93.
23. Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014) Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2**: 1063-1071.
24. Rauber D., Philippi F., Seibert J., Huwer J., Natter H., Hempelmann R. (2019) From Current Science to School—the Facets of Green Chemistry on the Example of Ionic Liquids. *WJCE* **7**: 153-165.
25. Rogers R. D., Seddon K. R. (2003) Ionic liquids--solvents of the future? *Science* **302**: 792-793.
26. Rover Jr L., Fernandes J. C., de Oliveira Neto G., Kubota L. T., Katekawa E., Serrano S. H. (1998) Study of NADH stability using ultraviolet-visible

- spectrophotometric analysis and factorial design. *Analytical biochemistry* **260**: 50-55.
27. Sigma-Aldrich β -Nicotinamide adenine dinucleotide – Product information <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n8285pis.pdf> Pristupljeno 8. rujna 2020.
28. Strohmeier G. A., Pichler H., May O., Gruber-Khadjawi M. (2011) Application of Designed Enzymes in Organic Synthesis. *Chemical Reviews* **111**: 4141–4164.
29. Zhang Q., De Oliveira Vigier K., Royer S., Jérôme F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**: 7108 - 7146.
30. Zhang Z., Xu B., Luo J., Von Solms N., He H., Zhang Y., Pinelo M, Zhang S. (2018) Ionic Liquids as Bifunctional Consolvents Enhanced CO₂ Conversion by NADH-Dependent Formate Dehydrogenase. *Catalysts* **8**: 304.

Izjava o izvornosti

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

Božica Lilić

ime i prezime studenta