

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2020

Mia Radović
1015/MB

**UTJECAJ PRIRODNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA NA
AKTIVNOST I SKLADIŠNU
STABILNOST IMOBILIZIRANE I
SLOBODNE LIPAZE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Manuele Panić, mag. ing.

Posebnu zahvalu želim uputiti cijeloj svojoj istraživačkoj grupi, Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, što su vjerovali u mene kada ja nisam, dali mi priliku, nadu i motivaciju. Veliko hvala roditeljima i cijeloj obitelji na konstantnoj podršci te što su me tjerali da budem najbolja verzija sebe. Završno, posebno hvala svim prijateljima zbog kojih će ovo studentsko doba biti nezaboravno.

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

UTJECAJ PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA AKTIVNOST I SKLADIŠNU

STABILNOST IMOBILIZIRANE I SLOBODNE LIPAZE

Mia Radović, 1015/MB

Sažetak: Implementacija načela zelene kemije upotrebom prirodnih eutektičkih otapala (NADES) u biokatalizi omogućuje unaprijeđenje procesa kroz bolju supstratnu topljivost, poboljšanu enzimsku aktivnost i stabilnost. U ovom radu utvrđuje se najpovoljnije otapalo koje može poslužiti kao reakcijski i skladišni medij za slobodnu (sLip) i imobiliziranu (imLip) *C. antarctica* lipazu B. U tu svrhu ispitana su tri NADES-a (ChEG, ChGly, ChGlc) sa različitim udjelima vode (10, 30 i 50 % (v/v)). Inkubacija enzima u svim otapalima 28 dana pri 25 °C, pokazala je nadmoćniju stabilnost i aktivnost imLip u odnosu na sLip. Dok sLip zadržava maksimalno 40 % rezidualne aktivnosti nakon 28 dana inkubacije (u ChGlc_{30%}), aktivnost imLip pada sporije, pri čemu u istom periodu zadržava i do 67 % aktivnosti (u ChGly_{10%}). Zaključno, ChGly izdvaja se kao NADES s najvećim potencijalom da postane stabilizirajući medij za lipaze.

Ključne riječi: zelena kemija, prirodna eutektička otapala, lipaza, biokataliza, skladična stabilnost

Rad sadrži: 48 stranica, 17 slika, 4 tablice, 67 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag. ing

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo
2. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
4. Izv.prof.dr.sc. Senka Djaković

Datum obrane: 23. siječnja 2020.

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

NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT IMPACT ON ACTIVITY AND STORAGE STABILITY OF IMMOBILIZED AND FREE LIPASE FORM

Mia Radović, 1015/MB

Abstract: Implementation of green chemistry principles through the use of natural deep eutectic solvents (NADES) in biocatalysis can improve reaction efficiency and sustainability through better substrate solubility, improved enzyme activity and stability. To determine the best solvent to act as reaction and stabilization medium for immobilized (imLip) and free (sLip) *C. antarctica* lipase B, three NADES (ChEG, ChGly, ChGlc) with different water shares (10, 30 i 50 % (w/w)) have been assessed. Enzyme incubation in these solvents at 25 °C during the period of 28 days has shown greater activity and stability of imLip in regard to the sLip. While sLip maintains up to 40 % residual activity after 28 day incubation period (in ChGlc_{30%}), imLip keeps a significantly higher value in the same period, up to 67% (in ChGly_{10%}). Finally, ChGly steps out as the best NADES that could potentially serve as lipase stabilizing medium.

Keywords: green chemistry, natural deep eutectic solvents, lipase, biokatalysis, storage stability

Thesis contains: 48 pages, 17 figures, 4 tables, 67 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: Ivana Radojčić Redovniković, prof.dr.sc.

Technical support and assistance: Manuela Panić, mag. ing

Reviewers:

1. PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor
2. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
3. PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor
4. PhD. Senka Djaković Associate professor (substitute)

Thesis defended: 23 January 2020

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Zelena kemija i zelena otapala	3
2.2. Prirodna eutektička otapala	4
2.2.1. Dizajniranje prirodnih eutektičkih otapala	4
2.2.2. Priprema prirodnih eutektičkih otapala.....	6
2.2.3. Svojstva prirodnih eutektičkih otapala	7
2.2.4. Primjena prirodnih eutektičkih otapala.....	8
2.3. Lipaze u biotehnologiji.....	11
2.3.1. Struktura enzima i mehanizam reakcija.....	13
2.3.2. Imobilizacija lipaza.....	14
2.3.3. <i>Candida antarctica</i> lipaza B.....	15
2.3.4. Aktivnost, selektivnost i stabilnost lipaza.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Kemikalije	17
3.1.2. Enzimi	17
3.1.3. Oprema i uređaji	17
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala	18
3.2.2. Određivanje aktivnosti lipaza	19
3.2.3. Određivanje (skladišne) stabilnosti lipaza	22
3.3. Obrada podataka.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Izbor i priprema otapala	25
4.2. Odabir prirodnih eutektičkih otapala za imobiliziranom <i>Candida antarctica</i> lipazom B kataliziranu hidrolizu butil-etanoata.....	26

4.3. Odabir prirodnih eutektičkih otapala za slobodnom <i>Candida antarctica</i> lipazom B kataliziranu hidrolizu butil-etanoata.....	33
4.4. Usporedba slobodne i imobilizirane <i>Candida antarctica</i> lipaze B.....	39
4.5. Doprinos istraživanja.....	40
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

U posljednja dva desetljeća potreba za zaštitom okoliša postala je imperativ u svakodnevnom životu zbog globalnih promjena s kojima se suočavamo. Kao odgovor na te promjene nastala je zelena kemija koja nudi konkretne smjernice za adaptaciju starih i dizajn novih kemijskih produkata i procesa. Implementacijom zelenih tehnologija moguće je dizajnirati održiv, učinkovit i siguran proces u raznim industrijama.

Budući da otapala značajno doprinose ukupnoj količini proizvedenog otpada u većini industrijskih procesa, intenzivno se proučava upotreba modernih, nekonvencionalnih reakcijskih i skladišnih medija. Iz tehnološke i ekološke perspektive, u centru pozornosti istraživača i industrije našla su se prirodna eutektička otapala koja svojim svojstvima zadovoljavaju principe zelene kemije. Ova netoksična i nezapaljiva otapala mješavina su jeftinih, prirodnih, nehlapljivih i lako dostupnih komponenata pripremljenih mješanjem kvaternih amonijevih soli i donora vodika u specifičnom molarnom omjeru, što rezultira sintezom homogene otopine. Zbog velikog broja mogućih struktura ovih otapala, moguće je dizajnirati otapalo željenih fizikalno-kemijskih svojstava, što čini eutektička otapala prikladnima za raznovrsnu upotrebu, posebice u biokatalizi. Također, njihov potencijal leži u unaprijeđivanju učinkovitosti i održivosti procesa kroz bolju supstratnu topljivost te poboljšanu enzimsku aktivnost i stabilnost. Do sada najistraženiji enzimi u tim otapalima su hidrolaze, što je i logično, s obzirom na to da su lipaze najvažniji industrijski enzimi. Unatoč tome, funkcija i upotreba eutektičkih otapala u lipazom kataliziranim reakcijama nije potpuno razjašnjena. Zbog svega navedenog, ovaj rad pokušat će dokazati značaj na tržištu relativno novih, prirodnih eutektičkih otapala u biokatalizi. Točnije, ispitat će se njihov potencijal za djelovanje kao reakcijskih i stabilizirajućih medija za lipaze. Uz to, s obzirom na to da je stabilnost enzima u otapalu važan parametar pri određivanju prihvatljivosti određenog otapala za primjenu u industrijskom mjerilu, nastojat će se izdvojiti optimalni stabilizirajući medij specifično za imobiliziranu i slobodnu *Candida antarctica* lipazu B.

U ovom radu ispitivat će se utjecaj triju različitih prirodnih eutektičkih otapala na dvije glavne osobine enzima, aktivnost i stabilnost, i to za slobodnu i imobiliziranu *Candida antarctica* lipazu B. Za istraživanje su izabrane tri tercijarne otopine koje se najčešće koriste u biokatalizi posredovanoj lipazama. To su otapala na bazi kolin-klorida s varijacijama pri izboru molekula

donora vodika (etan-1,2-diol, glicerol i glukoza) te udjelu vode (10, 30 i 50 % (v/v)). Procjena utjecaja odabranih otapala na aktivnost i stabilnost enzima vršit će se praćenjem modelne hidrolitičke reakcije te usporediti s aktivnosti i stabilnosti enzima u referentnom kalij-fosfatnom puferu. Reakcija će se pratiti kromatografski, kvalitativnom i kvantitativnom analizom produkta reakcije na plinskom kromatografu spregnutim s masenim spektrofotometrom, u vremenu od 240 min i u ukupno 8 točaka tijekom 28 dana, pri sobnoj temperaturi. Skladišna stabilnosti lipaza izrazit će se kao rezidualna aktivnost enzima nakon inkubacije u odabranim otapalima. Kao dodatni parametri za usporedbu aktivnosti imobilizirane i slobodne *Candida antarctica* lipaze B, za svako otapalo će se izračunati pojedinačna iskorištenja i volumetrijske produktivnosti prije inkubacije (u $t = 0$ min).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Zelena kemija i zelena otapala

Ubrzan razvoj i otkrića novih biokatalizatora te sve veća potreba za ekološki prihvatljivim industrijskim procesima potaknula je napredak i upotrebu principa zelene kemije. Zelena kemija definira se kao „dizajniranje kemikalija i procesa tako da reduciraju ili eliminiraju upotrebu i sintezu opasnih supstanci“ (Anastas i Warner, 1998). Anastas i Warner su još 1998. godine postavili dvanaest principa zelene kemije, među kojima su i koncepti „dizajn sigurnih kemikalija“ i „sigurnija otapala i pomoćna sredstva“. Konstruiranih dvanaest principa nisu samostalne smjernice, već kohezivni sustav za dizajn novih kemijskih produkata i procesa. Samo primjenom svih principa moguće je stvoriti održiv, učinkovit i siguran proces (Anastas i Eghbali, 2010).

Kao najveći onečišćivači i većina mase korištena u katalitičkim procesima, otapala zauzimaju veliku pozornost istraživača i industrije (Constable i sur., 2002). Otapala za biokatalizu konstantno se usavršavaju i unaprjeđuju, a do sada su doživjela više generacija. **Voda** kvalitativno i kvantitativno najviše odgovara načelima zelene kemije. Unatoč tome, zbog svoje visoke polarnosti ona predstavlja problem za brojne hidrofobne organske supstrate koji se ne mogu otapati u vodenom mediju. Također, procesi uklanjanja vode iz reakcijske smjese vrlo su skupi, a u vodenim medijima često se odvijaju i nepoželjne sporedne reakcije poput polimerizacije, hidrolize i racemizacije. Zbog svega navedenog, u gotovo svim industrijski važnim bioprocima široka upotreba vode nastoji se izbjeći (Xu i sur., 2017). **Organska otapala** kao reakcijski medij posjeduju značajne prednosti, kao što su bolje iskorištenje procesa, lakše uklanjanje otapala zbog niže točke vrelišta, manja stopa inaktivacije/inhibicije supstrata i/ili produkta, niža mogućnost denaturacije biokatalizatora te suprimiranje nusreakcija. Unatoč brojnim prednostima, organska otapala suočavaju se s brojnim nedostacima kao što su zapaljivost, hlapivost i inhibicija aktivnosti biokatalizatora. Kao nova alternativna otapala koja prate načela zelene kemije, na tržištu su dostupne **ionske kapljevine**. One nadoknađuju nedostatke organskih otapala i pokazuju poboljšana tehnološka svojstva poput sigurnosti za manipulaciju zbog nehlapljivosti i nezapaljivosti. Usprkos svemu navedenom, zbog sumnje u ekološku i okolišnu benignost ionskih kapljevinama daljnja istraživanja i napredak u razvoju novih zelenijih otapala od višestruke su važnosti (Cvjetko Bubalo i sur. 2014). Kao alternativa ionskim kapljevinama, razvila su se **eutektička otapala**, nosioci titule „otapala 21. stoljeća“ (Paiva i sur., 2014; Alonso i sur., 2016).

2.2. Prirodna eutektička otapala

Većina postojećih organskih otapala ne zadovoljava načela zelene kemije te je potrebno prilagoditi do sada primjenjivane procese u industriji kako bi odgovarali tim zahtjevima. Brojna istraživanja dokazala su da upravo eutektička otapala mogu biti izvrsna zamjena za klasična organska otapala (Paiva i sur., 2014; Smith i sur., 2014). Pojam eutektičko otapalo (eng. Deep eutectic solvent, DES) prvi su opisali Abbott i sur. (2003). Do danas je poznato mnogo strukturnih varijacija ovih otapala ($>10^6$) zbog čega se smatraju „dizajnerskim otapalima“ (Liu i sur., 2018). Posebnom vrstom DES-a smatra se prirodno eutektičko otapalo (eng. Natural deep eutectic solvents, NADES), nastalo miješanjem prirodnih primarnih metabolita i predstavnika iz skupine akceptora vodika. Svi DES-ovi koji imaju potencijal sudjelovati u dizajnu lijekova, kao pomoćna tvar u njihovoj formulaciji, nazivaju se terapijska eutektička otapala (eng. Therapeutic deep eutectic solvents, THEDES).

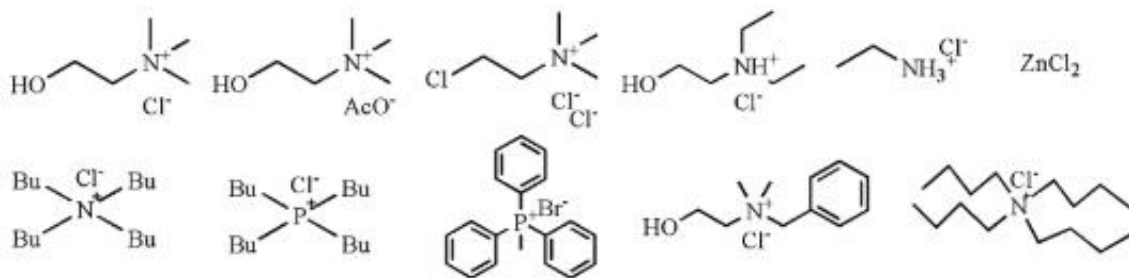
Zanimljivo je da je analiza metaboloma primjenom nuklearne magnetske rezonance (NMR) ukazala na postojanje NADES-a kao trećeg medija u organizmu uz vodu i lipide. Naime, NADES-i biljkama mogu pomoći preživjeti uvjete bez vode, a imaju značajnu ulogu i u sintezi intracelularnih makromolekula (Xu i sur., 2017). Dodatna istraživanja ovih otapala mogla bi otkriti dosad nepoznatu vezu između staničnog metabolizma i fiziologije.

2.2.1. Dizajniranje prirodnih eutektičkih otapala

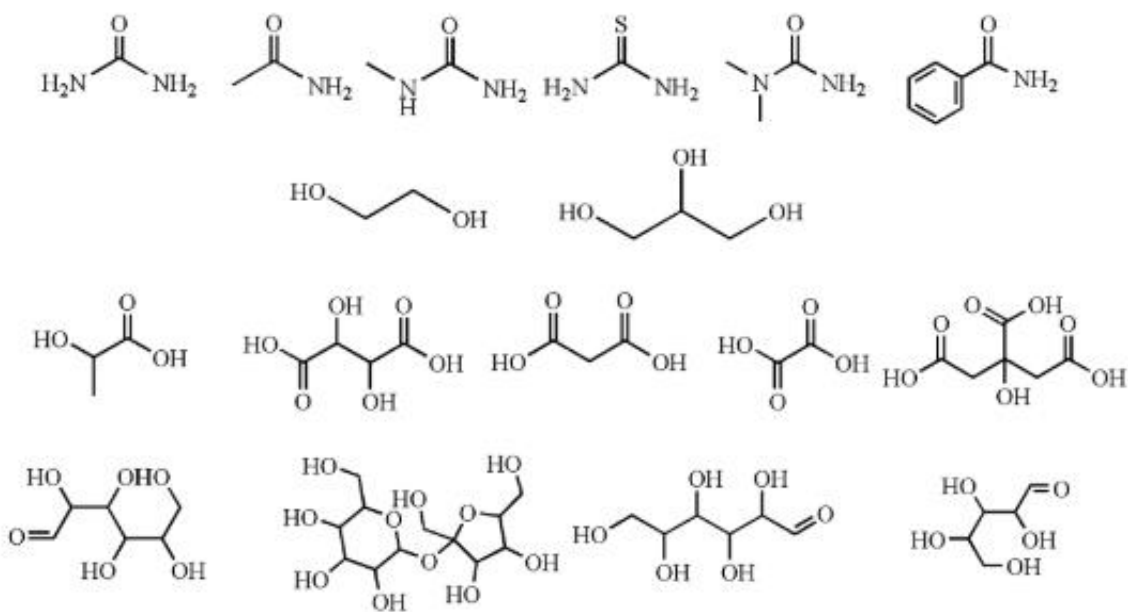
Strukturu NADES-a određuje odabir minimalno dviju komponenti koje ulaze u sastav otapala. Sastavnice otapala jeftine su, lako dostupne i netoksične te se mogu samostalno povezati vodikovim vezama kada su pomješane u određenom molarnom omjeru (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b). Najčešće se formiraju miješanjem/kombinacijom akceptora i donora vodika (slika 1). Akceptori vodika uglavnom su kvarterne amonijeve soli poput kolin-klorida i etilamonij-klorida. Za izbor donora vodika postoji više opcija među gotovim i lako dostupnim nenabijenim komponentama primarnih metabolita: amini, šećeri (npr. glukoza, saharoza, ksiloza i dr.), alkoholi (npr. ksilitol, sorbitol), polioli (npr. etan-1,2-diol, glicerol), organske kiseline (npr. mliječna), itd. Osim sekundarnih smjesa sastavljenih od jednog akceptora i jednog donora vodika, uz dodatak vode mogu se sintetizirati i tercijarne smjese.

a)

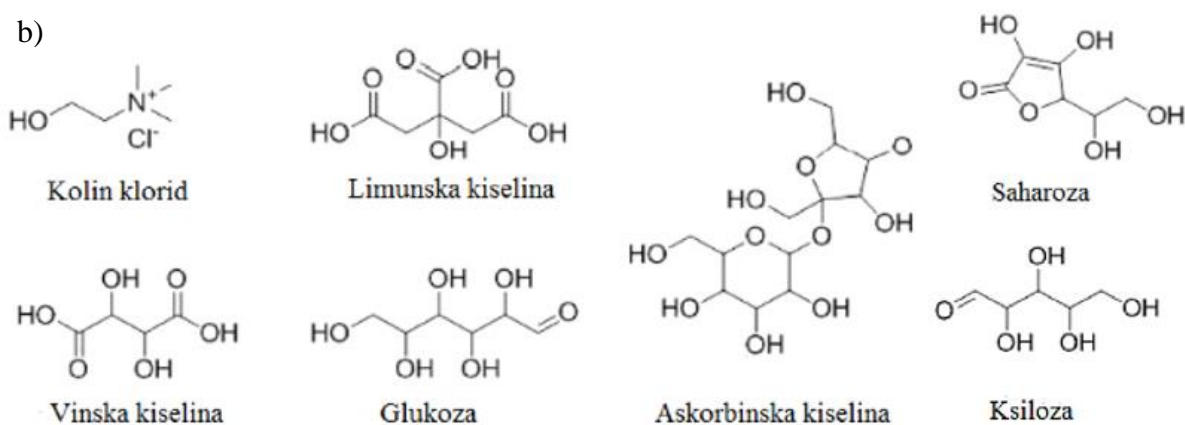
Akceptori vodika/Halogene soli



Donori vodika



b)



Slika 1. Kemijske strukture različitih komponenata koje mogu formirati (prirodna) eutektička otapala. a) primjeri akceptora i donora vodika za sintezu DES-a (Xu i sur., 2017) b) primjeri akceptora i donora vodika za sintezu NADES-a (Paiva i sur., 2014).

2.2.2. Priprema prirodnih eutektičkih otapala

Nakon odabira željenih komponenti, pristupa se pripremi otapala. Postoji više načina pripreme eutektičkih smjesa, ali sve procese odlikuju jednostavnost i blagi uvjeti pripreme (sobna temperatura i atmosferski tlak), što odgovara načelima zelene kemije. Ako su odabrane komponente higroskopne, prije upotrebe potrebno ih je osušiti. Sušenje je ključan korak jer voda u sastavnicama direktno utječe na njihove odvage, a time i njihov konačan molarni omjer. Jednom kada se formira NADES, rezidualna voda više se ne može u potpunosti ukloniti jer molekule vode također sudjeluju u formiranju mreže jakih vodikovih veza s komponentama NADES-a. Prilikom sinteze sekundarnih eutektičkih otapala sačinjenih od jednog donora i jednog akceptora vodika dolazi do interakcije sastavnica, pri čemu nastale intramolekularne vodikove veze i delokalizacija naboja snižavaju točku taljenja smjese te formiraju tekuće-čvrstu fazu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b). Zbog tog svojstva, eutektička otapala nazivaju se novom generacijom tekućih soli (Elgharbawy i sur., 2018). Pri pripremi tercijarnih NADES otopina, voda se može dodati nakon ili tijekom sinteze, uz akceptora i donora vodika. Za formiranje eutektičkog otapala potreban je mehanički, termalni ili ne-termalni izvor energije.

Postoji više metoda pripreme NADES-a: i) usitnjavanje komponenti pri sobnoj temperaturi u tarioniku, ii) konstantno miješanje uz zagrijavanje pri temperaturama od 50 °C do 80 °C, iii) metoda isparavanja, iv) metoda zaleđivanja i sušenja i v) korištenje alternativnih izvora energije poput ultrazvuka i mikrovalova (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b; Ruesgas-Ramon i sur., 2017). Kao najbolji izbor ističe se mehanički izvor energije (usitnjavanje u tarioniku), jer se njime izbjegava degradacija NADES-a. Druga najbolja i ujedno najupotrebljivija metoda miješanje je uz zagrijavanje koje se odvija u par sati. Alternativni izvori energije značajno skraćuju vrijeme pripreme pa se izdvajaju kao najbrža metoda.

Nakon pripreme otapala, strukturu i čistoću NADES-ova potrebno je potvrditi raznim analizama, poput proton nuklearne magnetske rezonance (^1H -HMR), diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) ili Fourierove infracrvene spektroskopije (FT-IR) (Liu i sur., 2018; Panić i sur., 2019). Zaključno, otapala je potrebno pravilno skladištiti kako bi se izbjegle interakcije sa zrakom.

2.2.3. Svojstva prirodnih eutektičkih otapala

Mnoga konvencionalna otapala toksična su, zapaljiva i korozivna. Zbog mogućnosti isparavanja i dobre topljivosti u raznim medijima doprinose onečišćavanju zraka, vode i tla. Uz to, mogu uzrokovati ozbiljne nesreće i izlagati radnike i korisnike štetnim utjecajima (Anastas i Eghbali, 2010). Eutektička otapala razvijena su kako bi nadišla sve te nedostatke.

Glavni su parametri za određivanje ekološke prihvatljivosti otapala toksičnost (citotoksičnost) i biološka razgradivost. DES-ovi se općenito kategoriziraju kao otapala nepostojeće ili niske (cito)toksičnosti za laboratorijske životinje te lako i brzo biorazgradiva otapala. Budući da je većina eutektičkih otapala građena od prirodnih komponenata (NADES-i), ona se mogu jednostavno i relativno brzo razgraditi različitim prirodnim (mikro)organizmima (Radošević i sur., 2015; Zarewski i sur. 2016). Jedan od primjera donora vodika korištenih za sintezu NADES-a je glicerol, koji može ući u metabolički put glikolize ili glukoneogeneze da bi se u nizu reakcija potpuno metabolizirao (Mbous i sur., 2017). Mehanizam i kinetiku biorazgradnje uvjetuje struktura akceptora i donora vodika, točnije broj hidroksilnih skupina koje one posjeduju (Radošević i sur., 2015). Unatoč tome, dokazano je da varijacije u strukturi korištenih komponenata bitno utječu na te parametre (Hayyan i sur., 2013). Njihova biorazgradivost zavisi prvenstveno o tvarima koje ulaze u njihov sastav, stoga se NADES-i zbog svog prirodnog podrijetla potpuno uklapaju u koncept zelene kemije. Zbog potencijalne industrijske primjene u velikom mjerilu, citotoksični i genotoksični učinak svakog sintetiziranog NADES-a potrebno je ponovno ispitati. Nadalje, s obzirom na to da su individualne komponente NADES-ova krutine ili nezapaljive tekućine, NADES-i su slabo hlapljivi i nezapaljivi (Paiva i sur., 2014), čime se smanjuje rizik od eksplozija i požara u organskim reakcijama u kojima je NADES otapalo. Niska točka ledišta (T_f) osigurava da tekućine ostaju u biokatalitičkim procesima, a određena je mnogim faktorima. Primjerice, dokazano je da povećan broj hidroksilnih grupa molekula koje djeluju kao donori vodika u NADES-u povećava vrijednost točke ledišta. Tako kolin-klorid otapalo s glicerolom sadrži 3 hidroksilne grupe i $T_f = -40$ °C, a s etan-1,2-diolom dvije hidroksilne grupe i $T_f = -66$ °C (Zhang i sur., 2012). Dodatne dvije karakteristike NADES-ova generalno su visoka gustoća i viskoznost koje utječu na transfer mase. Kao funkcije temperature, gustoća i viskoznost snižavaju se s porastom temperature (Zhao i sur., 2015).

Zaključno, dokazano je da su fizikalno-kemijska svojstva u funkciji sastava NADES-a. Zbog velikog broja kombinacija sastavnica koje ih mogu tvoriti postoji potreba za razvojem novih matematičkih modela koji će moći predvidjeti odnos strukture i aktivnosti otapala.

2.2.4. Primjena prirodnih eutektičkih otapala

Zbog konstantnog pritiska i imperativa u formiranju ekološki prihvatljivih procesa u svim industrijama, a pogotovo kemijskoj, načela zelene kemije i eutektička otapala sve se više istražuju kako bi se mogla učinkovito implementirati (Sheldon, 2017). Zbog mogućnosti inženjeringa eutektičkih otapala, prikladna su za raznovrsnu upotrebu u organskoj kemiji, biokatalitičkim procesima te procesima separacije i ekstrakcije organskih i anorganskih spojeva. Jedna od glavnih djelatnosti kemijske i farmaceutske industrije sinteza je kiralnih spojeva visoke enantiomerne čistoće u proizvodnji lijekova, poljoprivrednih i ostalih kemikalija primjenjivih na prirodne sustave. Biološki sustavi mogu prepoznati različite optičke izomere te kao posljedicu interakcije s kiralnim okruženjem uzrokovati različite i često suprotne fiziološke odgovore. Asimetrična sinteza prokiralnih spojeva vrši se enzimski, a kao reakcijski medij tih reakcija sve se češće koriste eutektička otapala. Njima je moguće modulirati enzimsku aktivnost, selektivnost i stabilnost (Guajardo i sur., 2018). Veliki problem proizvodnje na industrijskoj razini brojni su hidrofobni supstrati koji su u reakcijskoj smjesi prisutni u niskim koncentracijama. Unatoč tome, dokazano je da su NADES-i pogodan reakcijski medij za biokatalizu s jako hidrofobnim supstratima (Fredes i sur., 2019). Nadalje, zbog sposobnosti doniranja i prihvatanja protona i elektrona odlični su kandidati za otapanje raznolikih materijala poput soli, aminokiselina, proteina, šećera, lijekova, itd. Osim navedenog, mogu otapati različite metalne okside, zbog čega se koriste i u elektrokemijskim procesima poput elektropoliranja ili elektropozicije. Pored svega, mogu se koristiti kao mediji u multikomponentnim reakcijama, elektrofilnim supstitucijama, nukleofilnim reakcijama, kopolimerizacijama, katalitičkom sparivanju C-C veza, itd. (Durand i sur., 2013).

Biokataliza u NADES sustavima

Biokataliza se definira kao reakcija katalizirana biokatalizatorom kao što je izolirani enzim ili cijela stanica (Xu i sur., 2017). Postojeći biokatalitički procesi u industriji zahtijevaju konstantno usavršavanje kako bi mogli pratiti ubrzane ekološke te društveno-ekonomske promjene u svijetu. Prilikom dizajna biokatalitičkog procesa važno je minimizirati upotrebu pomoćnih reagensa i otapala za sve reakcije i korake pročišćavanja kako bi se proizveo minimalni otpad po jedinici

sintetiziranog produkta. Budući da se svojstva eutektičkih otapala mogu lagano modelirati izborom sastavnica, eutektička otapala imaju višestruku ulogu u brojnim biotransformacijama (tablica 1), gdje mogu sudjelovati u različitim tipovima reakcija, poput esterifikacije, hidrolize, redukcije ili oksidacije. Mogu se koristiti kao čista otapala, kootapala u vodenim medijima i dijelovi dvofaznog sustava ili supstrati u reakcijama biokatalize (Faber, 2011). Dokazana je veća učinkovitost DES-a u lipazom kataliziranim reakcijama u odnosu na ionske kapljevine i organska otapala (Gorke i sur., 2008). Osim što mogu utjecati na tijek biokatalize, mogu utjecati i na strukturu i aktivnost biokatalizatora (Xu i sur., 2017). Tako, primjerice, povećanje molarnog omjera donora vodika u NADES-ovima na bazi kolin-klorida (npr. sa 2:1 na 1:2) povećava udio α -uzvojnica u peroksidazi hrena. Posljedično, tercijarna struktura proteina postaje otvorenija, a enzim pokazuje bolju aktivnost i stabilnost (Wu i sur., 2014).

Potražnja sve kompleksnijih proizvoda, proizvoda s višestrukim funkcijama i kiralnošću izdvaja enzime kao najprikladnije industrijske biokatalizatore (Ferreira-Leitão i sur., 2017). U svakom je bioprosesu nakon odabira biokatalizatora potrebno odabrati adekvatno otapalo u kojem se odvija željena reakcija (reakcijski medij) i otapalo za održavanje aktivnosti te stabilnosti biokatalizatora kroz dulji vremenski period (skladišni medij). Zbog svojih jedinstvenih karakteristika poput niske hlapivosti, visoke termalne stabilnosti, biorazgradivosti i niske toksičnosti, razmatra se upotreba modernih, nekonvencionalnih medija poput eutektičkih otapala kao reakcijskih i skladišnih medija u biokatalizi.

Tablica 1. Primjeri najčešćih reakcija kataliziranih enzimima ili cijelim stanicama u eutektskim otapalima

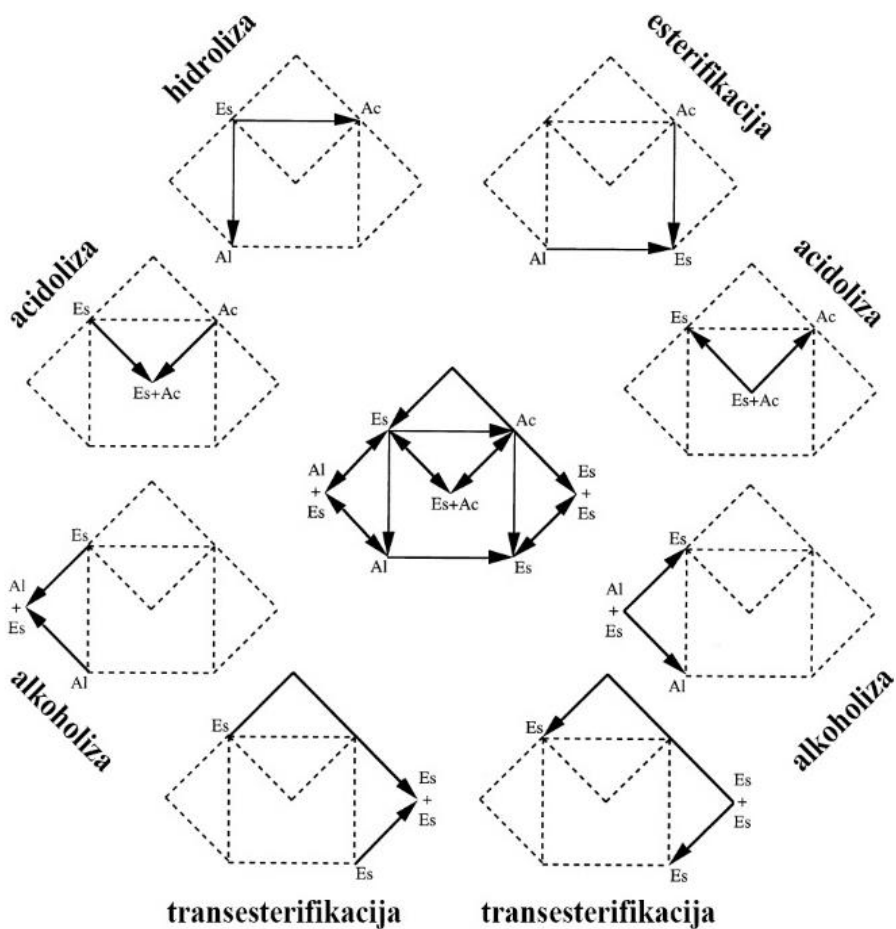
	Analizirani DES	Biokatalizator	Izvor
ESTERIFIKACIJA	1 ChGly*, ChU, ChEG, MetGly		(Guajardo i sur., 2017)
	2 ChU*, ChGly*, ChOx, ChMo, ChEG, EACU, EACGly	<i>Candida antarctica</i> lipaza B (Novozyme 435)	(Durand i sur., 2012)
	3 ChGly, ChEG*·ChU		(Cvjetko Bubalo i sur., 2015a)
	4 ChU, ChGly*, CitGlc, FruScu, CitFru, CitScu, CitSol		(Ülger i Takaç, 2017)
HIDROLIZA	5 ChGly, ChU, ChEG*, ChDEG, EACGly, DEACEG, DEACTEG		<i>Burkholderia cepacia</i> lipaza
	6 ChGlc, ChXyl, ChXylol, ChGly, ChEG*	Korijen mrkve	(Panić i sur., 2017)
	7 ChU, ChGly*, CitGlc, FruScu, CitFru, CitScu, CitSol	<i>Candida antarctica</i> lipaza B (Novozyme 435)	(Ülger i Takaç, 2017)
REDUKCIJA	8 ChGlc*, ChGly*, ChEG		(Panić i sur., 2018)
	9 ChGly*, ChEG, ChOx, ChMa, ChGlc*, ChFru*, ChXyl*, ChU	liofiliziran pekarski kvasac	(Cvjetko Bubalo i sur., 2015b)
	10 ChGlc*, ChXyl, ChXylol, ChGly, ChEG	carrot root	(Panić i sur., 2017)
	11 ChGly	<i>Candida viswanathi</i> AM120	(Maćzka i sur., 2018)
	12 ChGly	Pekarski kvasac	(Maugeri i Domínguez De María, 2014)
	13 ChGly	<i>Ralstonia</i> sp. alkohol dehidrogenaza (ADH), <i>Thermoanaerobacter</i> ADH i ADH iz konjske jetre overeksprimirana u <i>Escherichia coli</i>	(Müller i sur., 2015)
	14 ChGly, ChEG*, ChU	rekombinantne stanice s aldo-keto reductazama i glukoza dehidrogenazom	(Xie i sur., 2019)

*optimalno otapalo za najviše reakcijske prinose

Kratice: kolin-klorid (Ch), limunska kiselina (Cit), *N,N*-dietil etanol amonij klorid (DEAC), dietilen glikol (DEG), etilamonij klorid (EAC), etan-1,2-diol (EG), fruktoza (Fru), glukoza (Glc), glicerol (Gly), jabučna kiseina (Ma), metilamonij klorid (Met), malonska kiselina (Mo), oksalna kiselina (Ox), sorbitol (Sol), saharoza (Scu), trietilen glikol (TEG), urea (U), ksiloza (Xyl), ksilitol (Xylol).

2.3. Lipaze u biotehnologiji

Lipaze (triacilglicerol hidrolaze, EC 3.1.1.3.) su biokatalizatori koji pripadaju skupini hidrolaza. Ovi enzimi nalaze se u skoro svim živim organizmima, uključujući i viruse, gdje ih odlikuje mogućnost obavljanja širokog spektra aktivnosti i široka supstratna specifičnost. Uglavnom sudjeluju u metabolizmu masti, ali zbog svoje karakteristične strukture imaju sposobnost katalizirati brojne druge reakcije (slika 2). Možemo ih podijeliti u dvije glavne skupine: reakcije hidrolize i reakcije sinteze u vodi netopljivih estera, prirodnih ili sintetskih triacilglicerola (Gandhi, 1997). Smjer reakcije diktira medij u kojem se ona odvija, pa tako u vodenim medijima lipaze kataliziraju hidrolizu estera, a u organskim otapalima sintezu istog supstrata (Klibanov, 2001). Zbog velike prilagodljivosti i promjenjivosti, uz nisku cijenu i mogućnosti katalize bez upotrebe koenzima, prepoznati su kao najvažnija skupina industrijskih enzima, čije je, primjerice, globalno tržište 2018. procijenjeno na 425 milijuna američkih dolara (Anonymus, 2020).



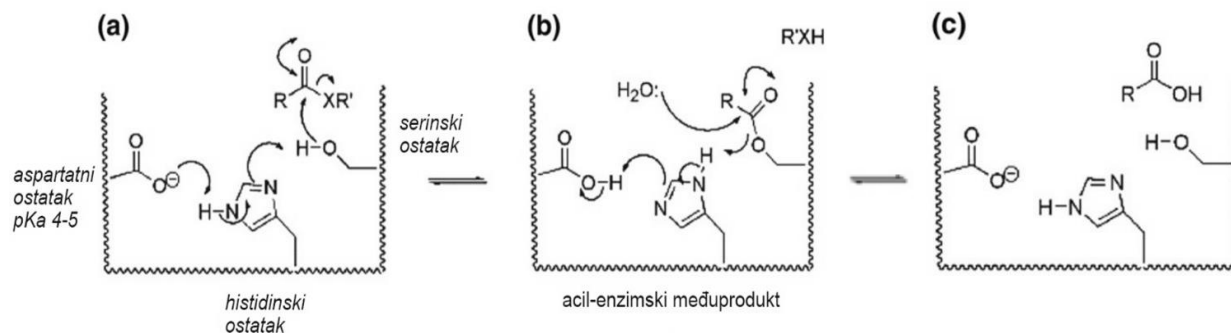
Slika 2. Pregled reakcija kataliziranih lipazama. Reaktanti su shematski pozicionirani na početku, a produkti na kraju strelica. Kratice: ester (Es), alkohol (Al), kiselina (Ac) (Paiva i sur., 2000).

Već je u 19. stoljeću otkrivena prva lipaza, 1856. godine, kada je Claude Bernard otkrio proteine u soku gušterače koji hidroliziraju netopljive kapljice ulja u topljive proizvode. Do danas je identificirano, izolirano i okarakterizirano više od 50 lipaza različitog podrijetla (Paiva i sur., 2000), što ih ujedno čini jednim od najviše upotrijebljenih i proučavanih enzima. Koriste se u brojnim industrijama poput prehrambene (proizvodnja stočne hrane i okusa za mliječne proizvode te industrija ulja), farmaceutske (proizvodnja kiralnih lijekova i rezolucija racemičnih smjesa), kozmetičke (proizvodnja parfema i krema za kožu), tekstilne (obrada kože i proizvodnja sintetskih materijala), kemijske industrije (proizvodnja detergenata, agrokemikalija, biodizela, obrada otpadnih voda, uklanjanje boje sa otpadnog papira), itd. (Gandhi, 1997). Reakcije katalizirane lipazama odvijaju se pri blagim uvjetima, što posebno pogoduje sintezi osjetljivih proizvoda koji na tržištu predstavljaju najskuplju skupinu proizvoda (Sharma i sur., 2001). Uz to, blagi reakcijski uvjeti pogoduju razvoju ekološki prihvatljivih bioprocasa koji u današnje vrijeme predstavljaju imperativ u održivom poslovanju. Zbog toga su lipaze atraktivan biokatalizator pri konstrukciji novih i adaptaciji starih bioprocasa, posebice iz aspekta očuvanja okoliša.

2.3.1. Struktura enzima i mehanizam reakcija

Lipaze su proteini topljivi u vodi koji posjeduju katalitičku aktivnost u dvofaznim i jednofaznim sustavima, s napomenom da je ona u jednofaznim sustavima nešto manja. Međutim, ako supstrat u reakcijskom mediju u jednofaznom sustavu prijeđe koncentraciju topljivosti, on se izdvaja kao emulzija ili micelij, pri čemu tvori drugu fazu. Budući da je supstratnom modelu aktivnost lipaza pod direktnom kontrolom koncentracije supstrata na granici faza, u tom se slučaju lipaze aktiviraju i započinju interfaznu katalizu (Reis i sur., 2009). Prema tome, okoliš u kojem lipaze najčešće djeluju i u kojem posjeduju najveću hidrolitičku aktivnost sastoji se od minimalno dvije faze (dvofazni sustav s organskom i vodenom fazom). Enzim se veže na granici tih faza, konformacijski se mijenja i tada može katalizirati reakciju, što objašnjava enzimski model (Paiva i sur., 2010). U neaktiviranom obliku, aktivno mjesto građeno od katalitičke trijade (serin-histidin-aspartat/glutamat) zaklanja „poklopac“ građen od α -zavojnice i polipeptida koji kontrolira pristup supstratu. Aktivacijom na granici faza poklopac se uklanja i aktivno mjesto postaje dostupnije. Ta pojava naziva se aktivacija na granici faza (Ghanem, 2007), a mehanizam koji ju opisuje dobro je istražen (Reis i sur., 2009).

Mehanizam reakcija kataliziranih lipazama predočen je na slici 3. Reakcija započinje aktivacijom aminokiseline serin u aktivnom mjestu enzima, tako što, uz prisustvo histidina i aspartata, dolazi do deprotoniranja serinskog bočnog ogranka (slika 3a). U drugom koraku hidroksilna (-OH) skupina bočnog ogranka serina nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom supstrata te nastaje acil-enzimski međuprodukt, uz oslobađanje molekule alkohola (slika 3b). Završno, nukleofilna molekula poput vode ili monoglicerida napada acilirani enzim i oslobađa produkt, pri čemu se regenerira aktivno mjesto (slika 3c). Ovaj korak deaciliranja enzima pod kontrolom je elektronegativnosti molekula na granici faza.



Slika 3. Mehanizam lipazom katalizirane reakcije (Reis i sur., 2009).

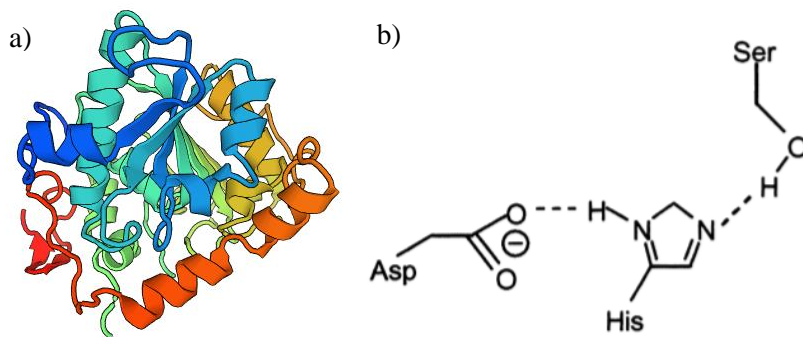
2.3.2. Imobilizacija lipaza

Visoka stabilnost, aktivnost i stereoselektivnost lipaza prvenstveno su odgovorne za njihovu široku upotrebu u biotehnologiji. Unatoč tome, slobodne lipaze su skupi i nedovoljno robusni industrijski biokatalizatori koji se u praksi moraju koristiti u visokim koncentracijama. U današnje vrijeme komercijalna primjena određenog enzima ovisi o postojećim imobilizacijskim tehnikama koje omogućavaju reciklaciju enzima, čime se smanjuje ukupni trošak procesa (Mohamad i sur., 2015). Uz to, nastali produkt (imobilizirana lipaza) mora biti aktivan, poželjno imati poboljšane karakteristike i mora moći podnijeti višestruku upotrebu (Tran i Balkus, 2011).

Poznate su brojne metode imobilizacije lipaza čiji je cilj imobilizirati samo otvoreni oblik lipaza u kojem je polipeptidni poklopac odvojen tako da aktivno mjesto enzima bude dostupno za biokatalizu (Mateo i sur., 2007; Fernandez-Lorente i sur., 2007). Imobilizirana lipaza tako postaje dostupna reaktantima i produktima, ali je fizički odvojena od reakcijskog medija, što osigurava lakšu manipulaciju i postupke pročišćavanja produkta (Paiva i sur., 2010). Zbog afiniteta lipaza prema različitim vrstama nosača, lipaza se može imobilizirati na organskim i anorganskim nosačima (Jesionowski i sur., 2014), a od svih dostupnih metoda najčešće je korištena imobilizacija vezanjem enzima na nosač, i to adsorpcijom (Mateo i sur., 2007). Adsorpcija je jednostavna, jeftina, ne modificira enzim i omogućuje regeneraciju nosača. Budući da lipaze djeluju na hidrofilno-hidrofobnoj granici faza, dokazano je da hidrofobne interakcije imaju glavnu ulogu u adsorpciji lipaza na hidrofobne nosače, a sam je mehanizam adsorpcije na hidrofobni nosač dobro poznat (Paiva i sur., 2000). Iako najčešća, najbrža i najisplativija metoda imobilizacije lipaza, adsorpcija posjeduje brojne nedostatke poput desorpcije enzima s nosača promjenom ionske jakosti. Pri procesu imobilizacije lipaza u obzir je potrebno uzeti niz dodatnih zahtjeva koji nisu nužni za imobilizaciju ostalih enzima, poput: i) tendencije monomernih otvorenih formi lipaza da tvore dimere, ii) izmijenjena svojstva i nižu aktivnost dimera od monomera, iii) nereproducibilnost udjela pojedinog oblika lipaze na nosaču ovisno o uvjetima imobilizacije za različite serije enzima, iv) zasjenjivanje aktivnih mjesta enzima i onesposobljavanje katalize, v) disocijaciju dimernih formi enzima sa nosača i kontaminaciju produkta (Ortiz i sur., 2019). S druge strane, s obzirom na to da je aktivno mjesto lipaza vrlo fleksibilno, pokazano je da imobilizacijski postupci mogu značajno modulirati svojstva lipaza, pozitivno i negativno (Fernandez-Lorente i sur., 2007). Zbog svega navedenog, imobilizacija lipaza zahtjevnija je od ostalih enzima te se prilikom optimizacije procesa u obzir mora uzeti više zahtjeva.

2.3.3. *Candida antarctica* lipaza B

Postoji mnogo poznatih lipaza, a kao specifična za svoju porodicu izdvaja se lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica*. Njezina specifičnost primarna je sekvenca koja ne pokazuje značajnu homologiju niti s jednom poznatom lipazom, posebice konsenzus sekvenca koja oblikuje aktivno mjesto. Sa molekularnom masom od 33 kDa i izoelektričnom točkom od 6.0, *Candida antarctica* lipaza B je α/β protein potpuno određene strukture (slika 4). Serin-histidin-asparaginska kiselina (Ser-His-Asp) čini katalitičku trijadu, mali poklopac, koji ne može potpuno zakloniti aktivno mjesto kao kod drugih lipaza (Uppenberg i sur., 1994; Stauch i sur., 2015). Takva konformacija diktira supstratnu specifičnost i visok stupanj stereospecifičnosti za ovu lipazu (Uppenberg i sur., 1995). Za razliku od ostalih lipaza, ona nema tendenciju formirati dimere što ju čini lakšom za manipulaciju i imobilizaciju, stoga je među najstabilnijim komercijalno dostupnim lipazama (Ortiz i sur., 2019). Komercijalno je dostupno mnogo slobodnih i imobiliziranih *Candida antarctica* lipaza B. Visoka stabilnost čini ju idealnim kandidatom za istraživanja stabilnosti i aktivnosti enzima u novim zelenim otapalima poput ionskih kapljevina i eutektskih smjesa. Zbog svega navedenog, oba oblika *Candida antarctica* lipaze B odabrana su kao biokatalizatori za analizu u ovom radu.



Slika 4. a) Swiss model 3D strukture *Candida antarctica* lipaze B, b) shema katalitičke trijade u slobodnoj *Candida antarctica* lipazi B (Raza i sur., 2000).

Na tržištu je dostupno više imobiliziranih oblika lipaza, a jedan od najraširenijih i najviše upotrijebljenih komercijalno dostupnih biokatalizatora u industriji i znanosti je Novozyme 435 (Ortiz i sur., 2019). Otvorena monomerna forma enzima imobilizirana je postupkom interfazne aktivacije lipaze na hidrofobni organski nosač, makroporoznu sferičnu smolu građenu od akril polimera komercijalnog naziva Lewatit VP OC 1600.

2.3.4. Aktivnost, selektivnost i stabilnost lipaza

Svaki biokatalizator, pa tako i lipaza, može se okarakterizirati trima osnovnim veličinama: aktivnošću, selektivnošću i stabilnošću (Bommarius i Riebel, 2004). Ukupna enzimaska aktivnost izražava se internacionalnim jedinicama: $1 \text{ IU} \equiv 1 \text{ U} \equiv 1 \mu\text{mol min}^{-1}$, ali može se izraziti i kao:

- volumetrijska aktivnost bazirana na jedinicu volumena: $1 \text{ U mL}^{-1} = 1 \mu\text{mol (min mL)}^{-1}$
- specifična aktivnost enzima s obzirom na masu biokatalizatora: $1 \text{ U (mg proteina)}^{-1} = 1 \mu\text{mol (min mg proteina)}^{-1}$

Selektivnost enzima možemo podijeliti na enantio-, kemo- i regio- selektivnost. U kontekstu enzimске biokatalize organskih spojeva u farmaceutskoj industriji, enantioselektivnost je najvažnija vrsta selektivnosti jer omogućava sintezu čistog produkta definirane strukture i funkcije. Stabilnost uglavnom podrazumijeva termičku i/ili skladišnu stabilnost enzima. U ovom radu promatrana je skladišna stabilnost lipaza tijekom vremena pod ustaljenim uvjetima temperature, pH vrijednosti i koncentracije dodanih tvari. Navedene karakteristike lipaza mogu se modulirati brojnim fizikalno-kemijskim parametrima, a dokazan je i značajan utjecaj reakcijskog i skladišnog medija (Durand i sur., 2013; Maugeri i Dominguez de Maria, 2014). U posljednjih desetak godina intenzivno se proučava upotreba lipaza u novim alternativnim otapalima poput eutektičkih otapala (tablica 2) koja pokazuju relativno bolju aktivnost, stabilnost, enantio- i stereoselektivnost lipaza u odnosu na organska otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a; Guajardo i sur., 2018).

Tablica 2. Primjeri lipazom kataliziranih reakcija u DES-ovima. Kratice: acil (Ac), *C. antarctica* lipaza A (CALA) i *C. antarctica* lipaza B (CALB), imobilizirana *C. antarctica* lipaza B (iCALB), kolin-klorid (Ch), urea (U), glicerol (Gly).

Enzim	DES	Supstrat	Produkt	Izvor
iCALB, CALB, CALA	Ch/U (1:2) Ch/Gly (1:2)	Etil valerat s butan-1-olom	Butil valerat	Gorke i sur., 2008
iCALB	Ch/U (1:2) ChAc/Gly	Migliol ulje 812	Triglicerid esteri	Zhao i sur., 2011
Novozyme 435	Ch/Gly (1:2)	Sojino ulje	Biodizel	Zhao i sur., 2013
Novozyme 435	Ch/Gly (1:2) Ch/U (1:2)	Fenolni esteri		Durand i sur., 2013
iCALB	Ch/U	Fenolni esteri		Durand i sur., 2014
iCALB, Novozyme 435	Ch/U (1:2) Ch/GlyZ (1:1)	Oleinska kiselina i dekanol	Decil oleat	Kleiner i Schörken, 2015
iCALB	Ch/različiti šećeri (1:1)	Esteri masnih kiselina	Glikolipidi	Siebenhaller i sur., 2017

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Butan-1-ol ($\geq 99\%$), Sigma–Aldrich, Njemačka
- Butil-etanoat ($\geq 99\%$), Sigma–Aldrich, Njemačka
- D -(+)-glukoza, Acros organics, Geel, Belgija
- Destilirana voda
- Etan-1,2-diol ($\geq 99\%$), Fisher Scientific, Loughborough, UK
- Glicerol (redestiliran), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalij-fosfatni pufer, pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF (K_2HPO_4 , Fisher Scientific, UK)
- Kolin-klorid (99%), Acros organics, Geel, Belgija
- *n*-heptan (99%), CARLO ERBA Reagents S.A.S., Val de Reuil Cedex, Francuska

3.1.2. Enzimi

- imobilizirana lipaza (imLip)
Novozyme 435, lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* (≥ 5000 U g^{-1} , rekombinantna, eksprimirana u *Aspergillus niger*), imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama s udjelom vode 1-2 (w/w %). Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- slobodna lipaza (slLip)
lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antartica* (9 U mg^{-1} , rekombinantna, eksprimirana u *Aspergillus oryzae*) u formi bež praha. Sigma Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Elektromagnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Vrtložna miješalica, Multi Speed Vortex MSP-3500, bioSan, Latvija
- Plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan

3.2. Metode

3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

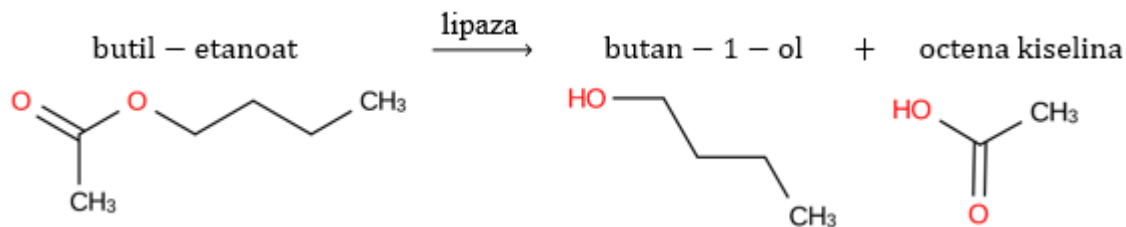
U tikvicama s okruglim dnom pomiješaju se prethodno izračunate i izvagane količine kolin-klorida i odgovarajućih donora vodika prema molarnim omjerima prikazanim u tablici 3. U svaku smjesu dodaje se određena količina vode (10, 30 i 50 % (v/v)), nakon čega se tercijarna otopina zagrijava na elektromagnetskoj miješalici na 50 °C tijekom 2 h, sve dok ne nastane homogena, bezbojna i prozirna tekućina. Tikvice sa sintetiziranim eutektičkim smjesama čuvaju se na sobnoj temperaturi do daljnje primjene kao otapala u modelnoj reakciji hidrolize.

Tablica 3. Popis korištenih NADES-a i njihovih karakteristika

	NADES	Molarni omjeri	Udio vode [% v/v]	Kratica	pH
1.	Kolin-klorid:etan-1,2-diol	1:2	10	ChEG _{10%}	7,73
2.			30	ChEG _{30%}	7
3.			50	ChEG _{50%}	5,93
4.	Kolin-klorid:glicerol	1:2	10	ChGly _{10%}	4,15
5.			30	ChGly _{30%}	3,3
6.			50	ChGly _{50%}	3,5
7.	Kolin-klorid:glukoza	1:1	30	ChGlc _{30%}	5,2
8.			50	ChGlc _{50%}	4,0

3.2.2. Određivanje aktivnosti lipaza

Aktivnost lipaze određena je kromatografski, praćenjem modelne reakcije hidrolize butil-etanoata (slika 5). Točnije, vršena je kvalitativna i kvantitativna analiza supstrata, butil-etanoata i produkta reakcije, butan-1-ola.



Slika 5. Modelna reakcija, lipazom katalizirana hidroliza butil-etanoata

Eksperimentalni dio rada je radi praktičnosti i preglednosti podijeljen na dva seta uzoraka, ovisno o vrsti korištenog biokatalizatora (tablica 4).

Tablica 4. Shematski prikaz eksperimentalnih reakcijskih smjesa. *Kalij-fosfatni pufer (KP).

1. imLip					
		lipaza [mg]	otapalo [μ L]	supstrat [μ L]	Σ reakcijske smjese [mL]
eksperimentalni set 1	ChEG	5	1974	26	2
	ChGly	5,1			
	ChGlc	4,9			
	KP*	5			
2. slLip					
		lipaza [μ L]	otapalo [μ L]	supstrat [μ L]	Σ reakcijske smjese [mL]
eksperimentalni set 2	ChEG	75	1417,5	7,5	1,5
	ChGly				
	ChGlc				
	KP*				

Prvi eksperimentalni set od 9 uzoraka sastojao se od 4 vrste otapala (ChEG, ChGly, ChGlc i KP) s određenim udjelima vode (10, 30 i 50 % (v/v)) u kojima je resuspendirana odvagana masa imobilizirane lipaze (imLip). Drugi eksperimentalni set od 9 uzoraka također se sastojao od 4 vrste otapala (ChEG, ChGly, ChGlc i KP) s određenim udjelima vode (10, 30 i 50 % (v/v)). U ukupnom volumenu od 1,5 mL odgovarajućeg otapala, resuspendirano je 75 μ L slobodne lipaze (slLip) koja je prethodno pripremljena kao radna otopina masene koncentracije 4 mg mL⁻¹ u kalijev-fosfatnom puferu (KP).

Svaka od provedenih reakcija hidrolize započinje dodatkom supstrata, 26 μL butil-etanoata ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) za imLip ili 7,5 μL butil-etanoata ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) za sLip, u reakcijsku smjesu. Iz reakcijske smjese inkubirane na homogenizatoru pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i 900 min^{-1} , u određenim vremenskim intervalima (0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 min, te dodatnim 180, 240, 300, 360 min za nulte reakcije, $t = 0 \text{ min}$) izuzimaju se alikvoti od 200 μL za daljnju analizu. Posebna pažnja pridodaje se uzorkovanju otapala sa imobiliziranom lipazom, tako da u izuzetom alikvotu ne zaostanu makroporozne poliakrilne kuglice s enzimom. Alikvoti se neposredno nakon uzorkovanja ekstrahiraju *n*-heptanom u omjeru 1:1, 3 min pri 900 rpm na vrtložnoj miješalici. 50 μL organske faze izuzima se u viale za analizu na plinskom kromatografu.

Određivanje koncentracije butan-1-ola

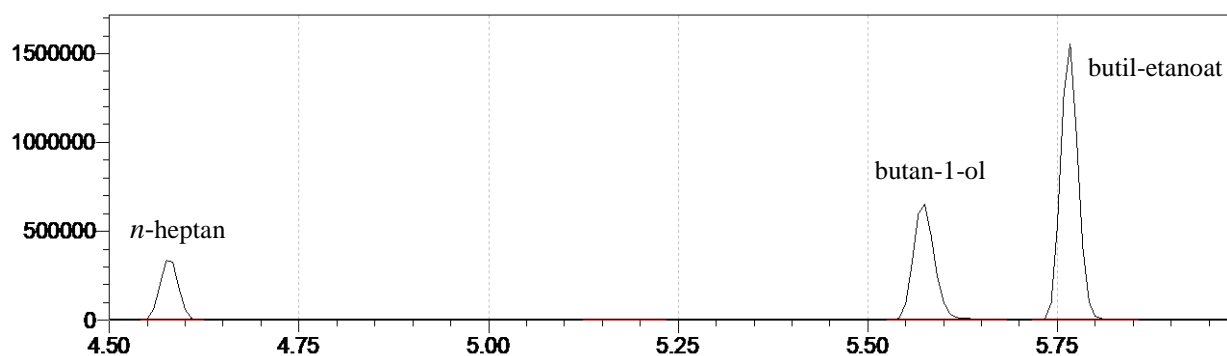
Kvalitativna i kvantitativna analiza butil-etanoata i butan-1-ola provodi se na plinskom kromatografu spregnutom s masenim spektrofotometrom (GC-MS, slika 6). Za analizu korišteni su sljedeći kromatografski uvjeti:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)
- Temperatura kolone: $T_1 = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), $T_2 = 150 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta T = 30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$)
- Pokretna faza: helij (He)
- Protok: $51,0 \text{ mL min}^{-1}$
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Vrijeme trajanja analize: 6,17 min (4,5 – 6,17 min mjerenja)



Slika 6. Plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan.

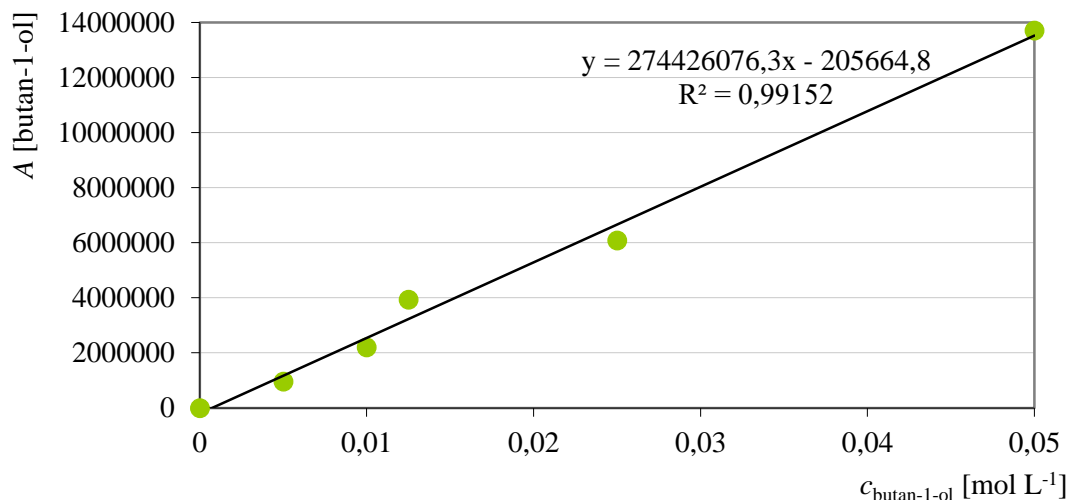
Identifikacija butil-etanoata i butan-1-ola provedena je na temelju retencijskih vremena, tj. vremena izlaženja razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi s kiralne kromatografske kolone te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka s onima dobivenima analizom. Retencijsko vrijeme (R_t) za butil-etanoat iznosi 5,76 min, a R_t (butan-1-ol) = 5,56 min. Molarna koncentracija produkta reakcije, butan-1-ola, računa se izravno iz jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama. Teorijski, hidrolizom 1 mola butil-etanoata nastaje 1 mol butan-1-ola i 1 mol octene kiseline koju nije moguće analizirati na plinskom kromatografu pri takvim uvjetima. Tipičan plinski kromatogram reakcijske smjese nalazi se na slici 7.



Slika 7. Tipičan plinski kromatogram nakon analize reakcijske smjese za lipazom kataliziranu hidrolizu butil-etanoata.

Izrada baždarnog dijagrama

Baždarni dijagram za određivanje molarne koncentracije butan-1-ola izrađuje se tako što se pripreme otopine poznatih koncentracija butan-1-ola u *n*-heptanu ($0,025 - 0,005 \text{ mol L}^{-1}$) i analiziraju na plinskom kromatografu spregnutom sa masenim spektrofotometrom. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika prikazu se na ordinati, a na apscisi se prikazu pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala konstruira se dijagram ovisnosti množinske koncentracije butan-1-ola o površini ispod pika (slika 8) te se prema dobivenoj jednadžbi pravca mogu izračunati nepoznate molarne koncentracije butan-1-ola u ostalim uzorcima.



Slika 8. Baždarni dijagram za određivanje molarne koncentracije butan-1-ola ($c_{\text{butan-1-ol}}$) sa pripadajućom jednačbom pravca. A = površina ispod kromatografskog pika butan-1-ola.

3.2.3. Određivanje (skladišne) stabilnosti lipaza

Eksperimentalni setovi 1 i 2 opisani u poglavlju 3.2.2. pripremljeni su kao šaržne reakcije za mjerenje reakcije hidrolize u ukupno 8 točaka tokom 28 dana kako bi se ispitala stabilnost lipaze u tercijarnim otapalima kolin-klorida, vode i određenog donora vodika. Lipaze su u ispitivanim otapalima inkubirane 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 i 28 dana pri 25 °C. Reakcija hidrolize je u tim vremenskim točkama započeta dodatkom supstrata, butil-etanoata i praćena 120 min. Produkt reakcije, butan-1-ol kvantitativno je i kvalitativno određen pomoću GC-MS-a kao što je prethodno opisano. Skladišna stabilnost enzimskog pripravka u ispitivanom otapalu izražena je kao rezidualna aktivnost enzima nakon inkubacije na 25 °C u određenom vremenskom intervalu. Kao dodatni parametri za usporedbu stabilnosti imobilizirane i slobodne lipaze u različitim otapalima izračunata su pojedinačna iskorištenja i volumetrijske produktivnosti u $t = 0$ min.

3.3. Obrada podataka

U svrhu međusobne usporedbe aktivnosti lipaza, za lipazom kataliziranu modelnu reakciju hidrolize u pojedinim otapalima u $t = 0$ min računa se iskorištenje i volumetrijska produktivnost hidrolize te rezidualna aktivnost enzima. Podaci prikupljeni na GC-MS-u analizirani su na sljedeće načine:

Iskorištenje procesa hidrolize $\eta_{hidroliza}$ (%) reakcije računa se prema jednadžbi 1:

$$\eta_{hidroliza} = \frac{c_E}{c_T} * 100 \quad [1]$$

gdje je:

c_E - izmjerena koncentracija butan-1-ola (mol L^{-1}),

c_T - teoretski moguća koncentracija butan-1-ola (mol L^{-1}).

Volumetrijska produktivnost $P_{V \text{ hidroliza}}$ ($\text{mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) hidrolize računa se prema jednadžbi 2:

$$P_{V \text{ hidroliza}} = \frac{c_{p2} - c_{p1}}{t} \quad [2]$$

gdje je:

c_{p1} - početna molarna koncentracija butan-1-ola (mmol L^{-1}),

c_{p2} - molarna koncentracija butan-1-ola u trenutku uspostave konstantne vrijednosti (mmol L^{-1}),

t - vrijeme trajanja procesa (min).

Rezidualna aktivnost lipaza (%) računa se kao postotak aktivnosti enzima nakon inkubacije u odnosu na inicijalnu aktivnost enzima bez inkubacije (nulti dan pri 25 °C). Lipaze su inkubirane 1, 2, 3, 7, 14, 21 i 28 dana pri 25 °C u puferu i NADES-ima sa različitim udjelima vode.

Aktivnost lipaza definirana je konstantom brzine hidrolize (k). Hidroliza u svakom otapalu za obje lipaze praćena je na GC-MS-u porastom koncentracije produkta, butan-1-ola, u vremenu. Izuzete su početne točke hidrolize u kojima je zabilježen linearan rast koncentracije produkta te je kroz njih provučen pravac. U odgovarajućoj jednadžbi pravca, koeficijent smjera pravca predstavlja k - konstantu brzine hidrolize.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pravilan odabir reakcijskog medija jedan je od ključnih koraka u reakcijama biokatalize, očuvanju aktivnosti i stabilnosti biokatalizatora te uspostavi ekonomski isplativog, učinkovitog i ekološkog procesa primjenjivog i u industrijskom mjerilu. Kao održiva alternativa klasičnim organskim otapalima u biokatalizi pojavljuju se razna nekonvencionalna otapala. Prirodna eutektička otapala trenutno pokazuju najveći potencijal u području zelene kemije. Budući da je njihova priprema sigurna, jednostavna i jeftina te postoji bezbroj kombinacija lako dostupnih prirodnih sastojaka za njihovo formiranje, to ih čini idealnim izborom za razvoj ekološki prihvatljivih procesa.

Lipaze su najvažnija skupina biokatalizatora s biotehnoškom primjenom, no njihova je primjena raširena i u mnogim drugim industrijskim granama. Reakcije katalizirane lipazama odvijaju se pri blagim uvjetima, što je značajno iz aspekta očuvanja okoliša, pa su za uspostavu potpuno održivog ekološkog procesa intenzivirana istraživanja do sada nepoznate upotrebe NADES-a kao skladišnog i reakcijskog medija za lipaze.

U ovom je radu ispitivana aktivnost i stabilnost dviju vrsta lipaza B izoliranih iz kvasca *Candida antarctica*; slobodne lipaze (sILip) i lipaze imobilizirane na makroporoznim poliakrilnim kuglicama (imLip) u NADES-ima i referentnom kalij-fosfatnom puferu. Za ispitivanje prikladnosti upotrebe NADES-a kao skladišnih i reakcijskih medija izabrane su tri tercijarne otopine koje se najčešće koriste u biokatalizi posredovanoj lipazama: kolin-klorid s etan-1,2-diolom, s glicerolom i s glukozom, uz odgovarajuće udjele vode (10, 30 i 50 %, (v/v)). Uz spomenute NADES-e, za usporedbu uspješnosti modelne reakcije hidrolize katalizirane lipazom korišteno je i konvencionalno otapalo, kalij-fosfatni pufer. Budući da je stabilnost enzima u otapalu važan parametar pri određivanju prihvatljivosti određenog otapala za primjenu u industrijskom mjerilu, stabilnost oba enzima praćena je pri sobnoj temperaturi kroz 28 dana. Kao dodatni parametri za usporedbu dviju lipaza u otapalima izračunate su volumetrijska produktivnost i iskorištenje reakcije hidrolize te rezidualna aktivnost enzima.

4.1. Izbor i priprema otapala

Ključni parametri biokatalitičkog procesa, kao što su volumen reakcijske smjese te koncentracija supstrata i enzima, optimirani su u preliminarnom istraživanju. Reakcijske smjese konstruirane su prema tablici 4. U ovom radu nastoji se ustvrditi koje je najpovoljnije otapalo koje može poslužiti kao skladišni i reakcijski medij za slobodne i imobilizirane lipaze te su u tu svrhu ispitane tri vodene otopine NADES-a na bazi kolin-klorida (tablica 3.). Osim što je sama priprema vrlo jednostavna (poglavlje 3.2.1.), iskorištenje reakcije je 100 %, što predstavlja značajnu prednost za pripremu NADES-a. Treba napomenuti da se voda dodana za sintezu tercijarnih otopina smatra sastavnim i neodvojivim dijelom NADES-a, jer se vodikovim vezama povezuje s ostalim komponentama koje ulaze u sastav NADES-a. Početno se trebala ispitivati i tercijarna otopina ChGlc_{10%} no ona je nakon preliminarnih ispitivanja isključena iz eksperimentalnog dijela rada. Pokazalo se da je viskoznost tog NADES-a previsoka za pravovremenu manipulaciju te je topljivost supstrata i sLip-e značajno niska. Već je dokazano da su NADES-i odlični reakcijski mediji za biokatalitičke reakcije s jako hidrofobnim supstratima (Maugeri i Domínguez de María, 2014; Fredes i sur., 2019) jer, kao organska otapala, povećavaju njihovu topljivost. Lipaze mogu katalizirati brojne reakcije, ali kao modelna je u ovom radu izabrana hidroliza butil-etanoata jer je on jako hidrofoban supstrat.

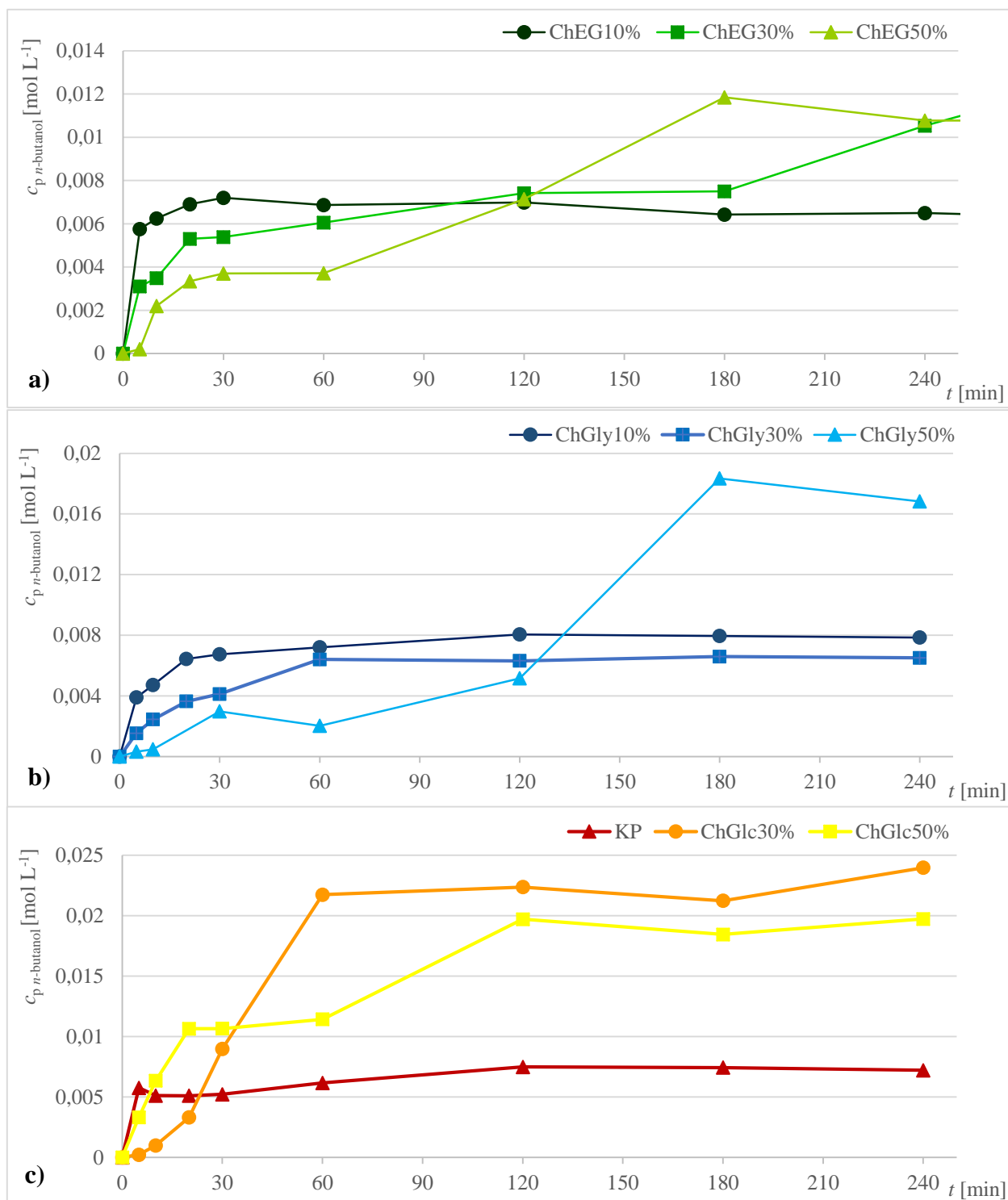
Zbog održivosti i potencijalnog prijenosa procesa u veće mjerilo (*eng. scale up*), potrebno je opravdati upotrebu NADES-a i iz ekonomskog aspekta. Procjena cijena NADES-a vrši se analizom cijena pojedinih čistih komponenti dostupnih na službenoj stranici Mercka, Njemačka. Procijenjene vrijednosti iznose: 43 \$ kg⁻¹ za ChEG, 48 \$ kg⁻¹ za ChGly i 84 \$ kg⁻¹ za ChGlc. Taj cjenovni rang odgovara ostalim organskim otapalima kao što je 99 %-tni *n*-heptan (81,53 \$ kg⁻¹), što čini prirodna eutektička otapala povoljnima za upotrebu u većem mjerilu.

4.2. Odabir prirodnih eutektskih otapala za imobiliziranom *Candida antarctica* lipazom B kataliziranu hidrolizu butil-etanoata

Imobilizirana lipaza (imLip) biokatalizator je visoke stabilnosti i robusnosti što omogućava njegovu olakšanu manipulaciju i upotrebu, posebno u kontinuiranim industrijskim procesima. Unatoč tome, reakcijska stabilnost enzima u NADES sustavima još nije dobro istražena.

Tijek imLip katalizirane reakcije hidrolize butil-etanoata praćen je pomoću plinske kromatografije, tj. kvantifikacijom nastalog produkta reakcije, butan-1-ola, do uspostave konstantne koncentracije. Na slici 9. vidljiva je usporedba tijeka hidrolize u različitim NADES-ima i puferu kao referentnom otapalu. Može se primijetiti da vrijeme uspostave reakcijske ravnoteže ovisi o prirodi otapala i udjelu vode. Ravnotežna koncentracija produkta najbrže se ostvaruje u puferu, što je ujedno i kvalitativno najniža ostvarena koncentracija butan-1-ola. Nasuprot tome, ravnoteža reakcije unutar 240 min nije uspostavljena jedino u ChEG_{30%}. Jedno od mogućih objašnjenja uklještenje je supstrata u mrežu vodikovih veza koje formira NADES (ChEG_{30%}) među svojim sastavnicama, čime se otežava pristup supstrata enzimu te sama biokataliza (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Nadalje, vidljivi su različiti trendovi nastanka produkta prije i nakon 120 min za tercijarne otopine s EG (slika 9A) i Gly (slika 9B). Početno je najbrža reakcija u 10 % tercijarnim vodenim otopinama (do 120 min), da bi se trend nakon 120 min promijenio, kada se najbrža reakcija ostvarila u 50 % tercijarnim vodenim otopinama. Iako pokazuju isti trend do uspostave reakcijske ravnoteže, NADES s Gly ostvaruje nešto veće vrijednosti molarnih koncentracija butan-1-ola. Povoljni utjecaj Gly i EG na aktivnost lipaza može se objasniti nastankom jakih vodikovih veza između tih poliola i hidroksilnih grupa na bočnim ograncima serina u aktivnom mjestu enzima, čime se modificira katalitička aktivnost imLip. Otapala tim mehanizmom povećavaju nukleofilnost serina te omogućavaju bržu reakciju sa supstratom (Huang i sur., 2014.). Unatoč tome, najviše koncentracije butan-1-ola u ovom eksperimentu nastale su u tercijarnim otopinama s glukozom kao izvorom vodika, a kao superiorno otapalo izdvaja se ChGlc_{30%}.

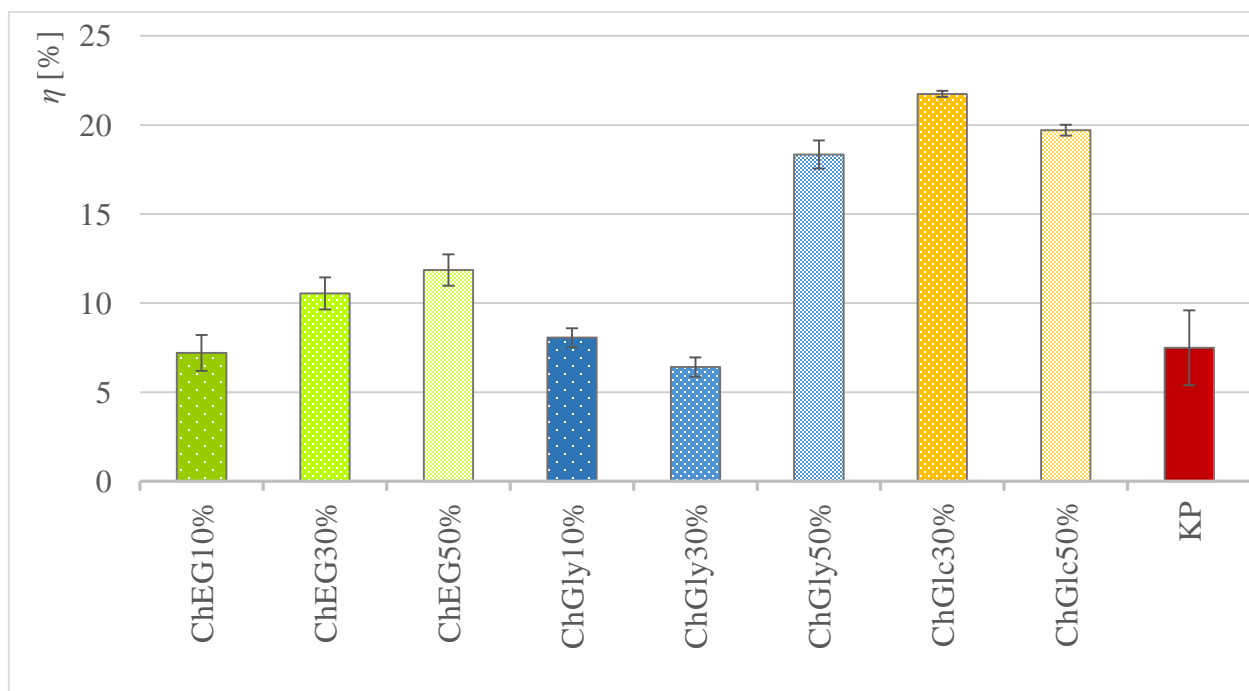
Zaključno, može se primijetiti da dodatak vode pospješuje biokatalizu jer su NADES-i s većim udjelom vode ostvarili i veće koncentracije butan-1-ola. To opažanje odgovara teorijskim navodima da voda pospješuje biokatalizu zbog smanjenja viskoznosti i gustoće medija, što direktno pogoduje lipazom kataliziranim reakcijama (Guajardo i sur., 2018). Također, visok udio NADES-a i nizak udio vode može utjecati na formiranje vodikovih veza otapala sa supstratom, čime se smanjuje njegova dostupnost enzimu (Panić i sur., 2018).



Slika 9. Tijek imLip katalizirane reakcije hidrolize butil-etanoata prikazan kroz nastanak produkta butan-1-ola (c_p) u a) kolin-klorid:etan-1,2-diolu (ChEG), b) kolin-klorid:glicerolu (ChGly), c) kalij-fosfatnom puferu (KP) i kolin-klorid:glukozi (ChGlc). Reakcijski uvjeti: 5,0 mg imLip, 0,1 mol L⁻¹ butil-etanoata, 25 °C, 240 minuta.

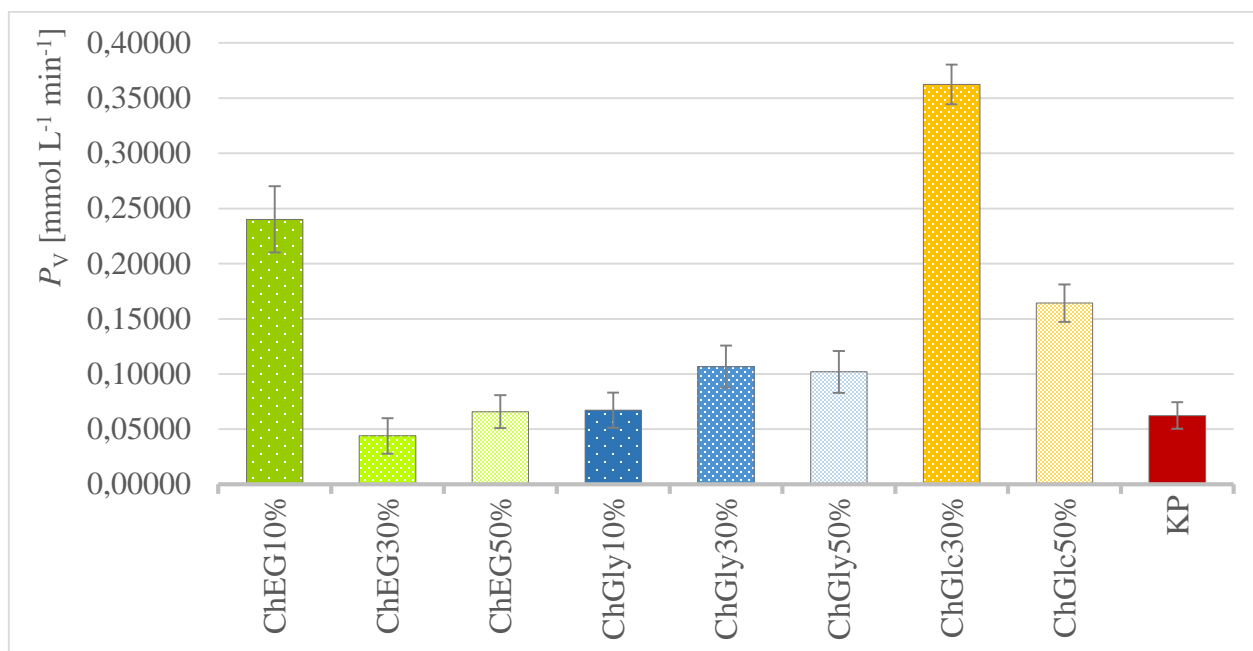
Iako je iz grafičkih prikaza tijeka hidrolize moguće vidjeti utjecaj pojedinih tercijarnih otopina i pufera na uspješnost hidrolize, u svrhu bolje interpretacije rezultata izračunata su odgovarajuća iskorištenja i volumetrijske produktivnosti imLip katalizirane reakcije prema formulama [1], [2]. Rezultati izračuna grafički su prikazani na slikama 10 i 11.

Iskorištenja (η) imLip katalizirane reakcije hidrolize u NADES-ima iznose: 7,2-11,9 % za ChEG, 6,4-18,3 % za ChGly i 19,7-21,7 % za ChGlc i s time su viša ili približno jednaka hidrolizi u referentnom kalij-fosfatnom puferu ($7,5 \pm 2,1$ %). Kao tri najbolja otapala prema vrijednostima iskorištenja hidrolize ističu se ChGlc_{30%} ($21,74 \pm 0,18$ %), ChGlc_{50%} ($19,71 \pm 0,30$ %) i ChGly_{50%} ($18,34 \pm 0,80$ %). Unatoč tome, iako vrijednosno najprikladnije otapalo, tercijarna otopina ChGlc_{30%} je tijekom eksperimentalnog rada izdvojena kao nereprezentativni uzorak zbog sumnje u nehomogenost. Također, visoka gustoća otopine onemogućava adekvatnu i pravovremenu manipulaciju, zbog čega se izbacuje iz izbora kandidata za odabir najprikladnijeg reakcijskog medija. Ako se promatra utjecaj udjela vode u NADES-ima, za otopine ChEG i ChGly primijećeno je povećanje iskorištenja s povećanjem udjela vode (slika 10), iz čega se može zaključiti da je visoki sadržaj vode u nekim slučajevima poželjan za uspješno odvijanje hidrolize. Već je prethodno uočena visoka stabilnost imLip (Novozyme 435) u bezvodnom ChGly (Guajardo i sur., 2018), kao i smanjivanje viskoznosti medija dodatkom 20 % vode kao ko-otapala, što je pogodovalo modelnoj reakciji. Dokazano je da izbor donora vodika pri konstrukciji NADES-a te odabir odgovarajućeg udjela vode značajno utječu na enzimsku aktivnost.



Slika 10. Iskorištenje (η) imLip katalizirane reakcije hidrolize butil-etanoata u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 5,0 mg imLip, 0,1 mol L⁻¹ butil-etanoata, 25 °C, vrijeme: do uspostave ravnoteže reakcije. Kratice: kolin-klorid:etan-1,2-diol (ChEG), kolin-klorid:glicerol (ChGly), kalij-fosfatni pufer (KP) i kolin-klorid:glukoza (ChGlc).

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti za imLip kataliziranu reakciju hidrolize kreću se u rasponu 0,04 mmol L⁻¹ min⁻¹ (ChEG_{30%}) do 0,36 mmol L⁻¹ min⁻¹ (ChGlc_{30%}), što je ujedno i najbolja postignuta vrijednost (slika 11). Svi ispitani NADES-i pokazali su više vrijednosti od referentnog otapala – pufera, uz iznimku ChEG_{30%} koji predstavlja ujedno i najnižu izmjerenu vrijednost. Utjecaj različitih udjela vode u tercijskim otopinama na volumetrijsku produktivnost nije primijećen, ali kao dva najbolja otapala kandidata vrijednosno odudaraju ChEG_{10%} (0,24 ± 0,03 mmol L⁻¹ min⁻¹) i ChGlc_{30%} (0,36 ± 0,02 mmol L⁻¹ min⁻¹). Također, zanimljivo je primjetiti da nema značajne korelacije između vrijednosti iskorištenja i volumetrijskih produktivnosti za analizirana otapala. Ovi podaci potvrđuju značaj pojedinačnih mjerenja tih vrijednosti i odbacivanje pretpostavki da se ona prate iste trendove.



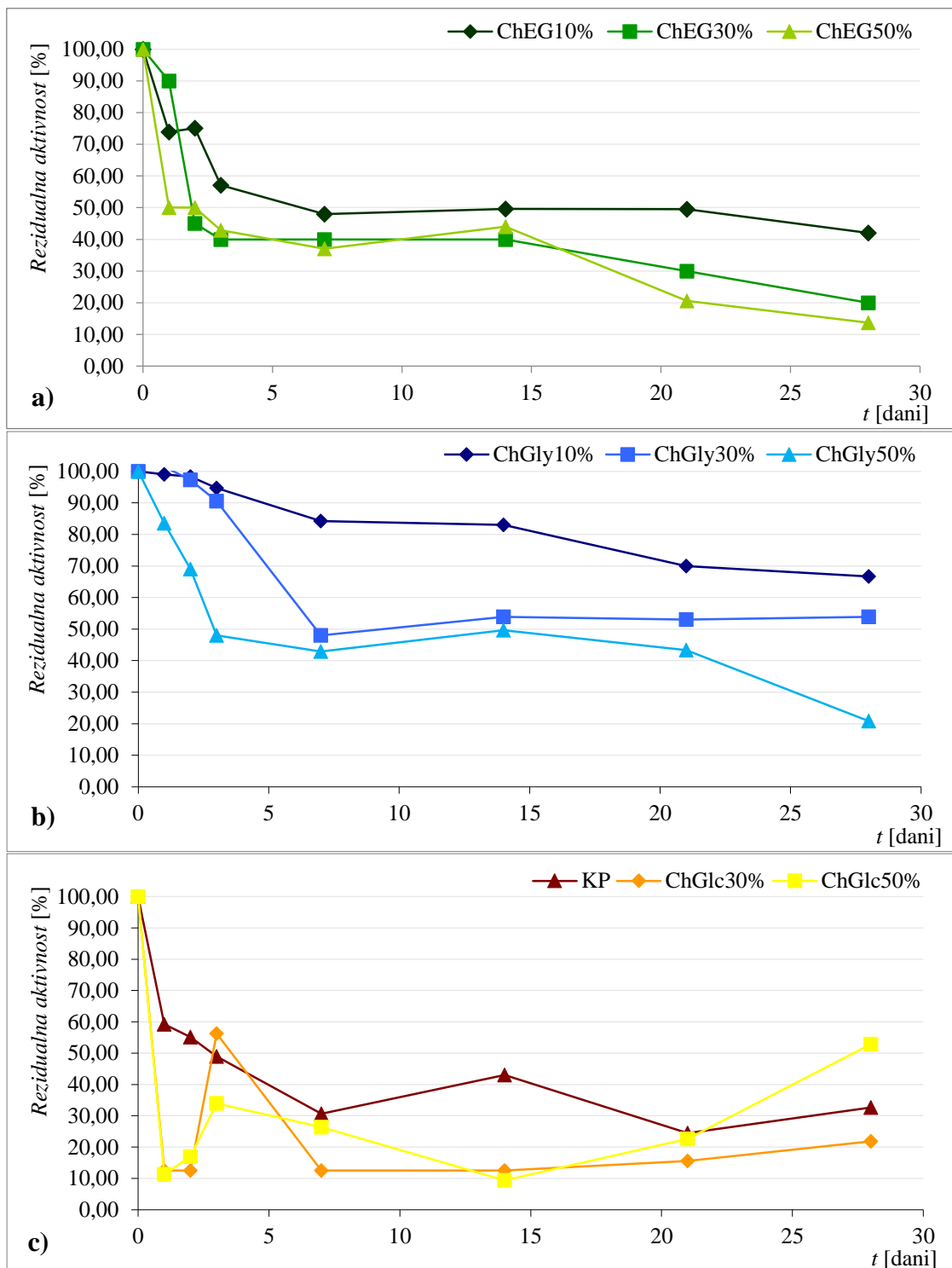
Slika 11. Volumetrijska produktivnost (P_V) za imLip kataliziranu reakciju hidrolize butil-etanoata u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 5,0 mg imLip, 0,1 mol L⁻¹ butil-etanoata, 25 °C, vrijeme: do uspostave ravnoteže reakcije. Kratice: kolin-klorid:etan-1,2-diol (ChEG), kolin-klorid:glicerol (ChGly), kalij-fosfatni pufer (KP) i kolin-klorid:glukoza (ChGlc).

Na temelju rezultata dobivenih praćenjem tijekom hidrolize te izračunatih iskorištenja i volumetrijske produktivnosti, može se zaključiti da je najpovoljnije otapalo za očuvanje aktivnosti imLip, NADES s glukozom kao donorom vodika, točnije ChGlc_{30%}. Modelnu reakciju u ChGlc_{30%} odlikuje brza uspostava reakcijske ravnoteže (60 min), najviša postignuta koncentracija produkta (0,024 mol L⁻¹), visoko iskorištenje ($\eta = 21,74 \pm 0,17$ %) i visoka volumetrijska produktivnost ($P_V = 0,36 \pm 0,02$ mmol L⁻¹ min⁻¹). Elgarbawy i sur. (2018) ispitivali su različite NADES-e i pufere kao medije za biotransformacije katalizirane lipazama te došli do istog zaključka. Pokazalo se da NADES na bazi šećera, točnije tercijarna otopina Ch-Glc-voda, aktivira sve lipaze, uključujući imobiliziranu *Candida antarctica* lipazu B. Također, dokazano je da skladištenje imLip u NADES-ima na bazi šećera kroz 72 sata daje bolju relativnu aktivnost u odnosu na pufer (Elgharbawy i sur., 2018). Unatoč tome, kao što je prethodno spomenuto, zbog visoke gustoće otopina s glukozom kao donorom vodika otežana je manipulacija, pa se sumnja u nehomogenost otopine. Zbog svega navedenog, potrebno je dodatno istražiti za sada još nedovoljno poznate molekularne mehanizme interakcija otapala s lipazama, kako bi sa sigurnošću izveli valjani zaključak.

Skladišna stabilnost imobilizirane *Candida antarctica* lipaze B u prirodnim eutektičkim otapalima

Pravilno skladištenje enzima jedan je od ključnih faktora za očuvanje aktivnosti i važan parametar pri određivanju prihvatljivosti određenog otapala za primjenu u industrijskom mjerilu. Zbog toga, skladišna stabilnost imLip istraživala se inkubacijom enzima u referentnom puferu i u tri tercijarne otopine NADES-a s odgovarajućim udjelima vode tijekom 28 dana. Skladišna stabilnost imLip u ispitivanim otapalima izražena je kao rezidualna aktivnost enzima nakon inkubacije na 25 °C u određenom vremenskom intervalu.

Na slici 12 vidljiv je trend smanjivanja rezidualne aktivnosti imLip u različitim otapalima ovisno o vremenu inkubacije. Inicijalni pad aktivnosti imLip primjećen je kroz prvih 3 (slika 12A) ili 7 dana inkubacije (slika 12B), nakon čega slijedi period od 7 ili čak 14 dana u kojem ne dolazi do značajnije promjene u rezidualnoj aktivnosti lipaze. Završni pad rezidualne aktivnosti nastupa tek nakon 21. dana, osim u slučaju ChGly_{30%} gdje on potpuno izostaje u analiziranom periodu. Za NADES-e s glukozom taj trend ne vrijedi te je već u prvih 24 sata zabilježen značajan pad od 90 % aktivnosti. Unatoč smanjivanju vrijednosti rezidualne aktivnosti, vidljivo je da potpuna inaktivacija imLip nije zabilježena prilikom inkubacije niti u jednom ispitivanom otapalu cijelo vrijeme trajanja eksperimenta (ukupno 28 dana). To inicijalno upućuje na zadovoljavajuću skladišnu stabilnost imLip u svim analiziranim otapalima. Ovaj rad utvrđuje da nakon 28 dana inkubacije najniža zabilježena rezidualna aktivnost iznosi 13 % (ChEG_{50%}), a najviša 67 % (ChGly_{10%}). Unatoč rezultatima aktivnosti imLip (tijek reakcije, η i V_P), u kojima se tercijarne otopine s glukozom kao donorom vodika ističu kao najpovoljnije, rezultati stabilnosti kroz 28 dana pokazuju drugačije trendove. Usporedbom svih korištenih otapala, najprikladnijim za očuvanje skladišne stabilnosti imLip izdvaja se NADES s glicerolom kao donorom vodika. Zaključno, za sve ispitivane NADES-e osim ChGlc ostvarena je bolja skladišna stabilnost imLip kroz 28 dana u odnosu na referentni kalijev-fosfatni pufer, a kao superioran za održavanje stabilnosti i aktivnosti imLip izdvaja se ChGly_{10%} koji zadržava 84 % od početne aktivnosti nakon 7 dana te čak 67 % nakon svih 28 dana inkubacije.



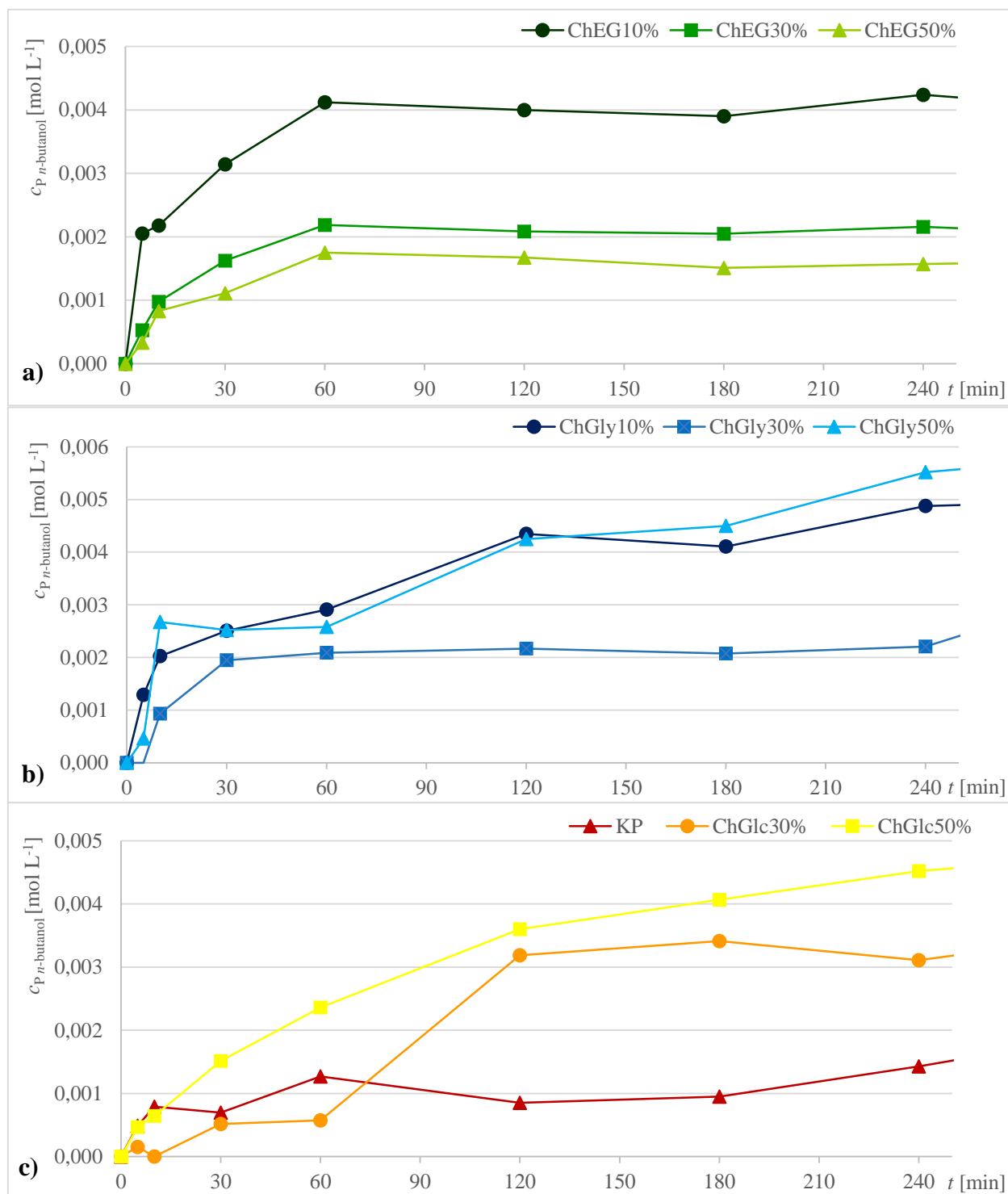
Slika 12. Rezidualna aktivnost imLip u puferu i NADES-ima sa različitim udjelima vode (10, 30 i 50 % (v/v)) u ovisnosti o vremenu inkubacije. a) kolin-klorid:etan-1,2-diol (ChEG), b) kolin-klorid:glicerol (ChGly), c) kalij-fosfatni pufer (KP) i kolin-klorid:glukoza (ChGlc). Reakcijski uvjeti: 5,0 mg imLipaze, 25 °C, 28 dana.

4.3. Odabir prirodnih eutektičkih otapala za slobodnom *Candida antarctica* lipazom B kataliziranu hidrolizu butil-etanoata

Slobodna lipaza (sLip) biokatalizator je visoke aktivnosti no reakcijska stabilnost ovog enzima u NADES sustavima nije još dobro istražena. Budući da je slobodni oblik ovog enzima manje robusan od imobilizirane varijante, očekuju se niže vrijednosti svih analiziranih parametara (koncentracija sintetiziranog produkta, η , V_P i rezidualna aktivnost).

Tijek sLip katalizirane reakcije hidrolize butil-etanoata praćen je istom metodologijom kao i imLip, pomoću plinske kromatografije. Točnije, vršila se kvantifikacija nastalog produkta reakcije, butan-1-ola, do uspostave konstantne koncentracije. Na slici 14 vidljiva je usporedba tijeka hidrolize u različitim NADES-ima i kalij-fosfatnom puferu kao referentnom otapalu. Može se primijetiti da se vrijeme uspostave reakcijske ravnoteže razlikuje za sva odabrana otapala. Na slici 13A možemo primijetiti da se za sve tercijarne otopine ChEG ravnotežno stanje uspostavlja oko 60. min te je do kraja inkubacije koncentracija nastalog butan-1-ola konstantna. To nije slučaj za ChGly i ChGlc. U ChGly_{30%} najbrže je uspostavljeno ravnotežno stanje, 0,002 mol L⁻¹ u 30 min. Nasuprot tome, ravnoteža reakcije unutar 240 min nije uspostavljena u većem broju otapala: ChGly_{10%}, ChGly_{50%} i ChGlc_{50%}. Jedno od mogućih objašnjenja duže je vrijeme potrebno za konformacijsku prilagodbu sLip okolini, tj. NADES-u, s obzirom na to da enzim ne posjeduje nosač koji bi ga dodatno stabilizirao te je samim time podložniji okolišnim uvjetima. U svim ispitivanim NADES-ima ostvarene su veće koncentracije butan-1-ola nego usporedbom hidrolize u referentnom puferu. Maksimalna vrijednost ostvarena je u ChGly_{50%} (0,0055 mol L⁻¹), a sljedeća najveća vrijednost ostvarena je u ChGly_{10%} (0,0049 mol L⁻¹), iz čega se može zaključiti da udio vode ne utječe bitno na tijek reakcije sLip katalizirane hidrolize.

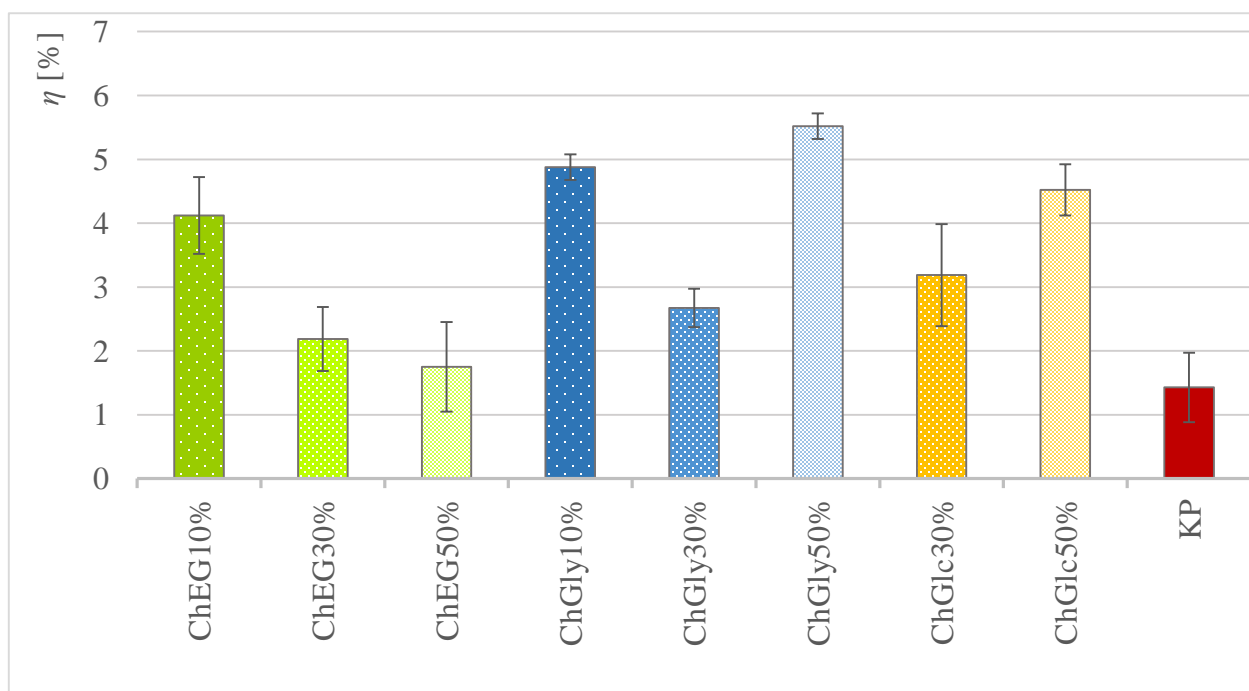
Zaključno, najviše koncentracije butan-1-ola u ovom eksperimentu nastale su u tercijarnim otopinama s glicerolom kao izvorom vodika, a kao superiorno otapalo izdvaja se ChGly_{50%}.



Slika 13. Tijek sLip katalizirane reakcije hidrolize butil-etanoata prikazan kroz nastanak produkta butan-1-ola u a) kolin-klorid:etan-1,2-diolu (ChEG), b) kolin-klorid:glicerolu (ChGly), c) kalij-fosfatnom puferu (KP) i kolin-klorid:glukozi (ChGlc). Reakcijski uvjeti: 75 μL sLip [4 mg ml^{-1}], 7,5 μL butil-etanoata [0,1 mol L^{-1}], 25 $^{\circ}\text{C}$, 240 minuta.

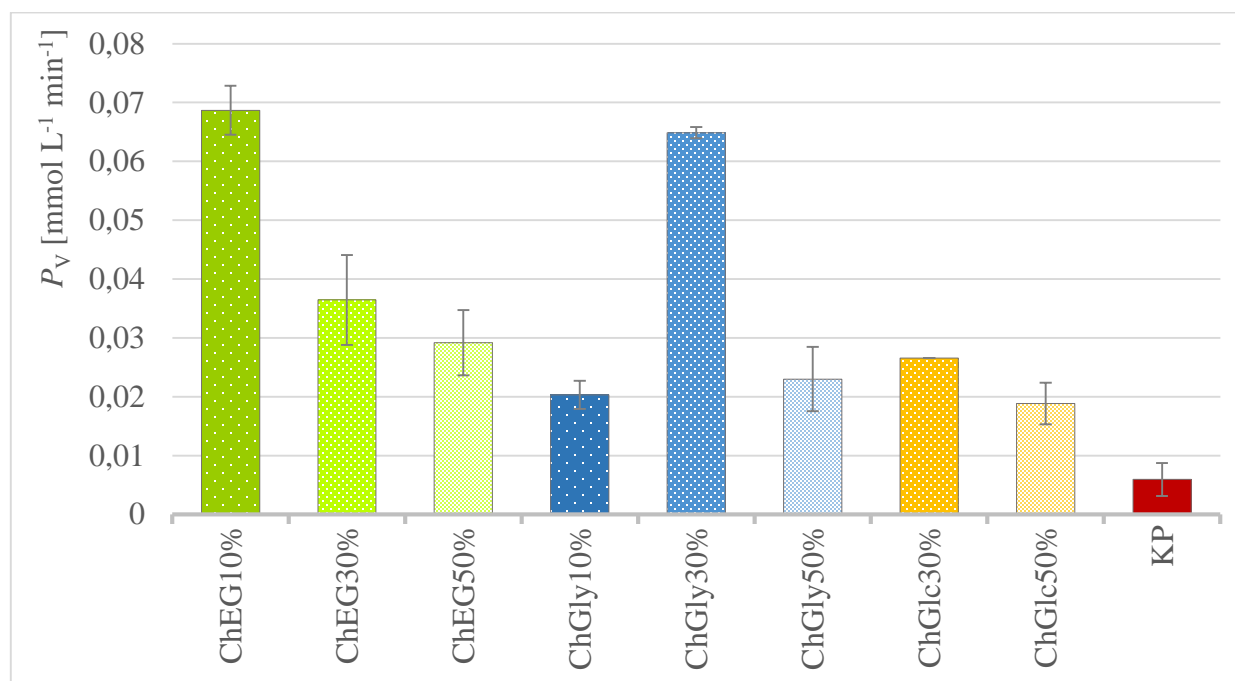
Iako je iz grafičkih prikaza tijekom reakcije moguće vidjeti utjecaj pojedinih tercijarnih otopina i referentnog pufera na uspješnost hidrolize, u svrhu bolje interpretacije rezultata, kao i za imLip, prema formulama [1], [2] izračunata su odgovarajuća iskorištenja i volumetrijske produktivnosti sLip katalizirane reakcije. Rezultati izračuna grafički su prikazani na slikama 14 i 15.

Iskorištenja (η) sLip katalizirane reakcije hidrolize u NADES-ima iznose: 1,75 - 4,12 % za ChEG, 2,67 - 5,52 % za ChGly i 3,19 - 4,52 % za ChGlc (slika 14). Sve su vrijednosti iskorištenja u NADES-ima više od iskorištenja hidrolize u referentnom kalij-fosfatnom puferu ($1,43 \pm 0,50$ %). Prema ovom kriteriju kao najbolja otapala ističu se tercijarne otopine kolin klorida s glicerolom, posebice ChGly_{10%} ($4,88 \pm 0,20$ %) i ChGly_{50%} ($5,52 \pm 0,20$ %), koji predstavlja ujedno i najvišu izmjerenu vrijednost. Nije zapažen utjecaj udjela vode na iskorištenje procesa.



Slika 14. Iskorištenje (η) sLip katalizirane reakcije hidrolize butil-etanoata u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 75 μ L sLip [4 mg ml^{-1}], 7,5 μ L butil-etanoata [$0,1 \text{ mol L}^{-1}$], 25 °C, vrijeme: do uspostave ravnoteže reakcije. Kratice: kolin-klorid:etan-1,2-diol (ChEG), kolin-klorid:glicerol (ChGly), kalij-fosfatni pufer (KP) i kolin-klorid:glukoza (ChGlc).

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti za sLip kataliziranu reakciju hidrolize kreću se u rasponu $0,006 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (KP) do $0,069 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (ChEG_{10%}), što je ujedno i najbolja postignuta vrijednost (slika 15). Uz to, vidljivo je da su svi ispitivani NADES-i pokazali više vrijednosti od referentnog otapala, kalij-fosfatnog pufera. Utjecaj različitih udjela vode u tercijarnim otopinama na volumetrijsku produktivnost nije primijećen, ali kao dva najbolja otapala kandidata vrijednosno značajno odudaraju ChEG_{10%} ($0,069 \pm 0,00 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i ChGly_{30%} ($0,065 \pm 0,00 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$).



Slika 15. Volumetrijska produktivnost (P_v) za sLip kataliziranu reakciju hidrolize butil-etanoata u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: $75 \mu\text{L}$ sLip [4 mg ml^{-1}], $7,5 \mu\text{L}$ butil-etanoata [$0,1 \text{ mol L}^{-1}$], $25 \text{ }^\circ\text{C}$, vrijeme: do uspostave ravnoteže reakcije. Kratice: kolin-klorid:etan-1,2-diol (ChEG), kolin-klorid:glicerol (ChGly), kalij-fosfatni pufer (KP) i kolin-klorid:glukoza (ChGlc).

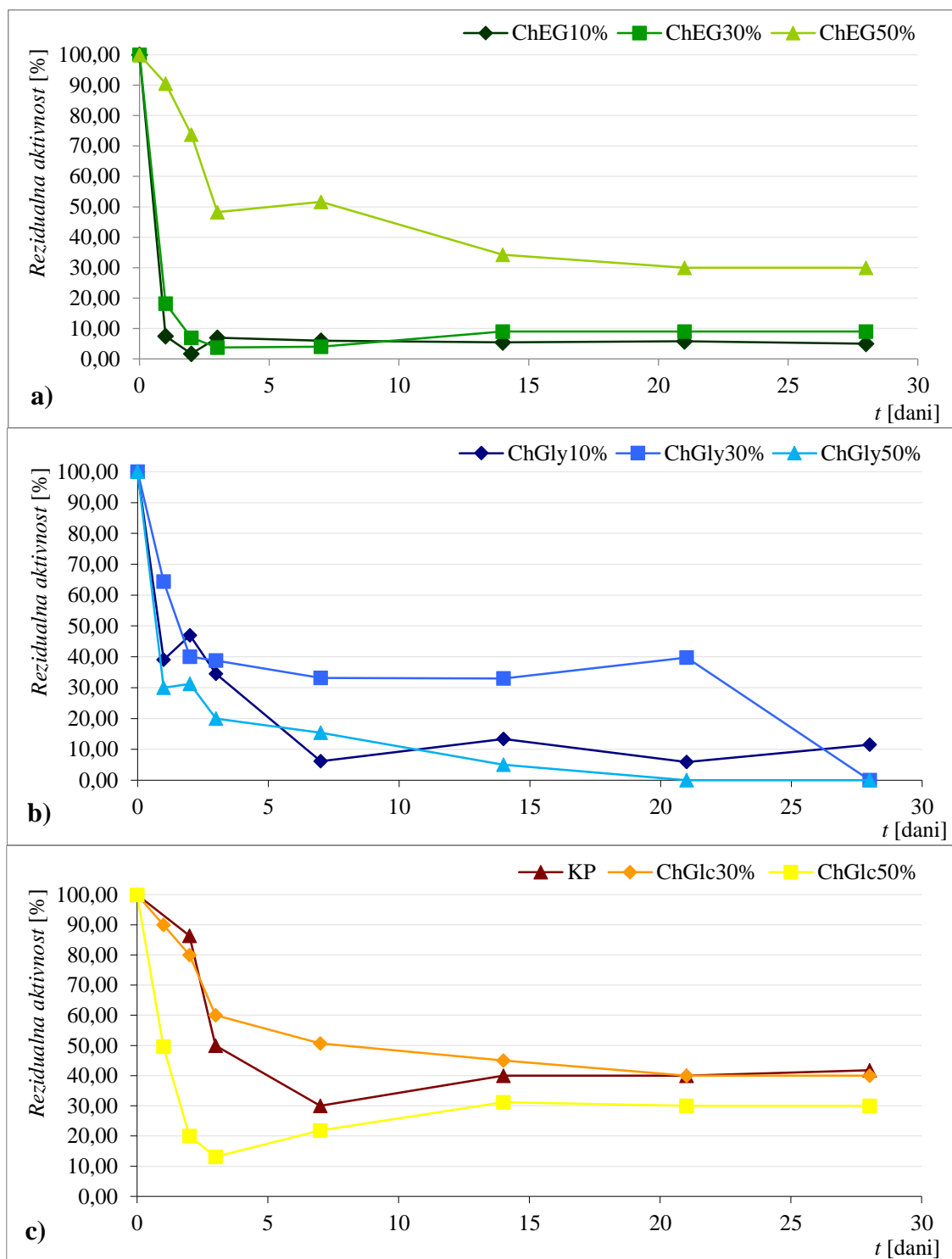
Na temelju rezultata dobivenih praćenjem tijeka hidrolize te izračunatih iskorištenja i volumetrijske produktivnosti ne može se izdvojiti jedno otapalo koje prednjači u svim navedenim veličinama. Unatoč tome, primijećeno je da NADES-i s glicerolom kao donatorom vodika pokazuju najpovoljnije karakteristike. Tako modelnu reakciju u ChGly_{30%} odlikuje brza uspostava reakcijske ravnoteže (30 min) i visoka volumetrijska produktivnost ($P_v = 0,065 \pm 0,00 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), a ChGly_{50%} najviša postignuta koncentracija produkta ($0,0055 \text{ mol L}^{-1}$) te najviše iskorištenje procesa ($\eta = 5,52 \pm 0,20 \%$).

Skladišna stabilnost slobode *Candida antarctica* lipaze B u prirodnim eutektičkim otapalima

Slobodni enzimi komercijalno su najčešće dostupni u obliku praha, a njihovo pravilno skladištenje jedan je od ključnih faktora za dugoročno očuvanje aktivnosti. Skladišna stabilnost sLip istraživala se jednakom metodologijom kao i imLip, tako da se enzim inkubirao u referentnom puferu i u tri tercijarne otopine NADES-a s odgovarajućim udjelima vode tijekom 28 dana. Skladišna stabilnost imLip u ispitivanim otapalima izražena je kao rezidualna aktivnost enzima.

Na slici 16 vidljiv je pad vrijednosti rezidualnih aktivnosti sLip u NADES-ima s različitim udjelima vode (10, 30 i 50 % (v/v)), nakon inkubacije pri 25 °C u ovisnosti o vremenu. Potpuna inaktivacija sLip zabilježena je samo u slučaju inkubacije enzima 21 dan u ChGly_{50%} te 28 dana u ChGly_{30%}. U ostalim eksperimentalnim setovima nakon početnog pada rezidualna aktivnost, iako smanjena, ostala je konstantna i iznosila maksimalno 40 % (ChGlc_{30%} i KP) te minimalno 5 % (ChEG_{10%}). Unatoč dobivenim vrijednostima, postoje literaturni podatci u kojima se sLip u nekim NADES-ima deaktivira nakon jednog dana, no to u ovom istraživanju nije primjećeno. Uz to, dokazano je da u bezvodnom ChGly nakon jednog dana inkubacije rezidualna aktivnost pada na 20 % (Guajardo i sur., 2018). U ovom je radu nakon jednog dana inkubacije sLip u ChGly_{50%} rezidualna aktivnost pala na 30 %, što djelomično odgovara spomenutom literaturnom navodu, jer je za ChGly_{30%} iznosila 64 %, a za ChGly_{10%} 39 %. Na slici 16A možemo primijetiti da rezidualna aktivnost sLip u ChEG_{10%} i ChEG_{30%} pada za više od 90 % već nakon jednog dana inkubacije, ali do kraja 28. dana zadržava tu vrijednost. Moguće objašnjenje zašto deaktivacija sLip unutar jednog dana nije zabilježena, dapače, dobivene su značajno veće vrijednosti rezidualne aktivnosti sLip, leži u činjenici da su ispitivane tercijarne otopine NADES-a, a ne sekundarne (bezvodne). Dodatak vode može značajno utjecati na viskoznost otopine i topljivost supstrata, čime se povećava aktivnost enzima.

Unatoč rezultatima aktivnosti sLip (tijek reakcije, η i V_P), u kojima se tercijarne otopine s glicerolom kao donorom vodika ističu kao najprigodnije, rezultati stabilnosti kroz 28 dana pokazuju drugačije trendove. Usporedbom svih korištenih otapala, kao superiorni za očuvanje skladišne stabilnosti sLip izdvajaju se NADES-i s glukozom kao donorom vodika. ChGlc_{30%} zadržava 30 % rezidualne aktivnosti, a ChGlc_{50%} 40 % nakon svih 28 dana inkubacije.



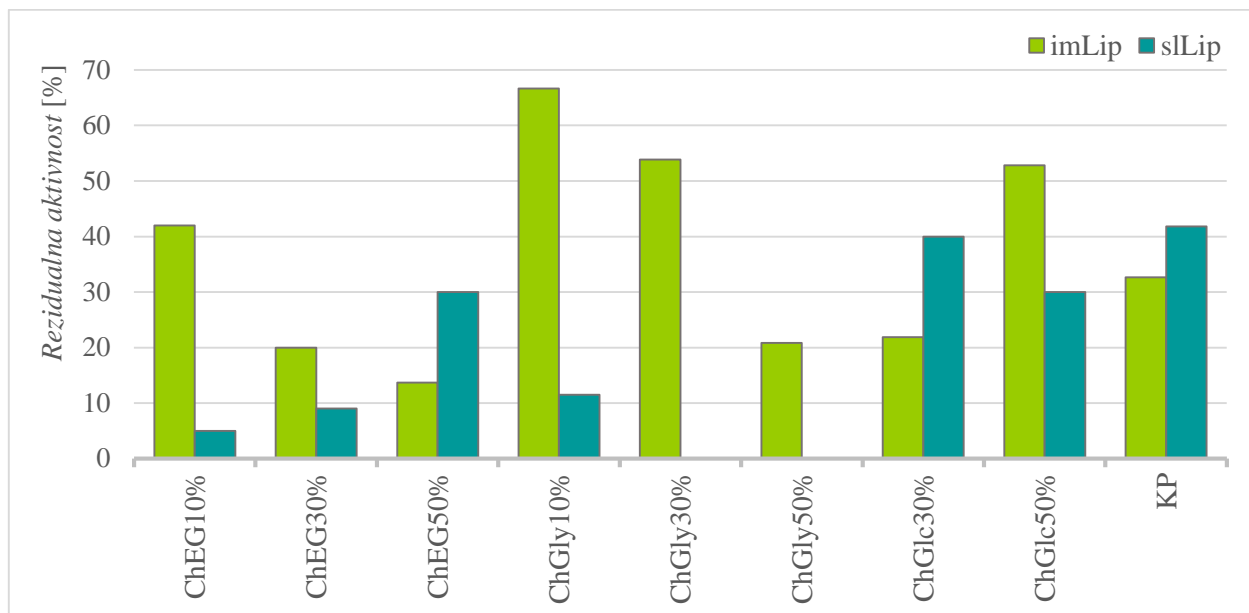
Slika 16. Rezidualna aktivnost sLip u puferu i NADES-ima sa različitim udjelima vode (10, 30 i 50 % (v/v)) u ovisnosti o vremenu inkubacije. a) kolin-klorid:etan-1,2-diol (ChEG), b) kolin-klorid:glicerol (ChGly), a) kalij-fosfatni pufer (KP) i kolin-klorid:glukoza (ChGlc). Reakcijski uvjeti: 75 μL sLip [4 mg ml^{-1}], 7,5 μL butil-etanoata [$0,1 \text{ mol L}^{-1}$], 25 °C, 28 dana.

4.4. Usporedba slobodne i imobilizirane *Candida antarctica* lipaze B

Poznato je da postoji značajna razlika u aktivnosti i stabilnosti imobiliziranih i slobodnih enzima, a u ovom radu je to eksperimentalno potvrđeno na primjeru *Candida antarctica* lipaze B. Budući da je slobodni oblik ovog enzima manje robusan od imobiliziranog, očekivane su značajno niže vrijednosti svih analiziranih parametara (koncentracija sintetiziranog produkta, η , V_P i rezidualna aktivnost), što je eksperimentalno i dokazano. Tako je, primjerice, najviša izmjerena vrijednost iskorištenja za imLip iznosila 21,74 %, a za sLip 5,52 %.

Već je dokazano da inkubacija imobiliziranih lipaza u NADES-ima na bazi kolin-klorida omogućuje visoku aktivnost i stabilnost enzima. Također, poznato je da je takva inkubacija povoljnija nad puferom. To potvrđuje istraživanje u kojem je nakon 72 sata inkubacije pri 40 °C u NADES-u (kolin-klorid:urea_{50%}) zadržano 50 % aktivnosti imLip, značajno više nego u fosfatnom puferu gdje se ostvaruje samo 30 % aktivnosti (Fredes i sur., 2019). Nadalje, dokazana je biokompatibilnost ChGly otapala s imobiliziranom *Candida antarctica* lipazom B (Zhao i sur., 2013). Ovaj rad potvrđuje te literarne navode i utvrđuje da nakon 28 dana inkubacije najviša zabilježena rezidualna aktivnost imLip iznosi 67 % (ChGly_{10%}). Usporedbom rezidualnih aktivnosti imLip i sLip (slika 17), može se zaključiti da je imobilizirana lipaza vidno stabilnija od slobodne inačice u ispitanim NADES-ima, što je u korelaciji s dosadašnjim spoznajama (Guajardo i sur., 2018). Dok sLip zadržava maksimalno 40 % rezidualne aktivnosti nakon 28 dana (u ChGlc_{30%}), aktivnost imLip pada sporije, pri čemu u istom vremenu zadržava i do 67 % svoje inicijalne aktivnosti (u ChGly_{10%}). Ovakvo je opažanje u skladu s teorijom pripreme imobiliziranih enzima, jer je glavna prednost imobiliziranog enzima upravo veća otpornost na razgradnju (Zhu i sur., 2001). ImLip stabilnija je zahvaljujući višekratnom vezanju enzima na nosač sastavljen od makroporoznih poliakrilnih kuglica. Taj postupak sprječava intermolekularne procese poput agregacije proteina ili proteolize te posljedično dovodi do nastajanja stabilnije enzimske molekule. Također, imobilizacija osigurava aktivnost enzima kroz dulji period, njegovu višestruku upotrebu i jednostavnu obradu produkata. Sve te karakteristike čine imLip lakšom za manipulaciju i robusni sustav za mjerenje. Sve navedeno može objasniti značajno više izmjerene vrijednosti rezidualnih aktivnosti za imLip u odnosu na sLip.

Zaključno, aktivnost imLip najbolja je u NADES-u s glukozom kao donorom vodika, a sLip u NADES-u s glicerolom kao donorom vodika. Suputno tome, stabilnost imLip najbolja je u NADES-u s glicerolom kao donorom vodika, a sLip u NADES-u s glukozom kao donorom vodika.



Slika 17. Usporedba rezidualnih aktivnosti imobilizirane (imLip) i slobodne (sLip) lipaze nakon 28 dana inkubacije u različitim otopalima. Kratice: kolin-klorid:etan-1,2-diol (ChEG), kolin-klorid:glicerol (ChGly), kolin-klorid:glukoza (ChGlc) i kalij-fosfatni pufer (KP).

NADES koji sadrži glicerol kao donor vodika ima veliki potencijal postati zeleno otopalo budućnosti. Njegova upotreba u biokatalizi, ali i kemijskim sintezama, osim ekološki i funkcionalno, opravdana je i ekonomski. Glicerol nastaje u velikim količinama kao nusprodukt u proizvodnji dizela što ga čini jeftinom i lako dostupnom sirovinom (Hernaiz i sur., 2010; Ciriminna i sur., 2014). Također, dokazano je postojanje veze između kiselosti donora vodikove veze (glicerola) i skladišne te termičke stabilnosti lipaza (Kim i sur., 2016). Prethodno je već izražena sumnja u nehomogenost uzoraka u ChGlc otopalu zbog visoke viskoznosti i gustoće koje onemogućava adekvatnu i pravovremenu manipulaciju, stoga se prednost daje NADES-ima na bazi kolin-klorida s glicerolom kao donorem vodika.

4.5. Doprinos istraživanja

Ovaj rad donosi novu perspektivu u području upotrebe NADES-a kao novih zelenih otopala za skladištenje i očuvanje enzima i enzimskih preparata, uz poseban naglasak na održavanje stabilnosti i aktivnosti. Zamjena postojećih organskih otopala novim „zelenijim“ opcijama predstavlja značajnu prednost u ekološkom, ekonomskom i procesnom smislu. Također, primijenjena upotreba zelene kemije konkretan je korak u borbi protiv generiranja industrijskog otpada, s obzirom na to da su otopala jedan od najvećih i najopasnijih onečišćivača.

5. ZAKLJUČCI

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

- 1) Uočen je značajan utjecaj prikladne formulacije prirodnih eutektičkih otapala (odabirom donora vodika i volumnih udjela vode) na aktivnost (promatranu kroz tijek, iskorištenje i volumetrijsku produktivnost modelne reakcije) i stabilnost lipaza (rezidualnu aktivnost enzima).
- 2) Analizom tijeka, iskorištenja i volumetrijske produktivnost modelne reakcije hidrolize butil-etanoata, kao najbolje otapalo za održavanje aktivnosti imobilizirane lipaze pokazalo se otapalo ChGlc, a za slobodnu lipazu ChGly.
- 3) Analizom vrijednosti rezidualnih aktivnosti enzima, kao najprikladnije otapalo za održavanje skladišne stabilnosti imobilizirane lipaze pokazalo se otapalo ChGly (67 % rezidualne aktivnosti nakon 28 dana inkubacije u ChGly_{10%}), a za slobodnu lipazu ChGlc (40 % rezidualne aktivnosti nakon 28 dana inkubacije u ChGlc_{30%}).
- 4) Imobilizirana *Candida antarctica* lipaza B aktivnija je od slobodne *Candida antarctica* lipaze B u svim analiziranim otapalima s ostvarenim većim maksimalnim vrijednostima iskorištenja i volumetrijske produktivnosti.
- 5) Imobilizirana *Candida antarctica* lipaza B stabilnija je od slobodne *Candida antarctica* lipaze B u svim analiziranim otapalima. Dok sLip zadržava maksimalno 40 % rezidualne aktivnosti nakon 28 dana (u ChGlc_{30%}), aktivnost imLip pada sporije, pri čemu u istom vremenu zadržava i do 67 % aktivnosti (u ChGly_{10%}).
- 6) Prirodna eutektička otapala na bazi kolin-klorida s glicerolom kao donorom vodika izdvajaju se kao otapala najvećeg potencijala za primjenu u industriji, kao reakcijski i skladišni medij za lipaze.

6. LITERATURA

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

Alonso, D. A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I. M., Ramon, D.J. (2016) Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century. *Eur. J. Org. Chem.* 612–632.

Anastas, P. T., Warner J. C. (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, **107**, 2167.

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green chemistry: Principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**(1), 301–312.

Anonymus (2020) MarketsandMarkets, Microbial Lipase Market by Application (Cleaning Agents, Animal Feed, Dairy Products, Bakery Products, and Confectionery Products), Form (Powder and Liquid), Source (Fungi and Bacteria), and Region - Global Forecast to 2023 <<https://www.marketsandmarkets.com>> . Pristupljeno 3 siječnja 2020.

Bommarius, A. S., Riebel, B. R. (2004) *Biocatalysis*. WILEY-WCH Verlag GmbH & Co. KGaA. I. str. 19-40.

Ciriminna, R., Pina, C. D., Rossi, M., Pagliaro, M. (2014) Understanding the glycerol market. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **116**(10), 1432–1439.

Constable, D. J. C., Curzons, A. D., Cunningham, V. L. (2002) Metrics to ‘green’ chemistry -which are the best? *Green Chem.* **4**, 521–527.

Cvjetko Bubalo, M., Jurinjak Tušek, A., Vinković, M., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I. (2015a) Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **122**, 188–198.

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

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

- Durand, E., Lecomte, J., Barea, B., Dubreucq, E., Lortie, R., Villeneuve, P. (2013) Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chem.* **15**(8) 2275–2282
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., Villeneuve, P. (2012) Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem.* **47**, 2081–2089.
- Durand, E., Lecomte, J., Barea, B., Villeneuve, P. (2014) Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**(1), 16–23.
- Elgharbawy, A. A., Hayyan, A., Hayyan, M., Rashid, S. N., Nor, M. R. M., Zulkifli, M. Y., Alias, Y., Mirghania, M. E. S. (2018) Shedding light on lipase stability in natural deep eutectic solvents. *Chem. Biochem. Eng.* **32**(3), 359–370.
- Faber, K. (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. Izd., Springer. str. 1–268.
- Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Cabrera, Z., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R. (2007) Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Tech.* **41**(5), 565–569.
- Ferreira-Leitão, V., Cammarota, M., Gonçalves Aguiéiras, E., Vasconcelos de Sá, L., Fernandez-Lafuente, R., Freire, D. (2017) The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. *Catalysts*, **7**(12), 9.
- Fredes, Y., Chamorro, L., Cabrera, Z. (2019) Increased Selectivity of Novozyme 435 in the Asymmetric Hydrolysis of a Substrate with High Hydrophobicity Through the Use of Deep Eutectic Solvents and High Substrate Concentrations. *Molecules*, **24** (4), 792.
- Gandhi, N. N. (1997) Applications of Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**(6), 621–634.
- Ghanem, A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**, 1721-1754.
- Gorke, J. T., Srienc, F., Kazlauskas, R. J. (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.* **10**, 1235–1237.

- Guajardo, N., Ahumada, K., Domínguez de María, P., Schrebler, R. A. (2018) Remarkable stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized via cross-linking aggregates (CLEA) in deep eutectic solvents. *Biocatal. Biotransfor.* **37**(2), 106–114.
- Guajardo, N., Domínguez de María, H. P., Ahumada, K., Schrebler, R. A., Ramírez-Tagle, R., Crespo, F. A., Carlesi, C. (2017) Water as Cosolvent: Nonviscous Deep Eutectic Solvents for Efficient Lipase-Catalyzed Esterifications. *ChemCatChem* **9**, 1393–1396.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S., Saheed, O. K. (2013) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**(7), 2193–2195.
- Hernáiz, M. J., Alcántara, A. R., García, J. I., Sinisterra, J. V. (2010) Applied biotransformations in green solvents. *Chem. Eur. J.* **16**(31), 9422–9437.
- Huang, Z.L., Wu, B.P., Wen, Q., Yang, T.X., Yang, Z. (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**(12), 1975–1981.
- Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B. (2014) Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption* **20**, 801–821.
- Juneidi, I., Hayyan, M., Mohd Ali, O. (2016) Toxicity profile of choline chloride-based deep eutectic solvents for fungi and *Cyprinus carpio* fish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 7648–7659.
- Kim, S. H. i sur. (2016) Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. . *J. Mol. Catal. B Enzym.* **128**, 65–72.
- Kleiner, B., Schörken, U. (2015) Native lipase dissolved in hydrophilic green solvents: a versatile 2-phase reaction system for high yield ester synthesis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **117**(2) 167–177.
- Klibanov, A. M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241–246.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., Pauli, G. F. (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.* **81**, 679–690.
- Mączka, W., Wińska, K., Grabarczyk, M., Żarowska, B. (2018) Yeast-Mediated Stereoselective Reduction of α -Acetylbutyrolactone. *Appl. Sci.* **8**, 1334.

- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Tech.* **40**(6), 1451–1463.
- Maugeri, Z., Domínguez de María, P. (2014) Benzaldehyde lyase (BAL)-catalyzed enantioselective CC bond formation in deep-eutectic-solvents-buffer mixtures. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **107**, 120–123.
- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., Looi, C. Y. (2017) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering - Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.* **35**(2), 105–134.
- Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A. (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Equip.* **29**, 205–20.
- Müller, C. R., Lavandera, I., Gotor-Fernández, V., Domínguez de María, P. (2015) Performance of recombinant-whole-cell-catalyzed reductions in deep-eutectic-solvent-aqueous-media mixtures. *ChemCatChem* **7**, 2654–2659.
- Ortiz, C. i sur. (2019) Novozyme 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catal. Sci. Technol.* **9**(10), 2380–2420.
- Paiva, A. L., Balcao, V. M., Malcata, X. F. (2000) Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Tech.* **27**, 187–204.
- 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 Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Panić, M., Delač, D., Marin, R., Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M. (2018) Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives : *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. *Biotechnol. Lett.* **41**, 253-262.
- Panić, M., Gunjević, V., Cravotto, G., Radojčić Redovniković, I. (2019) Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches. *Food Chem.* **300**, 125-185.

- Panić, M., Majerić Elenkov, M., Roje, M., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I., (2017) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process Biochem.* **66**, 133-139.
- Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Redovniković, R. I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **112**, 46–53.
- Raza, S., Fransson, L., Hult, K. (2000) Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Sci.* **10**(2), 329–338.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., Miller, R. (2009) Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interfac.* **147-148**, 237–250.
- Ruesgas-Ramon, M., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E. (2017) Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 3591–3601.
- Sharma, R., Christi, Y., Banerjee, U. C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **19**, 627–662.
- Sheldon, R. A. (2017) Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **6**(1), 32–48.
- Siebenhaller, S., Muhle-Goll, C., Luy, B., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., Hiller, E., Günther, M., Rupp, S., Zibek, S., Syldatk, C. (2016) Sustainable enzymatic synthesis of glycolipids in a deep eutectic solvent system. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **133**, S281–S287.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**(21), 11060–11082.
- Stauch, B., Fisher, S. J., Cianci, M. (2015) Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J. Lipid Res.* **56**, 2348-2358.
- Tran, D. N., Balkus, K. J. (2011) Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *ACS Catalysis*, **1**, 956–968.

- Ülger, C., Takaç, S. (2017) Kinetics of lipase-catalysed methyl gallate production in the presence of deep eutectic solvent. *Biocatal. Biotransformation* **35**, 407–416.
- Uppenberg, J. i sur. (1995) Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, **34**(51), 16838–16851.
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., Jones, T. A. (1994) The sequence, cristal determination and refinement of two cristal forms of Lipase B *Candida antarctica*. *Structure*, **2**(4), 293–308.
- Wu, B. P., Wen, Q., Xu, H., Yang, Z. (2014) Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: activity, stability and structure. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **101**, 101–107
- Xie, P., Zhou, X., Zheng, L. (2019) Stereoselective synthesis of a key chiral intermediate of (S)-Rivastigmine by AKR-GDH recombinant whole cells. *J. Biotechnol.* **289**, 64–70.
- Xu, P., Zheng, G. W., Zong, M. H., Li, N., Lou, W. Y. (2017). Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.* **4**(1).
- Zakrewsky, M., Banerjee, A., Apte, S., Kern, T. L., Jones, M. R., Del Sesto, R. E., Koppisch, A. T., Fox, D. T., Mitragotri, S. (2016) Choline and geranate deep eutectic solvent as a broad-spectrum antiseptic agent for preventive and therapeutic applications. *Adv. Healthc. Mater.* **5**(11), 1282–1289.
- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jerome, F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**(21), 7108–7146.
- Zhao, B. Y., Xu, P., Yang, F. X., Wu, H., Zong, M. H., Lou, W. Y. (2015) Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and Application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**(11), 2746–2755.
- Zhao, H., Baker, G. A., Holmes, S. (2011) New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org Biomol Chem.* **9**(6), 1908–1916
- Zhao, H., Zhang, C. and Crittle, T. D. (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **85–86**, 243–247.

Zhu, K. i sur. (2001) Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. *BBA-Protein Struct. M.* **1547**(2), 329–338.

7. PRILOZI

Popis korištenih kratica:

- $^1\text{H-NMR}$ = proton nuklearna magnetska rezonanca (eng. Proton Nuclear Magnetic Resonance)
- Ac= kiselina
- Al= alkohol
- CALA= *Candida antarctica* lipaza A
- CALB= *Candida antarctica* lipaza B
- Ch= kolin-klorid
- Cit= limunska kiselina
- DEAC= N,N-dietil etanol amonij klorid
- DEG= dietilen glikol
- DES= eutektička otopala (eng. Deep Eutectic Solvents)
- DSC= diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (eng. Differential Scanning Calorimetry)
- EAC= etilamonij klorid
- EG= etan-1,2-diol
- Es= ester
- Fru= fruktoza
- FT-IR= Fourierova infracrvena spektroskopija (eng. Fourier Transform Infrared spectroscopy)
- GC-MS= plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (eng. gas chromatography with mass spectrometry)
- Glc= glukoza
- Gly= glicerol
- iCALB= imobilizirana *Candida antarctica* lipaza B
- imLip= imobilizirana *Candida antarctica* lipaza B, Novozyme 435
- KP= kalijev-fosfatni pufer
- Ma= jabučna kiselina
- Met= metilamonij klorid
- Mo= malonska kiselina
- NADES= prirodna eutektička otopala (eng. Natural Deep Eutectic Solvents)

- Ox= oksalna kiselina
- Scu= saharoza
- sLip= slobodna lipaza, *Candida antarctica* lipaza B
- Sol= sorbitol
- TEG= trietilen glikol
- THEDES= terapijska eutektička otapala (*eng.* Therapeutical Deep Eutectic Solvents)
- U= urea
- Xyl= ksiloza
- Xylol= ksilitol

Grčki simboli i parametri:

- P_v = volumetrijska produktivnost [$\text{mmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$]
- R_t = retencijsko vrijeme [min]
- T_f = temperatura ledišta [$^{\circ}\text{C}$]
- v/v = volumni udio
- η = iskorištenje [%]

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Mia Radović