

Redukcija prokiralnih ketona u prirodnim eutektičkim otapalima

Pušek, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:693793>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Anita Pušek,
1319/MB

**REDUKCIJA PROKIRALNIH
KETONA U PRIRODNIM
EUTEKTIČKIM
OTAPALIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marine Cvjetko Bubalo te uz pomoć dr.sc. Manuele Panić.

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

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na prenesenom znanju, razumijevanju, uloženom trudu, strpljenju i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i dr.sc. Manueli Panić i ostalim djelatnicima Laboratorija na nesebičnoj pomoći te brojnim korisnim savjetima tijekom čitavog obavljanja praktičnog dijela.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji, dečku i svim prijateljima koji su mi bili najveća podrška i motivacija tijekom mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

REDUKCIJA PROKIRALNIH KETONA U PRIRODNIH EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Anita Pušek, 1319/MB

Sažetak: U svrhu povećanja *zelenog* karaktera u biotransformacijskim postupcima proizvodnje biološki aktivnih spojeva, raste broj istraživanja usmjerenih na mogućnost primjene prirodnih eutektičkih otapala i enzima kao biokatalizatora, a čime se značajno smanjuje negativan učinak klasične kemijske sinteze. U ovom radu ispitan je utjecaj odabranih ekološki prihvatljivih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida i betaina na aktivnost i promjene u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze te na stabilnost reduciranog i oksidiranog oblika nikotinamidnog koenzima. Rezultati ispitivanja pokazali su da eutektička otapala betain:etilen-glikol i kolin-klorid:urea imaju stabilizirajući učinak na enzimsku aktivnost te na oba koenzima. Budući da su kiralni alkoholi ključni prekursori u dobivanju lijekova i finih kemikalija, u ovome radu je provedena reakcija enantioselektivne redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanona katalizirane oksidoreduktivnim enzimima pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u otapalu betain:etilen-glikol s različitim udjelima. Biokatalitička reakcija redukcije u eutektičkom otapalu betain:etilen-glikol rezultirala je većim iskorištenjem u odnosu na bioredukcije provedene u čistoj vodi i puferu.

Ključne riječi: alkohol dehidrogenaza, biokataliza, nikotinamidni koenzimi, prirodna eutektička otapala, redukcija, 2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanon

Rad sadrži: 58 stranica, 21 slika, 5 tablica, 48 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: Dr.sc. Manuela Panić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo
3. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
4. Doc.dr.sc. Davor Valinger (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna 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

REDUCTION OF PROCIRAL KETONES IN NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Anita Pušek, 1319/MB

Abstract: For the purposes of increasing the green character in biotransformations for the production of biologically active compounds, the number of studies focused on the possibility of using natural eutectic solvents and enzymes as biocatalysts is growing, which significantly reduces the negative effect of classical chemical synthesis. In this study, the influence of selected environmentally friendly eutectic solvents based on choline chloride and betaine on the activity and changes in the conformation of the enzyme alcohol dehydrogenase and on the stability of the reduced and oxidized form of nicotinamide coenzyme was investigated. The test results showed that the eutectic solvents betaine: ethylene glycol and choline chloride: urea have a stabilizing effect on enzyme activity and on both coenzymes. Since chiral alcohols are the key precursors in the preparation of drugs and fine chemicals, the enantioselective reduction of 2-chloro-1- (3,4-difluoro-phenyl)ethanone catalyzed by oxidoreductive enzymes of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in natural eutectic solvents betaine:ethylene-glycol with different water contents was performed. Additionally, the eutectic solvent choline-chloride:urea has also been shown as a suitable solvent in previous tests. The biocatalytic reduction reaction in the eutectic solvent betaine: ethylene glycol resulted in higher yields compared to the bioreductions performed in pure water and buffer.

Keywords: biocatalysis, natural eutectic solvents, reduction, 2-chloro-1- (3,4-difluorophenyl)ethanone

Thesis contains: 58 pages, 21 figures, 5 tables, 48 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Manuela Panić*

Reviewers:

1. *PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor*
2. *PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor*
3. *PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*
4. *PhD. Davor Valinger, Assistant professor (substitute)*

Thesis defended: September 25th, 2020.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ZELENA KEMIJA	2
2.1.1. Principi zelene kemije	2
2.1.2. Smjerovi zelene kemije	3
2.1.2.1. Kataliza i biokataliza	4
2.1.2.2. Ekološki prihvatljiva otapala	5
2.2. PRIMJENA ENZIMA U ORGANSKOJ SINTEZI	6
2.2.1. Općenito o enzimima	6
2.2.2. Biokatalizatori u biotransformacijama	10
2.2.2.1. Oksidoreduktaze	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Biokatalizator	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Pufferi i njihova priprema	14
3.1.4. Oprema i uređaji	15
3.2. METODE RADA	16
3.2.1. Priprema <i>prirodnih</i> eutektičkih otapala	16
3.2.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze (ADH)	17
3.2.3. Praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenaze primjenom spektrofluorimetrije	18
3.2.4. Praćenje stabilnosti koenzima NAD ⁺ i NADH u <i>prirodnim</i> eutektičkim otapalima	19
3.2.5. Enantioselektivna redukcija 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem <i>S. cerevisiae</i>	20
3.2.5.1. Određivanje koncentracije produkata (<i>R,S</i>)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola	22
3.2.5.2. Izrada baždarnog dijagrama	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. PRIPREMA PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA	25
4.2. UTJECAJ ODABRANIH PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA ENZIM ALKOHOL DEHIDROGENAZU (ADH)	26
4.2.1. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze (ADH)	27
4.2.2. Praćenje promjena u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) primjenom spektrofluorimetrije	28

4.3. STABILNOST NIKOTINAMIDNIH KOENZIMA U PRIRODNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	31
4.3.1. Stabilnost NADH	34
4.3.2. Stabilnost NAD ⁺	42
4.4. ENANTIOSELEKTIVNA REDUKCIJA 2-KLORO-1-(3,4-DIFLUORO-FENIL) ETANONA KATALIZIRANA PEKARSKIM KVASCEM	47
5. ZAKLJUČCI	52
6. LITERATURA	54

1. UVOD

U posljednje se vrijeme, u sklopu *zelene* kemije, intenzivno istražuju novi, ekološki prihvatljivi i energetski učinkovitiji procesi proizvodnje u svrhu očuvanja okoliša i smanjenja nastajanja štetnih nusprodukata. Ciljevi *zelene* kemije u zaštiti okoliša i ekonomskoj dobiti ostvaruju se kroz nekoliko dominantnih smjerova, među kojima najširu primjenu imaju biotransformacije, enzimski katalizirane pretvorbe organskih spojeva u definirane konačne produkte. Veliki potencijal biotransformacijskih procesa očituje se u blagim uvjetima rada, visoke enantioselektivnosti biokatalizatora te mogućnosti modifikacije enzima za željenu primjenu, što je od izuzetnog značaja u sintezi enantiomerno čistih spojeva koji su od velike važnosti u farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Naime, enzimске reakcije mogu se provesti s izuzetnom kemo-, regio- i stereoselektivnošću koje omogućuju proizvodnju gotovo isključivo jednog enantiomera.

Osim primjene biokatalizatora u biotransformacijama, *prirodna* eutektička otapala kao alternativa hlapljivim organskim otapalima omogućavaju sintezu organskih spojeva koja je znatno manje štetna za okoliš u odnosu na uobičajene klasične kemijske metode sinteze. Prema načelima *zelene* kemije idealno otapalo je netoksično, kemijski i fizički stabilno, ima nisku hlapljivost i mogućnost višekratne uporabe te je jednostavno za rukovanje. Prednosti eutektičkih otapala su manja toksičnost prema okolišu i ljudima, biorazgradivost, stabilnost, niži troškovi sirovina zbog čega su jeftinija za proizvodnju, te se jednostavnije sintetiziraju.

Stoga, kako su među najčešćim biokatalizatorima koji dominiraju u industrijskim biokatalizama oksidoreduktaze koje ovise o koenzimima, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj odabranih *prirodnih* eutektičkih otapala na aktivnost i promjene u konformaciji strukture enzima alkohol dehidrogenaze te na stabilnost reduciranog i oksidiranog oblika nikotinamidnog koenzima. Također, svrha navedenih ispitivanja bila je pronaći idealno eutektičko otapalo u kojem će se provesti reakcija enantioselektivne redukcije supstrata 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u kiralni alkohol (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanol, kiralni intermedijer u sintezi biološki aktivne tvari lijeka koji pripada skupini antitrombotika.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA KEMIJA

Zelena kemija, grana je kemije koja se zasniva na osmišljavanju, razvoju te primjeni kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju, odnosno eliminiraju uporabu i/ili proizvodnju supstancija opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš. Koncept *zelene* kemije razvijen je 1990. godine na inicijativu Američke agencije za zaštitu okoliša (engl. *Environmental Protection Agency*, EPA), a 1995. godine pokrenut je program s ciljem prepoznavanja i podupiranja fundamentalnih i razvojnih kemijskih industrijskih metodologija, zahvaljujući kojima se postiže prevencija onečišćivača (engl. *Green Chemistry Challenge Awards*) (Anastas, 1998). U većini postojećih procesa proizvodnje upotrebljavaju se hlapljiva organska otapala pri čemu se u atmosferu otpuštaju velike količine otpadnih, za okoliš štetnih tvari. Kako bi se smanjila količina opasnog otpada sveprisutnog u industriji, potrebno je zamijeniti hlapljiva organska otapala ekološki prihvatljivim otapalima ili novim postupcima proizvodnje. U posljednje se vrijeme, u sklopu *zelene* kemije, intenzivno istražuju novi, sigurniji i energetski učinkovitiji procesi proizvodnje i primjene kemikalija koji se zasnivaju na kompromisu između ekonomskih, socijalnih i ekoloških zahtjeva. Ostvarujući zadane ciljeve *zelenog* programa, mijenja se ustaljena industrijska praksa – „proizvedi, onečisti, pa tek poslije čisti“ te krajem 20. stoljeća upravo ta grana kemije postaje okosnica industrijske ekologije (Jukić i sur., 2005).

2.1.1. Principi zelene kemije

Pokret za zaštitu okoliša, temeljen na znanstvenim i ekonomskim načelima, *zelena* kemija usko je vezan uz održivi razvoj. Definicija održivog razvoja ističe da je to razvoj koji ide ususret potrebama današnjice, bez negativnog utjecaja na mogućnosti budućih generacija da idu ususret svojim potrebama (Clark i Macquarrie, 2002). Održivi razvoj znatno je važan za kemijsku industriju jer posebno naglašava potrebu za izbjegavanjem onečišćenja, ali i prekomjerne upotrebe prirodnih izvora. Stoga, kako bi se smanjila ili eliminirala upotreba ili nastajanje štetnih nusprodukata te unaprijedila iskoristivost proizvodnih procesa, potrebno je pratiti dvanaest principa *zelene* kemije koja prema Jukić i sur. (2004) glase:

1. Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i sanirati nakon što je već nastao; Tijek kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni proizvod;

2. Postupak sinteze, ukoliko je to moguće, treba osmisliti s ciljem smanjenja upotrebe i proizvodnje spojeva toksičnih za ljude i za okoliš;
3. Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži učinkovitost;
4. Upotrebu pomoćnih kemijskih tvari (otapala, sredstva za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće;
5. Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum;
6. Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo;
7. Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštita funkcijskih skupina, privremene modifikacije fizikalno-kemijskog procesa itd.);
8. Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagensa u stehiometrijskim količinama;
9. Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja;
10. Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari;
11. U kemijskim procesima potrebno je smanjiti upotrebu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (toksičnost, eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

Zelena ili održiva kemija samo je drugačiji način razmišljanja o dizajnu, razvoju i primjeni kemijskih proizvoda i procesa. Prilikom osmišljavanja *zelenog* procesa nemoguće je istodobno maksimalno udovoljiti zahtjevima svih 12 principa, ali se nastoji primijeniti što veći broj istih tijekom pojedinih koraka sinteze. Primjenom navedenih principa pronalaze se kreativni i inovativni načini redukcije otpada, očuvanja energije, proizvodnje alternativnih goriva i zamjenskih tvari za opasne kemikalije, koji omogućuju uspostavu ravnoteže između prirodnih izvora, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša (Jukić i sur., 2004).

2.1.2. Smjerovi zelene kemije

Ciljevi *zelene* kemije u zaštiti okoliša i ekonomskoj dobiti ostvaruju se kroz nekoliko dominantnih smjerova poput katalize i biokatalize u cilju dobivanja visoko selektivnih, čistih spojeva bez nastanka toksičnih nusprodukata; uporabe i traženja alternativnih obnovljivih i neškodljivih sirovina poput biomase; razvoja manje štetnih eko-kompatibilnih kemikalija; pronalaza i ispitivanja alternativnih reakcijskih medija, netoksičnih i obnovljivih kao što su

voda, ionske kapljevine i superkritične tekućine; te istraživanja alternativnih reakcijskih uvjeta poput aktivacije mikrovalnim zračenjem kao i novim fotokatalitičkim reakcijama (Jukić i sur., 2005).

2.1.2.1. Kataliza i biokataliza

Katalitičke reakcije su reakcije na kojima se temelji više od 90 % svih industrijskih procesa, a u *zeleni* program uvode niz pogodnosti poput smanjene količine uložene energije, katalitičke, a ne stehiometrijske količine reaktanata, povećanja selektivnosti, smanjene uporabe otapala i sredstava za separaciju, upotrebe manje toksičnih tvari itd. Stoga, Anastas i Williamson (2000), utemeljitelji *zelene* kemije, s pravom smatraju da je kataliza jedan od temeljnih stupova te discipline, koja svoju obvezu očituje u prevenciji onečišćivača. Uvođenjem novih katalitičkih procesa kao biosintetske korake u proizvodnji postiže se dvostruki cilj, i to u vidu zaštite okoliša i financijske dobiti. Kataliza nalazi primjenu i u alternativnim reakcijskim medijima kao što su voda, superkritične tekućine i ionske kapljevine. Voda kao alternativan medij od značajnog je znanstvenog interesa jer ima niz prednosti u odnosu na organska otapala (nije skupa, nije toksična, nije zapaljiva itd.), u kojoj se pravilnim odabirom katalizatora može provoditi niz reakcija. Također, reakcije u superkritičnim tekućinama kao što su superkritični CO₂ i superkritični H₂O omogućuju postizanje svojstva plinova i tekućina, a pronalaze primjenu u ekološkom pristupu industrijskih procesa. Sve se više povećava i upotreba konverzije biomase u biokatalitičkim procesima u cilju komercijalne proizvodnje spojeva i bioproizvodnje iz obnovljivih sirovina koje su od posebnog značaja u prehrambenoj industriji, pri sintezi specifičnih kemikalija kao i u farmaceutskoj industriji. Aktivacija mikrovalnim (MW) zračenjem kao nekonvencionalnim energetske izvorom postala je veoma popularna i korisna tehnologija organske kemije. MW-zračenje ima posebno dobar utjecaj na reakcije koje su u tradicionalnim uvjetima odvijaju sporo kao što su npr. hidrolize nitrila, amida i estera, esterifikacije te polimerizacije. Onečišćenja zemlje, zraka i vode čine jedan od najvećih ekoloških problema današnjice koji nastaju kao rezultat ljudske djelatnosti, a znatno utječu na zdravlje čovjeka. Zato se intenzivno istražuju načini poboljšanja kvalitete zraka i vode, a jedan od najuspješnijih načina uklanjanja organskih onečišćivača iz zraka i vode je fotokataliza, odnosno heterogena fotokatalitička razgradnja (UV/katalizator) sa ili bez dodatka oksidacijskih sredstava. Zaključno, zamjenom nekih koraka kemijske sinteze s jednom od navedenih, a odgovarajućih reakcija može se postići *zeleni* karakter cijelog procesa (Jukić i sur., 2005).

2.1.2.2. Ekološki prihvatljiva otapala

U sklopu zelene tehnologije, aktivno se istražuju nova otapala koja će zamijeniti uobičajena opasna organska otapala koje karakteriziraju visoka hlapljivost i toksičnost. Idealno otapalo trebalo bi biti jednostavno za upotrebu, kemijski i fizički stabilno, netoksično, niske hlapljivosti te jednostavno za recikliranje uz mogućnost ponovne uporabe. Otapala koja su se najviše približila ovim zahtjevima su superkritični i subkritični fluidi, ionske kapljevine, eutektička otapala i otapala iz prirodnih/obnovljivih sirovina (slika 1) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). U posljednja dva desetljeća kao nova zelena, ekološki prihvatljiva otapala intenzivno se istražuju ionske kapljevine (engl. *Ionic Liquids, ILs*), organske soli koje su pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju, a zbog svojih specifičnih svojstava, koja ne posjeduje nijedna druga tvar, prikladne su za raznovrsnu uporabu (Blanchard i sur., 1999; Welton, 1996). Uz definiciju ionskih kapljevine često se spominje i njihovo talište, koje je niže od 100 °C. Ogromni potencijal ionskih tekućina proizlazi iz njihovih fizikalno-kemijskih svojstava; neznatne hlapljivosti, nezapaljivosti, velike toplinske, kemijske i elektrokemijske stabilnosti te mogućnosti ponovne upotrebe, koja se mogu prilagoditi kombinacijom različitih kationa i aniona za specifičnu upotrebu u raznim područjima. (Paiva i sur., 2014).



Slika 1. Zastupljenost ekološki prihvatljivih otapala u znanstvenoj literaturi (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a)

Unatoč brojnim pogodnim svojstvima, ionske kapljevine su slabo biorazgradive i toksične te samim time nisu održive. Navedeni nedostaci u načelu se odnose na imidazolijeve i piridinijeve ionske kapljevine te se u posljednje vrijeme razvoj alternativnih otapala usmjerio

prema prirodnim ionskim kapljevina i eutektičkim otapalima (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) koja su pokazala najveći potencijal u području zelene kemije.

Eutektička otapala, često ionskog karaktera, smjesa su dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, koja u određenom omjeru imaju niže talište od pojedinačnih komponenti smjese (Zhang i sur., 2012). U pripravi eutektičkih otapala široku primjenu ima kolin-klorid (ChCl), netoksična kvaterna amonijeva sol, koja lako stupa u interakcije s jeftinim i lako dostupnim donorima vodika poput uree, limunske kiseline, jantarne kiseline i glicerola. Komponente u DES-u povezuju se vodikovim vezama koje rezultiraju mjestimičnom delokalizacijom naboja pri čemu dolazi do sniženja točke tališta smjese, u odnosu na točke tališta polaznih sirovina (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Također, DES-ovi imaju slična svojstva kao i ionske kapljevine, no jeftiniji su za proizvodnju zbog nižih troškova sirovina, manje toksični i često biorazgradivi. Ukoliko se u strukturi DES-ova nađu primarni metaboliti, takva otapala nazivaju se *prirodna* eutektična otapala (engl. *Natural Eutectic Solvents*, NADES) koja u potpunosti udovoljavaju zahtjevima idealnog zelenog otapala prema principima zelene kemije. Glavna prednost NADES-ova u odnosu na ionske kapljevine je mogućnost pripreme ovih otapala koja je mnogo jednostavnija i ekonomičnija, a može se pripremiti na više načina: iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do unaprijed određene vrijednosti temperature. Kombinacije NADES-ova mogu se predviđati, a mogućnosti koje proizlaze iz sposobnosti dizajniranja najprikladnijih svojstava za određenu primjenu su ogromne (Paiva i sur., 2014).

2.2. PRIMJENA ENZIMA U ORGANSKOJ SINTEZI

2.2.1. Općenito o enzimima

Enzimi su organske makromolekule proteinskog sastava koje imaju sposobnost vezanja malih molekula te utjecanja na ravnotežu reakcija. To su biološki katalizatori, koji ubrzavaju kemijske reakcije, a da se pri tome ne troše i ne mijenjaju. Aktivnost enzima izražava se kao količina pretvorenog supstrata u mikromolovima u jedinici vremena. S obzirom da su enzimi proteini, sastoje se od jednog ili više linearnih lanaca čiji se aminokiselinski sastav gotovo uvijek, uz vrlo rijetke iznimke, sastoji od 20 zajedničkih aminokiselina. Osim učinkovitosti enzima koja se očituje u vrlo maloj količini enzima potrebnoj za provođenje reakcija te ubrzanje reakcija i do 10^{17} puta brže od odgovarajućih neenzimskih reakcija, još jedna prednost je što enzimi djeluju pri blagim uvjetima: pH=5–8, temperatura 20 – 40 °C,

atmosferski tlak, čime se smanjuju neželjene reakcije. Također, enzimi su lako biorazgradivi, pa su prihvatljivi za okoliš. Enzimi nisu ograničeni samo na svoje prirodne produkte, a moguće je raditi i u vodenom i u ne-vodenom mediju. Danas je poznat veliki spektar reakcija koje se provode pomoću enzima, pa i one koje nisu izvedive kemijskim metodama (Wohlgemuth, 2011).

Prema enzimskoj bazi podataka koja predstavlja sveobuhvatan skup informacija o metaboličkim enzimima na temelju primarne literature (engl. *The Comprehensive Enzyme Information System, BRAunschweig ENzyme DATabase, BRENDA*), enzimi su klasificirani u 7 kategorija prema tipu reakcija (tablica 1.).

Tablica 1. Klasifikacija enzima (BRENDA, 2020)

KLASA ENZIMA	OPIS REAKCIJE	TIP REAKCIJE
Oksidoreduktaze (EC 1)	oksidacija-redukcija: oksigenacija C–H, C–C, C=C veza, uklanjanje ili dodavanje ekvivalenata vodikovih atoma	$A_{\text{red}} + B_{\text{ox}} \leftrightarrow A_{\text{ox}} + B_{\text{red}}$
Transferaze (EC 2)	transfer skupina: aldehidne, ketonske, acilne, fosforilne, metilne, NH ₃	$AB + C \rightarrow A + BC$
Hidrolaze (EC 3)	hidrolitičko dobivanje estera, amida, laktona, laktama, epoksida, nitrila, anhidrida, glikozida, organohalogenata	$AB + H_2O \rightarrow AH + BOH$
Liaze (EC 4)	adicija-eliminacija malih molekula sa C=C, C=N, C=O veze	$AB \leftrightarrow A + B$ (obrnuta reakcija: sintaze)
Izomeraze (EC 5)	izomerizacija kao što je racemizacija, epimerizacija, pregradnja	$ABC \leftrightarrow ACB$
Ligaze (EC 6)	nastajanje-cijepanje C–O, C–S, C–N, C–C veze uz cijepanje trifosfata	$A + B + ATP \rightarrow AB + ADP + P_i$
Translokaze (EC 7)	translokacija hidrona, inorganskog aniona te kationa i njihovih kelata, aminokiselina, peptida, ugljikohidrata preko membrane ili njihovo odvajanje unutar membrane	$AX + B_{\text{side1}} \rightleftharpoons A + X + B_{\text{side2}}$

Također, jedna od najznačajnijih prednosti enzima kao biokatalizatora jest visoka selektivnost koja u skladu s principima *zelene* kemije doprinosi štednji energije, sirovina, smanjenju trajanja reakcije, minimalizaciji reakcijskih koraka te problema s neželjenim nusproduktima. Učinkovitost enzima očituje se u svojstvu visoke kemoselektivnosti, odnosno enzimi djeluju na jedinstveni tip funkcionalne skupine čime se smanjuje broj reakcijskih stupnjeva. Zatim, biokatalizatori pokazuju svojstvo regioselektivnosti, enzimi zbog svoje trodimenzijske strukture mogu razlikovati funkcionalne skupine koje su smještene u različitim područjima iste molekule supstrata čime se minimalizira količina nusprodukata. Uz navedene karakteristike, enzime karakterizira i svojstvo izrazito visoke kiralne selektivnosti, odnosno stereoselektivnosti zbog kojeg enzimi prepoznaju svaki oblik kiralnosti prisutan u supstratu (Faber i Patel, 2000).

Biotransformacije su enzimski katalizirane pretvorbe organskih spojeva, odnosno enzimске modifikacije definiranih čistih spojeva (prirodnih ili kemijski sintetiziranih) u definirane konačne produkte, najčešće pretvorbom u jednom koraku (Bommarius i Riebel, 2004). Temelje se na činjenici da enzimi djeluju izvan svoje prirodne okoline i prihvaćaju neprirodne supstrate prilikom čega dolazi do enzimске konverzije supstrata u produkt. Osim biotransformacija, za proizvodnju kemijskih spojeva, finih kemikalija i lijekova često se koriste kombinacije kemijskih i biokatalitičkih procesa. Pri tome se biokatalitički procesi koriste kao glavne reakcije koje zahtjevaju visoku selektivnost, specifičnost ili kao zamjena za ekološki nepovoljne reakcijske korake (Ghisalba i sur., 2010).

U posljednjih dvadeset godina došlo je do značajnog razvoja biotransformacijskih postupaka u proizvodnji vrijednih produkata. Veliki potencijal biotransformacija, odnosno biokatalize očituje se u trima glavnim prednostima u odnosu na kemijsku sintezu, a to su: (i) ekološka prihvatljivost zbog blagih uvjeta reakcije, (ii) visoka enantioselektivnost biokatalizatora, što je od izuzetnog značaja u sintezi enantiomerno čistih spojeva (od velike važnosti u farmaceutskoj industriji), te (iii) mogućnost modifikacije enzima za željenu primjenu metodama genetičkog, proteinskog inženjerstva i molekularne biologije (Grogan, 2009). Učinkovitost primjene biotransformacija u industriji ovisna je o dostupnosti i cijeni odgovarajućih enzima i mikroorganizama, pripremi proizvodnog procesa (hranjive podloge, reakcijske smjese ili biokatalizatora), izdvajanju te pročišćavanju proizvoda iz prirasle biomase, prednostima pred postojećim kemijskim metodama i procesima, vremenskim zahtjevima za razvojem novog procesa, problemu otpadnih voda i otapala, odobrenju procesa i krajnjeg proizvoda te javnom mišljenju (Faber, 2011). *Zelena* otapala kao kvalitetna

alternativa hlapljivim organskim otapalima i primjena biokatalizatora u biotransformacijskim procesima omogućavaju sintezu organskih spojeva koja je značajno manje štetna za okoliš u odnosu na uobičajene kemijske metode sinteze, a istovremeno je jednako ili u nekim slučajevima i više ekonomski isplativa. Stoga, radi postizanja povoljne ekonomike procesa, procesi biokatalize na samom početku razvoja proizvoda sve su češći i sve se više šire u svim granama industrije kemijskih procesa (Bommarius i Riebel, 2004).

Primjena biotransformacija u industrijskom mjerilu većinom se odnosi na dobivanje visokovrijednih proizvoda u manjim količinama. Biotransformacijski procesi najveću primjenu imaju u farmaceutskoj industriji, osobito zbog velike potražnje za enantiomerno čistim lijekovima u posljednjih nekoliko godina. Jedna od najznačajnijih biotransformacija u farmaceutskoj industriji je reakcija enantiselektivne hidrolize pri čemu se dobiva 6-aminopenicilanska kiselina iz prirodnog penicilina primjenom enzima penicilin-acilaze. Istaknute prednosti ove reakcije u odnosu na uobičajenu kemijsku sintezu su skraćivanje kemijski kataliziranog procesa sa tri na jedan stupanj, regiospecifičnost enzima, blagi reakcijski uvjeti, olakšana izolacija željenog produkta jer nema nusprodukata te ekonomičnija proizvodnja (Lancaster, 2002). U industriji finih kemikalija, enantiomerno čiste aminokiseline uglavnom se proizvode primjenom aminoacilaze, amidaze i karbamoilaze, pogodnih biokatalizatora za L- i D-aminokiseline. Dehidrogenaze i trasaminaze uspostavljaju se za redukcijske procese (Bommarius i Riebel, 2004). Primjena biotransformacija značajna je i u prehrambenoj industriji. S obzirom da je izomerizacija glukoze u fruktozu veoma traženi postupak jer je snaga zaslađivanja fruktozom veća od zaslađivanja saharozom te kako bi se izbjegli nedostaci kemijske izomerizacije sumpornom kiselinom koja dovodi do raspada i smeđe boje glukoznog sirupa, razvijen je blaži proces na osnovi enzima glukoza-izomeraze. Osim ovog primjera biokatalize, u prehrambenoj industriji česta je primjena enzima β -galaktozidaze koji katalizira reakciju hidrolize laktoze na sastavne monomere glukozu i galaktozu u postupku proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda koji ne sadrže laktozu, ali i sinteza L-karnitina, hranjivog sastojka koji pomaže metabolizmu i doprinosi jačanju zdravlja reakcijom dvostupanjske dehidrogenacije/hidratacije iz γ -butirobetaina (Bommarius i Riebel, 2004). Također, biokataliza se primjenjuje i u kozmetičkoj i tekstilnoj industriji, u proizvodnji polimera, agrokemikalija i stočne hrane te u obradi otpadnih voda. Produkti koji se sintetiziraju u velikom mjerilu su vitamini, aminokiseline, smole, farmaceutici, razni prehrambeni proizvodi i fine kemikalije (Ghisalba i sur., 2010; Bommarius i Riebel, 2004). Svrha i ciljevi biotransformacija uključuju uvođenje kiralnih centara u molekule, odvajanje

racemata, selektivnu pretvorbu odgovarajućih funkcionalnih skupina sličnih reaktivnosti, regioselektivnu funkcionalizaciju neaktivnog ugljika te pretvorbu nestabilnih molekula u blagim reakcijskim uvjetima (Bommarius i Riebel, 2004).

2.2.2. Biokatalizatori u biotransformacijama

Enzimi su svoju ulogu u proizvodnji pronašli još u 19. stoljeću, a od velike su važnosti i u *zelenoj* proizvodnji. Umjesto u klasičnoj organskoj sintezi koriste se u tehnologiji biokatalitičkih procesa zbog čega takva tehnologija ima velik značaj kod sigurnosti i zdravlja, ali i u okolišnim aspektima industrije (Wohlgemuth, 2011). U usporedbi s drugim vrstama katalizatora, npr. homogenim katalizatorima u kojima su ligandi odgovorni za specifičnost katalize ili heterogenim katalizatorima u kojima su katalitički aktivni centri pričvršćeni na čvrste nosače poput zeolita ili metalnih oksida, enzimi imaju svoje prednosti i nedostatke navedene u tablici 2. Iako enzimi često imaju velike prednosti u pogledu selektivnosti, njihova stabilnost često nije dovoljna. Uz to, dugo razdoblje razvoja novih biokatalizatora uslijed nedovoljne baze znanja o biokatalizi i biotehnologiji ostaju problem i izazov u primjeni biotransformacija u industrijskom mjerilu (Bommarius i Riebel, 2004).

Tablica 2. Prednosti i nedostaci enzimskih biokataliza (Bommarius i Riebel, 2004)

PREDNOSTI	NEDOSTACI
Izrazito visoka enantioselektivnost	Često niska specifična aktivnost
Izrazito visoka regioselektivnost	Nestabilnost na ekstremnim temperaturama i pH
Transformacija u blagim uvjetima	Dostupnost samo za odabrane reakcije
Otapalo je često voda	Dugo razdoblje razvoja novih enzima

U biotransformacijama se kao biokatalizatori koriste enzimi (sirovi ili pročišćeni), biljne i životinjske stanice i tkiva, čiste kulture mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni, alge) te umjetni enzimi (abzimi) (Grogan, 2009). Biokatalizatori u biotransformacijama često smanjuju broj reakcijskih stupnjeva, osiguravaju nastajanje željenog produkta u samo jednom koraku, povećanje prinosa produkta i vođenje procesa u blagim reakcijskim uvjetima. Hoće li se biokatalizatori koristiti u obliku cijelih stanica ili kao izolirani enzimi ovisi o više faktora

koji uključuju stabilnost i dostupnost enzima, njegovu složenost, znanje o potrebnom enzimu te o troškovima čitavog bioprocasa. Zbog kiralnosti aminokiselina od kojih su građeni enzimi i njihove prirodne kiralnosti, došlo je do veće učinkovitosti u enantioselektivnosti i prinosima procesa nego što je slučaj kod većine sintetičkih asimetričnih katalizatora.

Upotreba izoliranih enzima kao biokatalizatora ima prednosti u odnosu na primjenu cijelih stanica jer stanična membrana predstavlja problem kod pristupa supstratu i kod uklanjanja produkta s enzima. Također, izolirani enzimi kao biokatalizatori primjenjuju se u blagim reakcijskim uvjetima čime se smanjuju problemi s neželjenim nusproduktima koji često prate konvencionalne kemijske metode, djeluju učinkovito i selektivno te se proizvode u stabilnom obliku. Izolirani enzimi sve češću i uspješniju upotrebu nalaze u pojedinačnim reakcijama i doprinose velikoj raznolikosti metodologije u *zelenoj* proizvodnji. Nedostaci njihove primjene su ograničena stabilnost enzima izvan prirodnog okruženja, potreba za koenzimima te cijena izolacije enzima (Grogan, 2009). Biokatalizatori u obliku cijelih stanica mogu biti mikrobnog, biljnog ili životinjskog podrijetla, a funkciju biokatalizatora obavljaju u obliku kulture u fazi rasta, stacionarnoj fazi, u obliku spora ili se primjenjuju kao imobilizirana kultura. Najučinkovitiji oblik mikrobnog staničnog biokatalizatora je čista kultura mikroorganizma koja sadrži visoku koncentraciju jednog ili više enzima koji kataliziraju željene reakcije biotransformacije. Miješane kulture dvaju ili više različitih tipova mikroorganizama su često nestabilne zbog promjene dinamike populacije iz čega mogu nastati nepredvidive nusreakcije u biotransformaciji. Osim jeftinije sinteze biomase fermentacijom i jednostavnije tehnike provođenja reakcija, prednosti primjene cijelih stanica kao biokatalizatora su visoka stereoselektivnost i regioselektivnost, regeneracija koenzima staničnim mehanizmima i odvijanje višestupanjskih reakcija koje se odvijaju u uvjetima koji nisu štetni za ljude i okoliš. Budući da se enzimi u stanici nalaze u prirodnom okruženju i zaštićeni su od vanjskih faktora, općenito su dugoročno stabilniji od izoliranih enzima. Međutim, upotreba biokatalizatora kao cijelih stanica ima i nedostatke kao što su difuzija supstrata i produkta kroz staničnu membranu, odnosno kompleksniji postupci pročišćavanja produkta iz reakcijske smjese, niža produktivnost zbog neotpornosti na veće koncentracije supstrata, teža kontrola procesa i odvijanje neželjenih sporednih reakcija zbog prisutnosti drugih enzima. Također, procesi s cijelim stanicama često su kompleksni zbog toga što uključuju dvije faze procesa, uzgoj biomase i konverzija produkta (Faber, 2011).

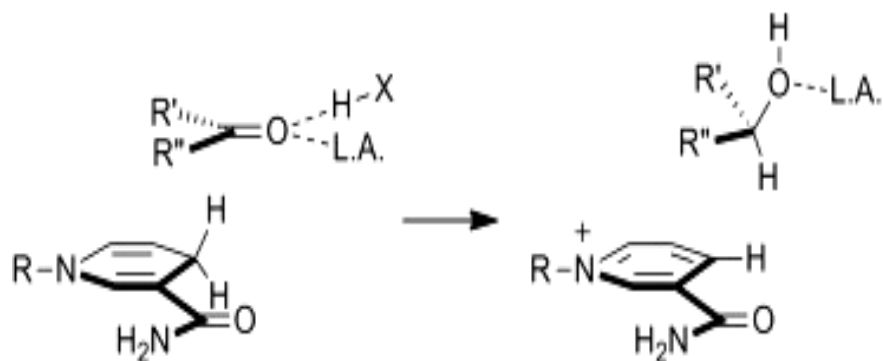
U pregledu koji sažima status biokatalizne obrade u industriji, Straathof (2002) bilježi da se broj biotransformacija u industrijskom mjerilu više nego udvostručio u posljednjih deset

godina. Straathof je obuhvatio 134 industrijskih biotransformacija, uključujući procese s cijelim stanicama ili enzimima, počevši od prekursora koji nije izvor ugljika, a među najčešćim katalizatorima koji dominiraju u industrijskim biokatalizama su hidrolaze (44 %), a zatim oksidoreduktaze (30 %) (Bommarius i Riebel, 2004).

2.2.2.1. Oksidoreduktaze

Organska proizvodnja ne bi bila moguća bez brojnih reducirajućih i oksidirajućih agenasa. Reakcije oksidacije i redukcije u kojima se odvija prijenos elektrona, standardna su vrsta reakcija u organskoj kemiji i proizvodnji finih kemikalija, a kataliziraju ih oksidoreduktaze. Kategorije enzima koji se rabe u redoks-reakcijama, a čine 25 % poznatih enzima su: dehidrogenaze, oksigenaze, hidroksilaze i peroksidaze. Oksidansi i reducensi su često toksični spojevi, lako zapaljivi i eksplozivni pa predstavljaju velik problem u proizvodnji. Kao glavni zadatak i krajnji cilj spominje se uklanjanje ili zamjena takvih spojeva iz finalnog proizvoda sa sigurnijim, zdravijim i ekološki prihvatljivijim spojevima. Oksidirajući enzimi od velikog su interesa za moderne metode biooksidacije. Biokatalitičke asimetrične oksidacije postignute su pomoću oksidaza, peroksidaza, dehidrogenaza, mono- i dioksidgenaza koje su u rangu s najboljim klasičnim kemijskim metodama oksidacije. Kao izvrstan alat u modernim metodama bioredukcije pokazali su se reducirajući enzimi kao što su dehidrogenaze i reduktaze. Značajan je i razvoj dvofaznih reakcijskih medija koji su povoljni za ketone slabo topljive u vodi i za reakcije u kojima su prisutni supstrati u visokim koncentracijama. Ovaj razvoj bitan je za asimetričnu redukciju ketona s *in situ* regeneracijom kofaktora pri čemu alkohol dehidrogenaza i formijat dehidrogenaza ostaju u stabilnom obliku. Kako mnoge oksidoredukcijske reakcije ovise o kofaktorima NAD^+/NADH i $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, osmišljen je djelotvoran *in situ* sustav regeneracije kofaktora koji se može prevesti u veće mjerilo. Razvijena je i katalitička asimetrična redukcija dvostrukih ugljik-ugljik veza koja može biti provedena u *cis*- ili *trans*- oblik i rezultirati s dva nova kiralna centra (Wohlgemuth, 2011).

Dehidrogenaze su jedna od najvažnijih podskupina oksidoreduktaza koje podrazumijevaju prijenos H^+ i dva elektrona sa nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD(H)), odnosno njegovog fosfata (NADP(H)) na molekulu akceptora kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Opći mehanizam djeovanja dehidrogenaze. Prijenos H^+ sa NAD(P)H na karbonilni supstrat, koji se aktivira interakcijom s Lewisovom kiselinom (Stewart, 2007).

Ovisno o strukturi supstrata dehidrogenaze mogu prevesti prokiralni supstrat u kiralni produkt, stoga imaju izuzetno veliku vrijednost. Kiralnost je vrlo česta u spojevima koji se nalaze u živim organizmima (aminokiseline, bjelančevine, nukleinske kiseline, hormoni), a opisuje prirodu molekule koja se očituje u nesimetričnosti i nemogućnosti poklapanja s vlastitom zrcalnom slikom. Kiralni spojevi prostorni su izomeri ili stereoizomeri, a nazivaju se enantiomerima. Moguće ih je razlikovati po interakciji s ravnom polariziranom svjetlošću; jedan enantiomer rotira svjetlost u smjeru kazaljke na satu (+), a drugi u smjeru suprotnom od kazaljke na satu (-). Organske molekule obično imaju središnju kiralnost s najmanje jednim stereogenim središnjim atomom ugljika vezanim za četiri različita supstituenta. Kiralni alkoholi su ključni sastavni dijelovi u industriji finih kemikalija, a alkohol dehidrogenaze (EC 1.1.1.1; ADH) mogu se upotrijebiti za sintezu ovih spojeva (Stewart, 2007). Ekstremni uvjeti mogu uzrokovati probleme s izomerizacijom, racemizacijom, epimerizacijom ili preuređivanjem spoja, što je moguće izbjeći uporabom biokatalizatora. Enzimske reakcije mogu se provesti s izuzetnom kemo-, regio- i stereoselektivnošću koje omogućuju proizvodnju gotovo isključivo jednog enantiomera. Osim što djeluju kao kiralni katalizatori protiv njihovih prirodnih supstrata, puno enzima također je u stanju katalizirati reakcije širokog spektra različitih supstrata (Faber, 2011). Cijele mikrobne stanice i enzimi mogu se upotrijebiti za kiralnu sintezu. Enzimi i katalizatori cijelih stanica mogu se imobilizirati i ponovo upotrijebiti tokom mnogih ciklusa, što biokatalitičke procese čini ekonomski učinkovitijima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biokatalizator

U ovom radu korištena je liofilizirana alkohol dehidrogenaza (ADH), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD te instant suhi pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, Kvasac d.o.o., Hrvatska.

3.1.2. Kemikalije

- Betain, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Urea, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen-glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Propilen-glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid (reducirani oblik, NADH), p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirani oblik, NAD⁺), p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etanol, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Etil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Supstrat 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanon, Apollo scientific, Manchester, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.1.3. Pufferi i njihova priprema

- PBS puffer

0,2 g KCl i 8 g NaCl otopi se u 800 mL destilirane vode te se u otopinu doda 1,44 g Na₂HPO₄ i 0,24 g KH₂PO₄. pH vrijednost otopine podesi se na 7,4 dodatkom 1 mol dm⁻³ otopine HCl te nadopuni destiliranom vodom do 1000 mL.

- Glicin-pirofosfatni pufer

8,34 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ i 0,42 g glicina otopi se u 250 mL redestilirane vode. pH vrijednost otopine podese se na 9,0 dodatkom 1 mol dm^{-3} otopine HCl.

- Tris-HCl pufer

15,14 g Tris baze otopi se u 150 mL destilirane vode uz miješanje. pH vrijednost otopine podese se na 7,5 dodatkom 12 mol dm^{-3} otopine HCl te nadopuni destiliranom vodom do 250 mL.

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator s regulacijom temperature, EppendorfThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure)
- Magnetska mješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- pH/ion metar S220, Mettler Toledo, SAD
- UV – Vis spektrofotometar, GENESYS 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Spektrofluorimetar, Cary Eclipse, Varian, SAD
- Plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema *prirodnih* eutektičkih otapala

U ovom radu pripremljena su *prirodna* eutektička otapala na bazi kolin-klorida i betaina dodatkom prethodno preračunate količine komponenata u tikvicu s okruglim dnom prema zadanim molarnim omjerima prikazanih u tablici 3. Zatim je u svaku tikvicu dodan određen volumen vode, kako bi se u konačnici dobila eutektička otapala s različitim molarnim udjelima vode. Reakcijska smjesa je zagrijana do 50 °C na magnetskoj miješalici te je nakon 2 sata miješanja dobivena homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Pripremljena *prirodna* eutektička otapala prema tablici 3. korištena su za potrebe praćenja stabilnosti koenzima NAD⁺ i NADH. Također, u izradi eksperimentalnog dijela korišten je drugi način pripreme *prirodnih* eutektičkih otapala za potrebe mjerenja aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze. Napravljena su razrjeđenja šest različitih bezvodnih otapala na bazi kolin-klorida i betaina kako bi se dobila otapala s 40 % i 80 % vode (v/v) prema tablici 4. Reakcijska smjesa je također zagrijana do 50 °C na magnetskoj miješalici te je nakon 2 sata miješanja dobivena homogena, prozirna i bezbojna tekućina. pH vrijednost pripremljenih *prirodnih* eutektičkih otapala izmjerena je pomoću multimetra pH/ion metra pri temperaturi od 25 °C. Dobivena eutektička otapala zatvorena su parafilmom i skladištena na tamnom mjestu prije daljnje primjene.

Tablica 3. Pripravljena *prirodna* eutektička otapala za ispitivanje stabilnosti koenzima

<i>Prirodno</i> eutektičko otapalo	Kratica	Molarni omjer komponenata
Kolin-klorid : urea : voda	ChU8	1:2:8
Kolin-klorid : glicerol : voda	ChGly8	1:2:8
Kolin-klorid : etilen glikol : voda	ChEG8	1:2:8
Betain : urea : voda	BU8	1:3:8
Betain : glicerol : voda	BGly8	1:2:8
Betain : etilen glikol : voda	BEG8	1:3:8
Betain : propilen glikol : voda	BPG8	1:2:8

Tablica 4. Priprema *prirodnih* eutektičkih otapala za praćenje aktivnosti i promjena u konformaciji strukture enzima alkohol dehidrogenaze

<i>Prirodno</i> eutektičko otapalo	Udio vode [%, v/v]	Kratica	Molarni omjer komponenata
Kolin-klorid : urea	40 %	ChU40%	1:2
	80 %	ChU80%	
Kolin-klorid : glicerol	40 %	ChGly40%	1:2
	80 %	ChGly80%	
Kolin-klorid : etilen glikol	40 %	ChEG40%	1:2
	80 %	ChEG80%	
Betain : urea	40 %	BU40%	1:3
	80 %	BU80%	
Betain : glicerol	40 %	BGly40%	1:2
	80 %	BGly80%	
Betain : etilen glikol	40 %	BEG40%	1:3
	80 %	BEG80%	
Betain : propilen glikol	40 %	BPG40%	1:3
	80 %	BPG80%	

3.2.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze (ADH)

Aktivnost enzima ADH određena je spektrofotometrijskim testom koji se temelji na reakciji oksidacije etanola u acetaldehid u glicin pirofosfatnom puferu pH=9, odnosno u svakom od prethodno pripremljenih *prirodnim* eutektičkim otapalima.

Shematski se reakcija može prikazati jednadžbom:



Spektrofotometrijski je izmjerena promjena apsorbancije nastalog NADH pri $\lambda = 340$ nm jer reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetla te valne duljine, dok njegova oksidirana forma (NAD^+) u valnom području 300 – 400 nm ne apsorbira svjetlo.

Iz promjene apsorbancije u vremenu $\Delta\text{ABS}/\Delta t$ izračunata je volumna aktivnost enzima ADH (A_v) prema izrazu [1]:

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

gdje je:

f – faktor razrjeđenja;

V_r – volumen uzorka (cm^3);

V_u – ukupni volumen (cm^3);

ϵ_{340} – ekstincijski koeficijent ($\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$), iznosi $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ za $\lambda = 340 \text{ nm}$;

d – promjer kivete ($d = 1 \text{ cm}$)

$\Delta\text{ABS}/\Delta t$ – predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu (min^{-1})

Volumna aktivnost je izražena u međunarodnoj jedinici enzimske aktivnosti U po jedinici volumena pri čemu je $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ cm}^{-3}$.

Za test je potrebno u kvarcnu kivetu od 1 mL otpipetirati:

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

3.2.3. Praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenaze primjenom spektrofluorimetrije

Pripremljena je matična otopina enzima ADH u glicin pirofosfatnom puferu koncentracije $\gamma_{\text{ADH}} = 30 \text{ mg mL}^{-1}$, konačnog volumena 150 μL . U određena otapala, prethodno pripremljena *prirodna* eutektička otapala, odnosno pufer dodano je 10 μL matične otopine enzima ADH. Prije provođenja snimanja spektrofluorimetrom svaki uzorak se termostatirao na 25 °C tijekom 5 minuta. Mjerenje je provedeno spektrofluorometrijski praćenjem nastajanja fluorescentnih spektara uzoraka pri temperaturi od 25 °C. Spektri fluorescentne emisije zabilježeni su u rasponu valne duljine emisije (λ_{em}) od 300 do 400 nm, a valna duljina pobuđivanja je iznosila $\lambda_{\text{eks.}} = 293 \text{ nm}$.

3.2.4. Praćenje stabilnosti koenzima NAD^+ i NADH u *prirodnim* eutektičkim otapalima

Za potrebe ispitivanja stabilnosti koenzima prvo su pripremljene matične otopine koenzima NAD^+ , odnosno NADH masene koncentracije $\gamma_{\text{NAD}^+/\text{NADH}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ u definiranom puferu. Otopina koenzima NADH pripremljena je u glicin pirofosfatnom puferu (pH=9) pripremljenom prema protokolu opisanom u poglavlju 3.1.4., a NAD^+ u PBS puferu (pH=7,4). Zatim je u 5 mL svakog od prethodno pripremljenih *prirodnih* eutektičkih otapala odnosno referentnog pufera (glicin pirofosfatni i Tris-HCl za NADH odnosno PBS za NAD^+) dodano 10 μL matične otopine. Dobivene otopine inkubirane su tijekom 15 dana na sobnoj temperaturi od 25 °C te na temperaturi od 4 °C u hladnjaku. Tijekom mjerenja stabilnosti pripremljenih matičnih otopina koenzima NAD^+ i NADH praćene su promjene u apsorpcijskom spektru u rasponu 250 do 400 nm. Pomoću UV-VIS spektrofotometra očitavani su apsorpcijski maksimumi na valnim duljinama 340 nm za NAD^+ , odnosno 262 nm i 340 nm za NADH . Kako bi se izračunala relativna stabilnost koenzima izmjerene apsolutne vrijednosti apsorbanacija u različitim *prirodnim* eutektičkim otapalima te referentnim otapalima, izračunate su relativne vrijednosti apsorbanacije pri 262 ($A_{262\text{Rel}}$) odnosno 340 nm ($A_{340\text{Rel}}$) prema izrazima [2] i [3]:

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

gdje je:

A_{262n} - vrijednost apsorbanacije izmjerene na 262 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 odnosno 4 °C,

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

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

gdje je:

A_{340n} - vrijednost apsorbanacije izmjerene na 340 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 odnosno 4 °C,

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

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

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

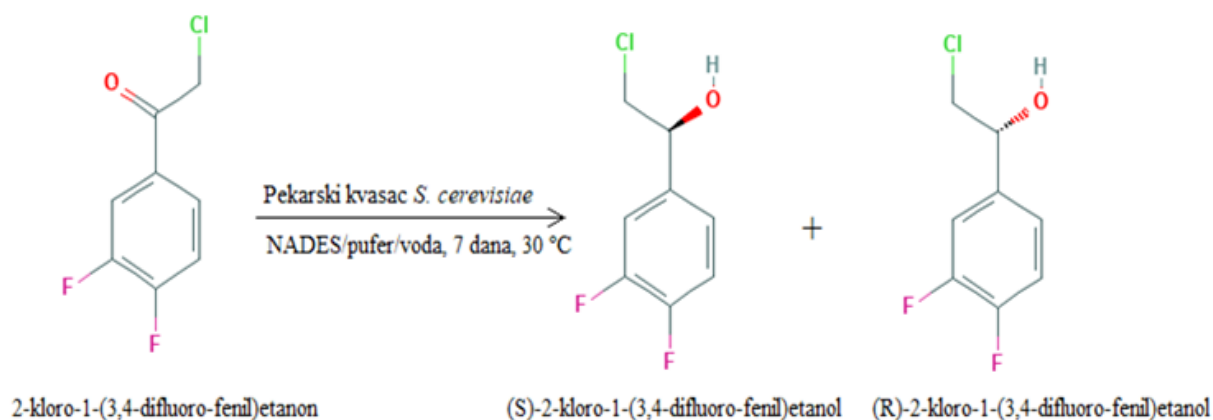
gdje $A_{262;15}$ predstavlja vrijednost apsorbancije izmjerene na 262 nm nakon 15 dana inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 odnosno 4 °C.

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

gdje $A_{340;15}$ predstavlja predstavlja vrijednost apsorbancije izmjerene na 340 nm nakon 15 dana inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 odnosno 4 °C.

3.2.5. Enantioselektivna redukcija 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirana pekarskim kvascem *S. cerevisiae*

Reakcija enantioselektivne redukcije supstrata 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona, prikazana na slici 3, provedena je pomoću pekarskog kvasca *S. cerevisiae* prema sljedećem protokolu.



Slika 3. Reakcija redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona

Prethodno isprane liofilizirane stanice pekarskog kvasca *S. cerevisiae* u destiliranoj vodi pomiješane su s destiliranom vodom kako bi se pripremila otopina kvasca koncentracije 5 g mL^{-1} . Pripremljena otopina kvasca miješana je na homogenizatoru sve dok nije dobivena

homogena smjesa, a dobivena suspenzija se centrifugirala na 6000 o min^{-1} tijekom 20 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant se odlije, a talog (kvašćeva biomasa) se koristi u daljnjem radu za asimetričnu redukciju 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona.

Reakcije redukcije provedene su u vodi, puferu te prethodno pripremljenom *prirodnom* eutektičkom otapalu (BEG) s tri različita udjela vode; 0 %, 40 % i 80 % (v/v) prema slijedećem protokolu. U epruvetu se dodaje 0,5 g pripremljenog kvasca, 1,5 mL odabranog otapala (voda, betain:etilen-glikol s različitim udjelom vode, pufer) i supstrat 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanon koncentracije 2 mg mL^{-1} , čime započinje reakcija redukcije acetofenona. Epruveta sa reakcijskom smjesom stavlja se u tresilicu na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ kroz 7 dana. Nakon 2, 5 i 7 dana, uzorak se centrifugira na 6000 o min^{-1} tijekom 20 minuta te se produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju iz supernatanta etil acetatom (1,5 mL) uz intenzivno miješanje tijekom 3 minute. Nakon razdvajanja slojeva, iz organske faze se izuzima $100 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka produkta, nakon čega slijedi analiza na plinskom kromatografu. Analiza svih uzoraka provedena je u duplikatu.

Radi usporedbe uspješnosti redukcije supstrata u različitim otapalima, za svaku pojedinu reakciju računa se iskorištenje reakcije te enantiomerni višak prema jednadžbama [6] i [7].

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

$$\eta = \frac{c_P}{c_T} \times 100 \quad [6]$$

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

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

$$ee = \frac{(S_{OH} - R_{OH})}{(S_{OH} + R_{OH})} \times 100 \quad [7]$$

gdje R_{OH} predstavlja površinu ispod pika (*R*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola, a S_{OH} površinu ispod pika (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola.

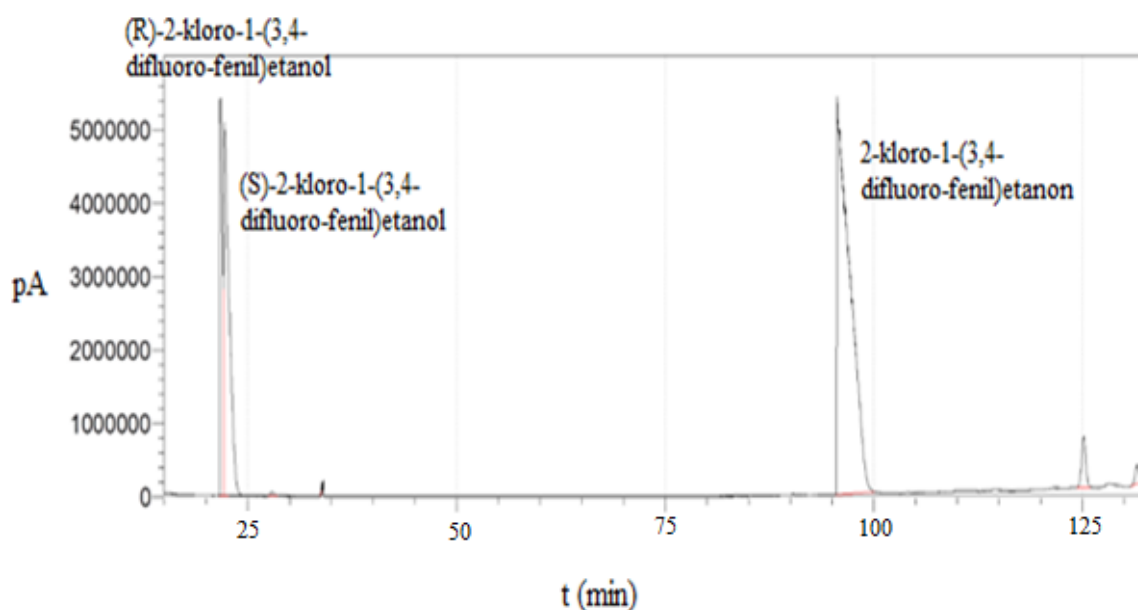
3.2.5.1. Određivanje koncentracije produkata (*R,S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola

Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona i nastajanja produkata reakcije redukcije (*R,S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom (GC-MS).

Za analizu 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona i (*R,S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola su korišteni sljedeći kromatografski uvjeti:

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

Identifikacija 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona, (*R*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola i (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola provedena je na temelju vremena izlaska razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi s kiralne kromatografske kolone te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka. Retencijsko vrijeme (R_t) za 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanon iznosi 98,625 min, R_t za (*R*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanol 21,5 min i R_t za (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanol 24 min što je vidljivo na slici 4.



Slika 4. Prikaz tipičnog plinskog kromatograma nakon analize reakcijske smjese sa kvascem katalizirane redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona

3.2.5.2. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnog dijagrama pripremljena je ishodna otopina 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u etil acetatu (EA) čija koncentracija iznosi 1 mg mL^{-1} . Zatim su napravljena razrjeđenja ishodne otopine supstrata tako da koncentracije redom iznose $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika stavljene su na ordinatu, a pripadajuće vrijednosti koncentracija na apscisu. Baždarni dijagram ovisnosti množinske koncentracije 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona o površini ispod pika konstruiran je pomoću računala.

Nepoznate koncentracije (*R*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola i (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola tijekom reakcije redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u prirodnom eutektičkom otapalu, vodi ili puferu računaju se izravno iz jednadžbe pravca dobivene iz baždarnog dijagrama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Koncept održivog razvoja iznimno je važan u suvremenoj kemijskoj industriji, gdje se poseban naglasak stavlja na smanjenje onečišćenja i prekomjerno korištenje prirodnih izvora. U svrhu eliminacije i nastajanja štetnih nusprodukata te poboljšanja učinkovitosti proizvodnih procesa, provode se istraživanja kako implementirati što veći broj principa *zelene* kemije u kemijsku tehnologiju i biotehnologiju današnjice.

Biotransformacijski procesi, odnosno enzimске modifikacije definiranih čistih spojeva u definirane konačne produkte, najčešću primjenu imaju u farmaceutskoj industriji, osobito zbog velike potražnje za enantiomerno čistim lijekovima u zadnjih nekoliko godina. Pri tome se biokataliza koristi kao glavna reakcija koja zahtijeva visoku selektivnost i specifičnost ili kao zamjena za ekološki nepovoljne reakcijske korake (Ghisalpa i sur., 2010). Među *zelenim* otapalima, *prirodna* su eutektička otapala (engl. *Natural Eutectic Solvents*, NADES) postala obećavajuća alternativa tradicionalnim organskim otapalima iz ekološke i tehnološke perspektive i značajno su povećala svoju popularnost u posljednjem desetljeću. Glavna svojstva NADES-ova, koja ih čine ekološki prihvatljivima, su nehlapljivost (smanjenje zagađenja zraka), nezapaljivost (doprinos sigurnosti procesa) i izvrsna stabilnost (omogućeno recikliranje i ponovna uporaba). Štoviše, NADES-ovi se primjenjuju kao alati u biokatalitičkim reakcijama (Panić i sur., 2018; Sheldon, 2016; Cvjetko Bubalo i sur., 2015b; Cvjetko Bubalo i sur., 2015c; Smith i sur., 2014; Durand i sur., 2013; Bommarius i Riebel, 2004), bilo kao otapala ili kao separacijska sredstva, kako bi se prevladali zahtjevni postupci obrade. NADES-ovi u biokatalitičkoj reakciji omogućavaju poboljšanje topljivosti supstrata/proizvoda; povećavaju aktivnost enzima te svojstva poput enantioselektivnosti, regioselektivnosti i stabilnosti enzima; i mogu prilagoditi stupanj reakcije (Panić i sur., 2018; Maugeri i Dominguez De Maria, 2014).

Stoga, kako su oksidoreduktaze među biokatalizatorima koji dominiraju u biokatalitičkim procesima u industrijskom mjerilu, u ovome je radu ispitan je utjecaj ekološki prihvatljivijih pripremljenih *prirodnih* eutektičkih otapala na alkohol dehidrogenazu (ADH) iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te na stabilnost koenzima o kojima aktivnost ovog enzima zavisi, NAD^+ i NADH . Nadalje, budući da su kiralni alkoholi ključni prekursori u dobivanju lijekova i finih kemikalija, u ovome radu je, u cilju ekološki prihvatljivog postupka redukcije ketona, provedena reakcija enantioselektivne redukcije supstrata 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u kiralni alkohol pomoću pekarskog kvasca *S. cerevisiae*. Redukcija je provedena i u vodi te

pufere kako bi se usporedila uspješnost provedenih reakcija. Provedeni postupak je u skladu sa *zelenom* kemijom, a značajan je jer redukcijom odabranog supstrata nastaje enantiomer (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanol, kiralni intermedijer u sintezi tikagrelora (Guo, 2017), biološki aktivne tvari lijeka *Brilique*. Lijek *Brilique* pripada skupini lijekova koji se nazivaju antitrombotici, a smanjuju mogućnost stvaranja krvnog ugruška i umanjuju vjerojatnost srčanog, moždanog udara i/ili smrti uslijed bolesti povezane sa srcem ili krvnim žilama.

4.1. PRIPREMA PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Priprema *prirodnih* eutektičkih otapala je jednostavna i 100 % učinkovita na razini atoma (engl. *Atom economy*) što je značajna prednost kod sinteze *zelenih* otapala. Naime, proces sinteze potrebno je osmisliti tako da je u konačni proizvod uključena maksimalna količina ulazne sirovine, a visok *Atom economy* znači smanjenje upotrebe neobnovljivih resursa, broja stupnjeva sintetskog procesa te količine otpada (Anastas i Warner, 1998). Sirovine koje se koriste za njihovu pripravu lako su dostupne, relativno jeftine, sigurne i biorazgradive. Postupak pripreme eutektičkih otapala podrazumijeva miješanje prethodno preračunatih sastojaka prema zadanim molarnim omjerima. Zatim se reakcijske smjese lagano zagrijavaju do 50 °C na magnetskoj miješalici dok se ne dobije bistra, homogena i bezbojna tekućina. Također, izmjerena je pH vrijednost otopina pripremljenih *prirodnih* eutektičkih otapala pri temperaturi od 25 °C, a prikazana je u tablici 5.

Tablica 5. Izmjerene pH vrijednosti prirodnih eutektičkih otapala pri 25 °C

Prirodno eutektičko otapalo	Kratica	Molarni omjer komponenata	pH vrijednost
Kolin-klorid : urea : voda	ChU8	1:2:8	7,9
Kolin-klorid : glicerol : voda	ChGly8	1:2:8	6,7
Kolin-klorid : etilen glikol : voda	ChEG8	1:2:8	6,8
Betain : urea : voda	BU8	1:3:8	6,2
Betain : glicerol : voda	BGly8	1:2:8	7,43
Betain : etilen glikol : voda	BEG8	1:3:8	7,42
Betain : propilen glikol : voda	BPG8	1:2:8	7,64

Usporedbom pH vrijednosti pripremljenih NADES-ova može se uočiti da većina otapala imaju neutralna do blago lužnata svojstva s pH vrijednostima u rasponu od 6,2 za BU8 do 7,9 za ChU8.

4.2. UTJECAJ ODABRANIH PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA ENZIM ALKOHOL DEHIDROGENAZU (ADH)

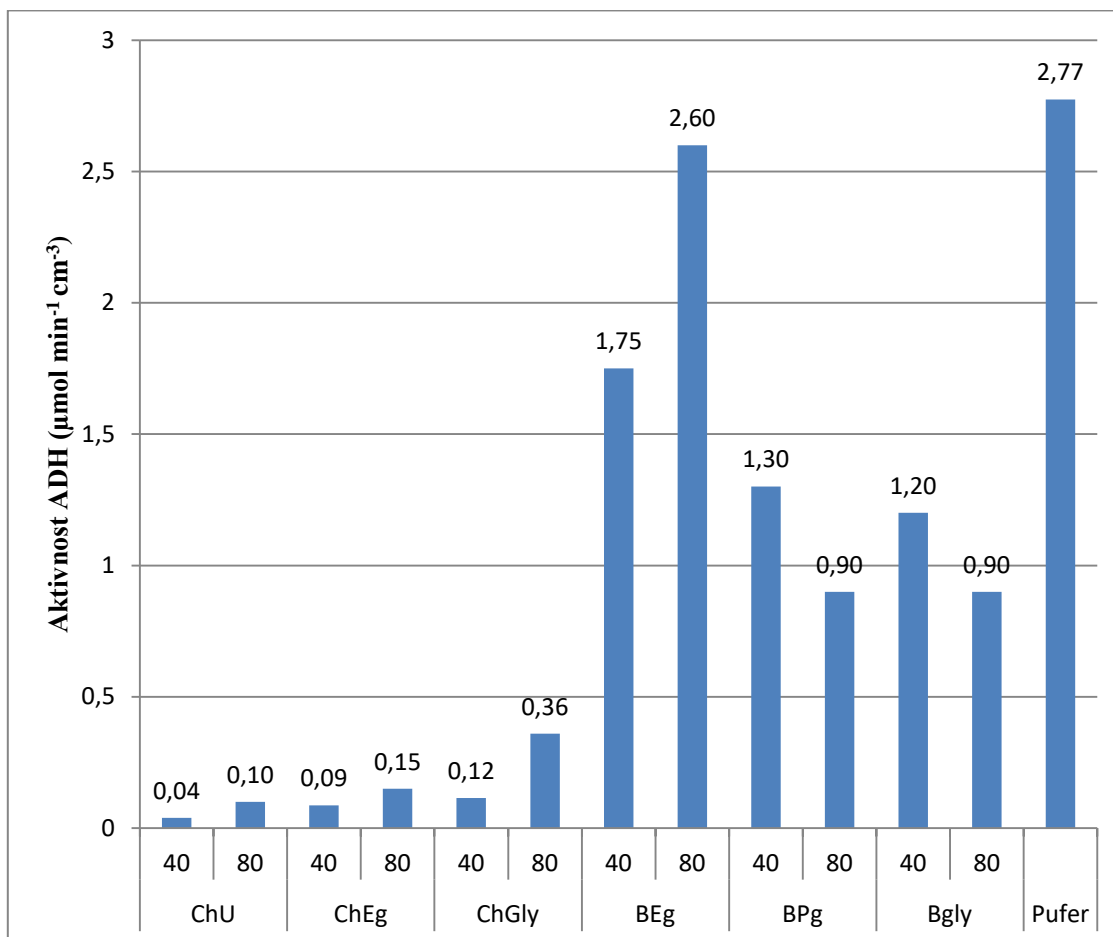
Enzim ADH pripada skupini dehidrogenaza, jedne od najvažnijih podskupina oksidoreduktaza odgovornih za reverzibilnu redukciju aldehida, ketona, α -, β - i ω -ketoestera u odgovarajuće hidroksi produkte. ADH katalizira enantioselektivnu redukciju ketona pri čemu nastaju odgovarajući sekundarni kiralni alkoholi u visokom enantiomernom suvišku. Pritom dolazi do redukcije koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+), o čijem prisustvu ovisi reakcija, a koji prelazi u svoj reducirani oblik (NADH). Primjerice, jedna od čestih primjena komercijalno dostupne ADH iz konjske jetre u industriji finih kemikalija jest kao proizvodni enzim i biokatalizator za recikliranje koenzima u oksidativnom postupku regio- i enantioselektivne reakcije redukcije racemičnog 2-fenilpropanala u (*S*)-2-(4-izobutilfenil)propanola s 93 % prinosa i izvrsnim enantomernim viškom > 99 % ee. Ovaj spoj služi kao intermedijer u sintezi (*S*)-ibuprofena, protuupalnog lijeka (Gröger i sur., 2012).

Budući da postoji velik broj amonijevih soli i donora vodikovih veza koji se mogu međusobno kombinirati, svojstva eutektičkih otapala se vrlo lako mogu podešavati. Na ovaj način postižu se željena kiselost, polarnost, topljivost otapala, točka ledišta, viskoznost i vodljivost (Zhang i sur., 2012). S obzirom na široko područje primjene oksidoreduktaza, proučavan je utjecaj različitih kolinijevih i betainijevih *prirodnih* eutektičkih otapala sa

poliolima (glicerol, etilen glikol i propilen glikol) i amidom ureom na aktivnost i promjene u konformaciji alkohol dehidrogenaze.

4.2.1. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze (ADH)

Učinak NADES-ova na aktivnost enzima proučavan je mjerenjem početne brzine reakcije katalizirane s $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ADH u glicin pirofosfatnom puferu koji sadrži 96 %-tni etanol i $530,7 \text{ mg mL}^{-1}$ NAD^+ u prisutnosti različitih NADES-ova. U svrhu provođenja ovog istraživanja korištena su pripravljena otapala prikazana u tablici 4. Aktivnost enzima ADH određena je spektrofotometrijskom metodom praćenja koncentracije NADH koji u reakciji nastaje redukcijom iz NAD^+ , što se na spektrofotometru očitava kao snažna apsorpcija valne duljine od 340 nm (Walker, 1992). Na slici 5 prikazana je volumetrijska aktivnost ADH izračunata prema izrazu [1] u različitim NADES-ovima i glicin pirofosfatnom puferu.



Slika 5. Volumetrijska aktivnost enzima ADH u različitim NADES-ovima s 40 % i 80 % vode i puferu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=2).

Iz rezultata prikazanih na slici 5 vidljivo je da aktivnost ADH značajno ovisi o strukturi NADES-a te da su vrijednosti istih u rasponu od $0,04 - 2,60 \mu\text{m min}^{-1} \text{cm}^{-3}$. U NADES-ovima koja sadrže betain kao akceptor vodikove veze, također poznat i kao trimetilglicin, volumna aktivnost ADH visoka u odnosu na otapala koja sadrže kolin-klorid. Najpogodnije otapalo za provođenje reakcije oksidacije etanola u acetaldehid pomoću enzima ADH je BEG80%, s aktivnošću od $2,60 \mu\text{m min}^{-1} \text{cm}^{-3}$, pri čemu je zabilježena aktivnost niža u odnosu na referentno otapalo (pufer) koja je iznosila $2,77 \mu\text{m min}^{-1} \text{cm}^{-3}$. Povećanje udjela vode u NADES-ovima povoljno utječe na aktivnost ADH, budući da dodatak vode u *prirodna* eutektička otapala koja imaju relativno visoku viskoznost omogućava bolji prijenos tvari za reaktant i produkt (Yang i sur., 2017). Za usporedbu, u BEG40% aktivnost enzima ADH iznosi $1,75 \mu\text{m min}^{-1} \text{cm}^{-3}$, a u BEG80% $2,60 \mu\text{m min}^{-1} \text{cm}^{-3}$ što potvrđuje pozitivan utjecaj vode na aktivnost ADH. Volumna aktivnost ADH u otapalima koja sadrže kolin-klorid kao akceptor vodikove veze manja je od $0,06 \mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$, stoga bi smanjenje aktivnosti enzima moglo biti posljedica inhibicije ADH.

4.2.2. Praćenje promjena u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) primjenom spektrofluorimetrije

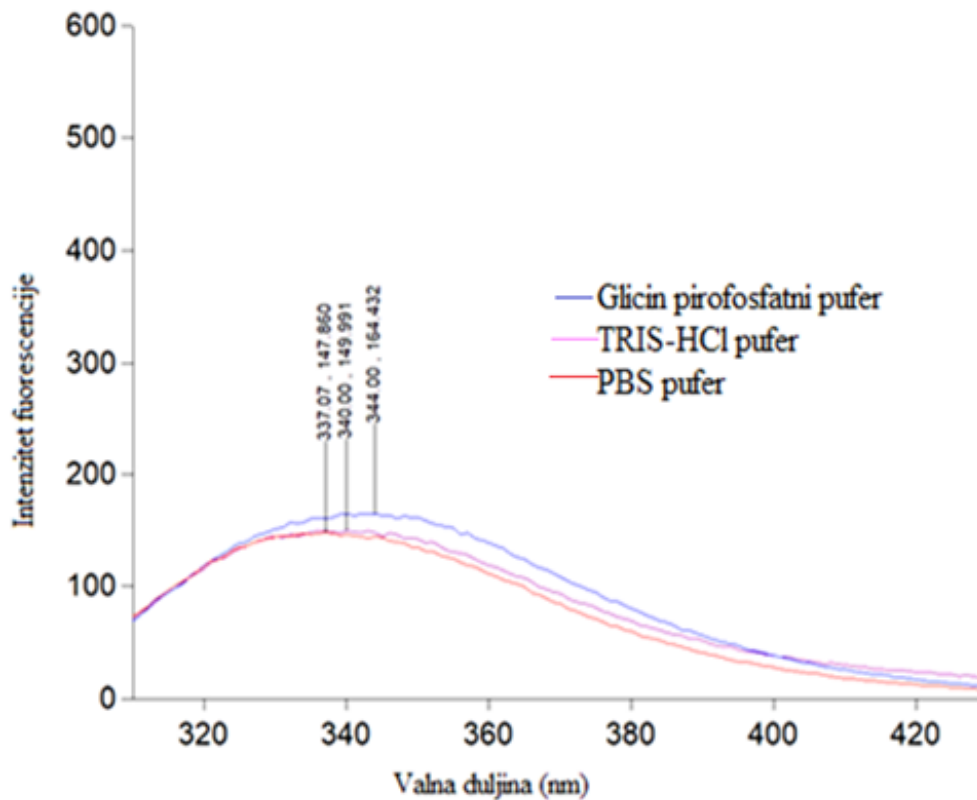
Kako bi se pratile promjene u konformaciji ADH provedeno je mjerenje je fluorescentnih spektara otopine enzima pri valnim duljinama pobuđivanja $\lambda_{\text{eks.}} = 293 \text{ nm}$ i emisije $\lambda_{\text{em.}} = 300 - 400$. U određene uzorke eutektičkih otapala i pufer volumena od 3 mL dodano je 10 μL matične otopine enzima ADH. Prije mjerenja svi uzorci su termostatorirani na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 minuta. Tijekom ove metode ispitan je utjecaj šest određenih NADES-ova ChU8, ChEG8, ChGly8, BEG8, BPG8 i BGly8 na promjene u konformaciji enzima ADH.

Spektrofluorimetrijska metoda mjerenja konformacije ADH moguća je radi native fluorescencije ovog proteina koja potječe od aminokiselina tirozina i triptofana. Najveći doprinos ukupnoj fluorescenciji pridaje aminokiselina triptofan, a raspon valnih duljina emisijskog maksimuma (λ_{max}) triptofana je od 308 nm do 355 nm, ovisno o stupnju izloženosti pobočnog ogranka. Konformacijske promjene uzrokuju promjene u intenzitetu maksimalne fluorescencije (I_{max}) i valnoj duljini emisijskog maksimuma (λ_{max}). Niže vrijednosti λ_{max} (engl. *blue shift*), triptofan pokazuje u nepolarnoj, hidrofobnoj mikrookolini (Jia i sur., 2014). U doticaju s otapalom, imidazolni prsten triptofana postaje izloženiji i stvara vodikove veze zbog čega dolazi do pomaka valne duljine maksimuma intenziteta fluorescencije prema crvenom dijelu spektra (engl. *red shift*) (Lakowitz, 2006). Osim toga,

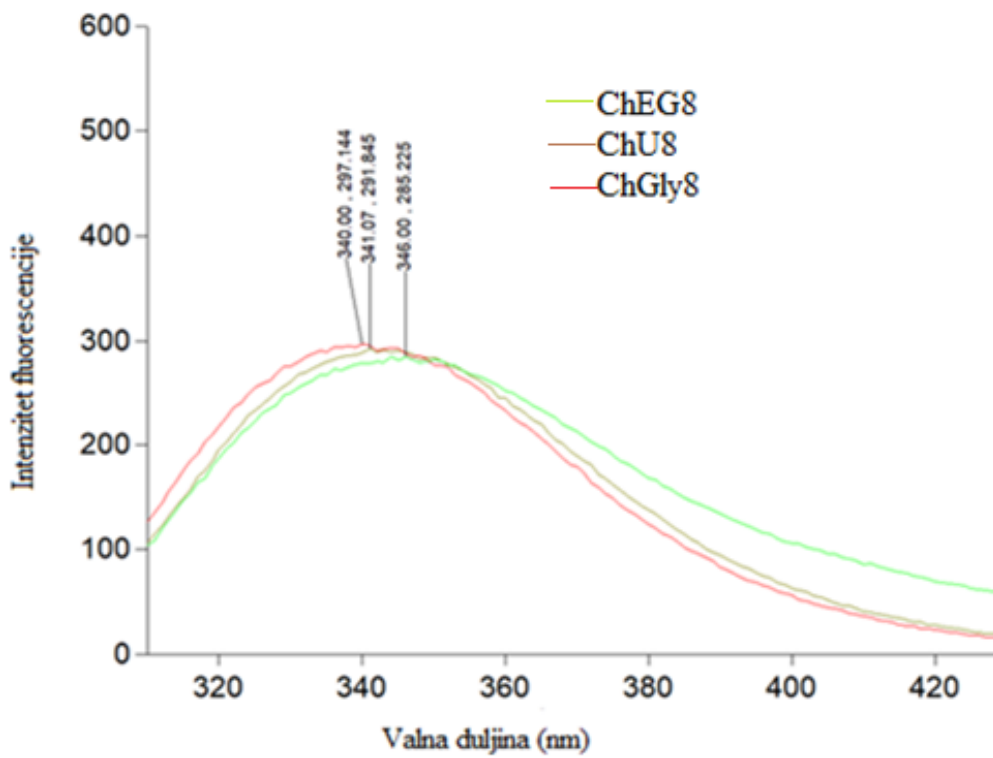
fluorescenciju triptofana moguće je utišati ili ugasiti molekulama „prigušivačima“ (engl. *quencher*). Prilikom gašenja ili utišavanja fluorescencije dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije zbog stvaranja veza između molekule „prigušivača“ i molekule fluorofora unutar triptofana odnosno proteina (Luisi i Favilla, 1970).

Slika 6 prikazuje fluorescentne spektre promjena u intenzitetu fluorescencije pri određenoj valnoj duljini pobuđivanja i emisije u različitim puferima (a), u NADES-ovima na bazi kolin-klorida (b) te u NADES-ovima na bazi betaina (c).

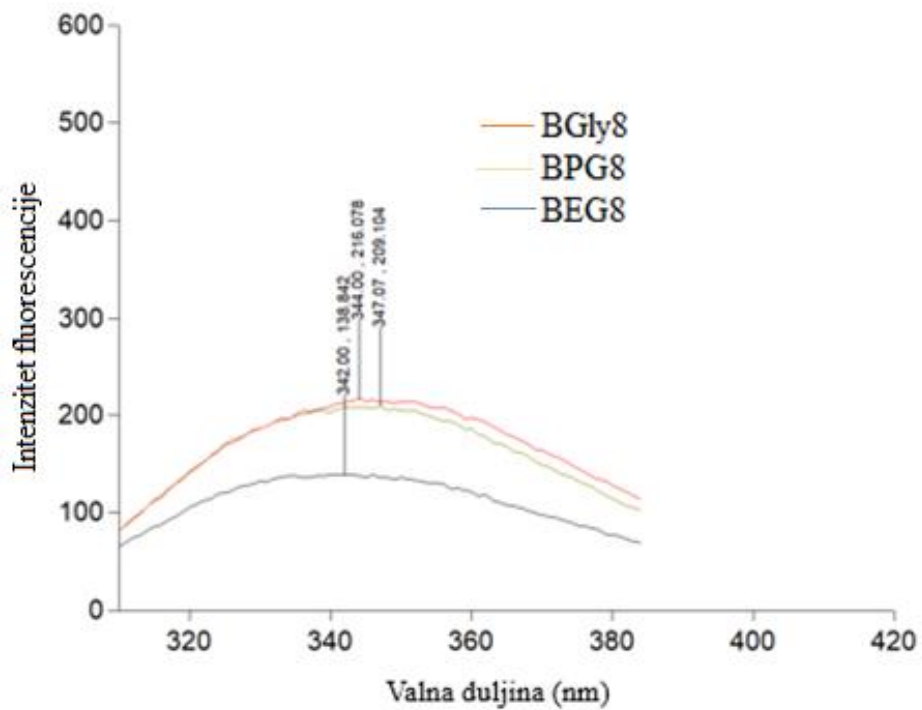
(a)



(b)



(c)



Slika 6. Fluorescentni spektri dobiveni mjerenjem na spektrofluorimetru pri valnim duljinama $\lambda_{\text{eks.}} = 293 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em.}} = 300\text{-}400$ kako bi se pratile promjene u konformaciji ADH u puferima (a), eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida (b) i eutektičkim otapalima na bazi betaina (c).

Usporedbom fluorescentnih spektara u puferima (slika 6a) sa spektrima u prirodnim eutektičkim otapalima (slika 6b i 6c) primjećujemo da nije došlo do značajne promjene valne duljine emisijskog maksimuma što ukazuje da nije došlo do promjena u sekundarnoj strukturi enzima (Nian i sur., 2019). Što se tiče intenziteta fluorescencije, vidljiv je značajan porast u kolinijevim NADES-ovima, dok je u betainijevim NADES-ovima zabilježen tek blagi porast intenziteta u odnosu na pufer. Primjerice, u tri ispitana pufera raspon intenziteta fluorescencije je od 147,86 - 164,43, dok u kolinijevim NADES-ima raspon 285,22 - 297,14, odnosno u betainijevim NADES-ovima 138,84 - 216,08. Značajan porast u intenzitetu fluorescencije zabilježen u uzorcima koji su sadržavali kolinijeve NADES-ove ukazuje da su ta otapala izazvala promjene u konformaciji ADH, što se dalje može povezati sa izrazito niskim aktivnostima enzima izmjerenim u tim otapalima (slika 6). U skladu s time, u betainijevim NADES-ovima zabilježene su male razlike u intenzitetu u odnosu na pufer uz istovremeno sličnu aktivnost enzima.

Također, rezultati su pokazali kako se kod kolinijevih NADES-ova konformacijske promjene ADH značajno ne razlikuju ovisno o donoru vodikovih veza, dok kod NADES-ovim koji kao akceptor vodikovih veza sadrže betain, zabilježene su značajne razlike u intenzitetu fluorescencije. Primjerice za BGly8 vrijednost intenziteta fluorescencije je 216,08, a za BEG8 138,84. U otapalu BEG8 zabilježena je najmanja razlika u intenzitetu fluorescencije u odnosu na pufer. Stoga, prema intenzitetu fluorescencije BEG8 je najbliži puferu budući da je u njemu izmjerena i najveća aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze u odnosu na sve ostale NADES-ove s betainom te se može zaključiti da je povoljnije otapalo od ostalih betainijevih NADES-ova.

4.3. STABILNOST NIKOTINAMIDNIH KOENZIMA U PRIRODNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Opće poznato je da određeni enzimi za svoju aktivnost zahtijevaju koenzime. Koenzimi su neproteinske građe, odnosno mogu biti male organske molekule, metalni ioni ili neka druga jednostavna molekula. Važnost koenzima očituje se u njihovom vezanju za apoenzim čime dovode do konformacijske promjene enzima i nastajanja katalitički aktivnog enzima, holoenzima. Najvažniji koenzimi koji sudjeluju u reakcijama oksidacije i redukcije katalizirane dehidrogenazama su $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ i NAD^+/NADH . Ti koenzimi primjenjuju se u mnogim znanstvenim poljima, a ponajviše prilikom dobivanja brojnih vrijednih kiralnih

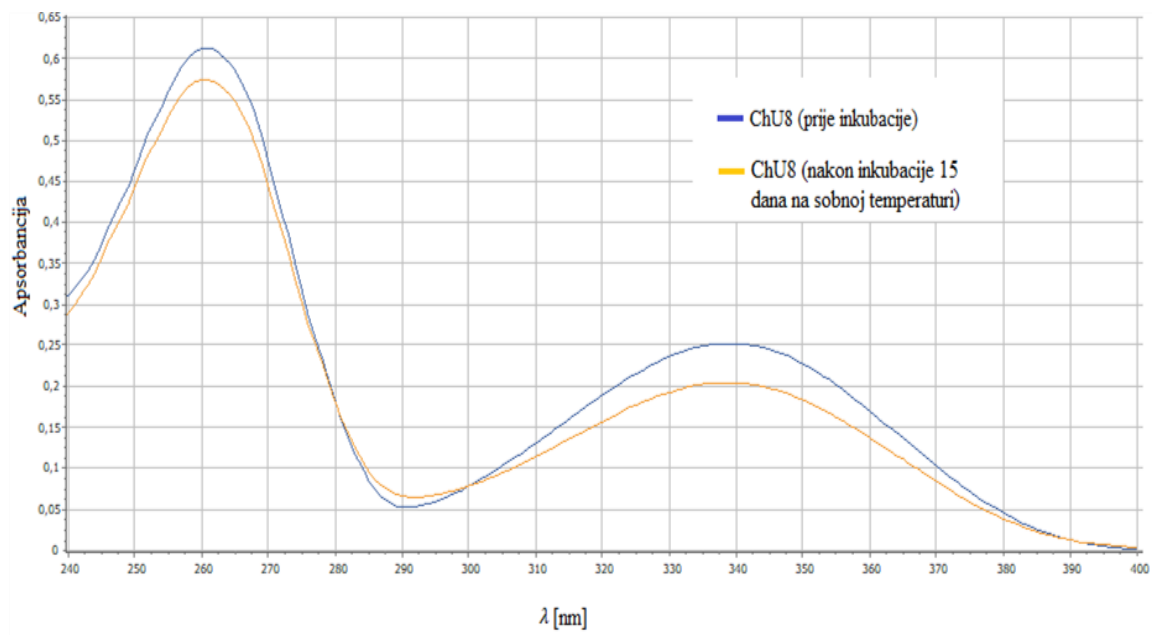
spojeva kao što su hidroksi-kiseline, aminokiseline, steroidi i alkoholi iz prokiralnih prekursora. Nikotinamidni prsten koenzima NAD^+ je redoks aktivan, prima vodikov ion pri čemu se reducira u NADH. S obzirom da su koenzimi skupi, osobito NAD(P)H, ne dodaju se u stehiometrijskim količinama. U posljednje vrijeme istražuju se i razvijaju *in situ* metode za njihovu regeneraciju. Učinkovit i ekonomičan regeneracijski sustav koenzima neophodan je za sintezu biološki aktivnih spojeva jer je koenzim NAD(P)H kompleksan i nestabilan (Bommarius i sur., 2002).

U ovom je radu primjenom UV/Vis spektroskopije, tj. praćenjem promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm, ispitana stabilnost nikotinamidnih koenzima NADH i NAD^+ tijekom inkubacije u NADES-ovima. Ova metoda pogodna je za praćenje stabilnosti koenzima iz razloga što apsorpcijski spektar NAD^+ i NADH sadrži apsorpcijski maksimum na 262 nm zbog skupine adenzin monofosfata, dok se u apsorpcijskom spektru NADH pojavljuje još jedan apsorpcijski maksimum pri 340 nm zahvaljujući dihidropiridinskom prstenu koji nastaje nakon redukcije (Rover i sur., 1998). S obzirom da se u strukturi oksidiranog oblika NAD^+ nalazi adenin koji apsorbira pri 262 nm, oksidacijom NADH u NAD^+ primjećuje se pik kod 260 nm, a zbog degradacije NADH tijekom inkubacije, degradira se i piridinski prsten što se očituje smanjenjem pika na 340 nm (Fukazawa i Ishihara, 2016).

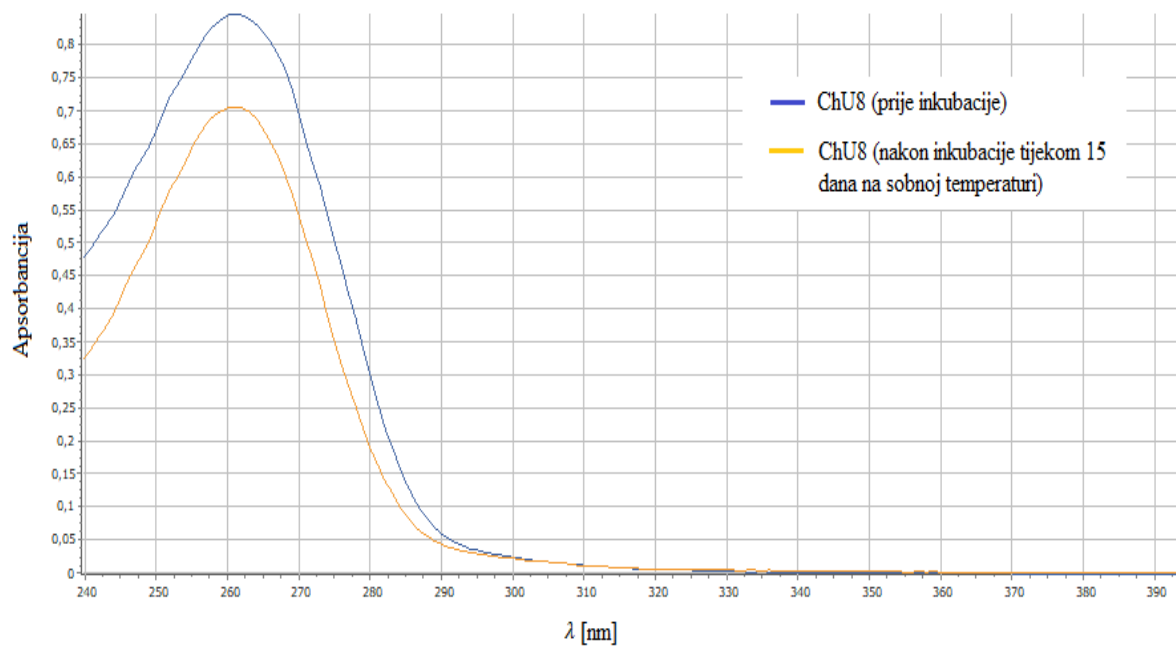
U svrhu istraživanja, pripremljene su matične otopine koenzima NAD^+ u PBS puferu pH=7,4 i NADH u glicin pirofosfatnom puferu pH=9. Zatim je u 5 mL svakog od prethodno pripremljenih NADES-ova prikazanih u tablici 3. i pufera dodavano po 10 μL matične otopine. Dobivene otopine inkubirane su tijekom 15 dana pri temperaturi 25 °C i 4 °C. Na slici 7 prikazane su primijećene promjene u apsorpcijskom spektru NADH tijekom inkubacije u ChU8 (a), odnosno NAD^+ tijekom inkubacije u ChU8 (b) na sobnoj temperaturi od 25 °C.

Eutektičko otapalo ChU8 karakteriziraju blago lužnata svojstva što potvrđuje činjenicu da su koenzimi stabilniji u rasponu pH medija od neutralnih do blago lužnatih (Zhang i sur., 2018). S druge strane, primjer destabilizacije koenzima NADH tijekom inkubacije u ChGly8, vidljiv kao porast apsorbanije na 338 nm uz pad u apsorbaniji na 262 nm, prikazan je na slici 7c. Fukazawa i Ishihara (2015) su ukazali na ovaj fenomen te opisali NADH kao spoj koji oksidira i formira inhibitorne produkte zbog kojih dolazi do smanjenja apsorpcije od početne pri 340 nm tijekom inkubacije u bilokojem otapalu.

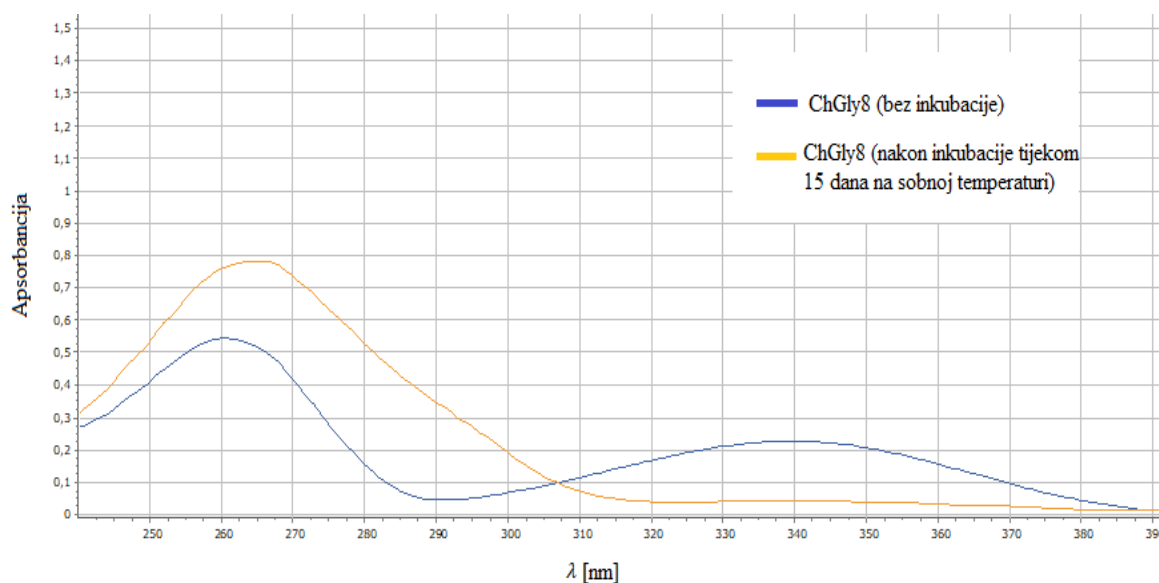
(a)



(b)



(c)

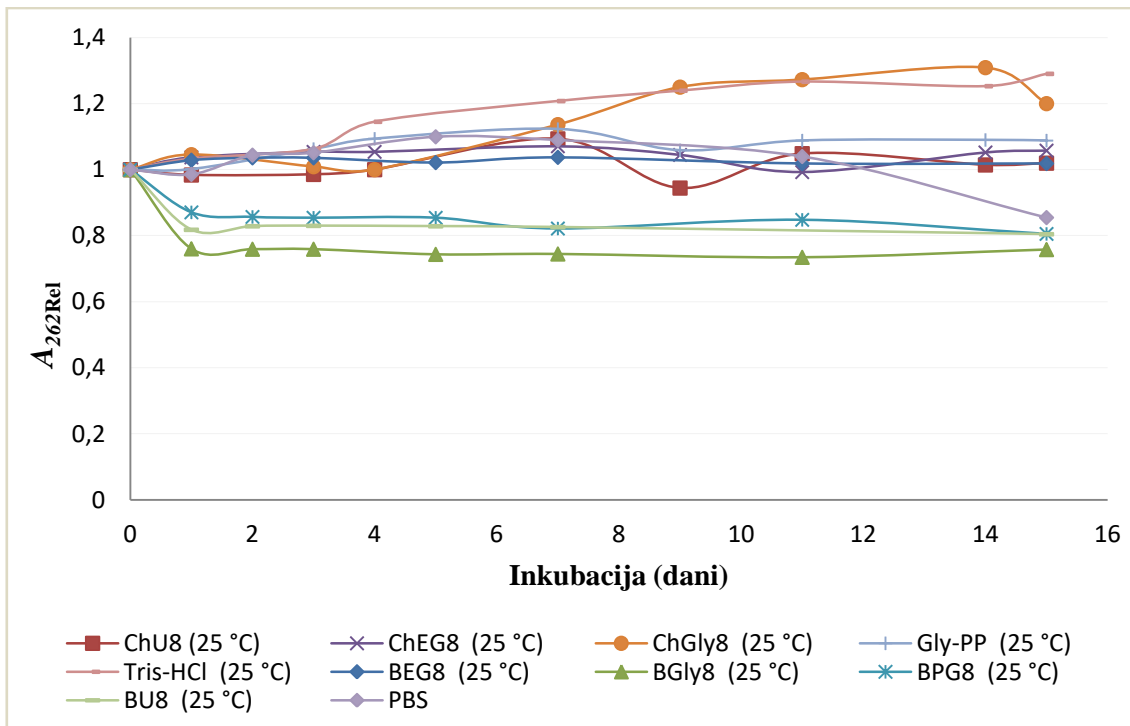


Slika 7. Tijek praćenja promjena u apsorpcijskom spektru NADH tijekom inkubacije u ChU8 (a); NAD^+ tijekom inkubacije u ChU8; NADH tijekom inkubacije u ChGly8 (c).

U ovom radu izmjerene vrijednosti apsorbancija preračunate su prema izrazu [2] i [3] ovisno radi li se o ispitivanju koenzima NAD^+ ili NADH te su relativne vrijednosti apsorbancija korištene za izračun relativne stabilnosti koenzima. Odstupanja od početne apsorbancije nakon inkubacije NAD^+ , odnosno NADH tijekom 15 dana u različitim NADES-ovima izračunate su prema formuli [4] i [5].

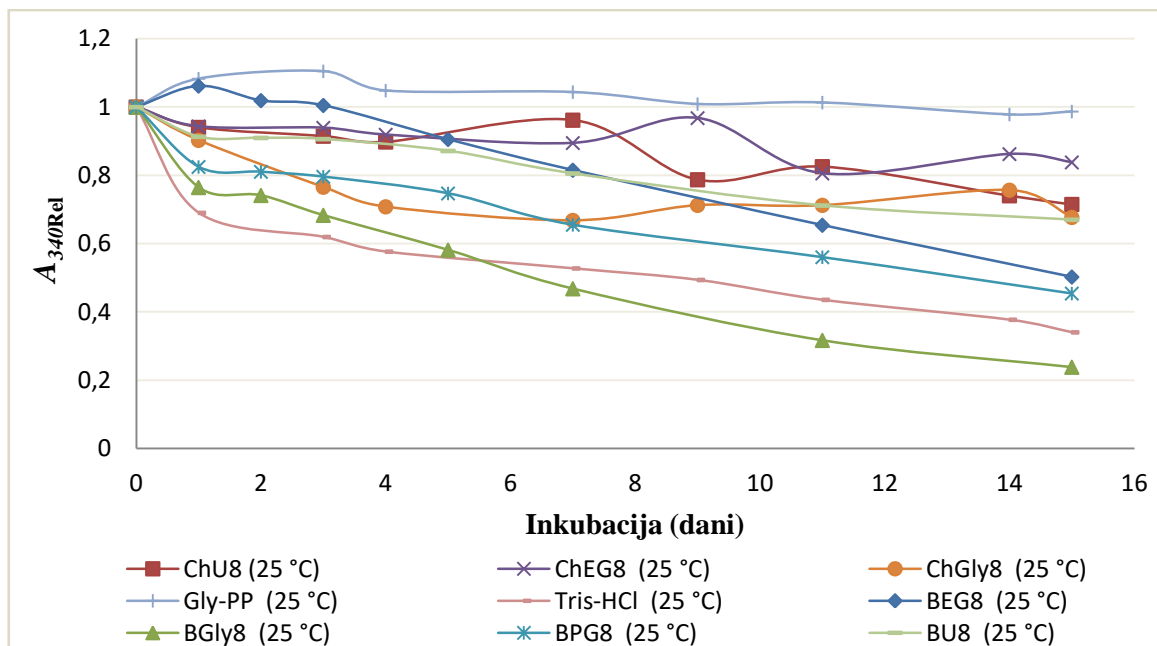
4.3.1. Stabilnost NADH

Na slici 8 i 9 prikazane su promjene u relativnoj stabilnosti koenzima NADH praćenjem promjena u apsorbanciji pri 262 nm i 340 nm tijekom 15 dana inkubacije u različitim NADES-ovima pri temperaturama 25 °C i 4 °C. Očekivano, rezultati upućuju da stabilnost NAD^+/NADH ovisi o pH vrijednosti i vrsti otapala, kao što je već opisano u literaturi za vodotopive polimere (Hentall i sur., 2001; Yamauchi i sur. 1981).



Slika 8. Tijek praćenja relativne stabilnosti NADH mjerenjem apsorbancije pri 262 nm (A_{262Rel}) tijekom 15 dana inkubacije u različitim NADES-ovima i referentnim puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Na grafičkom prikazu (slika 8) kod NADES-ova s betainom kao akceptorom vodika vidljiv je trend opadanja apsorbancija pri 262 nm tijekom prvih dva dana, a zatim su vrijednosti apsorbancije konstantne, dok su kod NADES-ova na bazi kolin-klorida vrijednosti apsorbancija pri 262 nm relativno konstantne tijekom svih 15 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, stoga se može zaključiti da otapala s kolin-kloridom imaju stabilizirajući utjecaj na koenzim NADH. U Tris-HCl puferu zabilježen je slabi porast vrijednosti apsorbancija tijekom 15 dana inkubacije.

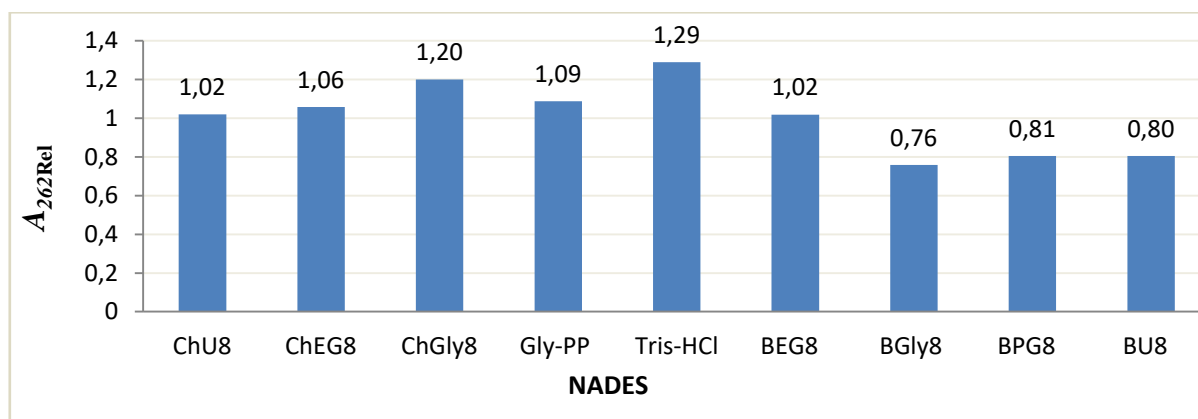


Slika 9. Tijek praćenja relativne stabilnosti NADH mjerenjem apsorbancije pri 340 nm (A_{340Rel}) tijekom 15 dana inkubacije u različitim NADES-ovima i referentnim puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

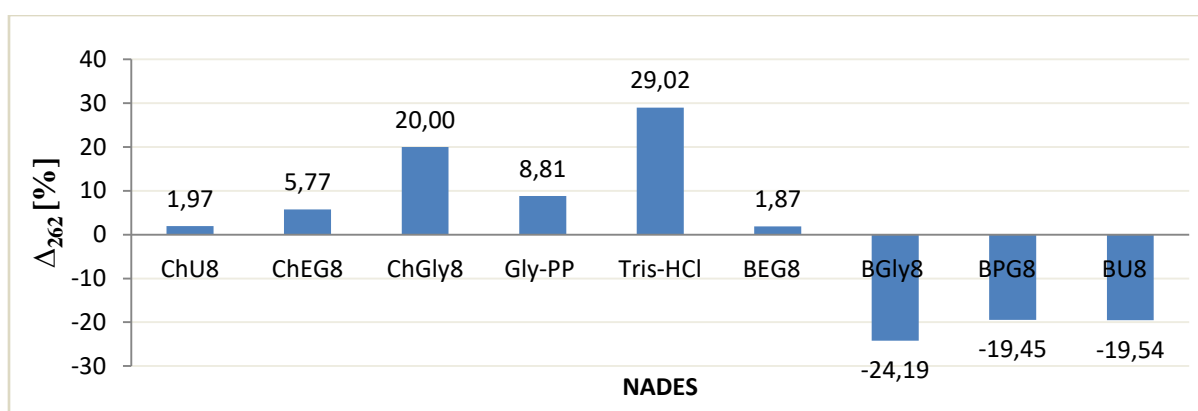
Nakon 15 dana inkubacije koenzima NADH u NADES-ovima na bazi kolin-klorida te u referentnom puferu (Tris-HCl) opaženo je povećanje apsorpcije na 262 nm i smanjenje apsorpcije na 340 nm.

Iako je iz grafičkih prikaza tijeka praćenja relativne stabilnosti moguće razumjeti utjecaj pojedinih NADES-ova na koenzim, zbog jednostavnije interpretacije rezultata prema jednadžbama [2] i [3] izračunate su relativne vrijednosti apsorpcija pri 262 nm i 340 nm (A_{262Rel} i A_{340Rel}) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u različitim NADES-ovima i referentnim puferima te odstupanja od početne vrijednosti pri 262 nm i 340 nm (Δ_{262} i Δ_{340}), a rezultati prikazani na slikama 10 i 11.

(a)



(b)



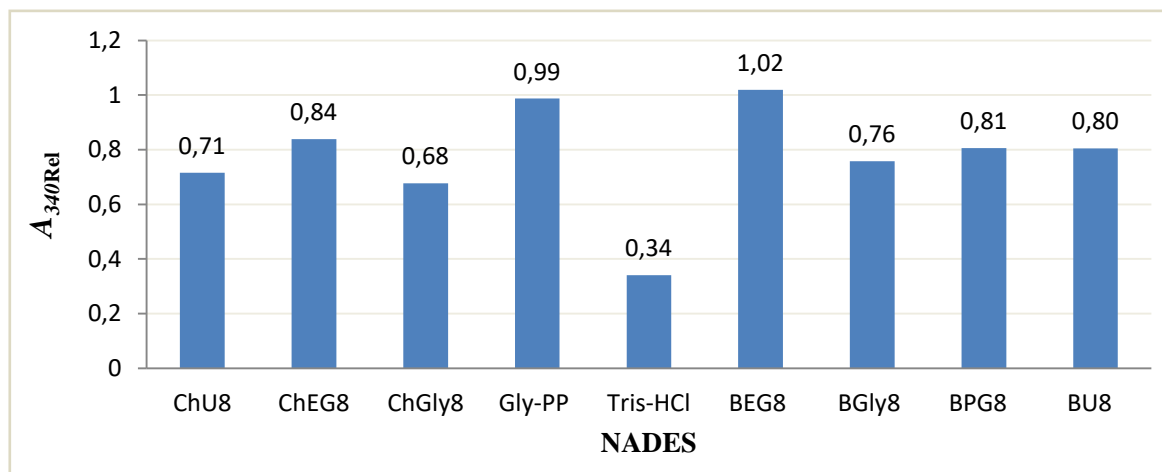
Slika 10. a) Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u različitim NADES-ovima i puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C; b) Odstupanje od početne apsorbancije na 262 nm (Δ_{262}) nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Na grafičkom prikazu (slika 10) može se uočiti da su odstupanja od početne apsorbancije izmjerene pri 262 nm u NADES-ovima na bazi betaina kao akceptora vodika veća u odnosu na NADES-ove na bazi kolin-klorida. Za usporedbu, u kolinijevim NADES-ovima odstupanja su u rasponu 1,97 - 20, a u betainijevim NADES-ovima -24,19 do -19,45. Otapala koja su se pokazala kao najpogodnija, odnosno gdje su odstupanja od početne apsorbancije pri 262 nm neznatna su ChU8 i BEG8. Ova otapala su karakteristična zbog više pH vrijednosti (7,9 za ChU8 i 7,42 za BEG8), što potvrđuje literaturni navod da blago lužnati uvjeti pozitivno utječu na stabilnost nikotinamidinskih koenzima (Zhang i sur., 2018).

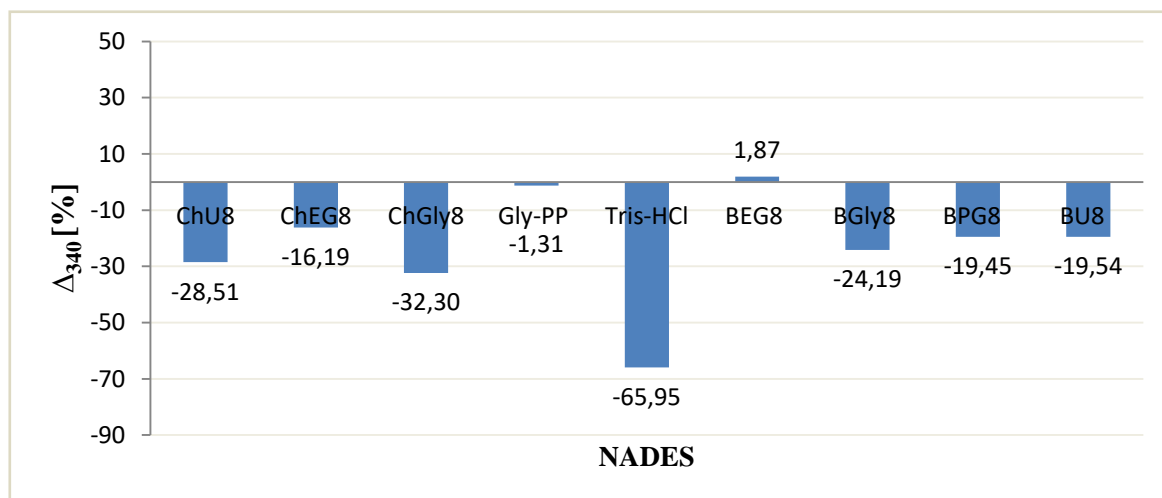
S druge strane, glicerol je najkiselija komponenta koja je korištena kao donor vodika u pripravi eutektičkih otapala, a time i pH NADES-a najniža (6,7 za ChGly8 i 7,43 za BGly8).

Sukladno očekivanome, rezultati su pokazali NADES-ovi s glicerolom u sastavu (ChGly8 i BGly8) najlošije utječu na stabilnost NADH.

(a)



(b)

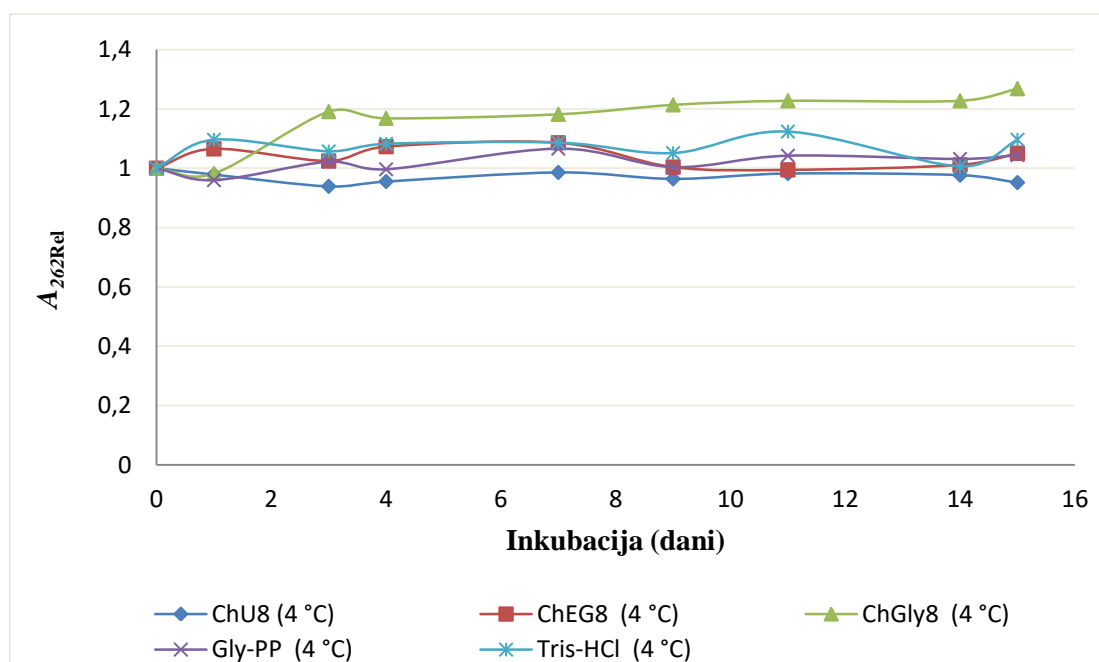


Slika 11. a) Relativna apsorbancija na 340 nm (A_{340Rel}) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u različitim NADES-ovima i puferima na sobnoj temperaturi od 25 °C; b) Odstupanje od početne apsorbancije na 340 nm (Δ_{340}) nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

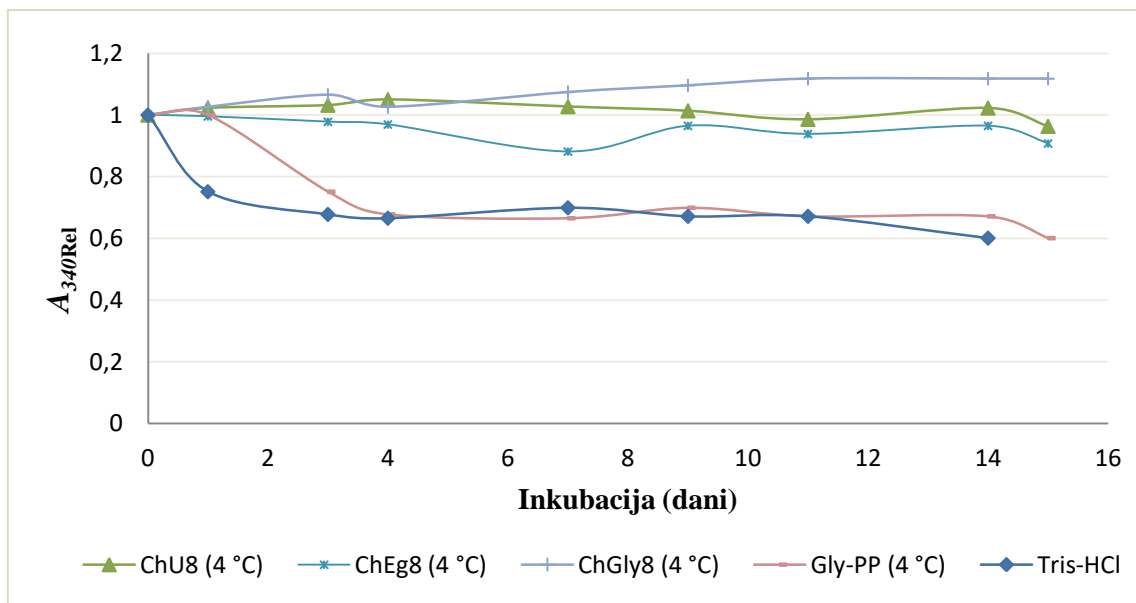
Na grafičkom prikazu (slika 11) vidljivo je da je mjerenjem apsorbancije na 340 nm najveća relativna vrijednost apsorbancije pri 340 nm zabilježena u uzorku s BEG8 te iznosi 1,02. Također, u otapalu BEG8 zamijećeno je najmanje odstupanje od početne apsorbancije pri 340 nm (1,87), zbog čega se BEG8 pokazalo kao najprihvatljivije eutektičko otapalo s najmanje

negativnog utjecaja na stabilnost reduciranog koenzima. Na valnoj duljini od 340 nm zabilježen je blagi pad u apsorbanciji kod uzoraka koji su sadržavali Tris-HCl pufer i glicin-pirofosfatni pufer što se može objasniti kao posljedica oksidacije NADH jer tijekom inkubacije reducirani NADH prelazi u oksidirani oblik NAD^+ (Zhang i sur., 2018).

Iako su dobiveni rezultati prilikom praćenja relativne stabilnosti koenzima NADH mjerenjem apsorbancije pri 262 nm i 340 nm tijekom 15 dana inkubacije u različitim NADES-ovima na sobnoj temperaturi od 25 °C pokazali da su najpogodnija otapala BEG8 i ChU8, vidljiva je činjenica da su manja odstupanja od početnih apsorbancija u NADES-ovima na bazi kolin-klorida, odnosno da su se pokazala boljima u odnosu na ona otapala na bazi betaina. Stoga, u cilju dodatnog istraživanja utjecaja NADES-ova koji u sastavu sadrže kolin-klorid provedeno je praćenje relativne stabilnosti koenzima NADH mjerenjem apsorbancije pri 262 nm i 340 nm tijekom 15 dana inkubacije u ChU8, ChEG8, ChGly8 i referentnim puferima pri temperaturi 4 °C te su rezultati prikazani na slici 12 i 13.



Slika 12. Tijek praćenja relativne stabilnosti NADH mjerenjem apsorbancije pri 262 nm ($A_{262\text{Rel}}$) tijekom 15 dana inkubacije u NADES-ovima pri temperaturi 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

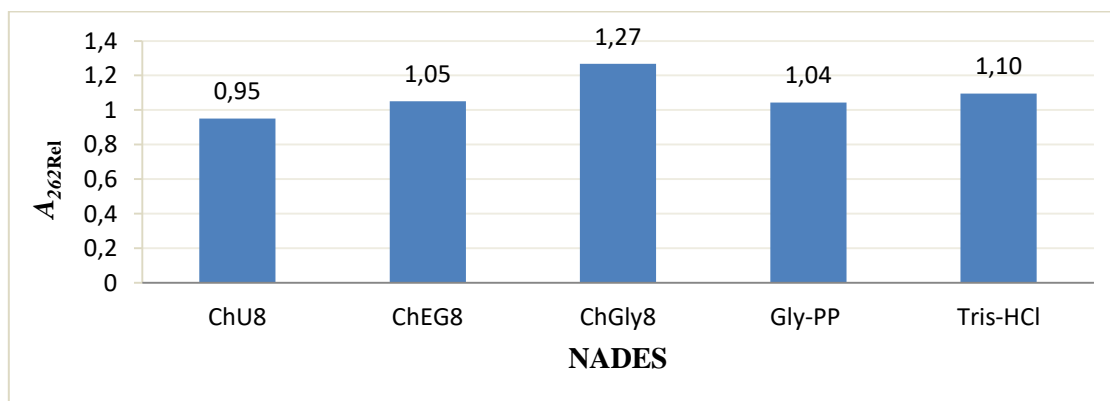


Slika 13. Tijek praćenja relativne stabilnosti NADH mjerenjem apsorbancije pri 340 nm (A_{340Rel}) tijekom 15 dana inkubacije u NADES-ovima pri temperaturi 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

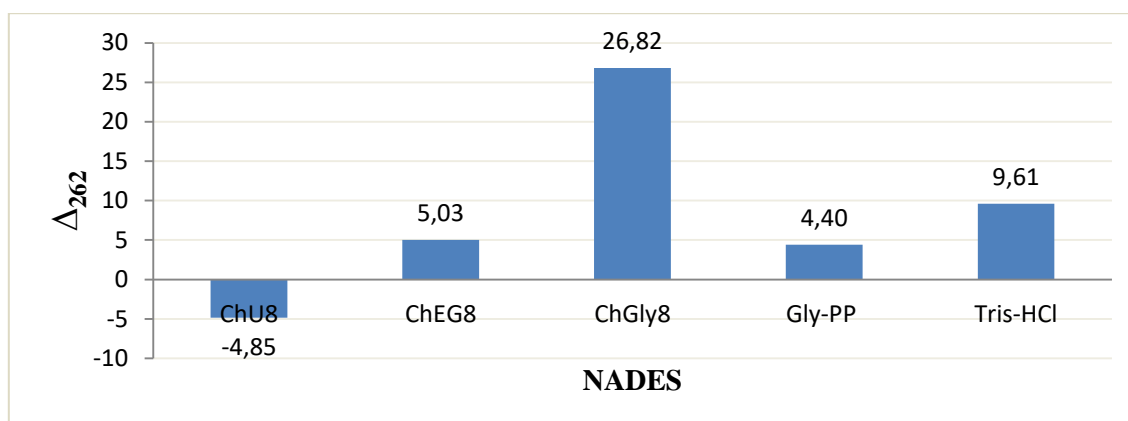
Usporedbom grafičkih prikaza na slici 8 i 9 s grafičkim prikazima na slici 12 i 13 može se zaključiti da su vrijednosti izmjerenih apsorbancija pri 262 nm i 340 nm relativno konstantne tijekom inkubacije u hladnjaku na temperaturi od 4 °C u odnosu na rezultate dobivene tijekom inkubacije na sobnoj temperaturi od 25 °C. Stoga, može se potvrditi utjecaj temperature na stabilnost koenzima NADH (Rover i sur, 1998). Ipak, na valnoj duljini od 340 nm zabilježen je blagi pad u apsorbanciji kod uzoraka koji su sadržavali Tris-HCl pufer i glicin pirofosfatni pufer što se može objasniti kao posljedica oksidacije NADH jer tijekom inkubacije reducirani NADH prelazi u oksidirani oblik NAD^+ (Zhang i sur., 2018).

Izračunate su relativne vrijednosti apsorbancija prema izrazima [2] i [3] pri 262 nm i 340 nm (A_{262Rel} i A_{340Rel}) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u NADES-ovima koji u sastavu sadrže kolin-klorid i referentnim puferima te odstupanja od početne vrijednosti pri 262 nm i 340 nm (Δ_{262} i Δ_{340}) prema formulama [4] i [5], a rezultati prikazani na sljedećim slikama 14 i 15.

(a)



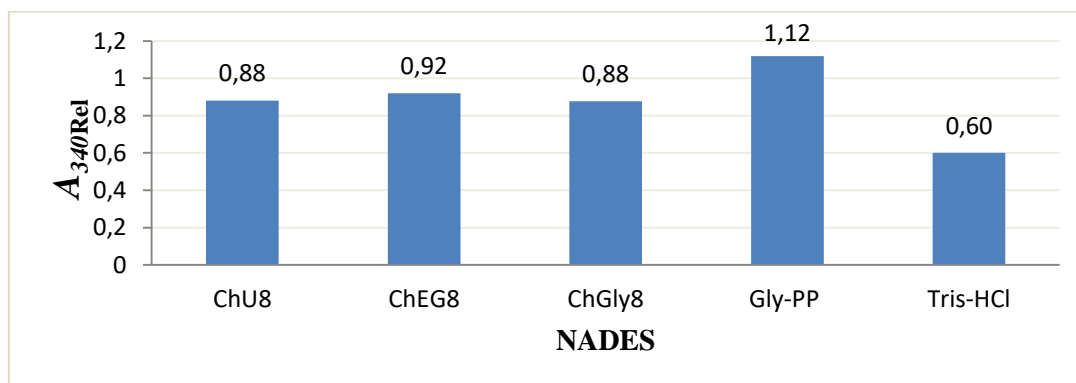
(b)



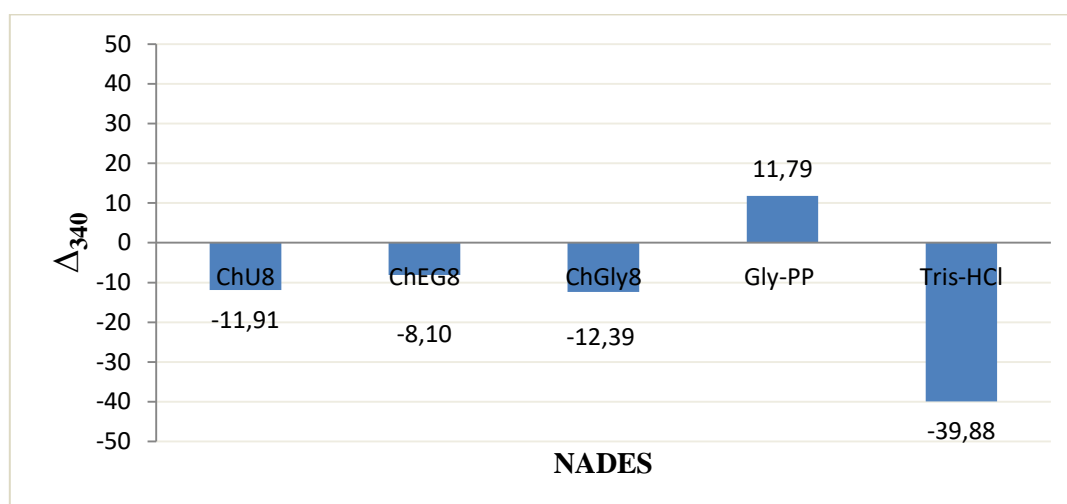
Slika 14. a) Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u NADES-ovima i puferima na temperaturi od 4 °C; b) Odstupanje od početne apsorbancije na 262 nm (Δ_{262}) nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$)

Na grafičkom prikazu (slika 14) najveće odstupanje od početne apsorbancije izmjerene pri 262 nm je u otapalu ChGly8 te iznosi 26,82, što se podudara s rezultatima dobivenim prilikom praćenja apsorbancija tijekom inkubacije u istom otapalu na sobnoj temperaturi od 25 °C.

(a)



(b)



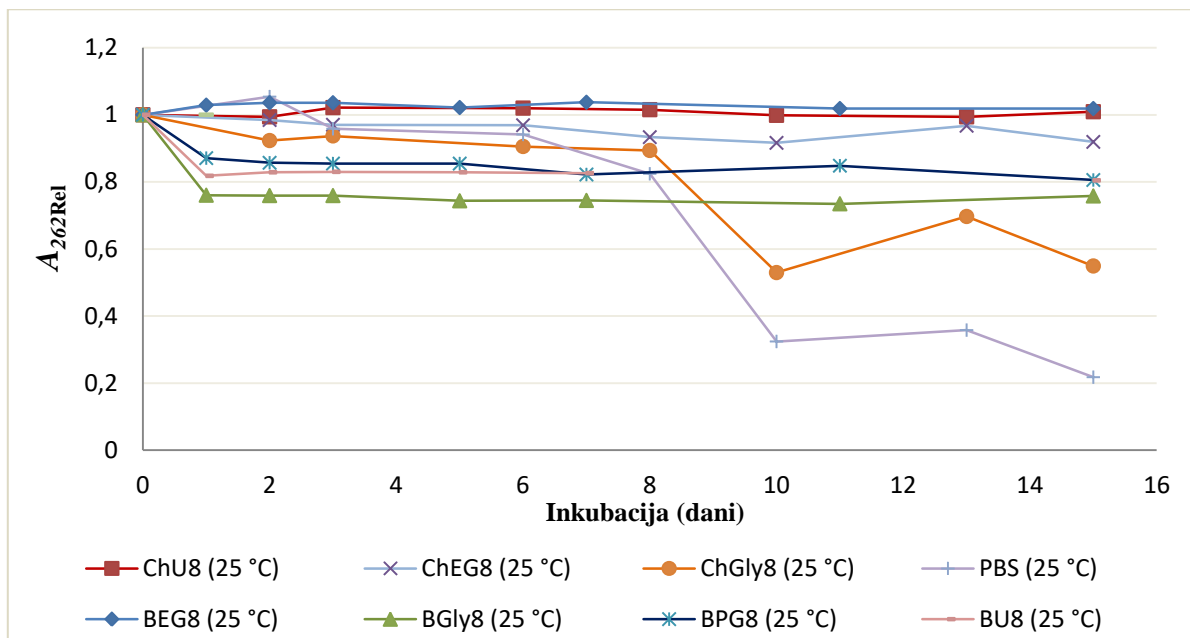
Slika 15. a) Relativna apsorbancija pri 340 nm (A_{340Rel}) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u NADES-ovima i puferima na temperaturi od 4 °C; b) Odstupanje od početne apsorbancije na 340 nm (Δ_{340}) nakon inkubacije Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Iz rezultata prikazanih na slici 15 može se zaključiti da su NADES-ovi koji u sastavu sadrže kolin-klorid kao akceptor vodika i različite nenabijene donore vodikove veze (urea, glicerol i etilen-glikol) stabiliziraju reducirani oblik koenzima NADH ukoliko se inkubacija provodi u hladnjaku pri temperaturi 4 °C.

4.3.2. Stabilnost NAD^+

Osim stabilnosti reduciranog oblika NADH, praćena je stabilnost oksidiranog oblika NAD^+ pri jednakim uvjetima. Uzorci su, osim koenzima, sadržavali prethodno pripremljene

NADES-ove prema tablici 3. i PBS pufer pH=7,4. Obzirom da NAD^+ apsorbira UV-VIS svjetlost samo na 262 nm, apsorbancija je mjerena pri navedenoj valnoj duljini na sobnoj temperaturi od 25 °C, a rezultati su prikazani na slici 16.

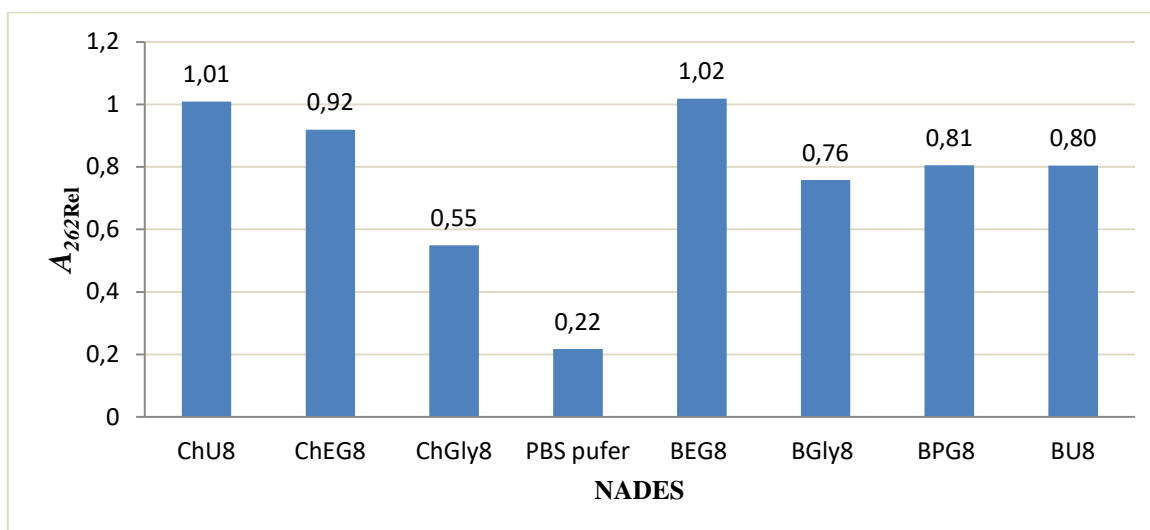


Slika 16. Tijek praćenja relativne stabilnosti NAD^+ mjerenjem apsorbancije pri 262 nm tijekom 15 dana inkubacije ($A_{262\text{Rel}}$) u različitim NADES-ovima i referentnom puferu sobnoj temperaturi od 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

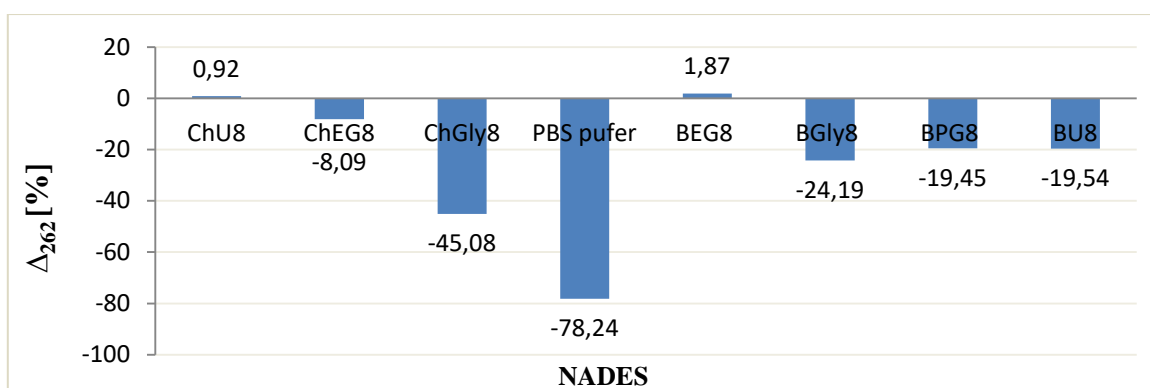
Na grafičkom prikazu (slika 16) vidljiv je pad apsorbancija izmjerenih pri 262 nm tijekom prva dva dana u NADES-ovima koji u sastavu sadrže betain (BEG8, BGly8, BPG8, BU8), nakon čega su vrijednosti apsorbancije konstantne tijekom 15 dana inkubacije oksidiranog oblika koenzima u istima. Drastičan pad vrijednosti apsorbancije uočava se u ChGly8 koji sadrži glicerol, najkiseliju komponentu u sastavu eutektičkih otapala. Praćenjem promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm, NADES-ovi na bazi kolin-klorida osim ChGIY8, pokazali su se pogodnima, s obzirom da su vrijednosti apsorbancije pri 262 nm konstantne tijekom 15 dana inkubacije u istima.

Nakon praćenja promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm, izmjerene apsorbancije pri 262 nm svedene su na relativne apsorbancije prema izrazima [2] i [3], te su izračunata odstupanja od početne apsorbancije pri 262 nm u različitim NADES-ovima i referentnom puferu, a rezultati su prikazani na slici 17.

(a)



(b)

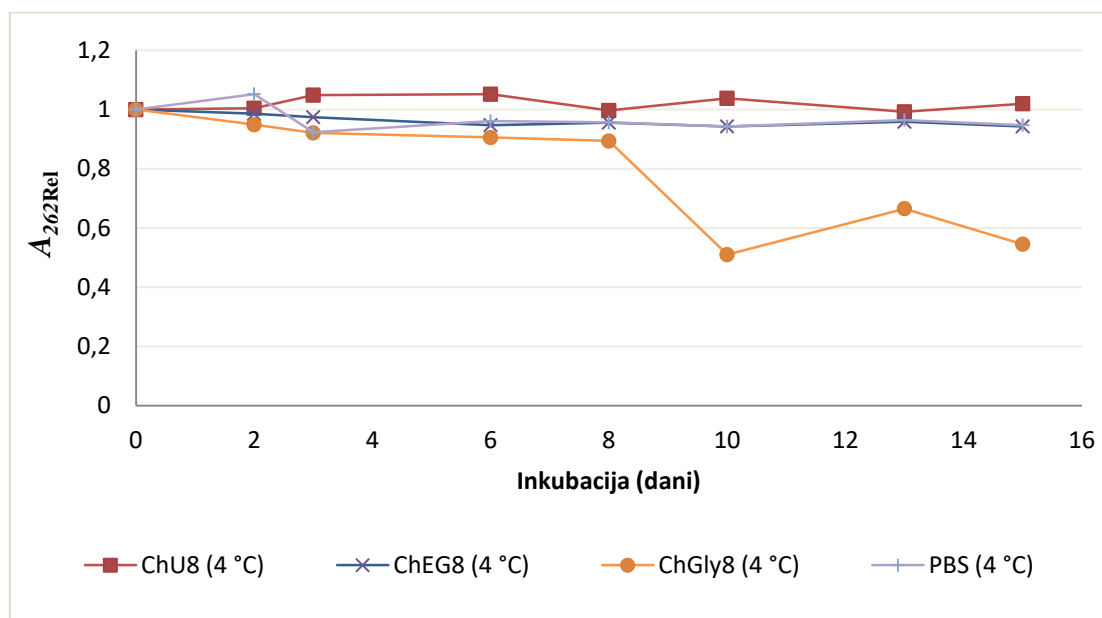


Slika 17. a) Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NAD^+ tijekom 15 dana u različitim NADES-ovima i puferu na sobnoj temperaturi od 25 °C; b) Odstupanje od početne apsorbancije na 262 nm (Δ_{262}) nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Na grafičkom prikazu (slika 17) vidljivo je da je mjerenjem apsorbancije na 262 nm najveća relativna vrijednost apsorbancije zabilježena u uzorku s BEG8 (1,02) i u uzorku s ChU8 (1,01), a odstupanja od početne apsorbancije pri 262 nm u istim otapalima su neznatna. Iz ovih rezultata može se zaključiti, sukladno s poznatom činjenicom, da je oksidirani oblik koenzima stabilniji pri blago lužnatim uvjetima. Urea je najlužnatija komponenta u sastavu pripremljenih eutektičkih otapala te pH vrijednost ChU8 otapala iznosi 7,9. Najlošiji NADES pri provedbi ovog ispitivanja bio je ChGly8 s izmjerenom relativnom apsorbancijom pri 262 nm od 0,55, a glicerol je najkiselija komponenta te pH vrijednost ChGly8 otapala iznosi 6,7.

Obzirom da su se NADES-ovi koji sadrže kolin-klorid pokazali prihvatljivijima u odnosu na utjecaj na stabilnost koenzima, u istim otapalima provedeno je praćenje promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 nm do 400 nm tijekom 15 dana inkubacije u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Na sljedećem grafičkom prikazu (slika 18) prikazan je tijek praćenja relativne stabilnosti NAD⁺ mjerenjem apsorbancije pri 262 nm tijekom 15 dana inkubacije (A_{262Rel}) u NADES-ovima na bazi kolin-klorida i referentnom puferu u hladnjaku na temperaturi od 4 °C.

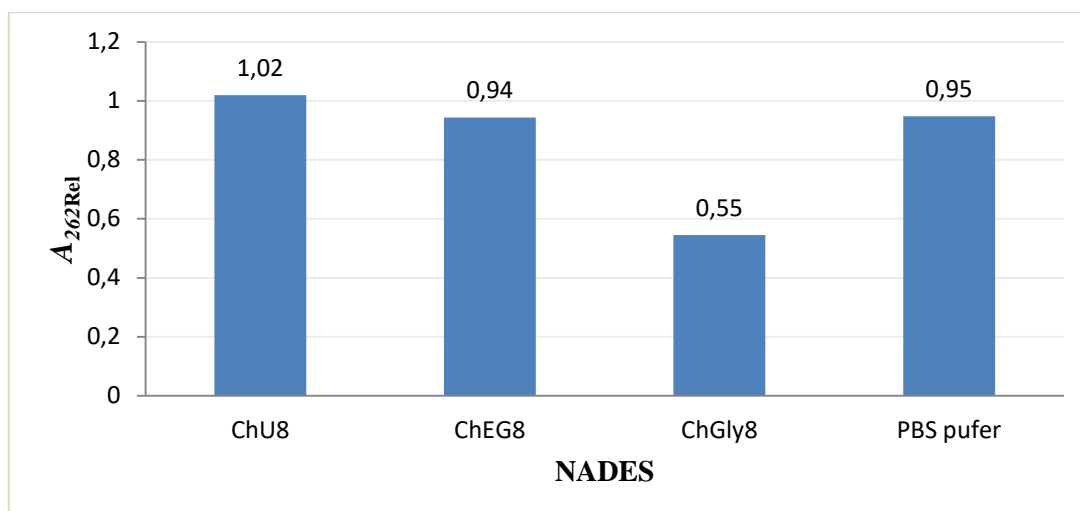
Nakon praćenja promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm, izmjerene apsorbancije pri 262 nm svedene su na relativne apsorbancije prema izrazima [2] i [3], te su izračunata odstupanja od početne apsorbancije pri 262 nm u različitim NADES-ovima i referentnom puferu, a rezultati su prikazani na slici 19.



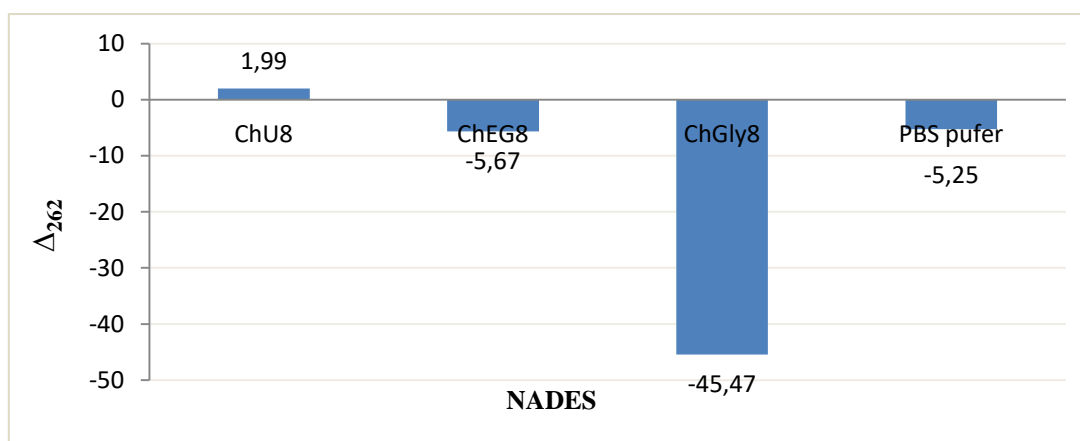
Slika 18. Tijek praćenja relativne stabilnosti NAD⁺ mjerenjem apsorbancije pri 262 nm tijekom 15 dana inkubacije (A_{262Rel}) u kolin-klorid NADES-ovima i referentnom puferu na temperaturi od 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Na grafičkom prikazu (slika 18) uočava se pad izmjerenih apsorbancija pri 262 nm tijekom 15 inkubacije u otapalu ChGly8 na temperaturi od 4 °C, što je u skladu s prethodnim rezultatima. U ostalim NADES-ovima na bazi kolin-klorida vrijednosti apsorbancije su konstantne tijekom svih 15 dana inkubacije na temperaturi od 4 °C.

(a)



(b)



(b)

Slika 19. a) Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NAD^+ tijekom 15 dana u NADES-ovima i puferu na temperaturi od 4 °C; b) Odstupanje od početne apsorbancije na 262 nm (Δ_{262}) nakon inkubacije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Na grafičkom prikazu (slika 19) vidljivo je da je najveća vrijednost relativne apsorbancije pri 262 nm nakon inkubacije NAD^+ tijekom 15 dana izmjerena u otapalu ChU8 te iznosi 1,02. Sukladno tome, izračunato je i najmanje odstupanje od početne apsorbancije u otapalu ChU8. Najmanja vrijednost relativne apsorbancije pri 262 nm nakon inkubacije NAD^+ tijekom 15 dana iznosi 0,55, a izmjerena je u otapalu ChGly8 te je ujedno i najveće odstupanje od početne apsorbancije u istom otapalu (-45,47). Ovaj rezultat slaže se s prethodno dobivenim rezultatima.

U zaključku, praćenjem promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm, odnosno ispitivanjem stabilnosti koenzima NADH i NAD⁺ u odabranim NADES-ovima koji sadrže kolin-klorid ili betain kao akceptor vodika, rezultati su pokazali da su najbolja eutektička otapala sa stabilizirajućim utjecajem na koenzime ChU8 i BEG8, dok su otapala koja sadrže glicerol u sastavu (ChGly8 i BGly8) s destabilizirajućim utjecajem na koenzime. Zanimljivo je da su izmjerene relativne apsorpcije pri 262 nm tijekom 15 dana inkubacije NADH i NAD⁺ na sobnoj temperaturi od 25 °C konstantne u navedenim otapalima, dok je mjerenjem apsorpcija pri 340 nm tijekom inkubacije NADH zabilježen pad apsorpcija u NADES-ovima na bazi kolin-klorida. Prema dobivenim rezultatima, može se uočiti da je BEG8 najpogodnije otapalo koje dobro stabilizira oba koenzima. Naime, Zhang i sur. (2018) u svojem radu navode da su povoljni uvjeti u kojima je stabilnost koenzima NAD⁺ najveća u pH rasponu od kiselog do blago neutralnog. S druge strane, neutralni do blago lužnati NADES-ovi pozitivno utječu na stabilnost koenzima NADH. Saznanje da postoji NADES koji dobro stabilizira oba koenzima, dovodi do značajnog doprinosa u primjeni *zelenih* otapala obzirom na široko područje uporabe oksidoreduktivnih biokatalitičkih reakcija u organskoj kemiji i proizvodnji lijekova i finih kemikalija.

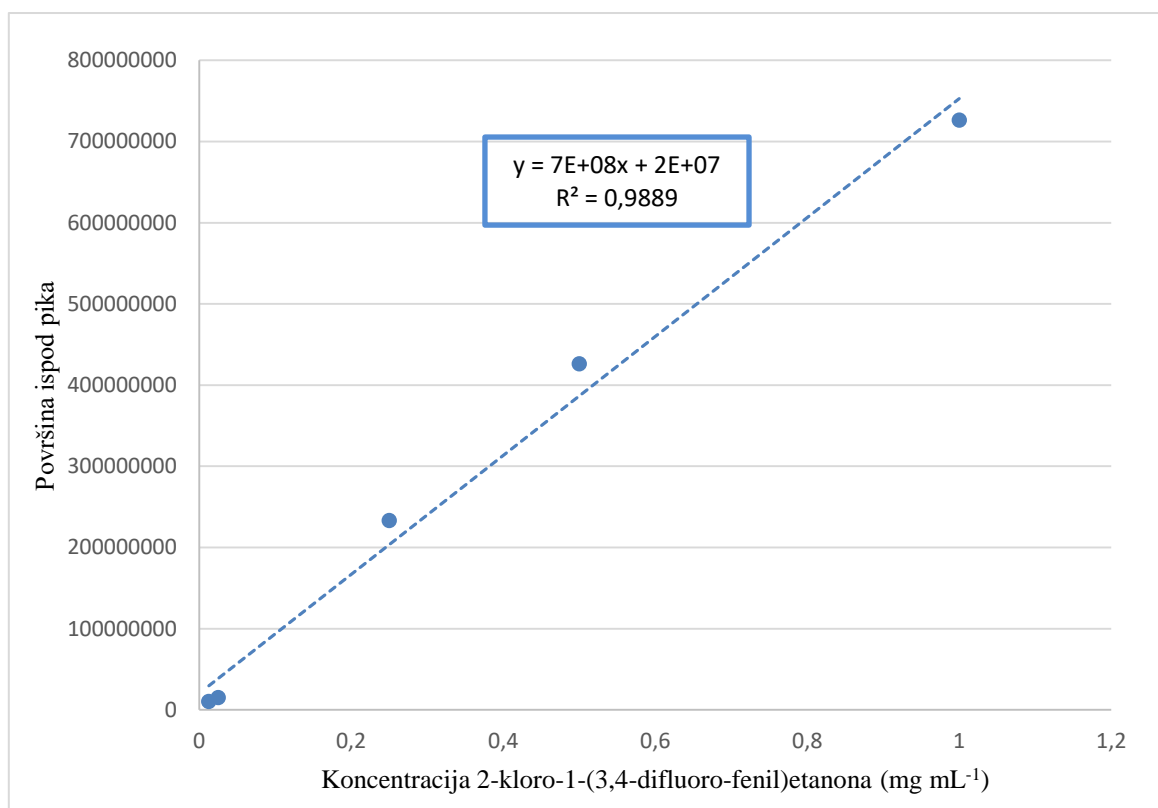
4.4. ENANTIOSELEKTIVNA REDUKCIJA 2-KLORO-1-(3,4-DIFLUORO-FENIL)ETANONA KATALIZIRANA PEKARSKIM KVASCEM

Enzimske reakcije imaju prednost pred klasičnim reakcijama kemijske sinteze zbog visoke enantio- i regioselektivnosti, a naročito ako se izvode u *zelenim* otapalima. Na raspolaganju su različiti biokatalizatori koje karakteriziraju pozitivna svojstva poput netoksičnosti, biorazgradivosti i djelovanja u blagim reakcijskim uvjetima, među kojima se ističu cijele stanice kvasca *S. cerevisiae*. Pekarski kvasac, idealan je biokatalizator za industrijsku primjenu jer je jeftin, lako dostupan i dobro proučen mikroorganizam, posjeduje GRAS status, a karakterizira ga netoksičnost, biološka razgradivost i lagano rukovanje (Cvjetko Bubalo i sur., 2015c; Xiao i sur., 2012). Kvasac najznačajniju upotrebu ima u asimetričnim redukcijama karbonilnih skupina pri čemu nastaju optički aktivni alkoholi. Važnost redukcijskih enzimskih reakcija je mogućnost uvođenja kiralnosti u molekulu izvođenjem reakcija na prokiralnim supstratima. Aldehidi i ketoni su takvi prokiralni supstrati jer vezanjem liganda na ugljikov atom karbonilne skupine karbonilni ugljik može postati asimetrični centar molekule. U većini redukcijskih reakcija stereokemijski tijek reakcije uvjetovan je uglavnom strukturom supstrata te se može zbivati prema Prelogovu pravilu asimetrične redukcije ketona (Šinko 2005; Prelog, 1964). Prema tom pravilu ketoni i aldehidi

s malom i velikom skupinom vezanom na karbonilni ugljik reducirat će se u *S*-alkohole uz uvjet da veća skupina ima viši stupanj prioriteta od manje skupine prema CIP-nomenklaturi. Sinteza enantiomerno čistih alkohola privukla je značajnu pozornost zbog njihove široke upotrebe kao ključnog sastavnog elementa u sintezi lijekova i farmaceutskih proizvoda (Guo i sur., 2017).

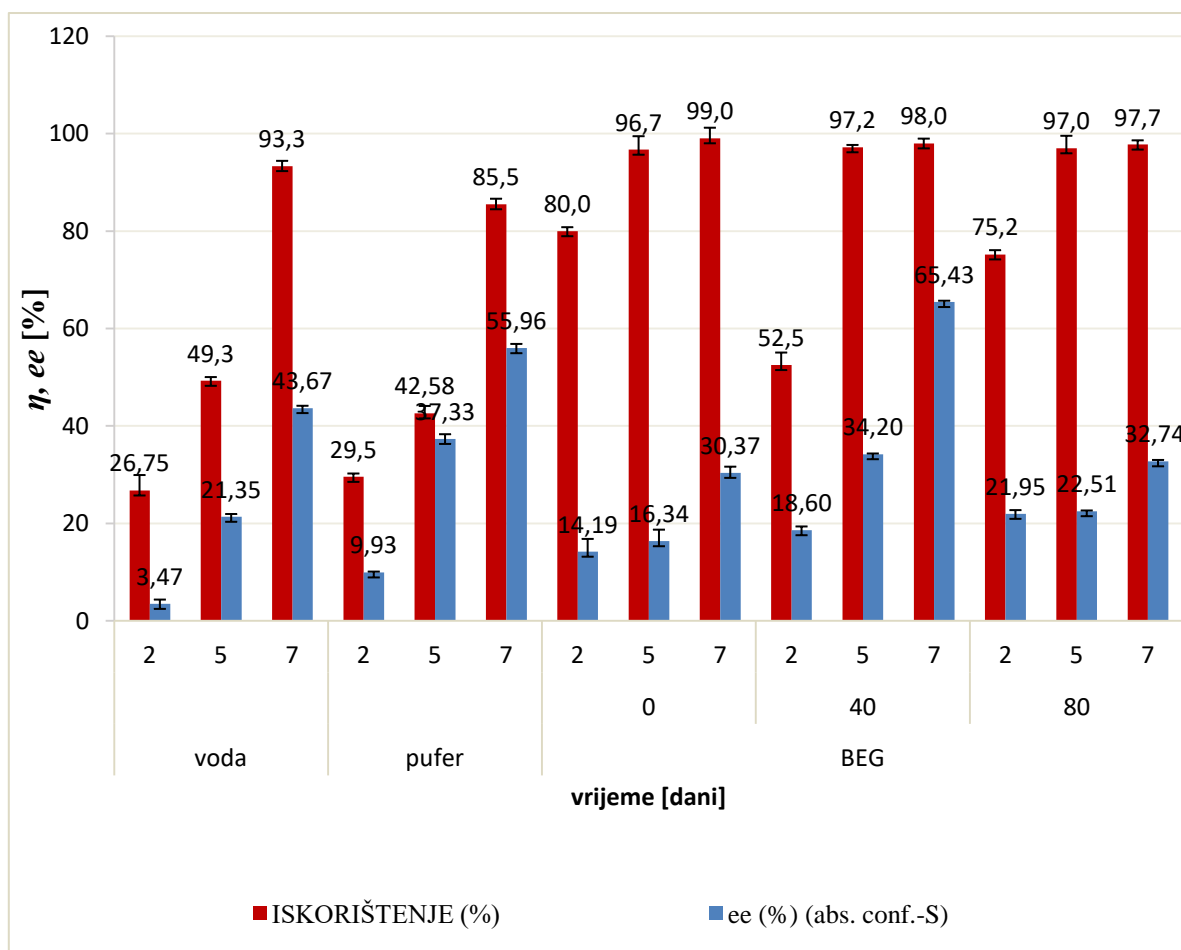
Stabilnost i aktivnost kvasca *S. cerevisiae* u *prirodnim* eutektskim otapalima već je potvrđena (Cvjetko Bubalo i sur., 2015c), a u ovome je radu ispitana njegova sposobnost enantioselektivne redukcije supstrata 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u kiralni alkohol u ekološki prihvatljivim otapalima BEG s različitim udjelima vode: 0 %, 40 %, i 80 %. Redukcija je provedena i u vodi te puferu kako bi se usporedila uspješnost provedenih reakcija. Ovaj proces je ekološki prihvatljiv i u skladu s *zelenom* kemijom, a značajan je jer redukcijom odabranog supstrata nastaje enantiomer (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanol, kiralni intermedijer u sintezi tikagrelora (Guo, 2017). U suspenziju pekarskog kvasca u NADES-u bez i uz dodatak 40 % i 80 % (v/v) vode, dodano je 2 mg mL⁻¹ 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona. Uzrokovanje je provedeno nakon drugog, petog i sedmog dana reakcije, a uzorci su analizirani pomoću plinske kromatografije.

Baždarni dijagram ovisnosti koncentracije 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona o površini ispod pika prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta prikazana je na slici 20.



Slika 20. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije 2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanona

Enantioselektivna redukcija 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona pomoću kvasca *S. cerevisiae* uspješno je provedena u svim odabranim otapalima. Nakon provedene analize pomoću plinske kromatografije, iz dobivenih rezultata izračunati su iskorištenje procesa redukcije (η) te enantiomerni višak (ee) prema formulama [6] i [7] kako bi se usporedila uspješnost reakcije redukcije u vodi, puferu, u eutektičkom bezvodnom otapalu BEG te u otapalu s 40 % i 80 % udjela vode (BEG40% i BEG80%). Na sljedećoj slici 21 prikazani su enantiomerni višak (ee) i iskorištenje procesa (η) reakcije redukcije katalizirane enzimima pekarskog kvasca u odabranim otapalima BEG, BEG40% i BEG80%, vodi i puferu.



Slika 21. Iskorištenje reakcije i enantiomerni višak redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanona katalizirane enzimima pekarskog kvasca *S. cerevisiae*. Reakcijski uvjeti: 1,81 mg mL⁻¹ supstrata 2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanona; 0,5 g pekarskog kvasca; 7 dana; 28 °C. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti ± S.D. (n = 3).

Dobiveni rezultati ukazuju na visoku enantioselektivnost biokatalizatora prema (*S*)-alkoholu što je u skladu s Prelogovim modelom redukcije (Prelog, 1964). Iskorištenja reakcije redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanona u otapalu BEG s različitim udjelima vode uglavnom su bila oko 90 % ili više što je vidljivo na slici 21. Također, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da povećanje udjela vode u sastavu otapala povoljno utječe na iskorištenje redukcije, odnosno da se najveća iskorištenja postižu u otapalu BEG s 80 % udjela vode. Takav rezultat bio je očekivan budući da dodatak vode u prirodna eutektička otapala koja imaju relativno visoku viskoznost, omogućava bolji prijenos reaktanta i produkta u reakcijskoj smjesi (Yang i sur., 2017). Uspoređujući enantiomerni višak i iskorištenje redukcije u eutektičkom otapalu BEG s 40 % vode, puferu i vodi (slika 21), vidljivo je da se BEG40% pokazalo kao najučinkovitije otapalo za enantioselektivnu redukciju 2-kloro-1-(3,4-

difluoro-fenil)etanona u kojem je ostvareno iskorištenje od 98 % te enantiomerni višak od 65,43 %. Ako usporedimo enantiomerni višak nakon 7 dana u vodi, puferu i odabranim NADES-ovima (BEG, BEG40% i BEG80%), enantiomerni višak je u rasponu od 3,47 % do 65,43 %. Ovakav rezultat nije zadovoljavajući te bi se upotrebom drugog katalizatora kao što su ketoreduktaze iz *Leifsonia* sp. mogla povećati specifičnost supstrata i postići viši enantiomerni višak (> 99 %). Također, kako bi se poboljšala katalitička sposobnost enzima, potrebno je regulirati koncentraciju supstrata koja utječe na konverziju supstrata u produkt (Guo i sur., 2017). Iz literature je dobro poznato da promjena pH vrijednosti utječe na aktivnost i selektivnost enzima koji sudjeluju u reakciji, kao i na regeneraciju koenzima prisutnog u stanicama, što posljedično utječe na prinos reakcije (Xiao i sur., 2012).

Dobiveni rezultati nisu pokazali neki uobičajen trend u postocima iskorištenja procesa i enantiomernog viška s obzirom na postotak vode u NADES-u. Moguće da je to posljedica različite aktivnosti brojnih enzima u stanicama pekarskog kvasca koji su u određenim uvjetima aktivni odnosno inhibirani, na što mogu utjecati i karakteristike pojedinog eutektičkog otapala (Panić i sur., 2018). U pripremljenim NADES-ovima, konverzije su veće nego u vodi što dokazuje prednost primjene BEG kao povoljnog otapala za provođenje redukcije. Budući da NADES-ovi povećavaju topljivost polarnih i nepolarnih sastojaka, mogućnosti manipulacije različitom polarnosti otapala putem dizajniranja eutektičkih otapala odabirom različitih komponenti za sintezu otapala su veoma velike. Dizajn otapala odabirom određenih metabolita može biti jedan od razloga povoljnog djelovanja na učinkovitost bio redukcije (Dai i sur., 2013).

U zaključku, rezultati potvrđuju prednost upotrebe ispitivanih NADES-ova u proizvodnji (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanola redukcijom 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona kataliziranom enzimima pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* obzirom da su konverzije supstrata u *S*-produkt rezultirale većim postotkom nego u čistoj vodi. Dizajniranjem otapala postižu se takve željene karakteristike eutektičkih otapala koja doprinose većim konverzijama i rezultiraju željenim enantiomerima (Gröger i sur., 2003). Otapalo BEG pokazalo se kao pogodno prirodno eutektičko otapalo *zelenog* karaktera za sintezu lijekova i finih kemikalija u farmaceutskoj industriji.

5. ZAKLJUČCI

U ovome radu ispitan je utjecaj ekološki prihvatljivijih *prirodnih* eutektičkih otapala na aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) te stabilnost koenzima NAD^+ i NADH . Također, ispitan je mogućnost primjene istih u reakciji redukcije 2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanona u komercijalno zanimljive, optički aktivne alkohole pomoću stanica pekarskog kvasca *S. cerevisiae*.

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

1. Prirodna eutektička otapala kolin-klorid:urea, kolin-klorid:glicerol, kolin-klorid:etilen-glikol, betain:urea, betain:glicerol, betain:etilen-glikol, betain:propilen-glikol pripremljeni su zagrijavanjem i miješanjem komponenti u odgovarajućim omjerima uz 100 %-tno iskorištenje reakcije. Također, razrjeđivanjem su pripremljena otapala s određenim volumnim udjelom vode.
2. Prirodna eutektička otapala na bazi betaina pokazala su se učinkovitijim u provođenju reakcije oksidacije etanola u acetaldehid koju katalizira alkohol dehidrogenaza u odnosu na otapala na bazi kolin-klorida. Najpovoljnije otapalo je BEG80%, pri čemu volumetrijska aktivnost alkohol dehidrogenaze iznosi $2,60 \mu\text{m min}^{-1} \text{cm}^{-3}$, dok je najveća volumetrijska aktivnost enzima bila u puferu, a iznosi $2,77 \mu\text{m min}^{-1} \text{cm}^{-3}$. Povećanje udjela vode u eutektičkim otapalima utječe pozitivno na aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze.
3. Prirodna eutektička otapala na bazi betaina pokazala su se učinkovitijim tijekom praćenja promjena u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze primjenom spektrofluorimetrije u odnosu na eutektička otapala na bazi kolin-klorida. S obzirom na činjenicu da je aktivnost enzima u korelaciji s intenzitetom fluorescencije, izmjerene niže apsorbancije u otapalima na bazi betaina označuju da otapala tvore veze s enzimom i imaju stabilizirajući učinak na enzimsku aktivnost.
4. Praćenjem promjena asorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm, odnosno ispitivanjem stabilnosti koenzima NADH i NAD^+ tijekom 15 inkubacije, dobivene su konstantne vrijednosti realativne apsorbancije u otapalima ChU8 i BEG8, što

znači da su to otapala sa stabilizirajućim utjecajem na oba koenzima. Otapala koja sadrže glicerol u sastavu (ChGly8 i BGly8) pokazala su se kao otapala s destabilizirajućim utjecajem na koenzime.

5. Kod enzimima pekarskog kvasca katalizirane enantioselektivne redukcije kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u otapalima na bazi betaina (BEG, BEG40%, BEG80%), uspoređujući enantiomerni višak i iskorištenje redukcije u odabranim eutektičkim otapalima, puferu i vodi vidljivo je da se BEG40% pokazalo kao najučinkovitije otapalo u kojem je ostvareno iskorištenje od 98 % te enantiomerni višak u korist (*S*)-enantiomera od 65,43 %.
6. Potvrđena je prednost upotrebe ispitivanih prirodnih eutektičkih otapala koji sadrže betain i etilen-glikol u proizvodnji (*S*)-2-kloro-1-(3,4-difluorofenil)etanola redukcijom 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona kataliziranom enzimima pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* obzirom da su konverzije supstrata u *S*-produkt rezultirale većim postotkom nego u čistoj vodi.

6. LITERATURA

Anastas, P. T., Bartlett, L. B., Kirchoff, M. M., Williamson, T.C. (2000) The role of catalysis in the design, development, and implementation of green chemistry. *Catal. Today* **55**, 11.

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

Blanchard, L. A., Hancu, D., Beckman, E. J., Brennecke, J. F. (1999), *Nature* **399**, 28.

Bommarius, A. S., Gibbs, P. R., Riebel, B. R., Wellborn, W. B. (2002) Cofactor Regeneration of NAD⁺ from NADH: Novel water-forming NADH Oxidases, *Adv. synth. catal.* 1615-4150/02

Bommarius, A. S., Riebel, B. R. (2004) *Biocatalysis: Application of Enzymes as Catalysts: Basic Chemicals, Fine Chemicals, Food, Crop Protection, Bulk Pharmaceuticals*. WILEY-WCH Verlag GmbH & Co. KGaA. I., 159-208.

BRENDA (2020) The comprehensive enzyme information system. BRENDA- BRAunschweig ENzyme DAtabase, <<https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer.php?browser=1>>. Pristupljeno 01. rujna 2020.

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

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

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

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

- Dabirmanesh, B., Khajeh, K., Akbari, J., Falahati, H., Daneshjoo, S., Heydari, A. (2011) Mesophilic alcohol dehydrogenase behavior in imidazolium based ionic liquids. *J. Mol. Liq.* **161**, 139-143.
- Dai Y., van Spronsenb J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y.H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* **766**: 61– 68.
- Drauz, K., Gröger, H., May, O. (2012) Enzyme catalysis in organic synthesis, 3.izd., Wiley-VCH, Weinheim, 3-11.
- Durand E, Lecomte J, Villeneuve P (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **115**, 379–385.
- Faber, K. (2011) Biotransformations in Organic Chemistry, 6. Izd., Springer-Verlag, Berlin., 1–268.
- Faber, K., Patel, R. (2000) Chemical biotechnology: A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 517-519.
- Fukazawa, K., Ishihara, K. (2016) Enhanced stability of NADH/dehydrogenase mixture system by water-soluble phospholipid polymers. *Biomater. Biomech. Bioeng.* **3**, 37-46.
- Ghisalba, O., Meyer, H.P., Wohlgemuth, R. (2010) Industrial biotransformation. U: Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology, Flickinger M.C., John Wiley & Sons, 1-18.
- Gröger H., Hummel W., Buchholz S., Drauz K., Nguyen T., Rollmann C., Hüsken H., Abokitse K. (2003) Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a hydrogenase-compatible biphasic reaction media. *Org. Lett.* **5**, 173-176.
- Gröger, H., Hummel, W., Borchert, S., Krauß, M. (2012) Reduction of Ketones and Aldehydes to Alcohols. U: Enzyme catalysis in organic synthesis, 3.izd., Wiley-VCH, Weinheim, 1099-1101.
- Hentall, P. L., Flowers, N., Bugg, T. D. H. (2001), “Enhanced acid stability of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) analogue”, *Chem. Commun.* **20**, 2098-2099.
- Illanes, A. (2008) Principles and Applications, U: Enzyme Biocatalysis, (Illanes, A., ured.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1-29.

- Jia, R., Hu, Y., Huang, H. (2014) Improving the catalytic performance of porcine pancreatic lipase in the presence of [MMIm][MeSO₄] with the modification of functional ionic liquids. *Process Biochem.* **49**, 668-672.
- Jukić, M., Đaković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Kovač, V., Vorkapić-Furač, J. (2005) Dominantni trendovi “zelene” kemije, *Kem. Ind.* **54**, 255–272.
- Jukić, M., Đaković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Vorkapić-Furač, J. (2004) Green Chemistry Opens the Way for Clean, Ecologically Acceptable Chemical Processes, *Kem. Ind.*, **53**, 217–224.
- Lakowitz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer*, New York.
- Lancaster, M. (2002) Principles of sustainable and green chemistry. U: handbook of green chemistry and technology, Clark J., Macquarrie D., Blackwell Science Ltd., 10-26.
- Luisi, P. L., Favilla, R. (1970) Tryptophan Fluorescence Wuenching in Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **17**, 91-94.
- Maugeri, Z., Dominguez De Maria, P. (2014) Whole-cell biocatalysis in deep-eutectic-solvents/aqueous mixtures. *Chem. Cat. Chem.* **6**, 1535–1537.
- Paiva, P., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sus. Chem. Eng.*, **2** (5) 1063–1071.
- Panić, M., Delač, D., Roje, M., Radojčić, Redovniković, I., Cvjetko, Bubalo, M. (2018b) Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives: *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. *Biotechnol. Lett.* **41**, 253-262.
- Panić, M., Majerić, Elenkov, M., Roje, M., Cvjetko, Bubalo, M., Radojčić, Redovniković, I. (2018a) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents. *Process. Biochem.* **66**, 133–139.
- Prelog, V. (1964) Specification of the stereospecificity of some oxidoreductases by diamond lattice sections. *Pure. Appl. Chem.* **9**, 119-30.

- Rover Jr., L., Fernandes, J. C. B., Neto, G. de O., Kubota, L. T., Katekawa, E., Serrano, S. H. P. (1998) "Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design", *Anal. Biochem.*, **260**(1), 50-55.
- Sheldon, R. A. (2016) Biocatalysis and biomass conversion in alternative reaction media. *Chemistry*. **22**, 12984–12999.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060–11082.
- Stewart J. D. (2007) Novel compounds synthesized by biotransformations: Future directions in alcohol dehydrogenase-catalyzed reactions. U: Matsuda T. (ur.), *Future directions in biocatalysis*. 1. izd., Amsterdam, Nizozemska: Elsevier, 293-303.
- Straathof, J. J., Panke, S., Schmid, A. (2002) The production of fine chemicals by biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 548–556.
- Šinko, G. (2005) Preparations and biological properties of chiral compounds. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **56**, 351-361.
- Walker, J. R. L. (1992) Spectrophotometric determination of enzyme activity: Alcohol Dehydrogenase (ADH), *Biochemical Education*, **20**, 42-43.
- Welton, T. (1999) Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* **99**, 2071–2084.
- Wohlgemuth, R. (2011) Green production of fine chemical by isolated enzymes. U: Tao, J. A., Kazlauskas, R. J. (ur.), *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*. Hoboken; New York; USA: John Wiley & Sons, Inc., 277-297.
- Xiao, Z. J., Du, P. X., Lou, W. Y., Wu H., Zong, M. H. (2012) Using water-miscible ionic liquids to improve the biocatalytic anti-Prelog asymmetric reduction of prochiral ketones with whole cells of *Acetobacter* sp. CCTCC M209061, *Chem. Eng. Sci.* **84**, 695–705.
- Yamauchi, J., Yoshimura, S., Takagahara, I., Fujii, K., Tai, A., Yamashita, J. i Horio, T. (1981), "Isolation and characterization of two potent inhibitors of various NADH dehydrogenases formed during storage of NADH", *J. Biochem.*, **90**(4), 941-955.

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

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

Guo, X., Tang, J.-W., Yang, J.-T., Ni, G.-W., Zhang, F.-L., Chen, S.-X. (2017) Development of a Practical Enzymatic Process for Preparation of (S)-2-Chloro-1-(3,4-difluorophenyl)ethanol. *Org. Proc. Res. Dev.* **21**, 1595–1601.

Zhang, Z., Xu, B., Luo, J., Von Solms, N., He, H., Zhang, Y., Pinelo, M, Zhang, S. (2018) Ionic Liquids as Bifunctional Consolvents Enhanced CO₂ Conversion by NADH-Dependent Formate Dehydrogenase. *Catalysts* **8**, 304-309.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Anita Pušek
