

Aktivnost litičke polisaharidne monooksigenaze u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Perković, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:690731>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2023.

Ivan Perković

**AKTIVNOST LITIČKE
POLISAHARIDNE
MONOOKSIGENAZE U
NISKOTEMPERATURNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tončija Rezića, te uz pomoć izv. prof. dr. sc. Marine Cvjetko Bubalo, izv. prof. dr. sc. Ane Jurinjak Tušek i Mije Radović, mag. ing.

Rad je napravljen u sklopu projekta "Integrirana proizvodnja nanoceluloze iz lignoceluloznih sirovina" (BIL-HR-AUT-2020-2021-17), financiran od strane Ministarstva znanosti i obrazovanja; voditelj projekta: Tonči Rezić.

Rad je napravljen u sklopu projekta " Furan based chemicals and materials for a sustainable development " (CA18220), financiran od strane Europske unije; voditelj projekta: Tonči Rezić.

Rad je napravljen u sklopu projekta "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (OPB-SLS 9717), financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost; voditelj projekta: Tonči Rezić.

Rad je napravljen u sklopu projekta "Intenzifikacija biokatalitičkih procesa za održivu valorizaciju otpada primjenom eutektičkih otapala u mikroreaktorima" (IPS-2022-02-3938) financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost; voditelj projekta: Marina Cvjetko Bubalo.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojem mentoru, prof. dr. sc. Tončiju Reziću na ugodnoj suradnji i stručnoj pomoći.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo i kolegici Miji Radović na pomoći oko snalaženja u laboratoriju i savjetima pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Također, zahvaljujem Leu Mogušu, Elvisu Djedoviću i ostalim kolegama, prijateljima koji su dijelili sve sretne i manje sretne trenutke sa mnom tijekom cijelog studiranja.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i podržavali me do samoga kraja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

AKTIVNOST LITIČKE POLISAHARIDNE MONOOKSIGENAZE U
NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA
Ivan Perković, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058209634

Sažetak: Ovim radom ispitana je aktivnost enzima litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) te je izrađen jednostavan i robusan matematički model kojime se nastoji predvidjeti korištenje otapala s najprikladnijim fizikalno kemijskim svojstvima njegovih sastavnih komponenata za biokatalitičku reakciju LPMO. Odabrane su lako dostupne, netoksične i relativno jeftine komponente za izradu niskotemperaturnih eutektičkih otapala prema načelima zelene kemije i održivog razvoja. Nakon sinteze otapala, spektrofotometrijski je ispitana aktivnost LPMO prvotno u NaAc puferu pH 6,4 u svrhu usporedbe aktivnosti. Potom je aktivnost enzima ispitana u priređenim otapalima istom spektrofotometrijskom metodom uz pufer kao slijepu probu. Nadalje, DES-ovi su matematički opisani pomoću vrijednosti dobivenih COSMO-RS programskim paketom. Dobivene vrijednosti grupirane su u 10 intervala kako bi se načinio sveukupni sigma profil DES-a. Na osnovi izrađenih intervala programskim paketom Statistica 13.0 izrađeni su modeli višestruke linearne regresije te djelomične linearne regresije.

Ključne riječi: *niskotemperaturna eutektička otapala, aktivnost, LPMO, COSMO-RS*

Rad sadrži: 46 stranica, 11 slika, 12 tablica, 54 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Tonči Rezić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Tonči Rezić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (član)
4. prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković (zamjenski član)

Datum obrane: 26. svibnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology and Brewing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

*ACTIVITY OF LYTIC POLYSACCHARIDE MONOOXYGENASE IN LOW-TEMPERATURE
DEEP EUTECTIC SOLVENTS*

Ivan Perković, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058209634

Abstract: This work investigated the activity of the lytic polysaccharide monoxygenase enzyme (LPMO) in low-temperature deep eutectic solvents (DES) and developed two simple and robust mathematical models to predict the use of solvents with the most suitable physicochemical properties of their components for the LPMO biocatalytic reaction. Easily accessible, non-toxic, and relatively inexpensive components were selected to create the deep eutectic solvents according to the principles of green chemistry and sustainable development. LPMO activity was initially spectrophotometrically tested in NaAc buffer pH 6,4 for comparison. Then, enzyme activity was tested in prepared solvents using the same method with buffer as a blank. Furthermore, DES were mathematically described using the COSMO-RS software package. The obtained values were grouped into 10 intervals to create a sigma profile of the solvents. Based on these intervals, multiple linear regression and piecewise linear regression models were developed using the Statistica 13.0 software package.

Keywords: *low-temperature deep eutectic solvents, activity, LPMO, COSMO-RS*

Thesis contains: 46 pages, 11 figures, 12 tables, 54 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Tonči Rezić, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (president)
2. Tonči Rezić, PhD, Full professor (mentor)
3. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor (member)
4. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full Professor (substitute)

Thesis defended: May 26th, 2023

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	3
2.1 NISKOTEMPERATurna EUTEKTIČKA OTAPALA	3
2.1.1.Definicija i značaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	3
2.1.2 Struktura i svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	4
2.2. ENZIMI U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČNIM OTAPALIMA	6
2.2.1. Učinci niskotemperaturnih eutektičkih otapala na enzime	6
2.2.2. Oksidoreduktaze u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.....	7
2.3. CAZy KLASIFIKACIJA ENZIMA	9
2.3.1. Enzimi s pomoćnom aktivnošću	11
2.4. KARAKTERISTIKE I STRUKTURA LPMO	11
2.5. AKTIVNOST LPMO	13
2.5.1 PEROKSIDAZNA AKTIVNOST LPMO	14
2.6. POPRATNE REAKCIJE I INAKTIVACIJA LPMO	15
2.7. MJERENJE AKTIVNOSTI LPMO	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Enzim	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Otopine i puferi	18
3.1.3. Oprema i uređaji	19
3.2. METODE	19
3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otalapala.....	19
3.2.2. Određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava DES-ova	20
3.2.3. Mjerenje aktivnosti litičke polisaharidne monooksigenaze	21

3.2.4. Računanje molekulskih deskriptora DES-ova primjenom COSMO-RS programskog paketa	22
3.2.5. Izračun konačnog sigma profila otapala kao molekularnog deskriptora	23
3.3. OBRADA PODATAKA	23
3.3.1. Izrada korelacijskog modela između aktivnosti LPMO-a i molekularnih deskriptora	23
3.3.2. Model višestruke linearne regresije	24
3.3.3. Provjera adekvatnosti modela koeficijentom višestruke determinacije (R^2) i analizom varijance pomoću F testa	25
3.3.4. Model djelomične linearne regresije.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala i fizikalno-kemijska karakterizacija	27
4.2. Brzina reakcije i aktivnosti LPMO-a.....	29
4.3. Utjecaj fizikalno-kemijskih karakteristika DES-a na aktivnost LPMO	32
4.3.1. Utjecaj pH DES-a na aktivnost LPMO.....	32
4.3.2. Odnos viskoznosti DES-ova i aktivnost LPMO	33
4.3.3. Odnos gustoće DES-ova i aktivnosti LPMO	34
4.4. Pad apsorbancije cerulolignona u DES-u Ch:U	35
4.5. Izrada sigma profila otapala	36
4.6. Model višestruke linearne regresije (VLR).....	38
4.7. Model djelomične linearne regresije (DLR)	41
5. ZAKLJUČCI.....	44
LITERATURA	45

1.UVOD

Potruga za obnovljivim izvorima energije zahtjeva ogroman trud diljem svijeta kako bi se smanjili negativni učinci na okoliš prouzročeni ljudskom djelatnošću. U ovom kontekstu, zanimljiv izvor obnovljive energije predstavlja energija sadržana u biljnoj biomasi. Međunarodna agencija za energetiku (*engl.* International energy agency, IEA) definira biljnu biomasu kao bilo kakvu tvar biljnog podrijetla koja se može primjeniti direktno kao gorivo ili koncentrirati u goriva te druge oblike energije, prvenstveno električna i toplinska (IEA 2021). Stoga, kako bi se mogao iskoristiti takav izvor energije potrebno je poznavati načine pridobivanja energije pohranjene u tvarima biljnog podrijetla. Poznato je da su biljne stanice pretežito sastavljene od lignoceluloznog materijala (poznat kao lignocelulozni kompleks) kojeg čine celuloza, hemiceluloza i ligning. U procesima pridobivanja energije iz biljne biomase ograničavajući faktor je hidroliza lignoceluloze do glukoze. Međutim, rješenje je moguće potražiti u prirodi, gdje su mikroorganizmi, posebice oni u carstvu gljiva, sposobni razgraditi staničnu stijenkku međusobnom suradnjom više različitih enzima. Ovaj fenomen dovodi do otupštanja glukoze u slobodnom obliku kojeg mikroorganizmi mogu upotrijebiti u obliku energije. Stoga gljive, točnije plijesni, igraju ključnu ulogu u degradaciji biljne biomase, proizvodeći širok raspon enzima koji djeluju na ugljikohidrate (*engl.* Carbohydrate-Active EnZymes, CAZy)

Jedan od enzima koji sudjeluje u razgradnji lignoceluloze je litička polisaharidna monooksigenaza (*engl.* lytic polysaccharide monooxygenase, LPMO) koja pospješuje djelovanje celulolitičkih enzima i time uvelike poboljšava učinkovitost procesa razgradnje. Ovaj metaloenzim s atomom bakra u središtu aktivnog mjesta uključen je u oksidativnu razgradnju polisaharida poput celuloze i hitina (Kont i sur., 2020). Također je važno poznavati uvjete za optimalno djelovanje ovog enzima kao bi se maksimalno iskoristio potencijal lignoceluloznih sirovina. S obzirom da je jedan od ključnih čimbenika svake enzimske reakcije i medij u kojem se provodi, odabir adekvatnog otapala je izuzetno važan. Činjenica da su enzimi stabilni i u nevodnim medijima poznata je više od 50 godina (Panić i sur. 2021). Iz ekološkog ali i tehnološkog aspekta, privlačna su relativno nova otapala koja su na bazi prirodnih i lako dostupnih sirovina, biorazgradiva i netoksična. Jedno od takvih otapala su niskotemperaturna eutektična

otapala (eng. Deep eutectic solvents, DES). Mediji na bazi DES-ova privlačni su u biokatalitičkim istraživanjima zbog lako prilagodljivih fizikalno-kemijskih svojstava. Pri dizajnu otapala s optimalnim karakteristikama od velike su pomoći ranije razvijeni programski paketi koji su u mogućnosti određena fizikalno-kemijska svojstva izraziti preko numeričkih vrijednosti, tkzv. molekularnih deskriptora (Rezić i sur. 2021) (Benguerba i sur. 2019).

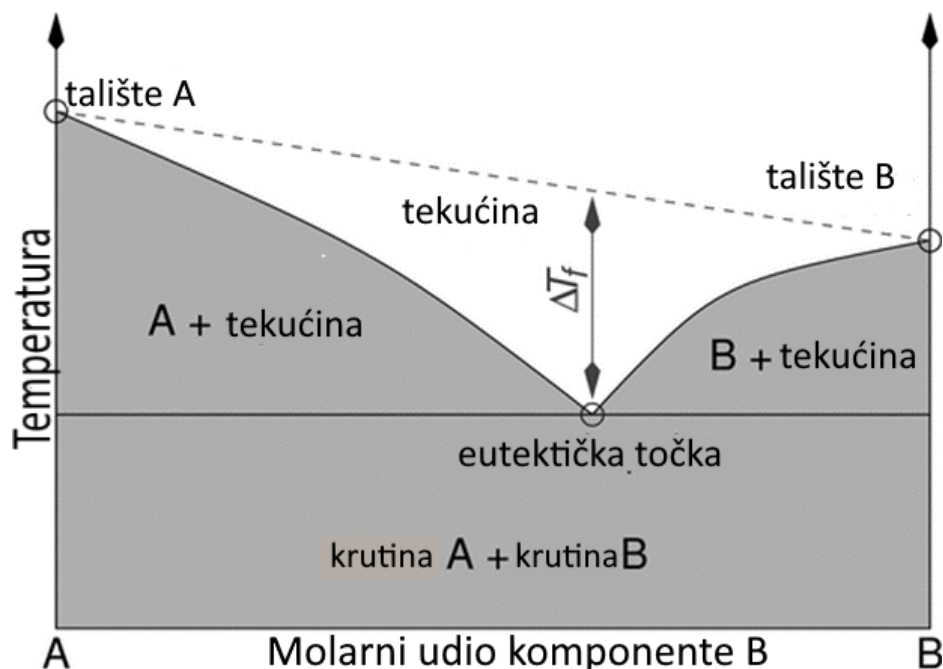
Cilj ovog rada bio je ispitati dosad još neistraženu interakciju DES-ova i LPMO, izmjeriti enzimsku aktivnost te matematički opisati svojstva reakcijskog medija kojeg čine DES i voda. Također su u sklopu rada izrađena dva matematička modela, temeljena na linearnoj regresiji, kojima su svojstva otapala (korištenjem programskog paketa COSMO-RS) dovedena u korelaciju s izmjerenim aktivnostima u svrhu mogućeg predviđanja i odabira optimalnih komponenti DES-a za aktivnost LPMO.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA

2.1.1. Definicija i značaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala.

Otapala nalaze široku primjenu u industrijskim procesima zbog ključne uloge u otapanju krutih komponenti, prijenosu tvari i topline te u koracima izdvajanja i pročišćivanja produkta. Prema procjeni, organska otapala čine 60 % svih industrijskih emisija te 30 % svih emisija hlapljivih organskih spojeva, uzrokujući brojne negativne učinke na okoliš (Anastas. i sur. 2010). Stoga je 1991. godine kemičar P.T. Anastas kroz program nazvan *zelena kemija* ukazao na potrebu za smanjenjem štetnih otapala te pronalaskom novih, ekološki prihvatljivijih i neškodljivih otapala koja se mogu reciklirati (Radović i sur. 2021). Posljedično su se proteklih 20-ak godina razvila ekološki prihvatljivija, prilagodljiva i pametna otapala, među kojima se ističu ionske kapljevine, superkritični i subkritični fluidi te otapala iz prirodnih ili obnovljivih izvora (otapala na bazi glicerola i niskotemperaturna eutektička otapala).



Slika 1. Shematski prikaz eutektičke točke na faznom dijagramu s dvije komponente A i B, ΔT_f predstavlja sniženje tališta (prema Smith i sur. 2014)

Eutektička točka (slika 1) je pojam koji označava najnižu temperaturu taljenja koja se može postići odabirom točno određenog omjera komponenata smjese. Stoga se za pojedinu smjesu može

reći da je eutektička ukoliko je njeno talište niže od onog što ga posjeduju njegove pojedinačne komponente. Pojam niskotemperaturno eutektičko otapalo (engl. *deep eutectic solvent, DES*) odnosi se na eutektičke smjese kod kojih dolazi do značajnog sniženja tališta te su često kapljevine pri sobnoj temperaturi (Radović i sur. 2021)

Sniženje tališta (T_t) javlja se kao posljedica delokalizacije naboja usred stvaranja snažnih međumolekulskih interakcija poput vodikovih, ionskih i van der Waalsovih veza. U svom radu, Abbott i sur. (2003) prvi su puta upotrijebili naziv DES kako bi opisali smjese amida s kvarternim amonijevim solima čije su sniženje tališta pripisali posljedicama formiranja međumolekulskih interakcija između donora vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor, HBD*) i akceptora vodikove veze (engl. *hydrogen bond acceptor, HBA*). Takve smjese priređene su u točno određenom stehiometrijskom omjeru. Primjerice, smjesa kolin-klorida ($T_t = 302\text{ °C}$) i uree ($T_t = 132\text{ °C}$) u molarnom omjeru 1:2, pri povišenoj temperaturi (50 °C) uz konstantno miješanje rezultira niskotemperaturnim eutektičkim otapalom s talištem od 12 °C , što je znatno niže od tališta kojeg posjeduju pojedinačne komponente (Smith i sur., 2014).

Trenutno se niskotemperaturna eutektička otapala predstavljaju kao alternativa ionskim kapljevima zbog svojih posebnih svojstava o kojima će se diskutirati dalje u radu. Nadalje, mogu se prirediti iz prirodnih sirovina vrlo jednostavnim i jeftinim procesom. Također, manje su štetna za okoliš od određenih hlapljivijih organskih otapala. S ovakvim karakteristikama korištenje DES-ova može predstavljati smanjenje troškova u mnogim industrijskim primjenama, stoga su trenutno dostupna niskotemperaturna eutektička otapala veoma privlačna u istraživanju zelenih otapala.

2.1.2 Struktura i svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala.

Niskotemperaturna eutektička otapala mogu se opisati pomoću opće formule Cat^+X^-zY , pri čemu Cat^+ predstavlja amonijev, sulfonijev ili fosfonijev kation, a X^- Lewisovu bazu koja je obično halogenid. Akceptor vodikove veze predstavljaju Cat^+X^- , dok zY predstavlja donora vodikove veze u kojoj z označava broj molekula Y koja stupa u međumolekulsku interakciju s X^- . Ova se otapala mogu razvrstati u četiri različite kategorije (Tablica 1), no većina su tip III (kvarterni sol Cat^+X^- i donor vodikove veze poput amida, kiseline i alkohola) budući da se sastoje od mješavine lako dostupnih i jeftinih spojeva kao što su: kolin-klorid ($ChCl$) i betain (kvarterne amonijeve soli) koji predstavljaju akceptore vodikove veze te šećera (npr. glukoza, fruktoza),

poliola (npr. etilen-glikol, glicerol), amida (npr. urea) i organskih kiselina (npr. mliječna i jabučna kiselina) koji predstavljaju nenabijene donore vodikovih veza (Sheldon i sur., 2017).

Tablica 1. Tipovi niskotemperaturnih eutektičih otapala (prema Radović i sur., 2021)

Kategorija DESa	Opća formula	Metali ili funkcijske grupe
Tip I	$Cat^+X \cdot MCl_x$	M= Zn, Sn, Fe, Al, Ga
Tip II	$Cat^+X \cdot MCl_x \cdot yH_2O$	M = Cr,Co,Cu,Ni,Fe
Tip III	$Cat^+X \cdot RZ$	Z= CONH ₂ , COOH, OH
Tip IV	$MCl_x \cdot RZ$	M = Al, Zn; Z = CONH ₂
Tip V	Nisu ionske	COOH, OH

Jedan od nedostataka postojanja jakih međumolekulskih interakcija je i relativno visoka vrijednost dinamičke viskoznosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala, koja može predstavljati problem u industriji (Pätzold i sur., 2019). U svrhu zaobilazjenja ovog nedostatka, moguće je primijeniti vodu kao dodatnu komponentu čime se smanjuju viskoznost i gustoća otapala. Međutim, previsok udio vode može narušiti supramolekularnu strukturu otapala, što bi rezultiralo vodenom otopinom pojedinih komponenata (Radović i sur., 2021). Ovisnost viskoznosti DES-ova o udjelu vode opisali su u svom radu Lapeña i sur. (2019) uspoređivši termofizikalna svojstva DES-a kolin-klorid:etilen glikol (1:2) i DES-a kolin-klorid:etilen glikol:voda (1:1,98:0:95). Prikazavši rezultate svojih mjerenja pomoću linearne ovisnosti o temperaturi, došli su do zaključaka kako voda u ovom DES-u rezultira smanjenjem gustoće za 0,2 % (navode također drugi rad u kojem je učinak vode izraženiji, primjerice u slučaju kolin-klorida i glicerola) te smanjenje dinamičke viskoznosti od 30 % pri najnižim temperaturama mjerenja.

Tališta najčešće korištenih niskotemperaturnih eutektičkih otapala su ispod 50°C (Paiva i sur., 2014). Dokazano je da se smanjenjem broja hidroksilnih grupa u molekuli koja djeluje kao donor vodikove veze smanjuje vrijednost tališta. Tako primjerice otapalo na bazi akceptora vodikove veze kolin-klorida s etilen-glikolom kao donatorom (alkohol s dvije hidroksilne grupe)

ima niže talište od otapala s istim akceptorom i glicerolom kao donorom (alkohol s tri hidroksilne grupe). Priroda komponenti koje sačinjavaju niskotemperaturno eutektičko otapalo također utječu i na njegovu kiselost i bazičnost. Primjerice, otapalo kolin-klorid:limunska kiselina (1:2) ima pH vrijednost od svega 0,83. S druge strane, otapala koja u svojoj strukturi sadrže amid pokazuju bazična svojstva s pH vrijednostima >8 , poput kolin-klorid:urea (molarni omjer 1:2) kojemu pH vrijednost iznosi 8,51. Utvrđeno je još da se s povećanjem udjela vode pH vrijednosti iz niskih i visokih područja pomiču bliže vrijednostima neutralnog područja (Radović i sur., 2021).

2.2. ENZIMI U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČNIM OTAPALIMA

Jedna od mogućih primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala je u biokatalitičkim procesima. Zbog širokog opsega strukturnih kombinacija koje posjeduju niskotemperaturna otapala moguće je dizajnirati optimalan sustav za specifičnu enzimsku reakciju. Time se može pospješiti enzimsku aktivnost i stabilnost, povećati prinos, modificirati afinitet prema stereoizomerima te učiniti proces ekološki prihvatljivijim (Sattlewal i sur., 2018). U biokatalitičkim reakcijama niskotemperaturno eutektičko otapalo može služiti kao otapalo ili pomoćno otapalo, ekstrakcijsko sredstvo u izdvajanju enzimskih produkata te u predtretmanu enzimske biomase (Guajardo i sur., 2016). Prilikom dizajniranja efikasnog biokatalitičkog procesa potrebno je uključiti iduće korake : (i) priprava i karakterizacija niskotemperaturnog eutektičkog otapala, (ii) traženje optimalnog DES-a za optimalan enzimski učinak, (iii) selekcija i optimizacija biokatalitičkog protokola za određivanje aktivnosti te (iv) izdvajanje produkta i recikliranje DES-a uzimajući uvećanje mjerila (engl. *scale up*) u obzir. Trenutno najistraženiji enzimi u DES-ovima su lipaze s obzirom na njihovu učestalost u industrijskoj primjeni, dok postoji i nekolicina radova o drugim hidrolitičkim enzimima poput fosfolipaza, proteaza i oksidoreduktaza (Panić i sur., 2021).

2.2.1. Učinci niskotemperaturnih eutektičkih otapala na enzime

Kroz poznavanje mehanizama interakcije DES-a i enzima moguće je utjecati na njegova ranije spomenuta svojstva poput aktivnosti i stabilnosti (Durand i sur., 2012), enantioselektivnosti (Dominguez De Maria i Maugeri, 2014) kao i na interakciju DES-a s ostalim sudionicima reakcije (supstrat, kosupstrat i produkt) (Cyjetko Bubalo i sur., 2015). Gorke i sur. (2010), analizirajući

reakcije transesterifikacije katalizirane lipazama, prvi su uočili kako komponente DES-a pokazuju 20 do 4600 puta manju reaktivnost od očekivane na temelju njihove koncentracije. Također, sparivanjem aniona (poput klorida u kolin-kloridu) smanjuje se reaktivnost denaturirajućih agenasa poput uree (Huang i sur., 2014). Što se tiče interakcija supstrata i DES-a, Cvjetko Bubalo i sur. (2015), prilikom ispitivanja lipazom katalizirane sinteze butil acetata, zaključili su kako postoje interakcije supstrata (butan-1-ol) i DESa kojima supstrat formira vodikove veze s otapalom te biva zarobljen u njegovoj strukturi i kao takav nedostupan enzimu.

Povećanje enzimске aktivnosti u niskotemperaturnim eutektnim otapalima povezano je s njihovom uključenošću u reakcijski mehanizam. U svom radu Cvjetko-Bubalo i sur. (2015) pokazali su kako je efikasnost esterifikacije *n*-butanola u butil acetat veća u otapalu kolin-klorid: etilen glikol s 5 % masenim udjelom vode nego u organskom otapalu *n*-heptanonu. Kao uzrok tome predložili su povećanu nukleofilnost serinskog ostatka u aktivnom mjestu enzima uslijed interakcija s DES-om, kao i činjenicu da DES uzrokuje stabilizaciju intermedijera pomoću vodikovih veza, čime se smanjuje potrebna energija aktivacije. Studije molekuskog uklapanja supstrata i enzima na lakazi pokazuju kako jače interakcije DES-a i enzima putem vodikovih veza pospješuju aktivnost same lakaze (Toledo i sur. 2019). Nekoliko publikacija navodi kako su DES-ovi dobri stabilizatori enzima. Cao i sur. (2017) ispitali su operativnu stabilnost imobilizirane lipaze izolirane iz *Aspergillus niger* u sustavu otapala kolin-klorid:glicerol (molarni omjer 1:2) i DMSO (1/3 v/v). Zabilježili su očuvanje više od 90 % aktivnosti nakon 5 ponovnih upotreba te više od 56,7 % nakon 10 ciklusa reakcija. Wu i sur. (2014) su uočili kako unatoč destabilizacijskom učinku uree i kolin-acetata, peroksidaza iz konjske jetre zadržava većinu svoje aktivnosti u DES-u kolin-klorid:urea čime se potvrđuje kako DES utječe na enzim kao kompleks a ne pojedinačnim komponentama. Koristeći metodu cirkularni dikroizam Zhou i sur. (2017) zabilježili su bolje očuvanje sekundarnih proteinskih struktura u DES-u kolin-klorid:sorbitol u usporedbi s fosfatnim puferom nakon 24h inkubacije. Isto očuvanje sekundarnih struktura u DES-u zabilježili su i kod lipaze G u slučajevima s ili bez kosupstrata H₂O₂. Ovaj učinak pripisali su mogućem očuvanju molekula vode u mikrookolišu enzima ključnih za aktivnost te stabilizaciju enzima (Zhou i sur. 2017).

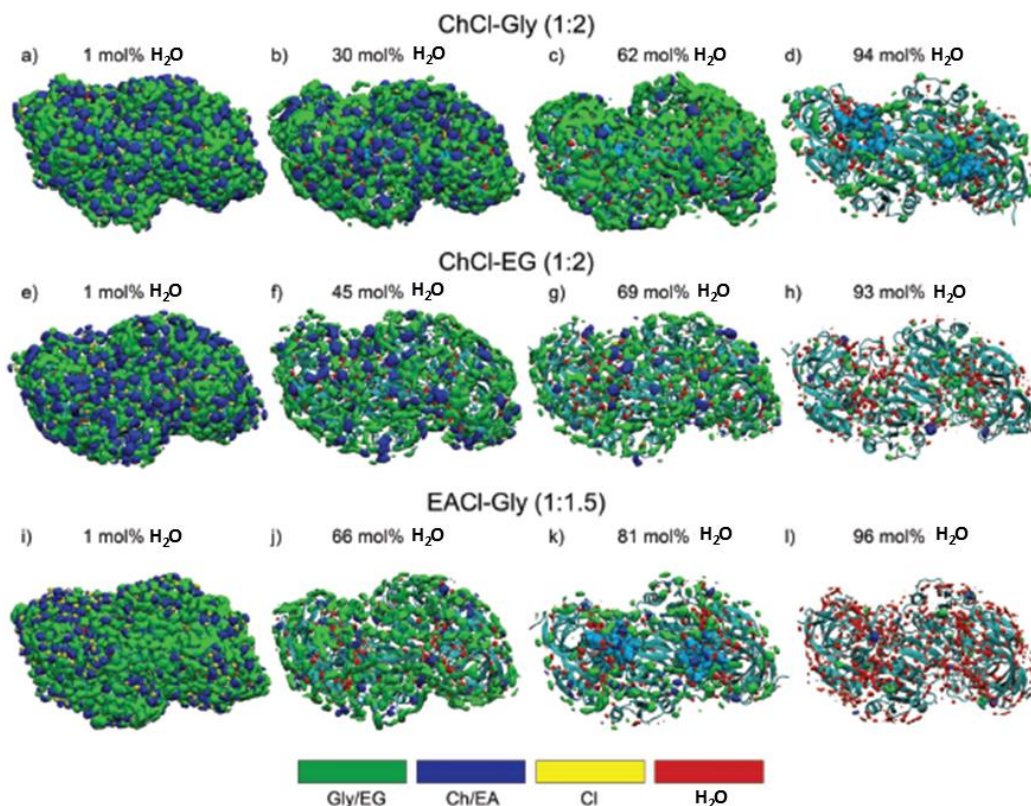
2.2.2. Oksidoreduktaze u niskotemperaturnim eutektnim otapalima

Utjecaj DES-ova na oksidoreduktaze trenutno nije sustavno istražen. Ma i sur. (2018) predložili su DES na bazi kolin-klorida, s ureom i poliolima kao donorima vodikove veze, kao

alternativna otapala u reakcijama oksifunkcionalizacije katalizirane oksidazom izolirane iz *A. nicotinae* i rekombinatne peroksidaze iz *A. aegerita*. U slučaju peroksidaze, za gotovo sve ispitane reakcije u DES-ovima, najmanje jedna otopina razrijeđena vodenim puferom rezultirala je većim koncentracijama produkta nego u čistom puferu. S druge strane aktivnost oksidaze bila je općenito manja u usporedbi s onom u puferu. Nadalje, svi DES-ovi su imali vrlo izražen stabilizirajući učinak na peroksidazu (znatno veći od pufera). Sun i sur. (2020) istražili su katalitičku aktivnost i termalnu stabilnost NAD ovisne citokrom P450 monooksigenaze u puferima na bazi kolin-klorida i poliola (kao što su glicin i etilen-glikol). Rezultati koje su dobili ukazuju na veću aktivnost i termalnu stabilnost u DES-ovima nego u puferima, posebice u kolin-klorid:etilen-glikol otapalu u kojem je uočeno dvostruko povećanje aktivnosti nakon peterodnevne inkubacije u DES-u (u usporedbi s puferom).

Interakcije između komponenata DES-ova, molekula vode i enzima moguće je ispitati računalnim simulacijama, metodama molekularne dinamike (Monhemi i sur., 2014). Tako su u svom radu Bittner i sur. (2022) izvjestili o utjecaju DES-ova i njihovih individualnih komponenti na katalizu alkohol dehidrogenaze izolirane iz jetre konja. Ispitan je način formiranja hidracijskog sloja oko enzima te ovisnost o koncentraciji vode (slika 2). Rezultati pokazuju znatno odstupanje aktivnosti vode u smjesi s DES-om u usporedbi s idealnom smjesom, što potvrđuju i prijašnja istraživanja. Ovo negativno odstupanje upućuje na jake privlačne sile između komponenata DES-a i vode, što uzrokuje slabiju hidrataciju enzima. Voda se stoga ne nalazi toliko pri samoj površini enzima već je preferirana solvatacija u glavnini otopine. Drugim riječima, polarne komponente DES-a otklanjaju vodu s enzima natječući se pritom za polarne interakcije s površinom enzima. Kolin-klorid pokazuje veći afinitet (a_w 0,55) prema vodi nego što to čini glicerol (a_w 0,66). Iz toga se može zaključiti kako određena komponenta DES-a otklanja molekule vode više od druge (u ovom slučaju to čini kolin-klorid). Prema tome, ovisno o prirodi reakcije i potrebnom aktivitetu vode moguće je mijenjati molarni omjer komponenata DES-a kako bi se pogodovalo reakciji. Naime, iako molekule DES-a mogu oponašati interakcije vode i enzima te zamijeniti molekule vode na njegovoj površini, u slučaju alkohol dehidrogenaze konjske jetre (eng. *horse liver alcohol-dehydrogenase*, HLADH) voda je esencijalna glede strukture i aktivnosti. Također je zapaženo različita prisutnost HBA i HBD u solvacijskom sloju oko enzima. Broj molekula HBA gotovo linearno opada s većim molarnim udjelom vode, dok broj molekula glicerola i etilen glikola ostaje približno konstantan pri nižim koncentracijama vode. Time je moguće objasniti pozitivan

utjecaj glicerola na aktivnost HLADH gdje predominantno molekule glicerola i vode čine solvatacijski sloj oko enzima pri udjelu vode $x_w=0,72 \text{ mol}^{-1}$. Tu činjenicu potkrijepljuje i veća aktivnost HLADH u pokusima gdje je korišten DES s većim udjelima glicerola (primjerice 1:9 umjesto 1:2). Ovime je također demonstriran mogućnost industrijske primjene dizajniranog DES-a (kolin-klorid:glicerol, 1:9) u enzimskoj redukciji cinamaldehida u cinamil alkohol.



Slika 2. Vizualizirane funkcije prostorne distribucije vode i (a-d) ChCl-Gly (1:2), (e-h) ChCl-EG (1:2) i (i-l) EACl-Hly (1:1.5) oko HLADH, dobivene metodama molekularne dinamike. Mjesta na kojima je protein vidljiv predstavljaju mjesta u kojima se ne nalazi specifična komponenta otopine nego se izmjenjuju s vremenom. Plavom bojom označeni su HBA, zelenom HBD, žutom kloridni ioni te crvenom voda (prema Bittner i sur. 2022)

2.3. CAZy KLASIFIKACIJA ENZIMA

Baza podataka enzima s aktivnošću na kompleksne ugljikohidrate i glukokonjugate (engl. *The Carbohydrate-Active Enzyme database; CAZy*) sadrži podatke o klasifikaciji i pripadajućim informacijama o enzimima uključenim u sintezu, modifikaciju te razgradnju kompleksnih

ugljikohidrata (engl. *Carbohydrate-Active EnZymes, CAZymes*) poput disaharida, oligosaharida, polisaharida i glukokonjugata. Klasifikacija se zasniva na sličnosti slijeda aminokiselinskih sekvenci u enzimu, za razliku od sistematizacije Međunarodne unije biokemije i molekularne biologije (IUBMB) koja koristi mehanizam djelovanja enzima. Baza podataka se kontinuirano nadopunjava otkirivanjem novih enzimskih sekvenci, 3D struktura i mehanizama njihovih djelovanja. Baza podataka trenutno broji više od 400 različitih kategorija podijeljenih u šest klasa : glikozil hidrolaze (GH) , esteraze ugljikohidrata (engl. *carbohydrate esterases, CE*), polisaharidne liaze, glikozil transferaze (GT), nekatalitički moduli za vezanje ugljikohidrata te enzime s pomoćnom aktivnošću (engl. *auxiliary activities, AA*). S obzirom na višestruke uloge ugljikohidrata u prirodi ovi enzimi igraju važnu ulogu u zdravstvu, prehrani i biotehnologiji. CAZymes koji djeluju na glikozidne veze, tj. razgrađuju stijenu biljnih stanica imaju važnu ulogu u napretku biotehnologije i proizvodnje biogoriva (Walton i Davies, 2018).

Najbrojnija klasa enzima su glikozil hidrolaze koje trenutno sadrže 173 potklase prema podacima koje sadrži CAZy (CAZy, <http://www.cazy.org>). Ovi enzimi kataliziraju hidrolizu glikozidne veze između dva ugljikohidrata ili ugljikohidrata i drugih molekula (Rezić i sur., 2021). Ovisno o vrsti supstrata i njegovim fizikalno-kemijskim karakteristikama (topljivost, stupnju polimerizacije, strukturi molekule ugljikohidrata) enzimi u pojedinim potkategorijama ove klase pokazuju različitu aktivnost. U većini slučajeva hidroliza glikozidne veze katalizirana je dvama aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu enzima: jedan kiselinski ostatak kao proton donor i drugi kao nukleofil/baza. Razlikuju se GH koje djeluju na krajeve lanca polimernih molekula ugljikohidrata od onih koje djeluju na središnji dio molekule polimernih ugljikohidrata. Glikozil transferaze uključene su u biosintezu disaharida, oligosaharida i polisaharida. Kataliziraju formiranje glikozidne veze između fosforiliranih ugljikohidrata, ugljikohidrata, lipida, proteina, nukleinskih kiselina i malih molekula, pri čemu dolazi do oslobađanja fosfatne grupe. Posljedica reakcije je formiranje glikozidne veze. Polisaharidne liaze kataliziraju nehidrolitičko cijepanje glikozidne veze u polisaharidnim lancima koji sadrže uroničnu kiselinu pomoću β -eliminacijskog mehanizma. Time nastaje nezasićeni heksenuronični kiselinski ostatak i novi reducirajući kraj na polisaharidnom ostatku (CAZy, <http://www.cazy.org/Polysaccharide-Lyases.html>). CE kataliziraju O ili N acilaciju esterske veze supstituiranih šećera hidrolitičkim mehanizmom. Nekatalitički moduli za vezanje ugljikohidrata je naziv kategorije koja sadrži enzime s domenom za vezanje ugljikohidrata (engl. *carbohydrate-binding modules, CBM*). Nakon što aminokiselinska

sekvenca "prepozna" supstrat , omogućuje specifičnu prostornu interakciju enzima i supstrata nakon koje može doći do reakcije (Rezić i sur., 2021).

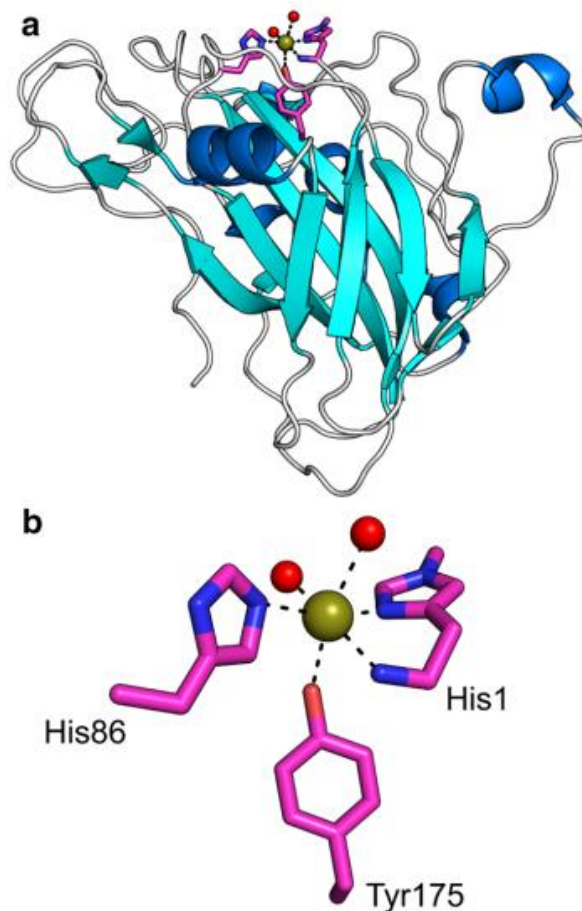
2.3.1. Enzimi s pomoćnom aktivnošću

Posljednja kategorija dodana u CAZy bazu podataka su enzimi s pomoćnom aktivnošću (AA). Ovi enzimi iskazuju sinergijski učinak s ostalim enzimima CAZy baze poput glikozid hidrolaza, polisaharid liaza te esteraza ugljikohidrata. Svrstani su u bazu podataka prema podudaranju proteinskih sekvenci s jednom ili više biokemijski okarakteriziranih enzima „osnivača“ kategorije (Rezić i sur., 2021). Enzimi AA kategorije nisu striktno ograničeni na jedan mehanizam katalitičke reakcije ili na specifični supstrat. Širok spektar ove kategorije čine stoga celobioza dehidrogenaze, oksidaze, lakaze i drugi enzimi koji provode oksidoredukcijske reakcije. redukcije (Andlar i sur., 2018). Nastanak ove kategorije povezan je s činjenicom i otkrićem da su GH61 i CBM33 zapravo polisahardine litičke monooksigenaze (engl. *lytic polysaccharide monooxygenases*, *LPMO*). S obzirom da se ligning gotovo uvijek nalazi s polisahardima u staničnoj stijenci, nova kategorija uključuje LPMO i oksidoreduktivne enzime uključene u razgradnju lignina. Kategorija AA sadrži 8 potkategorija LPMO te 9 potkategorija ligninolitičkih enzima (Radić 2022).

2.4. KARAKTERISTIKE I STRUKTURA LPMO

Strukturu LPMO karakteriziraju dva histidinska ostatka koji koodiniraju bakrov atom u planarnu konfiguraciju nazvanom Cu-histidinski prsten. Bivalentni bakrov atom izložen je reakcijskoj okolini u aktivnom mjestu koje se nalazi u sredini jedne od višepriputnih ravnih površina enzima (slika 3). Do sad je poznato da je taj motiv Cu-histidinskog prstena zajednički većini grupa LPMO opisanih u bazi CAZy (AA9 , AA10 , AA11 , AA13 , AA14, AA15). Osim Cu-histidinskog prstena, svim grupama LPMO zajednička je i β -sendvič struktura karakteristična za imunoglobuline. Ovu strukturu čini 8-10 antiparalelnih β -nabranih ploča, koje su povezane petljama s različitim brojem α -heliksa. Upravno te petlje i α -heliksi pridonose strukturnoj raznolikosti ove kategorije enzima. Prsten aktivnog mjesta sačinjen je od N-terminalnog histidina

te histidina iz unutrašnjosti koji zajedno s atomom bakra čine ravninu. Sam atom bakra kompleksiran je s dva atoma dušika (jedan iz imidazolnog prstena, drugi iz N-terminalnog dušika) jednog histidina i trećim atomom dušika imidazolnog prstena drugog histidina. Fungalni LPMO često je metiliran u N-terminalnom histidinu. Pretpostavlja se da je razlog toj metilaciji, njena uloga u zaštiti enzima od autooksidativne inaktivacije. Na ravninu prstena aksijalno je pozicioniran tirozin koji također djeluje kao koordinacijski ligand atoma bakra u aktivnom mjestu. Umjesto tirozina u nekim slučajevima prisutan je fenilalanin (kod određenih enzima grupe AA10 i AA15).



Slika 3. Trodimenzionalna struktura LPMO i njegovog aktivnog mjesta. a)struktura enzima b) izdvojeno aktivno mjesto (prema Eijsink i sur.,2019)

Najveće varijacije u strukturi LPMO su u regijama koje petlje o kojima ovisi i regiselektivnost LPMO. AA10 grupu karakteriziraju varijacije u L2 regiji koju čine petlje između prve i treće β -nabrane ploče sendvič strukture. Ona se sastoji još i od različitog broja uzvojnica te

na površini sadrži jednu ili dvije aromatske aminokiseline. Ova regija ključna je u prepoznavanju supstrata i čini velik dio cjelokupne regije za prepoznavanje supstrata. L3 regiju posjeduju neki enzimi AA9 grupe koju čini petlja između treće i četvrte β -nabrane ploče (Radić 2022; Vaaje-Kolstad i sur., 2017).

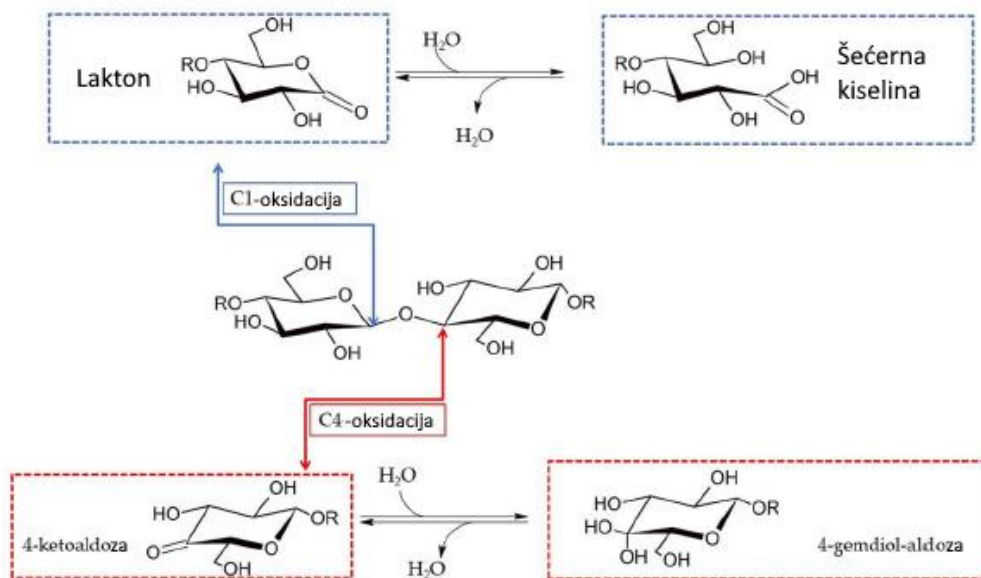
2.5. AKTIVNOST LPMO

Svi trenutno funkcijski okarakterizirani LPMO djeluju isključivo na polisaharide povezane β -1,4 (AA9, AA10 i AA11) ili α -1,4 (AA13) glikozidnim vezama (Wang i sur., 2021). Sama regiospecifičnost nije svojstvena određenoj grupi i može ovisiti o supstratu (Bissaro i sur., 2017; Chen i sur., 2018). LPMO mogu djelovati na netopljive supstrate poput kristalične celuloze, hitina i škroba te na djelomično ili potpuno topljive poput hemiceluloze, heteroksilana, ksilana i beta-glukana. Oksidacijska svojstva ovih enzima proizlaze iz postojanja ranije spomenutog histidinskog prstena u njihovoj strukturi. Stoga je glavni učinak LPMOa oksidacija C1 ili C4 ugljika glikozidne veze polisaharidnih supstrata (Vu i sur., 2014a; Isaksen i sur., 2014), čime se postiže destabilizacija i kidanje veze. Posljedično, krajevi lanca potom bivaju izloženi daljnjem djelovanju GH enzimima, rezultirajući u konačnici boljim procesom saharifikacije.

Kako bi se provela ova reakcija oksidacije, potreban je vanjski donor elektrona uz postojanje kisika ili vodikovog peroksida kao kosupstrata (Bissaro i sur., 2017; Meier i sur., 2018; Müller i sur., 2018). Kao donori elektrona mogu poslužiti različiti fenolni spojevi nastali razgradnjom lignoceluloznih sirovina, dodani reducensi poput askorbinske kiseline ili enzimi koji iskazuju sinergističko djelovanje s LPMO poput celobioza dehidrogenaze, ali i formaldehid oksidoreduktaza, polifenol oksidaza i lakaza (Wang i sur., 2021). U svojem radu (Wang i sur., 2019) opisali su molekularne mehanizme aktivacije kisika i formiranja vodikovog peroksida u LPMO. Prema njima, u prvom koraku reakcije donor elektrona (askorbat) reducirati će bivalentni atom bakra Cu(II) u Cu(I) kojemu slijedi rapidno vezanje O_2 te generiranje oblika LPMO-Cu(II)- O_2^- . Nakon toga, LPMO-Cu(II)- O_2^- odstranjuje vodikov atom s askorbata generirajući LPMO-Cu(II)-OOH. Prema njihovim izračunima, ovakav će oblik u idućem koraku odstraniti vodik s drugog askorbata, pritom generirajući H_2O_2 i Cu(I). Nakon što je oformiran međuprodukt Cu(I)- H_2O_2 , on će se pretoviriti u radikal LPMO-Cu(II)- O^\bullet ili otpustiti H_2O_2 . Ravnoteža ovih dvaju puteva ovisi o afinitetu LPMO prema supstratu. Naime, pravilno vezani supstrat će spriječiti moguću difuziju peroksida u ostatak otopine, zadržati ga u mikrookolišu aktivnog mjesta i time potaknuti aktivaciju Cu(I) atoma. Jednom kada je enzim u ovom aktivnom stanju, dolazi do

izdvajanja atoma vodika s C1 ili C4 pozicije supstrata. U idućem koraku će se drugim elektronom iz donora omogućiti kidanje kisik-kisik veze radikala, otpuštajući vodu i generirajući bakar-kisik radikale koji će se povezati s supstratnim radikalom čime se u konačnici hidroksilira polisaharid na C4 poziciji. Dodatni kisikov atom tako destabilizira glikozidnu vezu i dovodi do eliminacije susjednog glukana i formiranja laktone ili ketoaldoze (slika 4).

Razlog zbog postojanja LPMO s različitim regioselektivnostima još nije potpuno razjašnjen. Uočeno je kako jedan organizam poput gljive *Neurospora crassa* može eksprimirati LPMO koje oksidiraju celulozu na poziciji C1, na poziciji C4 ili na poziciji oba ugljikova atoma. Shodno tome LPMO su podijeljeni u tri tipa : LPMO-1 tip enzima koji oksidira C1 atom ugljika što dovodi do formiranja laktone koji spontano hidroliziraju u aldonske kiseline, LPMO-2 tip koji djeluje na C4 atom ugljikovih spojeva prilikom čega nastaju ketoaldoze koje u vodenim otopinama hidroliziraju u gem-diole. LPMO-3 tip je slabije specifičan pa djeluje i na C1 i na C4 atome ugljikovih spojeva (Radić 2022, Dimarogona i sur., 2012).



Slika 4. Produkti C1- i C4 oksidacije celuloznih supstrata (prema Vaaje-Kolstad i sur., 2017)

2.5.1 PEROKSIDAZNA AKTIVNOST LPMO

Iako su LPMO strukturno i funkcijski dobro okarakterizirani, kinetičkih spoznaja je relativno malo. Nedostatak podataka o enzimskoj kinetici LPMO posljedica je eksperimentalnih poteškoća

u kvantitativnoj karakterizaciji aktivnosti ovog enzima (Eijsink i sur., 2019). Nedavna spoznaja da LPMO koristi H_2O_2 uz (ili čak umjesto) O_2 pridonosi složenosti istraživanju reakcijskog mehanizma (Meier i sur., 2018).

Neovisno o mehanizmu, enzimu je potreban vanjski donor elektrona za katalizu. U slučaju kada je u reakciji kosupstrat H_2O_2 , reducens se koristi samo u primarnoj redukciji divalentnog atoma bakra Cu(II) u katalitički aktivan oblik Cu(I) . S druge strane, kada O_2 sudjeluje u reakciji dolazi do stehiometrijske redukcije u kojoj se prenose dva elektrona po glikozidnoj vezi koju enzim cijepa. Autooksidacija reducensa od strane O_2 dodatno komplicira kinetička ispitivanja jer često dovodi to stvaranja H_2O_2 . Nadalje, LPMO koji nisu vezani za supstrat pokazuju uz peroksidaznu i oksidaznu aktivnost pri kojoj dolazi formiranja H_2O_2 . (Hangasky et al., 2018). Koristeći katalitičku efikasnost (k_{cat}/K_M) kao pokazatelj efikasnosti konverzije supstrata u produkt, Kuusk i sur. (2018) zabilježili su oksidaciju netopivog hitina u iznosu od $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ uz H_2O_2 kao kosupstrat (LPMO *SmAA10A*). Shodno tome, Hangasky i sur. zabilježili su vrijednost oksidacije topljive celoheksanoze u iznosu od $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ uz O_2 kao supstrat (LPMO *MtPMO9E*). Trenutni podaci tako pokazuju kako je peroksidazna reakcija znatno brža.

Činjenica da određene peroksidaze, poput one u hrenu (engl. *horse radish peroxidase*, *HRP*), inhibiraju reakciju LPMO pod standardnim reakcijskim uvjetima (dovoljno O_2 i reducensa) sugerira kako je O_2 samo prekursorsna molekula katalitički relevantnom kosupstratu H_2O_2 (Bissaro i sur., 2017)

2.6. POPRATNE REAKCIJE I INAKTIVACIJA LPMO

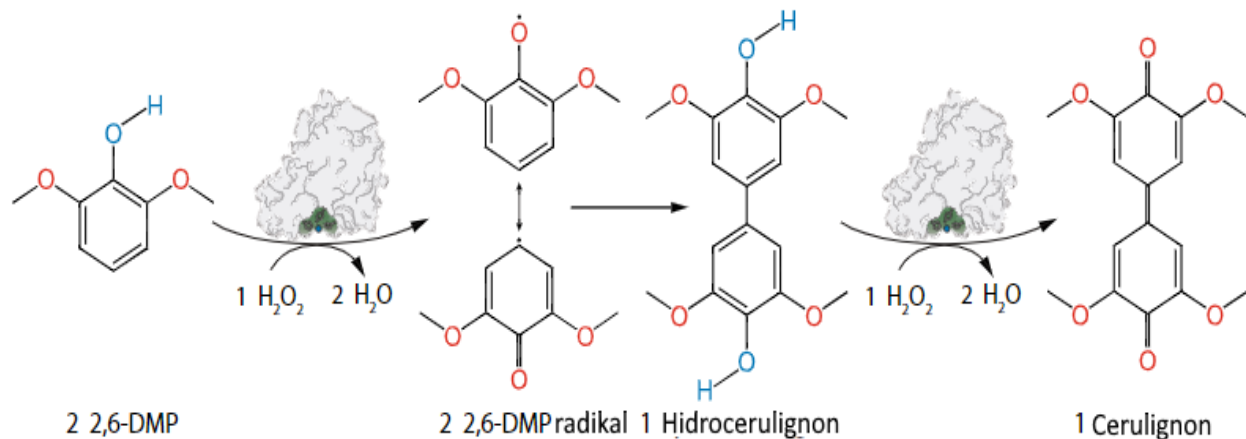
Stabilnost enzima iznimno je bitan parametar u industrijskom kontekstu primjene LPMO. U literaturi je tako poznata korelacija između slabog vezanja enzima za supstrat i njegove brze inaktivacije. (Loose i sur., 2018). Ova aktivacija zapravo je oksidativna samo-inaktivacija LPMO enzima koja se događa u aktivnom mjestu, osobito na histidinskim ostacima koji koordiniraju bakrov atom. Stoga je očit razlog manjoj inaktivaciji vezanog enzima činjenica da se nastali vodikov peroksid i kisikovi radikali troše na cijepanje veza u supstratu. U svom radu Kuusk i sur. (2018) pokazali su kako je brzina oksidativne inaktivacije *SmAA10A*, uzrokovane vodikovim peroksidom prilikom izostanka supstrata, 1000 puta sporija od brzine poželjne reakcije cijepanja glikozidne veze u prisutnosti supstrata. Drugim riječima, kada je LPMO u prisutnosti supstrata i peroksida snažno je inhibirana oksidativna samoinaktivacija u korist cijepanja glikozidne veze.

Općenito, važno je imati oksidacijsko stanje enzima pod kontrolom prilikom rukovanja njime (ekstrakciji, pročišćavanju, skladištenju i postavljanju reakcije) jer će slučajna redukcija bakra u aktivnom mjestu u prisutnosti kosupstrata i odustnosti prikladnog supstrata dovesti do samoinaktivacije enzima. Takvi problemi mogu se spriječiti korištenjem kelirajućih agensa poput EDTA kako bi se odstranio bakar iz aktivnog mjesta kada se enzim ne koristi, rad u anaerobnim uvjetima ili izbjegavati reducense.

2.7. MJERENJE AKTIVNOSTI LPMO

Najčešće korištene metode identifikacije i kvantifikacije produkata reakcija LPMO oslanjaju se na kromatografske metode i masenu spektrometriju, koje se razlikuju s obzirom na tip enzima i vrstu supstrata. Ionsko izmjenjivačka kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance anion exchange chromatography, HPAEC*) u mogućnosti je razdvojiti oksidirane oligosaharide nastale reakcijom LPMO i celuloznih supstrata. Analiza odvojenih oligosaharida moguća je pomoću različitih metoda poput pulsirajuće amperometrijske detekcije (engl. *pulsed amperometric detection, PAD*), electrosprej-ionizacijske masene spektrometrije (engl. *electrospray-ionization mass spectrometry, ESI-MS*) te detektor nabijenog aerosola (engl. *charged aerosol detector, CAD*).

Kombinacija HPAEC i PAD često je korištena metoda analize produkata nastalih nakon inkubacije LPMO i celuloze tretirane fosfornom kiselinom (engl. *phosphoric acid swollen cellulose, PASC*) uz askorbinsku kiselinu kao donor elektrona. Pogodna je za analizu nastalih produkata nakon cijepanja glikozdine veze oksidacijom na poziciji C1. Kako bi se eluirali analiti potrebno je povisi pH vrijednost u lužnato područje. Problem kod analize produkata nastalih oksidacijom na C4 poziciji predstavlja njihova tendencija tautomerizaciji i raspadanju prilikom povišenog pH. Još jedan nedostatak ove metode je i dugo trajanje analize (inkubacija može trajati i do 24h, a jedan prolaz kroz kolonu 30 minuta), stoga nije pogodno za mjerenje aktivnosti prilikom bioprocesa.



Slika 5. Oksidacija 2,6-DMP. Stehiometrija peroksidazne reakcije je 1:1 (prema Breslmayr i sur., 2018)

Iskoristivši relativno nedavnu spoznaju o ulozi H_2O_2 u reakcijama LPMO, Breslmayr i sur. (2018) razvili su brzu spektrofotometrijsku metodu za analizu aktivnosti (slika 5). Ovaj test temelji se na oksidaciji 2,6-dimetoksifenola (2,6-DMP) peroksidaznom aktivnošću LPMO kojom nastaju 2,6-DMP fenoksi radikali. Dva takva radikala dimerizacijom čine hidrocerulignon kojeg LPMO može pretvoriti u cerulignon, obojani produkt koji absorbira svjetlost valne duljine 469nm s molarnim absorpcijskim koeficijentom $53,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Jedan nedostatak metode je reakcija radikala i krajnjeg produkta, reakciju nije moguće spriječiti, no može se potisnuti manjom koncentracijom enzima. Metoda je optimizirana i opisana u radu iz 2019. godine u kojem se kao supstrat koristi difenol hidrocerulignon umjesto monofenola 2,6-DMP-a. Tako je moguće koristiti manje koncentracije supstrata i kosupstrata uz zadržavanje osjetljivosti. Zbog niže K_m vrijednosti prema hidrocerulignonu aktivnost je znatno izraženija te je moguće test prilagoditi uvjetima veće osjetljivosti, različitim puferima i rasponima pH vrijednosti. Četiri faktora kojima ju je moguće prilagoditi karakteriziraju ovu metodu: (1) sposobnost formiranja kompleksa između pufera i aktivnog mjesta može utjecati na aktivnost LPMO-a (2) povećanjem ionske jakosti pufera opada aktivnost LPMO-a (3) viša pH vrijednost eksponencijalno povećava peroksidaznu aktivnost LPMO, (4) povećavanje koncentracije supstrata i kosupstrata dovodi do povećane aktivnosti LPMO-a, no treba uzeti u obzir autooksidaciju hidrocerulignona te deaktivaciju LPMO vodikovim peroksidom. Granične koncentracije iznose $500 \mu\text{M}$ za HC te $100 \mu\text{M}$ za H_2O_2 (Breslmayr i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Enzim

Enzim korišten u mjerenjima je polisaharidna litička monooksigenaza izolirana iz gljive *Neurospora crassa* (NcLPMO)

3.1.2. Kemikalije

- Betain, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Etanol (96% v/v), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilen glikol, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Glicerol, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Natrijev acetat, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Saharoza, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Glukoza, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Urea, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Vodikov peroksid w(H₂O₂ = 30%) Gram Mol, Zagreb, Hrvatska
- 2,6-dimetoksifenol (DMP) TU Graz, Graz, Austrija

Sve kemikalije upotrebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće. Za pripravu eutektičkih otopala I otopina koristila se destilirana voda PBF-a.

3.1.3. Otopine i puferi

- Natrijev acetatni pufer (NaAc) (100 mM, pH = 6)
Octena kselina, w(C₂H₄O₂) = 99,5 % (do pH 6)
Natrijev acetat (1,6496 g)
Ultračista voda (200 mL)
- Testna otopina za mjerenje aktivnosti
5 mM otopina H₂O₂ (20 μL)
100 mM otopina DMP (20 μL)
100 mM NaAc pufer (400 μL/500 μL nulti uzorak)

3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator-IKA vortex, Genius 3, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Laboratorijska tresilica, Fisher Bioblock Scientific, tip KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, eppendorf epruvete, falkon epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete, špatule, stalak za epruvete, piknometar)
- Magnetska mješalica s grijanjem, Technica, Železnik, Slovenija
- Mikropipete (10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L)
- Multimetar pH/ion metar, S220, Mettler Toledo, Columbus, SAD
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYS™ 105, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD
- Viskozimetar ViscoQC 300-L, Anton Paar

3.2. METODE

3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otalapala

DES-ovi su pripremljeni kombinacijom točno definiranih molarnih omjera akceptora vodikove veze (eng. hydrogen bond acceptor, HBA) i donora vodikove veze (eng. hydrogen bond donor, HBD) uz dodatak deionizirane vode. U tu svrhu izvagane su izračunate mase pojedinih komponenti pomoću analitičke vage koje su potom prenesene u epruvete tipa falcon kako bi se pripremili DES-ovi. Pipetom je u smjesu dodana izračunata količina vode kako bi masena koncentracija vode u otapalu iznosila 10, 30 ili 50 % . Priprema DES-ova odvijala se u laboratorijskoj termotresilicu čija je temperatura postavljena na 60 °C a broj okretaja u minuti na 170. DES-ovi su preko noći pripremljeni, odokativno im je provjerena homogenost i konzistencija te ukoliko je sinteza bila uspješna (dobivena bistra, bezbojna i homogena teućina), upotrebjeni su za izvođenje eksperimenta.

Tablica 2. Pripravljena niskotemperaturna eutektička otapala

DES	Skraćenica	Molarni omjer	wH₂O (%)
Kolin-klorid:glukoza	ChCl:Glc	1:1	30
		1:1	50
Kolin-klorid:urea:etilen glikol	ChCl:U:EG	1:2:2	10
		1:2:2	30
Kolin-klorid:saharoza	ChCl:Suc	1:1	30
		1:1	50
Kolin-klorid:etilen glikol	ChCl:EG	1:1	10
		1:1	30
		1:1	50
Kolin-klorid:glicerol	ChCl:Gly	1:2	10
		1:2	30
		1:2	50
Kolin-klorid:urea	ChCl:U	1:2	10
		1:2	30
		1:2	50
Betain:urea	B:U	1:3	30
Betain:urea		1:3	50
Betain:etilen glikol	B:EG	1:2	10
		1:2	30
		1:2	50
Betain:glicerol	B:Gly	1:2	50

3.2.2. Određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava DES-ova

DES-ovima su određena iduća svojstva : gustoća, viskoznost i pH vrijednost. Gustoća je određena pomoću piknometra, što je uključivalo punjenje piknometra poznatim volumenom DES-a (2 mL) te vaganje mase. Dijeljenjem mase s volumenom izračunata je gustoća otapala. Vrijednosti pH

određene su laboratorijskim pH-metrom umetanjem elektrode u otapalo i iščitavanjem vrijednosti. Viskoznost otapala određena je rotacijskim viskozimetrom pri sobnoj temperaturi (22°C).

3.2.3. Mjerenje aktivnosti litičke polisaharidne monooksigenaze

Za mjerenje apsorbancije cerulignona korišten je spektrofotometrijski test koji se temelji na oksidacijskoj reakciji 2,6-DMP-a u pripadajuće fenoksi radikale koji dimerizacijom čine cerulignon (Breslmayr i sur., 2018). Prije samog mjerenja apsorbancije testna otopina s uzorkom zagrijavala se u vodenoj kupelji pri 30 °C 5-10 minuta i potom je prebačena u kivetu korisnog volumena 1mL. Korišteno je više šarži istog LPMO enzima te su zbog toga izmjerene i vrijednosti apsorbancije u puferu svakog dana mjerenja. Provedeno je i mjerenje u reakcijskoj smjesi bez enzima kao slijepa proba.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za mjerenje aktivnosti LPMO

Komponenta	Koncentracija u testu	Temeljna otopina	V [μ L] za nulti uzorak	V [μ L]
NaAc pufer pH 6/ DES		100 mM	500	430
DMP	500 μ M		0	30
H ₂ O ₂	100 μ M	5 mM u H ₂ O	0	20
Uzorak enzima			0	20

Dodatkom H₂O₂ kao posljedne komponente u reakcijskoj smjesi započinje mjerenje promjene apsorbancije u vremenu ($\Delta ABS/\Delta t$) spektrofotometrijski pri 469nm tijekom 120 sekundi.

Iz sakupljenih podataka o vrijednostima apsorbancije izračunata je brzina reakcije preko nagiba pravca ovisnosti apsorbancije o vremenu. U obzir su uzeti podaci skupljeni u prvih 60 sekundi kako bi se obuhvatilo linearno područje tijekom reakcije. Brzine reakcije izračunate su iz srednje vrijednosti nagiba pravca triju paralelnih mjerenja. Vrijednost brzine u DES-u izražena je relativno u odnosu na izmjerenu brzinu u puferu toga dana. Drugim riječima, relativna brzina reakcija pokazuje koliko je puta reakcija bila brža ili sporija od one u puferu toga dana. Iz vrijednosti relativne brzine reakcije preko jednadžbe (1) izračunata je relativna volumetrijska aktivnost enzima. EF vrijednost izračunata je preko jednadžbe (2)

$$\text{volumetrijska aktivnost}_{rel} (U L^{-1}) = \text{brzina}_{rel}(\text{min}^{-1}) \cdot EF \quad [1]$$

$$EF = \frac{\text{ukupni volumen}(ml) \cdot \text{stupanj razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka}(ml) \cdot \text{dužina}(cm) \cdot \text{molarni apsorpcijski koeficijent}(mM^{-1}cm^{-1})} \quad [2]$$

3.2.4. Računanje molekulskih deskriptora DES-ova primjenom COSMO-RS programskog paketa

U svrhu karakterizacije DES-a kao otapala korišten je termodinamički model COSMO-RS koji je ujedno i programski paket pod istim imenom. COSMO-RS zasniva se na kvanto-kemijskim modelima, razvijena od strane Klamt i sur. (2002). Unutar COSMO-RS teorije tekućina se smatra skupom gusto zbijenih i idealno opisanih molekula površinskim nabojima označenih grčkim slovom sigma (σ). Programski paket izrađuje krivulju vjerojatnosti distribucije sigmi nazvanom sigma profil.

Sigma profili pojedinih komponenata dobiveni su pomoću programskog paketa COSMO-RS. Iz postojeće baze podataka geometrijski i energijski optimiranih molekula izračunata je krivulja sigma profila koja je kvantitativna reprezentacija naboja na polarnoj površini molekule. Molekule koje se mogu klasificirati kao akceptori vodikove veze (HBA) karakteriziraju pikovi u području negativnih potencijala, dok s druge strane molekule koje se mogu klasificirati kao donori vodikove veze (HBD) karakteriziraju pikovi u području pozitivnih potencijala. Nepolarne molekule karakteriziraju pikovi u području potencijala oko nule. Uz elektrostatičku neusklađenost i interakcije vodikovih veza, COSMO-RS također uzima u obzir interakcije van der Waalsovih sila (vdW) između površinskih segmenata.

Kako bi se definirali molekularni deskriptori za sve komponente DES-a, dobivena sigma krivulja svakog pojedinog HBA, HBD i vode podijeljena je u 10 intervala. Širina svakog intervala je $0.005 e/\text{Å}^2$, obuhvaćajući područje od -0.025 do $+0.025 e/\text{Å}^2$. Površina ispod svake regije integrirana je zasebno kako bi se dobila numerička vrijednost u svrhu pridobivanja ulaznih podataka za statističku obradu. Numeričke vrijednosti u svakom od 10 područja zbrojene su, dok su vrijednosti na granicama svakog područja prepolovljene i pribrojene susjednim vrijednostima. Time je dobiven sigma profil svake komponente korištene u izradi DES-ova (HBD, HBA, voda) načinjen od 10 intervala.

3.2.5. Izračun konačnog sigma profila otapala kao molekularnog deskriptora

Jednom dobiveni sigma profil pojedinačnih komponenata dovedeni su u direktnu vezu s korištenim otapalima u mjerenju aktivnosti LPMO-a. Za svaki DES izračunato je 10 molekularnih deskriptora prema formuli (3) u kojoj X_j predstavlja molarni udio svake pojedinačne komponente j , $S_{\sigma-profile,j}^i$ sigma profil pojedinačne komponente j , a BK broj komponenata u smjesi. Ovime je dobiveno 10 ulaznih i nezavisnih varijabli, koje ujedno predstavljaju termofizikalne karakteristike svakog DES-a, označenih s S_{DES}^i ($i = 1-10$) kojima se ispituje učinak DES-a na aktivnost LPMO enzima.

Formula:

$$S_{DES}^i = \sum_{j=1}^{BK} X_j \cdot S_{\sigma-profile,j}^i \quad [3]$$

3.3. OBRADA PODATAKA

3.3.1. Izrada korelacijskog modela između aktivnosti LPMO-a i molekularnih deskriptora

Polazna pretpostavka statističke obrade podataka bila je ta da možemo eksperimentalno dobivene vrijednosti aktivnosti LPMO-a u DES-ovima opisati pomoću funkcije konačnog sigma-profila DES-a u kojem je ta aktivnost izmjerena, iskazanom kao skupom S_{mix}^i deskriptora i prikazanoj u jednažbama (4) :

$$Aktivnost = f(S_{mix}^1, S_{mix}^2, S_{mix}^3, S_{mix}^4, S_{mix}^5, S_{mix}^6, S_{mix}^7, S_{mix}^8, S_{mix}^9, S_{mix}^{10}) \quad [4]$$

Modelima višestruke linearne regresije i djelomične linearne regresije pokušao se opisati odnos između ulaznih varijabli (molekularnih deskriptora DES-a) i izlazne varijable (izmjerene aktivnosti u DES-u)

3.3.2. Model višestruke linearne regresije

Primjenjen je višestruki regresijski model u kojem se analitički određuje statistička povezanost aktivnosti enzima LPMO (zavisne varijable) o sigma profilu, tj. molekularnim deskriptorima DES-a (više nezavisnih varijabli). Linearni regresijski model je jednadžba (5) oblika:

$$A = b_0 + b_1 \cdot S_{DES}^1 + b_2 \cdot S_{DES}^2 + b_3 \cdot S_{DES}^3 + b_4 \cdot S_{DES}^4 + b_5 \cdot S_{DES}^5 + b_6 \cdot S_{DES}^6 + b_7 \cdot S_{DES}^7 + b_8 \cdot S_{DES}^8 + b_9 \cdot S_{DES}^9 + b_{10} \cdot S_{DES}^{10} \quad [5]$$

U navedenom modelu A predstavlja aktivnost koja ovisi o nezavisnim varijablama S_{DES}^i , $i = 1-10$. Iz oblika modela vidljivo je kako je aktivnost linearna kombinacija 10 izračunatih molekularnih deskriptora i parametara b_i , $i=1-10$. Parametri regresijskih modela procjenjuju se točkastim procjeniteljem (tj. brojem) ili intervalnom procjenom (tj. pouzdanim intervalom). Za procjenu parametara ovog regresijskog modela korištena je metoda najmanjih kvadrata koja se ujedno i najčešće koristi zbog visoke vjerodostojnosti.

Gledajući čisto matematički, pretpostavimo da model koji želimo naći ima oblik

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k$$

Ako se s $\hat{\beta}_j, j = 0, 1, 2, \dots, k$ označe procjenitelji nepoznatih parametara β_j , a s $\hat{\varepsilon}$ procjena vrijednosti slučajne pogreške ε , tada se traži model oblika :

$$Y = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \dots + \hat{\beta}_k x_k + \varepsilon \quad [6]$$

Tako je eksperimentalno određena vrijednost zavisne varijable Y (u slučaju ovog rada to predstavlja aktivnost) jednaka zbroju regresijske vrijednosti i rezidualnog odstupanja, odnosno procjene grešaka relacije. Primjena metode najmanjih kvadrata temelji se na traženju onih parametara za koji je rezidualni zbroj kvadrata (suma kvadrata slučajnih grešaka) minimalna. Rezidualna su odstupanja dana izrazom:

$$\hat{\varepsilon} = \hat{y}_i - y_i, i = 1, 2, \dots, n \quad [7]$$

Dok je rezidualni zbroj kvadrata (suma kvadrata slučajnih grešaka):

$$SSE = \sum_{i=1}^n \hat{\varepsilon}_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n [y_i - (\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \dots + \hat{\beta}_k x_k)]^2 \quad [8]$$

Minimum navedenog izraza dobijemo tako da (k+1) parcijalne derivacije izjednače s nulom, čime se dolazi do sustava od (k+1) linearnih jednadžbi .

Parcijalne derivacije su

$$\frac{\partial SSE}{\partial \hat{\beta}_0} = 0, \frac{\partial SSE}{\partial \hat{\beta}_1} = 0 \dots \frac{\partial SSE}{\partial \hat{\beta}_k} = 0 \quad [9]$$

Sustav od (k+1) jednadžbi može se zapisati u matričnom obliku te se njegovim riješenjem dobiju procijenitelji koeficijenata označeni s $\hat{\beta}_j$

U slučaju ovog rada, programskim paketom *Statistica* izračunate su vrijednosti parametara b_i , $i = 1, 2 \dots, 10$. Za dobivene procjene rezidualni zbroj kvadrata postiže minimum. Dobiveno je također i jedinstveno rješenje.

3.3.3. Provjera adekvatnosti modela koeficijentom višestruke determinacije (R^2) i analizom varijance pomoću F testa

S obzirom da dobiveni rezultat testa za pojedini parametar b_i nije dobar pokazatelj može li se model koristiti za procjenu vrijednosti zavisne varijable, tj. aktivnosti, potrebno je odrediti opći pokazatelj adekvatnosti modela koji se naziva koeficijentom višestruke determinacije. Dan je izrazom:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}, 0 \leq R^2 \leq 1 \quad [10]$$

Gdje je \hat{y}_i procjena vrijednosti y u modelu. Koeficijent je omjer zbroja kvadrata pogrešaka protumačenih modelom i ukupnog zbroja kvadrata pogrešaka. Osim koeficijenta višestruke determinacije, izračunat je i korigirani koeficijent determinacije. Dan je izrazom :

$$\bar{R}^2 = 1 - \frac{n-1}{n-(k+1)} (1 - R^2), \bar{R}^2 \leq R^2$$

Korigirani koeficijent determinacije uvijek je manji ili jednak koeficijentu višestruke determinacije .

Statistička značajnost regresijskog modela utvrđena je i analizom varijance (engl. ANOVA) F-testom, kojim su dobivene F-vrijednost i p-vrijednost.

3.3.4. Model djelomične linearne regresije

U svrhu ovog rada izrađen je i model djelomične linearne regresije. Matematička formula modela je sljedeća :

$$\begin{aligned}
 A = & (b_{01} + b_{11} \cdot S_{\text{mix}}^1 + b_{21} \cdot S_{\text{mix}}^2 + b_{31} \cdot S_{\text{mix}}^3 + b_{41} \cdot S_{\text{mix}}^4 + b_{51} \cdot S_{\text{mix}}^5 + b_{61} \cdot S_{\text{mix}}^6 + b_{71} \\
 & \cdot S_{\text{mix}}^7 + b_{81} \cdot S_{\text{mix}}^8 + b_{91} \cdot S_{\text{mix}}^9 + b_{101} \cdot S_{\text{mix}}^{10}) \cdot (A \leq b_n) \\
 & + (b_{02} + b_{12} \cdot S_{\text{mix}}^1 + b_{22} \cdot S_{\text{mix}}^2 + b_{32} \cdot S_{\text{mix}}^3 + b_{42} \cdot S_{\text{mix}}^4 + b_{52} \cdot S_{\text{mix}}^5 + b_{62} \\
 & \cdot S_{\text{mix}}^6 + b_{72} \cdot S_{\text{mix}}^7 + b_{82} \cdot S_{\text{mix}}^8 + b_{92} \cdot S_{\text{mix}}^9 + b_{102} \cdot S_{\text{mix}}^{10}) \cdot (A > b_n)
 \end{aligned}$$

Princip djelomičnog pristupa metodi linearne regresije zasniva se na podjeli izmjenernih podataka u više regija koje slijede linearne trendove u svrhu boljeg preklapanja modela s podacima. Konkretno, u izradi modela ovog rada izmjerene vrijednosti aktivnosti LPMO-a podijeljene su u dvije regije s jednom točkom prijeloma. Parametri su procijenjeni dvijema jednadžbama : jedna linearna regresijska jednadžba u kojoj su vrijednosti zavisne varijable A manje ili jednake vrijednosti točke prijeloma b_n i druga s vrijednostima zavisne varijable A većom od ili jednakom točki prijeloma b_n

4. REZULTATI I RASPRAVA

Aktivnost litičkih polisaharidnih monoooksigenaza (LPMO) kao relativno nove skupine enzima značajna je prilikom razmatranja strategija biotehnoške razgradnje lako dostupnih biopolimera poput celuloze i hitina. Njihova aktivnost predstavlja inicijalni proces, koji zatim olakšava drugim enzimima razgradnju ranije navedenih supstrata. Također, posljednih godina sve se više ističe potreba za korištenjem ekološki prihvatljivijih otapala promidžbom koncepta zelene kemije. Kao alternativa štetnim organskim otapalima ističu se proridna eutektička otapala poznatija kao DES (eng. *Deep eutectic solvents*) ili NaDES (eng. *Natural deep eutectic solvents*).

Cilj ovog rada bilo je ispitivanje aktivnost LPMO enzima u DES-ovima kao i izrada jednostavnog i robusnog matematičkog modela kojime bi se opisala aktivnost LPMO-a u različitim DES sustavima. Dobiveni model bi tako omogućio predviđanje i odabir DES-a s najprikladnijim fizikalno kemijskim svojstvima njegovih sastavnih komponenti (HBA i HBD), kao i masenim udjelom vode, za željenu aktivnost LPMO enzima. Prvi dio rada odnosi se na sintezu DES-ova točno određenih molarnih udjela HBA i HBD te masenog udjela vode izraženog u postocima. Odabrane su lako dostupne, netoksične i relativno jeftine komponente za izradu DES-ova prema načelima zelene kemije i održivog razvoja. Nakon sinteze otapala, spektrofotometrijski je ispitana aktivnost LPMO prvotno u puferu u svrhu usporedbe. Potom je aktivnost enzima ispitana u priređenim DES-ovima na jednak način uz pufer kao slijepu probu.

Nadalje, DES-ovi su matematički opisani pomoću vrijednosti dobivenih COSMO-RS programskim paketom. Dobivene vrijednosti grupirane su u 10 intervala kako bi se načinio sveukupni sigma profil DES-a. Na osnovi izrađenih intervala programskim paketom Statistica 13.0 izrađeni su modeli višestruke linearne regresije te djelomične linearne regresije.

4.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala i fizikalno-kemijska karakterizacija

Za razliku od njima srdonih ionskih kapljevina, priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala je jednostavnija i ekonomičnija. Kod pripreme otapala nije došlo do kemijske reakcije već su, kako je ranije navedeno, pripravljena povezivanjem komponenti vodikovim vezama tvoreći eutektičku smjesu. Iz aspekta zelene kemije, bitno je napomenuti kako se radi o održivom procesu koji posjeduje 100 %-tnu atomsku učinkovitost (svi atomi supstrata se ugrađuju u produkt) te kao takav ne stvara otpad. Pripravljene su DES-ovi načinjeni od kvarternih amonijevih soli i organskih molekula. Kolin-klorid ima široku primjenu u pripremi niskotemperaturnih eutektičkih otapala, jer

je organska sol koja lako stvara vodikove veze s jeftinim i lako dostupnim donorima vodika poput uree, glicerola i etilen glikola itd. (Wang i sur. 2013.). Radi se također o vrlo dostupnoj sirovini koja se proizvodi u velikim količinama. Betain je također pogodna komponenta za pripremu DES-ova s obzirom da je biorazgradiv, obnovljiv, jeftin, prirodno prisutan u biološkim sustavima, nije toksičan te ima široku industrijsku primjenu.

U tablici 4 prikazane su srednje vrijednosti izmjerenih fizikalno-kemijske karakteristike DES-ova te njihove standardne devijacije. Izmjerena gustoća je prema očekivanjima, s obzirom na opisano u teorijskom dijelu rada, kao i u literaturi (Radović i sur., 2021), veća od gustoće vode i u rasponu od otprilike 1,05 – 1,25 g/cm³. Izmjerena viskoznost DES-ova je znatno veća od vode, te se može primjetiti utjecaj strukture ovih otapala na karakteristike. Drugim riječima, otapala na bazi kolin-klorida sa šećerom kao donatorom vodikove veze kolin-klorid:glukoza s 30% H₂O i kolin-klorid:saharoza s 30 % H₂O (w/w) su najviskoznija i najgušća, s vrijednostima gustoće 1,1196 i 1,2208 g/cm³ te vrijednostima dinamičke viskoznosti 43,655 odnosno 75,203 mPa·s. Gledajući izmjerene vrijednosti pH može se uočiti kako je pH DES-ova koji sadrže amid kao donor vodikove veze (npr. kolin-klorid:urea) bazičan s pH vrijednostima > 8. Otapala sa šećerima ili poliolom kao donatorom vodikove veze (npr. kolin-klorid:glicerol) su kiselija s pH vrijednostima < 7. Također, valja napomenuti kako se s povećanjem sadržaja vode pH vrijednosti pomiču prema neutralnom području.

Tablica 4. Izmjerene fizikalno-kemijske karakteristike DES-ova

DES	Molarni omjer	Udio vode (%)	Gustoća ± st.dev. (g/cm³)	pH ± st.dev.	Viskoznost ± st.dev. (mPa·s)
ChCl:Glc	1:1	30	1,1196 ± 0,03	4,12 ± 0,04	43,655 ± 0,45
	1:1	50	1,1327 ± 0,05	4,30 ± 0,06	4,710 ± 0,23
ChCl:U:EG	1:2:2	10	1,1044 ± 0,03	9,25 ± 0,05	20,910 ± 0,67
	1:2:2	30	1,0864 ± 0,05	8,90 ± 0,01	6,324 ± 0,11
ChCl:Suc	1:1	30	1,2208 ± 0,04	5,90 ± 0,03	75,203 ± 0,58
	1:1	50	1,1330 ± 0,04	6,19 ± 0,02	6,524 ± 0,32
ChCl:EG	1:1	10	1,0208 ± 0,04	5,55 ± 0,04	31,655 ± 0,46
	1:1	30	1,0635 ± 0,04	6,34 ± 0,04	8,032 ± 0,09
	1:1	50	1,0493 ± 0,03	6,00 ± 0,06	3,322 ± 0,08
ChCl:Gly	1:2	10	1,1238 ± 0,02	4,83 ± 0,08	79,375 ± 0,68
	1:2	30	1,1289 ± 0,01	5,9 ± 0,07	11,975 ± 0,54
	1:2	50	1,0922 ± 0,03	5,45 ± 0,04	4,619 ± 0,45
ChCl:U	1:2	10	1,0817 ± 0,03	9,24 ± 0,00	44,800 ± 0,74
	1:2	30	1,1109 ± 0,03	8,88 ± 0,01	5,302 ± 0,12
	1:2	50	1,0460 ± 0,01	8,75 ± 0,03	2,230 ± 0,22
B:U	1:3	30	1,1376 ± 0,02	9,25 ± 0,03	6,938 ± 0,11
	1:3	50	1,0921 ± 0,05	8,50 ± 0,04	2,776 ± 0,45
B:EG	1:2	10	1,1165 ± 0,02	7,70 ± 0,05	43,780 ± 0,21
	1:2	30	1,0440 ± 0,05	7,45 ± 0,06	10,910 ± 0,32
	1:2	50	1,0588 ± 0,04	6,70 ± 0,04	4,574 ± 0,23
B:Gly	1:2	50	1,0863 ± 0,01	6,38 ± 0,01	5,882 ± 0,15

4.2. Brzina reakcije i aktivnosti LPMO-a

U izračun i iskazivanje brzine enzimske reakcije u DES-ovima uzeta je u obzir i brzina u NaAc puferu pH vrijednosti oko 6.4 . Razlog tomu je korištenje različitih sarži LPMO enzima i odvijanje mjerenja aktivnosti kroz duži vremenski period u kojem postoji potencijalni utjecaj skladištenja

na enzimsku aktivnost. Stoga je brzina enzimske reakcije izražena u relativnom odnosu s brzinom reakcije u puferu izmjerene istog dana. Izračunata relativna brzina prevedena je preko formule 1 u aktivnost.

U tablici 5 i tablici 6 prikazane su aktivnosti LPMO-a u NaAc i DES-ovima. Vrijednosti predstavljaju odnos aktivnosti u NaAc puferu i određenom DES-u. S obzirom da vrijednosti aktivnost proizlaze iz ranije izračunatih vrijednosti apsorbancija i brzina, primjenjuje se ista povezanost između sastava DES-ova i masenog udjela vode.

Tablica 5. Volumetrijska aktivnost LPMO u ChCl DES-ovima

DES i pripadajući udio vode u otapalu	<i>Volumetrijska aktivnost LPMO u DES-u (U L⁻¹)</i>
ChCl:Glc (1:1) 30 %	0
ChCl:Glc (1:1) 50 %	0
ChCl:U:EG (1:2:2) 10 %	8,37
ChCl:U:EG (1:2:2) 30 %	6,36
ChCl:Suc (1:1) 30 %	1,91
ChCl:Suc (1:1) 50%	0
ChCl:EG (1:1) 10 %	2,97
ChCl:EG (1:1) 30 %	1,11
ChCl:EG (1:1) 50 %	1,06
ChCl:Gly (1:2) 10 %	0,95
ChCl:Gly (1:2) 30 %	0,74
ChCl:Gly (1:2) 50 %	0,11
ChCl:U (1:2) 10 %	8,48
ChCl:U (1:2) 30 %	2,44
ChCl:U (1:2) 50 %	2,33

Tablica 6. Volumetrijska aktivnost LPMO u betain DES-ovima

DES i pripadajući udio vode u otapalu	<i>Volumetrijska aktivnost u DES-u (U L⁻¹)</i>
B:U (1:1) 30 %	3,34
B:U (1:1) 50 %	0,74
B:EG (1:2) 10 %	19,61
B:EG (1:2) 30 %	1,96
B:EG (1:1) 50 %	1,00
B:Gly (1:1) 50 %	0,64

Same brzine su izračunate iz nagiba tangente na linearni dio grafa funkcije ovisnosti apsorbancije cerulignona o vremenu. Iz stupčastih grafova vidljivo je u kojim DES-ovima dolazi do najuspješnije i najbrže enzimске reakcije. Iz ovih rezultata također je moguće uočiti utjecaj prirode spojeva i udjela vode na količinu sintetiziranog cerulignona. Može se uočiti kako je u DES-ovima kojima je donor vodikove veze šećerna molekula poput glukoze ili saharoze prisutna vrlo mala ili čak nepostojeća aktivnost. Mogući razlog tome je što su šećerni DES-ovi s kolin-kloridom kao HBA najviskozniiji i najgušći (Panić i sur., 2021) te prema tome otežavaju prijenos mase. Također, kombinacija kolin-klorida i polialkohola poput glicerola rezultira nižim koncentracijama produkta. Najveće vrijednost relativne apsorbancije dobivene su u trokomponentnom sustavu kolin-klorid:urea:etilen-glikol te dvokomponentnim sustavima kolin-klorid:urea i betain:etilen-glikol. U literaturi je navedeno kako se DES kolin-klorid:urea pokazao kao odličan biokatalitički medij (Shen i Andrioletti 2022). Iako mu je pH oko 8, dodatkom vode ta se vrijednost pomiče ka neutralnijem području. Područje pH između 6,0 i 7,5 je ono u kojem je validirana metoda Breslmayr i sur.(2019). Iako je urea prema proteinima pokazuje vrlo snažan denaturirajući učinak, vodikove veze između kolin-klorida i uree spriječavaju difuziju slobodnih molekula uree u enzim, što rezultira stabilnošću enzima u ovakvom mediju. Isto se može reći i za ostale DES-ove u kojima je urea HBD. U radu Duranda i sur. (2013) o utjecaju DES-ova na aktivnost i stabilnost lipaza opisano je praćenje stabilnosti imobilizirane lipaze B, izolirane iz *C. antarctic*, na 60 °C u

različitim trojnim smjesama soli kolina i uree oblika kolin-klorid:urea:voda. Rezultati pokazuju kako povećanje sadržaja vode u smjesi omogućuje održavanje aktivnosti lipaze. S druge strane, povećanje količine uree smanjilo je preostalu aktivnost enzima. Isto potvrđuju. Wu i sur. (2013) također su primijetili da, unatoč destabilizacijskom učinku kojeg uzrokuju urea i kolin-acetat, peroksidaza izolirana iz hrena bila je značajno stabilizirana u prisutnosti ChAc:U DES-a, što znači da DES utječe na svojstva enzima uglavnom kao kompleksa DES-a samog, a ne pojedinačnim komponentama.

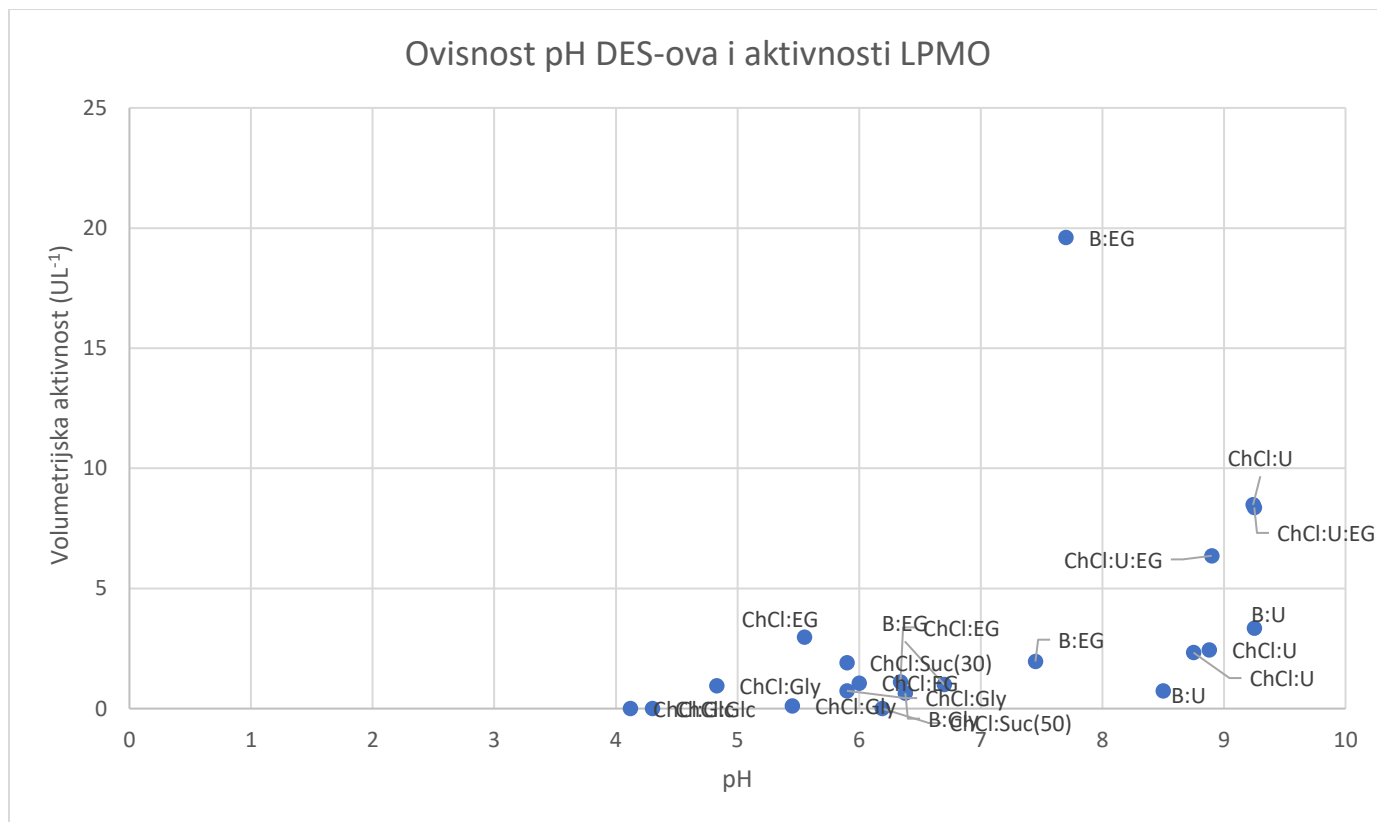
Iz priložene tablice također je vidljivo kako veći udio vode rezultira manjom koncentracijom produkta. Moguće je da je to rezultat narušavanja supramolekularne strukture DES-a prilikom povećanja masenog udjela vode. Iako je voda nužna kako bi se smanjila viskoznost enzima, veće koncentracije vode dovode do oslobađanja molekula iz veze HBA:HBD što rezultira u konačnici vodenom otopinom komponenata. Unatoč tome što je u literaturi navedeno kako je struktura stabilna do 40-50% masenog udjela vode (Radović i sur. 2021), moguće je da i niži udjeli dovode do oslobađanja molekula. U slučaju kada je HBD urea to bi značilo njeno otpuštanje i denaturaciju enzima čime bi se mogla objasniti manja koncentracija cerulignona u DES-ovima s većim udjelom vode.

4.3. Utjecaj fizikalno-kemijskih karakteristika DES-a na aktivnost LPMO

4.3.1. Utjecaj pH DES-a na aktivnost LPMO

Na slici 6 prikazana je raspodjela izmjenjenih relativnih aktivnosti LPMO u DES-ovima različitih pH vrijednosti.. Aktivnost LPMO značajno raste u područjima blago povišenog pH (7,5 – 9,25), tj. u određenim DES-ovima s blagim bazičnim svojstvima. Ova spoznaja preklapa se s podacima pH profila aktivnosti LPMO u različitim puferima prikupljenih u radu Breslmayr i sur. (2018a , 2019b) iz kojih je također preuzeta metoda mjerenja aktivnosti u NaAc te primjenjena u sintetiziranim DES-ovima.

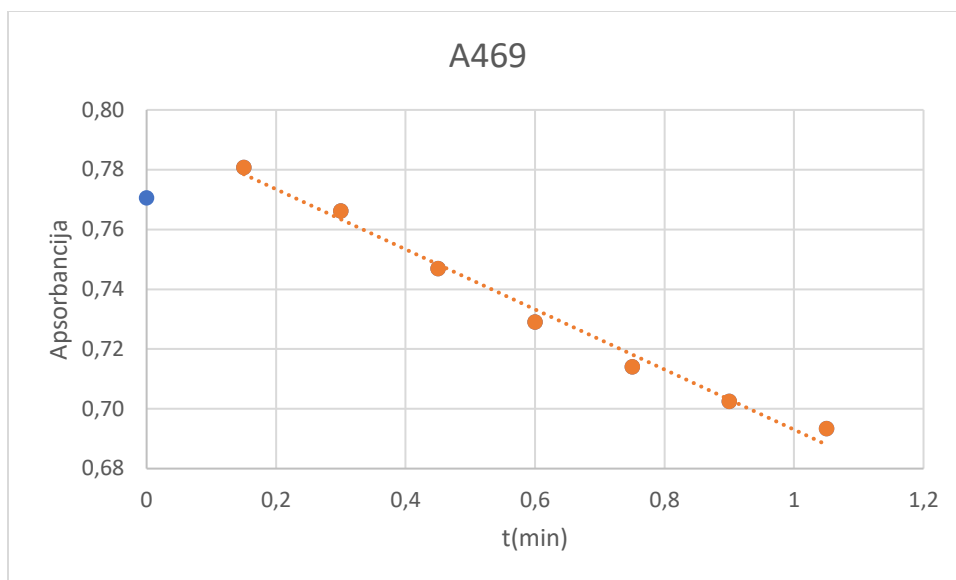
Najviši porast aktivnosti uočen je kod DES-a sastava betain:etilen-glikol (B:EG, 1:2) s masenim udjelom vode (wH₂O) 10%. Niti u jednom od DES-ova s pH vrijednostima u kiselom području nije zapažen porast aktivnosti LPMO u usporedbi s NaAc puferu pH 6.4, vidljivo iz vrijednosti relativnih volumetrijskih aktivnosti manjih od 1.



Slika 6. Graf raspodjele relativne aktivnosti u ovisnosti o pH DES-a

4.3.2. Odnos viskoznosti DES-ova i aktivnost LPMO

Na slici 7 prikazan je odnos relativnih aktivnosti LMPO i dinamičke viskoznosti DES-ova koja je izmjerena na sobnoj temperaturi. DES-ovi s većim udjelom vode imaju manju viskoznost i bolji prijenos mase, no s druge strane narušava se njihova supramolekularna struktura te dolazi do sustava u kojem su komponente DES-a otopljene u vodi. Time može doći do interferiranja komponenti u reakciji i u konačnici deaktivacije ili denaturacije enzima. Većina DES-ova nalaze se u području viskoznosti od 2,3 – 12 mPa·s te u njima nije zapažen značajan porast aktivnosti u usporedbi s puferom, osim u trokomponentnom DES-u kolin-klorid:urea:etilen-glikol (1:2:2) s 30% vode kojemu je vrijednost dinamičke viskoznosti 6,32 mPa·s. U području od 20 do 50 mPa·s nalaze se preostala tri DES-a u kojemu je uočen porast aktivnosti s obzirom na NaAc pufer. Veće vrijednosti aktivnosti u viskoznijim DES-ovima mogu biti posljedica bolje stabilnosti enzima u viskoznijim medijima, rezultat je kojeg navode u svom radu Mbous i sur. (2020) ispitujući aktivnost katalaze u DES-ovima na bazi kolin-klorida i različitih HBD (engl. *Hydrogen Bond Donor*) poput uree i etilen glikola.



Slika 9. Graf ovisnosti apsorbancije o vremenu za DES kolin-klorid:urea (10%)

4.5. Izrada sigma profila otapala

Sigma profil izražava vjerojatnost nalaženja segmenta koji posjeduju σ -polarnost na površini molekule te sadrži najrelevantnije kemijske informacije potrebne za predviđanje elektrostatskih i disperzijskih interakcija kao i formiranje vodikovih veza (Rezić i sur., 2021). Distribucija tih naboja, širina i visina pikova σ -profila variraju ovisno o samoj prirodi molekula. Stoga, bilo kakva promjena u molekularnoj strukturi može biti kvantificirana. Konačan sigma profil DES-a služi kao molekularni deskriptor, odnosno numerički pokazatelj kemijskih svojstava sadržanih u molekulama komponenata. Sastavljeni sigma profili svih korištenih DES-ova prikazani su u tablici 7 i tablici 8. Krivulje sigma profila podijeljene su u 10 regija, a svaka numerička vrijednost je zapravo površina ispod krivulje. Svaki interval korišten je kao nezavisna varijabla u ispitivanju korelacije s eksperimentalno dobivenim vrijednostima aktivnosti LPMO enzima. Iz sigma profila pojedinačnih komponenata sastavljen je konačni sigma profil kao linearna kombinacija pojedinačnih sigma profila svake komponente DES-a (uključujući i vodu) i njihovih molarnih udjela u smjesi oblika:

$$S_{mix}^i = x_1 \cdot a_1 + x_2 \cdot a_2 + x_3 \cdot a_3 + x_4 \cdot a_4$$

Gdje su $a_1 - a_4$ numeričke vrijednosti sigma profila pojedinačnih komponenata, a koeficijenti $x_1 - x_4$ ispred množinski udjeli pojedine komponente u sastavu konačnog DES-a. S obzirom da su određeni DES-ovi korišteni u ovom radu trokomponentni sustavi HBA:HBD:H₂O zadnji član je izdjenčen s 0.

Tablica 7. Konačni sigma profili kolin-klorid DES-ova

DES	Molar ni omjer	Udio vode	Sigma profil DES-a									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ChCl:Glc	1:1	30 %	0,0119	5,8338	11,401	14,878	9,4616	4,4718	5,5341	8,9496	11,664	0,461
ChCl:Glc	1:1	50 %	0,0058	6,0977	10,698	9,0709	5,7302	3,6541	4,7778	7,0471	9,9324	0,520
ChCl:U:EG	1:2:2	10 %	0	5,1143	13,043	18,065	15,124	7,9432	6,4343	10,195	13,100	0,240
ChCl:U:EG	1:2:2	30 %	0	5,7056	11,600	11,104	8,9224	5,5167	5,2957	7,8187	10,792	0,402
ChCl:Suc	1:1	30 %	0,0160	7,1557	11,854	12,374	8,4309	5,0579	5,9450	9,3465	11,179	0,578
ChCl:Suc	1:1	50 %	0,0075	6,7270	10,882	7,6627	5,0961	3,8951	4,9394	7,1553	9,6348	0,578
ChCl:EG	1:1	10 %	0	3,8788	10,307	24,316	20,319	6,5449	6,3085	10,349	13,560	0,216
ChCl:EG	1:1	30 %	0	5,1168	10,166	13,897	11,223	4,7050	5,1795	7,7840	10,913	0,397
ChCl:EG	1:1	50 %	0	5,7016	10,100	8,9763	6,9274	3,8361	4,6463	6,5722	9,6629	0,482
ChCl:Gly	1:2	10 %	0,0052	5,6742	11,796	22,508	21,621	8,3164	6,9953	12,628	13,637	0,246
ChCl:Gly	1:2	30 %	0,0024	6,0344	10,853	12,386	11,249	5,4146	5,4280	8,6840	10,779	0,422
ChCl:Gly	1:2	50 %	0,0012	6,1889	10,448	8,0449	6,8006	4,1699	4,7557	6,9920	9,5540	0,498
ChCl:U	1:2	10 %	0	5,4779	15,898	19,530	11,664	7,9045	6,1612	10,864	15,421	0,287
ChCl:U	1:2	30 %	0	5,9126	12,971	11,549	6,9281	5,3961	5,1113	8,0548	11,859	0,431
ChCl:U	1:2	50 %	0	6,1194	11,579	7,7516	4,6748	4,2026	4,6117	6,7181	10,165	0,500

Tablica 8. Konačni sigma profili betain DES-ova

DES	Molar ni omjer	Udio vode	Sigma profil DES-a									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B:U	1:3	30 %	0	6,0910	13,026	10,029	6,8373	5,7803	4,9437	7,2014	11,051	1,1561
B:U	1:3	50 %	0	6,2101	11,647	7,0353	4,6877	4,4429	4,5349	6,2940	9,7752	0,8900
B:EG	1:2	10 %	0	3,8013	9,3729	23,371	21,373	6,4060	5,6194	8,1597	12,453	2,4645
B:EG	1:2	30 %	0	5,0411	9,6910	13,714	12,029	4,6871	4,8584	6,7338	10,421	1,5466
B:EG	1:2	50 %	0	5,6521	9,8478	8,9552	7,4234	3,8400	4,4833	6,0311	9,4202	1,0942
B:Gly	1:2	50 %	0,0013	6,1779	10,260	7,9698	7,2050	4,1937	4,6271	6,5683	9,2446	0,9066

4.6. Model višestruke linearne regresije (VLR)

Model je dobiven izradom točkastog dijagrama unosom tabličnih podataka sigma profila DES-ova i pripadajućih vrijednosti relativne aktivnosti LPMO-a u DES-ovima. Rezultati regresijske analize i ANOVA-e prikazani su u tablici 9, odnosno tablici 10. Dobivene su vrijednosti korelacijskih parametara uz pojedine sigma faktore kao i njihova signifikatnost u izradi modela. Iz dobivenih vrijednosti vidljiva je ovisnost aktivnosti o sigma profilima. Koeficijenti uz pripadajući sigma faktor nalaze se u prvom, a njihova vrijednost u drugom stupcu. Vrijednost koeficijenta govori koliko pojedini sigma faktor pridonosi ispitanoj aktivnosti LPMO enzima u DES-ovima. Uz svaki je koeficijent u stupcu pored njega navedena odgovarajuća p-vrijednost koja govori o njegovoj statističkoj signifikantnosti. Na primjer, koeficijent b_2 ima p-vrijednost 0,003 i kao takav je signifikantan pri intervalu pouzdanosti 95% ($\alpha = 0,05$). S druge strane koeficijent b_6 ima p-vrijednost od 0,781 pri istom intervalu pouzdanosti, što znači da nije signifikantan te se stoga ne

razmatra pri izradi modela (vrijednosti im se izjednačuju s 0). Koeficijenti također imaju pozitivan ili negativan predznak koji predstavlja tip korelacije (pozitivna ili negativna) između sigma profila i aktivnosti enzima.

Prema Cheng i sur. koeficijent determinacije (R^2) i korigirani koeficijenti determinacije (\bar{R}^2) opći su pokazatelji adekvatnosti bilo kojeg linearno regresijskog modela. Štoviše, model se prema Le Man i sur. (2010) smatra prikladnim ukoliko je koeficijent determinacije iznad 0,75. S obzirom da omjer kvadrata pogrešaka protumačenih ovim modelom i ukupnog zbroja kvadrata pogrešaka jednak 0,793 model se može prihvatiti pri opisu aktivnosti LPMO-a u ovisnosti o sigma profilima kao molekularnim deskriptorima. Valja napomenuti da model ipak donekle odstupa od idealne vrijednosti $R^2=1$ što umanjuje njegovu točnost.

Kako parametar b_6 nije statistički signifikantan, izjednačuje se s nulom te konačna jednadžba modela glasi:

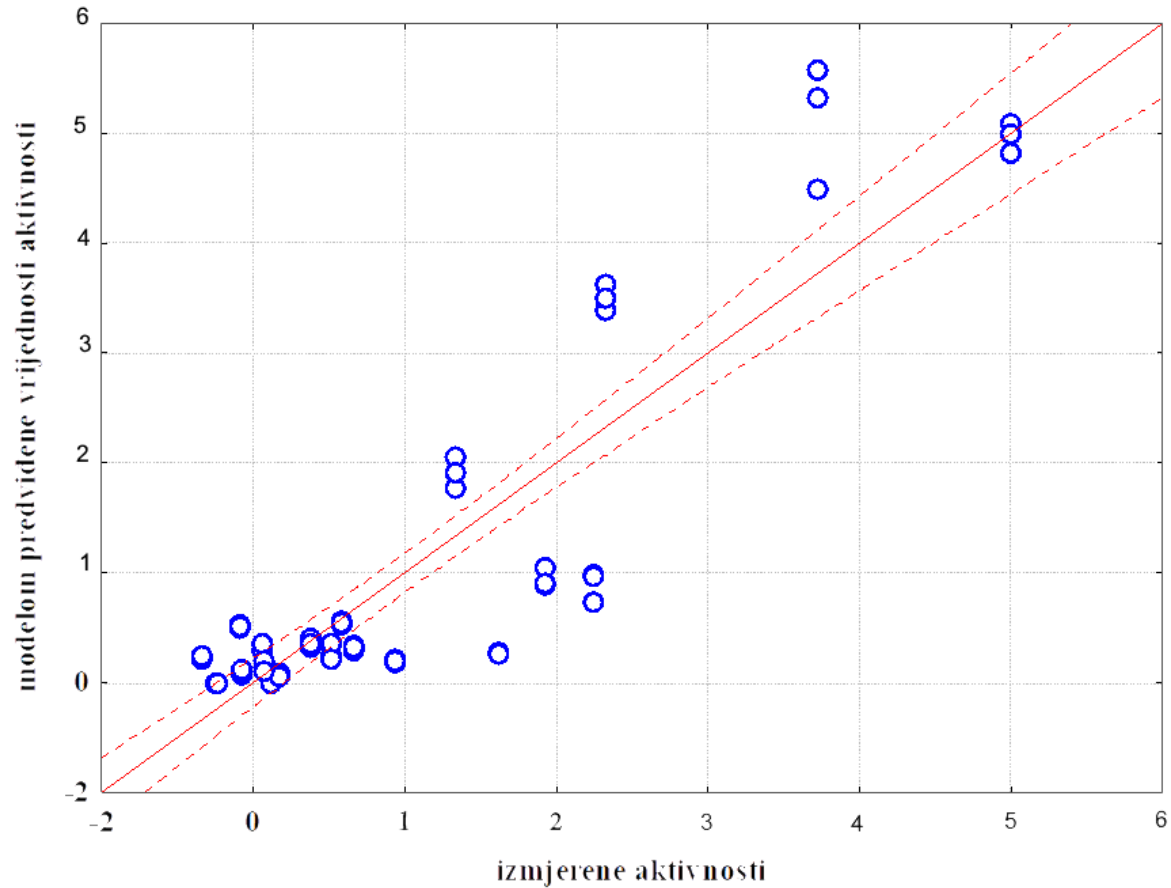
$$\begin{aligned} \text{Aktivnost} &= 7,979 + 173,931S_{mix}^1 + 2,699S_{mix}^2 + 1,808S_{mix}^3 + 0,924S_{mix}^4 \\ &= +0,801S_{mix}^5 - 5,080S_{mix}^7 - 1,739S_{mix}^8 - 1,943S_{mix}^9 - 4,395S_{mix}^{10} \end{aligned}$$

Tablica 9. Koeficijenti modela višestruke linearne regresije (VLR) i modela djelomične linearne regresije

Koeficijent	Vrijednost \pm standardna pogreška	p-vrijednost
b_0	$7,979 \pm 0,140$	<0,001
$b_1 (S^1_{\text{mix}})$	$173,931 \pm 0,009$	<0,001
$b_2 (S^2_{\text{mix}})$	$2,699 \pm 0,748$	<0,001
$b_3 (S^3_{\text{mix}})$	$1,808 \pm 0,604$	<0,001
$b_4 (S^4_{\text{mix}})$	$0,924 \pm 0,307$	<0,001
$b_5 (S^5_{\text{mix}})$	$0,801 \pm 0,159$	<0,001
$b_6 (S^6_{\text{mix}})$	$-0,128 \pm 0,046$	0,781
$b_7 (S^7_{\text{mix}})$	$-5,080 \pm 0,569$	<0,001
$b_8 (S^8_{\text{mix}})$	$-1,739 \pm 0,491$	<0,001
$b_9 (S^9_{\text{mix}})$	$-1,943 \pm 0,695$	<0,001
$b_{10} (S^{10}_{\text{mix}})$	$-4,395 \pm 0,638$	<0,001

Tablica 10. Rezultati ANOVA analize za model višestruke linearne regresije

R^2	0,793
R^2_{adj}	0,767
SEE	1,497
F-vrijednost	30,235
p-vrijednost	<0,001



Slika 10. Usporedba modela VLR i dobivenih eksperimentalnih vrijednosti

4.7. Model djelomične linearne regresije (DLR)

Izrađen je i model djelomične linearne regresije koji se sastoji od dvije linearne regije. Rezultati su vidljivi u tablici 11 i tablici 12. Prva linearna regija obuhvaća izmjerene relativne vrijednosti aktivnosti LPMO manje od 0,576 koja predstavlja točku prijeloma modela djelomične linearne regresije. Ove vrijednost predstavlja tkzv. točku prijeloma modela. Drugi dio modela obuhvaća izmjerene vrijednosti veće od točke prijeloma. Time se model sastoji od dva dijela, odnosno dvije jednačbe linearne regresije. Ovime se želi postići bolje preklapanje modela i izmjerenih vrijednosti te viša točnost modela. To se vidi iz korelacijskog koeficijenta $R^2=0,994$ koji je znatno veći od onog u VLR. Analizirajući vrijednost sume kvadrata odstupanja (SSE vrijednost) uočava se znatno manja vrijednost u modelu DLR (1,006) u usporedbi s modelom VLR (1,497) čime se dodatno ističe veća točnost modela DLR. No, većoj točnosti modela obično se pridružuje i veća složenost povećanjem broja parametara. U praktičnim primjenama, ovakvi

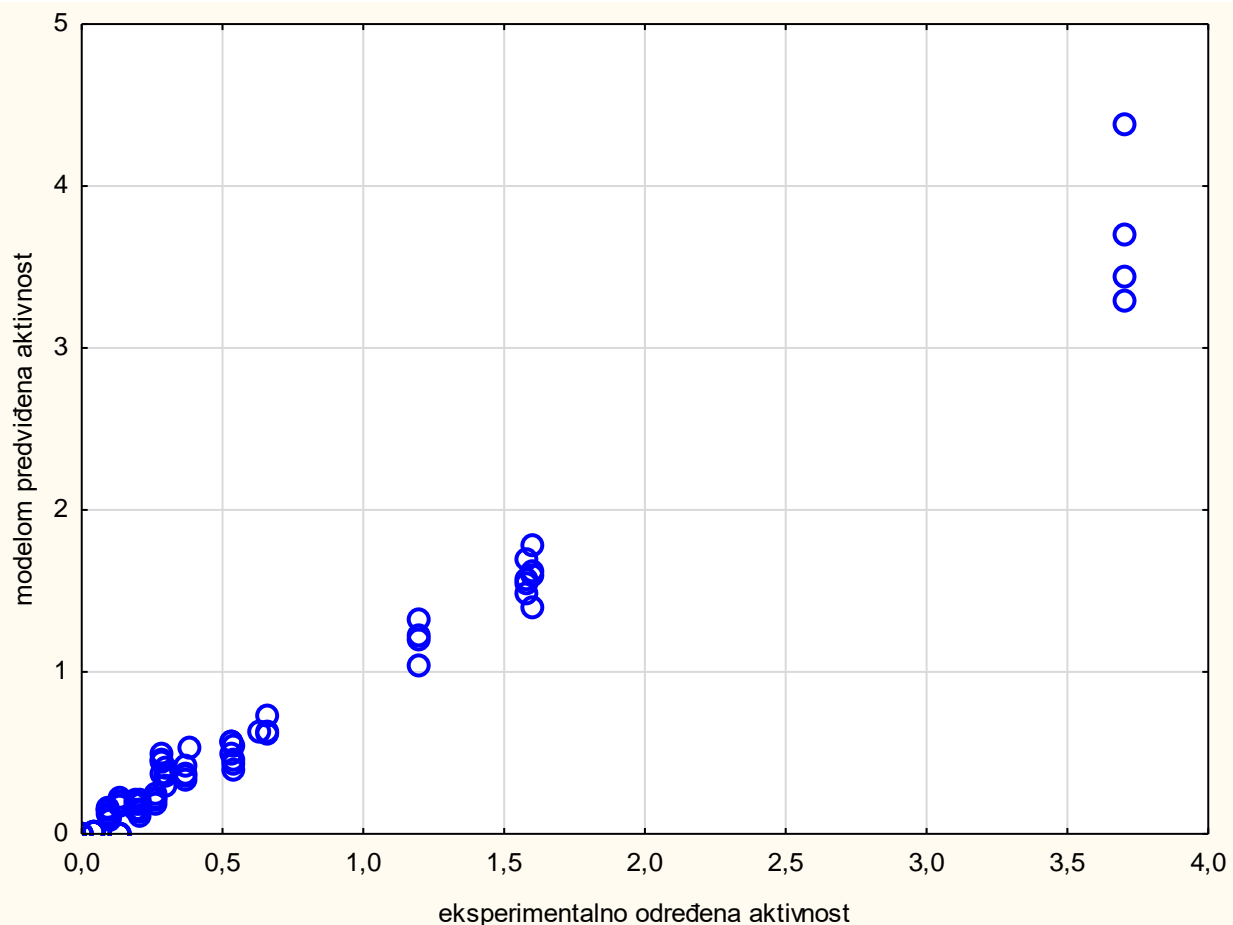
modeli teže se implementiraju jer zahtjevaju više specijaliziranog znanja, sofisticiranije matematičke koncepte i algoritme (Olson i sur., 2018).

Tablica 11. Koeficijenti modela djelomične djelomične linearne regresije (DLR) i točka prijeloma

Koeficijent modela i točka prijeloma	koeficijent± standardna pogreška	p-vrijednost
b_0	0,587 ± 0,148 -0,256 ± 0,111	<0,001
$b_1 (S^1_{mix})$	0,048 ± 0,037 -3,189 ± 0,118	<0,001
$b_2 (S^2_{mix})$	1,937 ± 0,142 -4,786 ± 1,001	<0,001
$b_3 (S^3_{mix})$	-1,144 ± 0,407 -4,786 ± 0,389	<0,001
$b_4 (S^4_{mix})$	0,574 ± 0,025 -2,473 ± 0,065	<0,001
$b_5 (S^5_{mix})$	-0,397 ± 0,049 -0,594 ± 0,189	<0,001
$b_6 (S^6_{mix})$	1,477 ± 0,675 -1,815 ± 0,594	<0,001
$b_7 (S^7_{mix})$	-1,987 ± 0,722 0,886 ± 0,045	<0,001
$b_8 (S^8_{mix})$	-0,804 ± 0,139 3,084 ± 0,097	<0,001
$b_9 (S^9_{mix})$	0,715 ± 0,100 -6,220 ± 0,373	<0,001
$b_{10} (S^{10}_{mix})$	-0,804 ± 0,077 4,958 ± 0,497	<0,001
Točka prijeloma	0,576 ± 0,019	<0,001

Tablica 12. Rezultati ANOVA analize za model djelomične linearne regresije (DLR)

R^2	0,994
R^2_{adj}	0,945
SEE	1,006
F-vrijednost	31,884
p-vrijednost	<0,001



Slika 11. Usporedba modela VLR i dobivenih eksperimentalnih vrijednosti

Doprinos ovog rada leži u spoznaji da je moguće provesti željenu biokatalitičku reakciju u otapalima koja su zamjena tradicionalnim organskim otapalima, kao u ekološkom tako i tehnološkom pogledu. Također je značajno što je u otapalima poput betain:etilen-glikol 10 % H₂O (w/w) postignuta veća aktivnost nego u ranijim eksperimentima provedenima u puferu (Bresmayr i sur., 2018) te kako je aktivnost moguće predvjeti matematičkim modelima višestruke i djelomične linearne regresije.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće

1. Sinteza DES-ova je jeftina, jednostavna i efikasna na razini atoma.
2. LPMO enzim je aktivan u DES-ovima, na njegovu aktivnost utječu fizikalna i kemijska svojstva DES-ova poput gustoće, pH i viskoznosti. U blago lužnatim (pH 7,5 -9,25) i viskoznijim medijima (do 45 mPa·s) moguće je postići veću aktivnost enzima.
3. U ovom istraživanju najveća aktivnost LPMO-a zabilježena je u DES-u B:EG s 10 % masenim udjelom vode, pH 7,7 i viskoznosti 43,78.
4. Moguće je koristiti sigma faktore kao molekularne deskriptore u svrhu predviđanja utjecaja raspodjele površinskih naboja molekula na aktivnost oksidoreduktaza.
5. Modeli višestruke linearne regresije i djelomične linearne regresije mogu se koristiti u predviđanju aktivnosti LPMOa koristeći sigma faktore kao ulazne i nezavisne varijable.
6. Model djelomične linearne regresije je složeniji model koji točnije predviđa biokatalitičku aktivnost LPMO-a ($R^2 = 0,994$, $SEE = 1,006$) usporedbi s modelom višestruke linearne regresije ($R^2 = 0,793$, $SEE = 1,497$).
7. Niskotemperaturna eutektička otapala posjeduju veliki potencijal u održivom razvoju kao ekološki prihvatljivija i održiva zamjena tradicionalnim otapalima.

LITERATURA

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical communications* **1**, 70-71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>

Anastas P, Eghbali N (2010) Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews* **39**(1), 301-312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>

Andlar M, Rezić T, Marđetko M, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018) Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci* **18**, 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>

Benguerba Y, Alnashef IM, Erto A, Balsamo M, Ernst B (2019) A quantitative prediction of the viscosity of amine based DESs using $\Sigma\sigma$ -profile molecular descriptors. *Journal of Molecular Structure* **1184**, 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.02.052>

Bissaro B, Røhr ÅK, Müller G, Chylenski P, Skaugen M, Forsberg Z (2017) Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂. *Nature Chem Biol* **13**(10), 1123–1128. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2470>

Bittner JP, Zhang N, Huang L, de María PD, Jakobtorweihen S, Kara S (2022) Impact of deep eutectic solvents (DESs) and individual DES components on alcohol dehydrogenase catalysis: connecting experimental data and molecular dynamics simulations. *Green Chemistry* **24**(3), pp.1120-1131. <https://doi.org/10.1039/D1GC04059F>

Breslmayr E, Daly S, Požgajčić A, Chang H, Rezić T, Oostenbrink C, Ludwig R (2019) Improved spectrophotometric assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol Biofuels* **12**(283). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1624-3>

Breslmayr E, Hanžek M, Hanrahan A i sur. (2018). A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol Biofuels* **11**, 79 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6>.

Bubalo MC, Tušek AJ., Vinković M, Radošević K, Srček VG, Redovniković IR, (2015) Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **122**, 188-198. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.005>

Cao SL, Deng X, Xu P, Huang ZX, Zhou J, Li XH, Zong MH, Lou WY, (2017) Highly efficient enzymatic acylation of dihydromyricetin by the immobilized lipase with deep eutectic solvents as cosolvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**(10), 2084-2088. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00011>

CAZy database (2022) Drula E, Garron M-L, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N (2022) The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res* **50**, 571–577. <http://www.cazy.org/> Pristupljeno 17. prosinca 2023

Chen L, Wei Q, Ma B, Gao F, Qi Y, Xie X, Qu Y. (2018). Molecular basis of substrate recognition and regioselectivity of fungal polysaccharide monoxygenases. *Frontiers in microbiology* **9**, 3042. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03042>

Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P (2012) Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Comput Struct Biotechnol J* **2**(3). <https://doi.org/10.5936/csbj.201209015>

Durand E, Lecomte J, Baréa B, Piombo G, Dubreucq E, Villeneuve P (2012) Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process biochemistry*, **47**(12), 2081-2089. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027>

Eijsink VG, Petrovic D, Forsberg Z, Mekasha S, Røhr ÅK, Várnai A, Bissaro B, Vaaje-Kolstad G, (2019). On the functional characterization of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Biotechnology for biofuels*, **12**(1),1-16.<https://doi.org/10.1186%2Fs13068-019-1392-0>

Gorke, J., Srienc F, Kazlauskas RJ (2010) Deep eutectic solvents for *Candida antarctica* lipase B-catalyzed reactions. In *Ionic liquid applications: pharmaceuticals, therapeutics, and biotechnology*, 169-180. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1038.ch014>

Guajardo N, Müller CR, Schrebler R, Carlesi C, Dominguez de Maria P, 2016 Deep eutectic solvents for organocatalysis, biotransformations, and multistep organocatalyst/enzyme combinations. *ChemCatChem*, **8**(6), 1020-1027. <https://doi.org/10.1002/cctc.201501133>

Hangasky JA, Iavarone AT Marletta MA i sur (2018). Reactivity of O₂ versus H₂O₂ with polysaccharide monoxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**(19), 4915-4920. <https://doi.org/10.1073/pnas.180115311>

Huang ZL, Wu BP, Wen Q, Yang TX, Yang Z, (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **89**(12), pp.1975-1981. https://doi.org/10.1007/10_2018_67

IEA. 2021. Biomass for power generation and CHP. <https://www.iea.org/reports/biomass-for-power-generation-and-chp> Pristupljeno 4. svibnja 2023.

Klamt A, Eckert F, Hornig M, Beck ME, Bürger T (2002) Prediction of aqueous solubility of drugs and pesticides with COSMO-RS. *Journal of computational chemistry*, **23**(2), pp.275-281. <https://doi.org/10.1002/jcc.1168>

Kont R, Bissaro B, Eijsink VG. and Våljamäe P, (2020) Kinetic insights into the peroxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). *Nature Communications*, **11**(1), p.5786. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19561-8>

Kuusk S, Kont R, Kuusk P, Heering A, Sørliie M, Bissaro B i sur. (2018) Kinetic insights into the role of the reductant in H₂O₂-driven degradation of chitin by a bacterial lytic polysaccharide monoxygenase. *J Biol Chem* **294**, 1516-1528. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA1118.006196>

- Lapeña D, Lomba L, Artal M, Lafuente C, Giner B, (2019) Thermophysical characterization of the deep eutectic solvent choline chloride: ethylene glycol and one of its mixtures with water. *Fluid Phase Equilibria* **492**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.03.018>
- Le Man H, Behera SK, Park HS, (2010) Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *International Journal of Environmental Science & Technology* **7**, 157-164. <https://doi.org/10.1007/BF03326127>
- Loose JS, Forsberg Z, Kracher D, Scheiblbrandner S, Ludwig R, Eijssink VGH i sur. (2016) Activation of bacterial lytic polysaccharide monoxygenases with cellobiose dehydrogenase. *Protein Sci* **25**, 2175-2186. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3043>
- Ma J, Lu X, Zhang Y, Chen J (2018). A novel deep eutectic solvent based on choline chloride: Synthesis and application as an extraction solvent for natural products. *Journal of Molecular Liquids* **261**, 24-29 <https://doi.org/10.1002/cctc.201901842>
- Maugeri Z, Domínguez de María P, (2014) Whole-Cell Biocatalysis in Deep-Eutectic-Solvents/Aqueous Mixtures. *ChemCatChem*, **6**(6), 1535-1537. <https://doi.org/10.1002/cctc.201400077>
- Mbous YP, Hayyan, M, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA, Looi CY (2017) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnology advances* **35**(2), 105-134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>
- Meier KK, Jones SM, Kaper T, Hansson H, Koetsier MJ, Karkehabadi S. i sur. (2018) Oxygen activation by Cu LPMOs in recalcitrant carbohydrate polysaccharide conversion to monomer sugars. *Chem. Rev* **118**(5), 2593–2635. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00421>
- Monhemi H, Housaindokht MR, Moosavi-Movahedi AA, Bozorgmehr MR, (2014) How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: choline chloride deep eutectic solvent. *Physical Chemistry Chemical Physics* **16**(28), pp.14882-14893. <https://doi.org/10.1039/C4CP00503A>
- Müller G, Chylenski P, Bissaro B, Eijssink VGH, Horn SJ (2018) The impact of hydrogen peroxide supply on LPMO activity and overall saccharification efficiency of a commercial cellulase cocktail. *Biotechnol Biofuels* **11**(209). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1199-4>
- Olson RS, Cava WL, Mustahsan Z, Varik A, Moore JH (2018) Data-driven advice for applying machine learning to bioinformatics problems. In *Pacific Symposium on Biocomputing 2018: Proceedings of the Pacific Symposium* **1**, 192-203. https://doi.org/10.1142/9789813235533_0018
- Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis R, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2**(5), 1063-1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I, (2021) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **96**(1), 14-30. <https://doi.org/10.1002/jctb.6545>

Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syldatk C, Holtmann D (2019) Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends in biotechnology* **37**(9), 943-959. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>

Radić I. (2022). 'Utjecaj promjene koncentracije vodikovog peroksida i askorbinske kiseline na operacijsku stabilnost litičke polisaharidne monooksigenaze', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, citirano: 07.05.2023., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:638764>

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I, (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala–racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, **70**(9-10), 551-562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>

Rezić T, Trontel A, Pavlečić M, Novak M, Herceg Z, Ivančić Šantek M i sur. (2021) Nove spoznaje u biološkoj razgradnji lignoceluloznih sirovina. U: Šubarić D, Miličević B (ured.) Neke mogućnosti korištenja nusproizvoda prehrambene industrije – Knjiga 3, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Veleučilište u Požegi, Osijek, str. 1-24

Rezić T, Presečki AV. and Kurtanjek Ž, (2021) New approach to the evaluation of lignocellulose derived by-products impact on lytic-polysaccharide monooxygenase activity by using molecular descriptor structural causality model. *Bioresource Technology*, **342**, p.125990. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125990>

Satlewal A, Agrawal R., Bhagi, S, Sangoro J, Ragauskas A.J., (2018) Natural deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: Recent developments, challenges and novel opportunities. *Biotechnology advances*, **36**(8), 2032-2050. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.009>

Sheldon RA (2017) The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chemistry*, **19**(1), 18-43. <https://doi.org/10.1039/C6GC02157C>

Shen G, Andrioletti B (2022) Choline Chloride/Urea Deep Eutectic Solvents: A Promising Reaction Medium for the Synthesis of Bio-Based Poly(hydroxyurethane)s. *Molecules* **27**, 4131. <https://doi.org/10.3390/molecules27134131>

Smith EL, Abbott, AP, Ryder KS (2014) Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews* **114**(21), pp.11060-11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

Sun H, Xin R, Qu D, Yao F (2020). Mechanism of deep eutectic solvents enhancing catalytic function of cytochrome P450 enzymes in biosynthesis and organic synthesis. *Journal of Biotechnology* **323**, 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.004>

Toled ML, Pereira MM, Freire, MG, Silva JP, Coutinho JA, Tavares AP (2019) Laccase activation in deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **7**(13), 11806-11814. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02179>

Vaaje-Kolstad G, Forsberg Z, Loose JS, Bissaro B, Eijsink VG (2017) Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr Opin Struc Biol* **44**, 67–

76. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.012>

Vu VV, Beeson WT, Phillips CM, Cate JH, Marletta MA (2014) Determinants of regioselective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. *J Am Chem Soc* **136**, 562-565. <https://doi.org/10.1021/ja409384b>

Walton PH, Davies GJ (2016) On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. *Cur Opin Chem Biol* **31**, 195–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.001>

Wang D, Li Y, Zheng Y, Hsieh YSY (2021) Recent Advances in Screening Methods for the Functional Investigation of Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Front Chem* **9**. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.653754>

Wang B, Johnston EM, Li P, Shaik S, Davies GJ (2019). Molecular mechanisms of oxygen activation and hydrogen peroxide formation in lytic polysaccharide monooxygenases. *ACS catalysis* **9**(6), 4953-4961. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01097>

Wang H, Liu S, Zhao Y, Wang J, Yu, Z., (2019) Insights into the hydrogen bond interactions in deep eutectic solvents composed of choline chloride and polyols. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **7**(8),7760-7767. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06676>

Wu BP, Wen Q, Xu H Yang Z (2014) Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **101**, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.001>

Zhou P, Wang X, Zeng ., Wang W, Yang B, Hollmann F, Wang Y, (2017) Deep eutectic solvents enable more robust chemoenzymatic epoxidation reactions. *ChemCatChem*, **9**(6), 934-936. <https://doi.org/10.1002/cctc.201601483>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis