

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Marija Karin

**ANALIZA STABILNOSTI
MODELNOG PROTEINA
LIZOZIMA U
NISKOTEMPERATURNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA
BAZI RAZLIČITIH OSMOLITA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Cvjetko Bubalo.

Rad je djelomično 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: izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo.

Želim se iskreno zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo, na njenom vodstvu, potpori i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala na velikom trudu, inspiraciji i mentorstvu koje će mi zauvijek ostati u dragom sjećanju.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na strpljenju, savjetima i pomoći oko praktičnog dijela izrade ovog rada. Hvala mojoj obitelji, prijateljima i mom dečku na podršci, razumijevanju i strpljenju tokom studiranja, a posebno tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala svima od srca.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ANALIZA STABILNOSTI MODELNOG PROTEINA LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI RAZLIČITIH OSMOLITA

Marija Karin, univ. bacc. ing. biotechn., 0058211522

Sažetak: Sve je veća zabrinutost i potreba za pronalaskom manje štetnih otapala zbog sve veće zagađenosti okoliša pa su znanstvenici sve više usmjereni prema proučavanju i korištenju niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *deep eutectic solvents, DES*) koja su zanimljiva zbog jednostavne pripreme, niske cijene te niske ili gotovo nikakve toksičnosti. Najnovije istraživanje stvara poveznicu između DES-ova i osmolita, koji su male organske molekule koje stanice nakupljaju kao odgovor na okolišne stresove te imaju jako dobra stabilizirajuća svojstva. Ova nova otkrića pružaju izvrsnu priliku za projektiranje novih otapala i sustava na bazi osmolita koji su izravno inspirirani prirodnim mikrookruženjem biomakromolekula. Različite kombinacije osmolita tvore višekomponentne eutektičke sustave koji pomažu u održavanju nativne konformacije i funkcionalnosti proteina i drugih biomolekula u nepovoljnim uvjetima. U ovom radu je ispitan utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita (osmoDES) na toplinski induciranu agregaciju te stabilnost modelnog proteina lizozima pri ekstremnim temperaturama. Rezultati ukazuju na značajan potencijal primjene pripremljenih osmoDES-ova kao tekućeg skladišnog medija za proteine, s obzirom na njihove izuzetne stabilizacijske sposobnosti.

Ključne riječi: *niskotemperaturna eutektička otapala, osmoliti, stabilizacija*

Rad sadrži: 48 stranica, 16 slika, 4 tablice, 57 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu

1. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo
3. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek
4. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Datum obrane: 20. prosinac 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

ANALYSIS OF THE STABILITY OF THE MODEL PROTEIN LYSOZYME IN DEEP EUTECTIC SOLVENTS BASED ON DIFFERENT OSMOLYTES

Marija Karin, univ. bacc. ing. biotechn., 0058211522

Abstract: There is a growing concern and the need to find less harmful solvents due to increasing environmental pollution, so scientists are increasingly directed towards the study and use of deep eutectic solvents (DES), which are interesting due to their simple preparation, low cost and low or almost no toxicity. The latest research creates a link between DESs and osmolytes, which are small organic molecules that cells accumulate in response to environmental stress and have very good stabilizing properties. These new discoveries provide an excellent opportunity to design new osmolyte-based solvents and systems that are directly inspired by the natural microenvironment of biomacromolecules. Different combinations of osmolytes form multicomponent eutectic systems that help maintain the native conformation and functionality of proteins and other biomolecules under adverse conditions. In this study, the influence of DES based on osmolytes (osmoDES) on heat-induced aggregation and stability of the model protein lysozyme at extreme temperatures was examined. The results indicate the significant potential of using the prepared osmoDES as a liquid storage medium for proteins, given their exceptional stabilization capabilities.

Keywords: *deep eutectic solvents, osmolytes, stabilization*

Thesis contains: 48 pages, 16 figures, 4 tables, 57 references, 0 supplements

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: Marina Cvjetko bubalo, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor
2. Marina Cvjetko Bubalo, Associate professor
3. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor
4. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor

Thesis defended: 20th of December, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ZELENA KEMIJA	2
2.1.1. Zelena otapala	4
2.1.2. Niskotemperaturna eutektička otapala	5
2.2. STABILIZACIJA PROTEINA U TEKUĆIM FORMULACIJAMA	7
2.2.1. Ekscipijensi u formulaciji proteina	9
2.2.2. Osmoliti kao ekscipijensi u formulaciji proteina	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Otopine i puferi	13
3.1.3. Enzimi i supstrati	13
3.1.4. Oprema i uređaji.....	14
3.2. METODE RADA.....	14
3.2.1. Priprema i karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita.....	14
3.2.2. Određivanje stabilosti proteina lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri visokim temperaturama	17
3.2.3. Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri niskim temperaturama	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA BAZI OSMOLITA.....	20
4.1.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita	20
4.1.2. Karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita primjenom infracrvene spektroskopije sa Furijerovim transformacijama	21
4.1.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita	28
4.2. STABILNOST LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA	30
4.2.1. Agregacije lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita.....	30
4.2.2. Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita.....	33
4.3. STABILNOST LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM	

OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA PRI NISKIM TEMPERATURAMA	35
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA.....	43

1. UVOD

U suvremenom društvu sve je veća zabrinutost i potreba za pronalaskom manje štetnih otapala zbog sve veće zagađenosti okoliša. Upravo zbog toga sve je veći fokus na razvijanju kemikalija i procesa koji minimiziraju ili čak eliminiraju korištenje i stvaranje opasnih tvari. Tom tematikom bavi se zelena kemija koja je osmišljena s ciljem dizajniranja proizvoda i procesa koji nemaju štetne učinke na ljudsko zdravlje i okoliš, a u isto vrijeme su i profitabilni (Anastas i Eghbali, 2010). Znanstvenici su sve više usmjereni prema proučavanju i korištenju niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *deep eutectic solvents*, *DES*) koja su zanimljiva zbog jednostavne pripreme, niske cijene, niske ili gotovo nikakve toksičnosti te sposobnosti prilagodbe zahvaljujući raznovrsnim strukturnim i fizikalno-kemijskim svojstvima koja se mogu oblikovati (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Kada se protein nalazi izvan svojeg prirodnog okruženja, često postaje nestabilan i podložan denaturaciji. Budući da je trodimenzionalna struktura proteina često ključna za njegovu funkcionalnost, velik napor ulaže se u istraživanje spojeva i metoda koji bi pomogli očuvati stabilnost proteina izvan njegovog prirodnog okoliša. Jedan od pristupa očuvanja funkcionalnosti proteina u vodenim otopinama jest dodatak različitih ekscipijensa poput osmolita. Naime, kako bi se prilagodili promjenjivim teškim uvjetima, organizmi proizvode i akumuliraju osmolite, male organske molekule koje imaju stabilizirajuće djelovanje na proteine. Upravo proučavanjem živih bića u prirodnom okruženju znanstvenici su došli do ideje povezivanja DES-ova i osmolita u nova obećavajuća otapala koja su pokazala izvrsnu stabilizaciju proteina (Cvjetko Bubalo i sur., 2023).

Cilj ovog rada bio je pripremiti niz DES-ova na bazi osmolita te ispitati njihov utjecaj na stabilnost modelnog proteina lizozima. U tu svrhu, otapala su pripravljena, određena su njihova fizikalno-kemijska svojstva (polarnost, pH vrijednost i gustoća) te je analizirana njihova struktura korištenjem infracrvene spektrofotometrije s Furijerovom transformacijom (FTIR). Nadalje, ispitan je utjecaj pripremljenih otapala na toplinski induciranu agregaciju te termodinamičku stabilnost lizozima pri ekstremnim temperaturama (-80, -14 i 80 °C).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA KEMIJA

Zelena kemija je definirana kao pristup koji se fokusira na razvijanje kemikalija i procesa koji minimiziraju ili čak eliminiraju korištenje i stvaranje opasnih tvari. Ovaj koncept zelene kemije prvi put se oblikovao u ranim devedesetim godinama prošlog stoljeća, a nakon toga je doživio međunarodno priznanje. To je rezultiralo stvaranjem mnogo programa i vladinih inicijativa diljem svijeta, a neki od najistaknutijih programa nalaze se u Sjedinjenim Američkim Državama, Ujedinjenom Kraljevstvu i Italiji. Ključni programi koji su se razvili u to vrijeme uključuju američki program *Green Chemistry Challenge Awards*, koji je započeo 1995. godine, te osnivanje Instituta za Zelenu kemiju 1997. godine koji je neprofitna korporacija za promicanje znanja, iskustva i kapaciteta te kretanja kemijske tvrtke prema održivosti, koja je napredovala u primjeni zelene kemije (De Marco i sur., 2018). Dvanaest načela zelene kemije služe kao smjernice koje pomažu kemičarima u postizanju održivosti. Ovaj pristup karakterizira pažljivo planiranje kemijskih sinteza i molekularnog dizajna kako bi se smanjile štetne posljedice (Anastas i Eghbali, 2010).

Cilj zelene kemije je smanjenje potencijalne opasnosti u svim fazama kemijskog procesa, pri čemu se opasnost definira kao sposobnost uzrokovanja štetnih posljedica za ljude i/ili okoliš. Na intrinzičnu razinu opasnosti može se utjecati putem pažljivog dizajna, s ciljem minimiziranja rizika, bilo da se radi o toksičnosti, fizičkim opasnostima kao što su eksplozivnost ili zapaljivost ili globalnim opasnostima poput oštećenje stratosferskog ozona. Ovi rizici, koji proizlaze iz navedenih opasnosti, mogu se pojaviti tijekom svih faza kemijskih transformacija, od samih sirovina koje se koriste u procesima do konačnih proizvoda. Kroz pažljivi inženjerski i procesni dizajn, moguće je smanjiti ili čak eliminirati intrinzične opasnosti koje proizlaze iz kemikalija i samih procesa, postižući tako sigurnije i ekološki prihvatljive rezultate (Anastas i Eghbali, 2010).

Dvanaest načela zelene kemije predstavili su 1998. Paul Anastas i John Warner. To je vodeći okvir za dizajn novih kemijskih proizvoda i procesa, koji se može primjenjivati na sve aspekte životnog ciklusa procesa (Anastas i Eghbali, 2010). Tih dvanaest načela zelene kemije temelje se na smanjenju ili nekorištenju toksičnih otapala u kemijskim procesima i analizama, a umjesto toga se stavlja naglasak na korištenje obnovljivih i bezopasnih sirovina. Osim toga, ubrzanje kemijskih reakcija primjenom katalizatora može pomoći, primjerice, u uštedi energije i manjem stvaranju otpada. Jedno od načela također se odnosi na svjestan razvoj proizvoda, tako da je poželjno da se nakon svog korisnog vijeka mogu razgraditi u proizvode bezopasne za okoliš,

također izbjegavajući bioakumulaciju. Stoga se primjećuje da se ova načela odnose na planiranje proizvoda, kroz njegovu sintezu, obradu i analizu. Glavni cilj je minimizirati ekološke rizike (De Marco i sur., 2018).

Kemija se dugo smatrala opasnom znanošću i javnost često povezuje riječ "kemikalija" s "otrovno". Dizajniranje sigurnijih održivih kemikalija i procesa zahtijeva nastojanje da se intrinzične opasnosti svedu na najmanju moguću mjeru i stoga ograniči rizik od nesreće i štete (Anastas i Eghbali, 2010). Dvanaest načela zelene kemije (tablica 1), koje su predložili Anastas i Warner, kriteriji su dizajna ili smjernice koje daju okvir za održivi dizajn. Oni čine sveobuhvatnu konstrukciju za dizajn sigurnijih kemikalija i kemijskih transformacija.

Tablica 1. Dvanaest načela zelene kemije (prema De Marco i sur., 2018)

1. Prevencija
Odnosi se na sprječavanje stvaranja otpada. Bolje je izbjegavati stvaranje otpada nego ga tretirati nakon što nastane.
2. Atomska ekonomija
Sintetske metode treba planirati tako da konačni proizvod sadrži što više reagensa korištenih tijekom procesa. Tako će se stvaranje otpada svesti na minimum.
3. Sigurnija kemijska sinteza
Sintetske metode trebale bi biti dizajnirane za korištenje i proizvodnju tvari s niskom ili nikakvom toksičnošću za rad i okoliš. Stoga se preporučuje zamjena toksičnih otapala otapalima niske toksičnosti ili otapalima bez toksičnosti.
4. Sigurniji dizajn kemikalija
Veliku važnost treba dati toksičnosti dizajniranih kemikalija. Oni bi očito trebali ispunjavati svoje funkcije, ali bi također trebali imati najmanju moguću toksičnost.
5. Korištenje sigurnijih otapala i pomoćnih tvari
Korištenje otapala i drugih reagensa treba izbjegavati gdje je to moguće. Kada to nije moguće, te tvari trebaju biti bezopasne.
6. Energetska učinkovitost
Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
7. Korištenje obnovljivih sirovina
Kad god je to ekonomski i tehnički izvedivo, treba koristiti obnovljive sirovine umjesto neobnovljivih.

Tablica 1. Dvanaest načela zelene kemije (prema De Marco i sur., 2018) (nastavak)

8. Redukcija derivata
Nepotrebne procese derivatizacije treba izbjegavati ili minimizirati jer zahtijevaju dodatnu upotrebu reagensa i stoga stvaraju otpad.
9. Kataliza
Korištenje katalitičkih reagensa (što je moguće selektivnije) je bolje od korištenja stehiometrijskih reagensa.
10. Dizajn proizvoda razgradnje
Kemikalije bi trebale biti dizajnirane tako da se na kraju svoje funkcije razgrade u bezopasne produkte razgradnje i ne ostaju postojane u okolišu.
11. Analiza u stvarnom vremenu za sprječavanje onečišćenja
Analitičke metode treba pratiti u stvarnom vremenu kako bi se izbjeglo stvaranje opasnih tvari.
12. Sprječavanje nesreća
I tvari i način na koji se koriste u kemijskom procesu trebaju biti odabrani uzimajući u obzir smanjenje potencijalnih nesreća, kao što su curenja, eksplozije i požari, s ciljem veće sigurnosti na radu i okoliša.

Zelena kemija postiže svoje ciljeve u zaštiti okoliša i ekonomskoj dobiti putem nekoliko glavnih pristupa. To uključuje katalizu, biokatalizu, korištenje obnovljivih sirovina (biomasa), upotrebu ekološki prihvatljivih medija za reakcije kao što su voda, ionske kapljevine i superkritične tekućine, primjenu nekonvencionalnih uvjeta za reakcije uz korištenje mikrovalova te razvoj novih fotokatalitičkih reakcija. Svi ovi smjerovi zajedno doprinose ostvarivanju ciljeva zelene kemije, čiji su temeljni fokus zaštita okoliša i postizanje ekonomske koristi (Jukić i sur., 2005).

2.1.1. Zelena otapala

Otapala čine oko 80 % ukupne količine kemikalija koje se koriste u mnogim važnim kemijskim procesima, posebno u proizvodnji finih kemikalija. Nažalost, ta su otapala često hlapljivi organski spojevi iz naftnih izvora koji nose nekoliko zdravstvenih i ekoloških rizika te se karakteriziraju visokom hlapljivošću, zapaljivošću i toksičnošću (Pacheco-Fernández i Pino, 2019). Brojni istraživači uzimaju ova dva aspekta kao razlog za potragu za novim zelenim otapalima koja bi zamijenila ona konvencionalna. Stoga, postoji sve veći broj publikacija koje se bave zelenim otapalima (Häckl i Kunz, 2018) te su posvećene dizajniranju novih, ekološki

prihvatljivih i podesivih otapala čija bi uporaba zadovoljila i tehnološke i ekonomske zahtjeve (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

Prema načelima zelene kemije, odabir prikladnog otapala temelji se na sigurnosti radnika (toksičnost, karcinogenost, mutagenost, apsorpcija kroz kožu i dišni sustav), sigurnosti procesa (zapaljivost, eksplozivnost, hlapljivost, stvaranje potencijalnog peroksida), zaštitu okoliša (ekotoksičnost, postojanost, onečišćenje podzemnih voda, uništavanje ozonskog omotača) i održivost procesa (sposobnost recikliranja i mogućnost ponovne uporabe) (Alfonsi i sur., 2008.), što znači da zelena otapala trebaju biti kemijski i fizički stabilna, s niskom hlapljivošću, jednostavna za korištenje i jednostavna za recikliranje s mogućnošću ponovne uporabe (Cvjetko Bubalo i sur., 2018).

Iako bi idealno bilo izbjeći upotrebu otapala u procesima, to je gotovo neizbježno zbog njihove ključne uloge u otapanju čvrstih tvari, prijenosu mase i topline, regulaciji viskoznosti te u koracima razdvajanja i pročišćavanja. Zbog toga postoje dvije glavne strategije za razvoj ekološki prihvatljivih otapala: zamjena tradicionalnih otapala dobivenih iz nafte s otapalima proizvedenim iz obnovljivih izvora i zamjena opasnih otapala s onima koji imaju bolje ekološke, zdravstvene i sigurnosne karakteristike (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

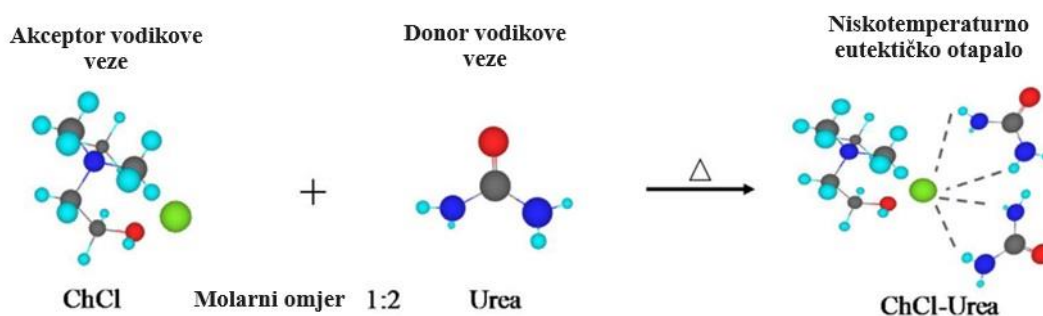
Iako se voda često koristi kao otapalo u industrijskim procesima, postoje ograničenja njezine primjene. Naime, mnogi organski i organometalni spojevi imaju vrlo nisku sposobnost otapanja u vodi, a također je i teško ukloniti vodu nakon završetka procesa u kojem je korištena, što čini njezinu upotrebu izazovnom. Zbog toga su razmatrana različita ekološki prihvatljiva, prilagodljiva i inovativna otapala. Među njima se ističu ionske kapljevine, niskotemperaturna eutektička otapala, superkritični i subkritični fluidi te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.1.2. Niskotemperaturna eutektička otapala

Izraz "eutektik" potječe od grčke riječi koja označava nisku temperaturu taljenja i može se primjenjivati na mješavinu (leguru) ili tekući medij. Općenito, eutektički sustav predstavlja homogenu smjesu komponenata koja, zbog specifičnih omjera, ima najniže moguće talište. Drugim riječima, talište eutektičkog sustava je niže od tališta svih njegovih komponenata, što ga čini posebno zanimljivim i važnim u različitim područjima (Cvjetko Bubalo i sur., 2023; Liu i sur., 2018).

Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) se obično definiraju kao sustavi sastavljeni od mješavine najmanje dviju komponenti, akceptora vodikove veze, poput netoksične kvaterne amonijeve soli (npr. kolin-klorid) i donora vodikove veze (npr.

amidi, šećeri, alkoholi i karboksilne kiseline) u različitim omjerima (Cvjetko Bubalo i sur., 2015), koji se mogu sami udružiti u novu eutektičku fazu koju karakterizira talište niže od svake pojedinačne komponente. Klasičan primjer DES-a je smjesa kolin-klorida (ChCl) (302 °C) i uree (132 °C) u molarnom omjeru 1:2 pri čemu se dobiva DES s talištem od 12 °C. Kolin-klorid je lako dostupan i jeftin dodatak hrani za životinje koji se proizvodi u velikim količinama, a urea je uobičajeno gnojivo. Stoga je smjesa kolin-klorida s ureom (U), u molarnom omjeru 1:2, lako dostupna, jeftina, biokompatibilna i biorazgradiva (Sheldon i Woodley, 2017). Shematski prikaz stvaranja niskotemperaturnog eutektičkog otapala dan je na slici 2. (Tomé i sur., 2018). Ova otapala predstavljaju većinu karakterističnih svojstava ionskih kapljevin (IL), kao što su lakoća sinteze i promjenjivi polaritet, gustoća i viskoznost, nehlapljivost i nezapaljivost. Međutim, priprema DES-a je jeftinija te ih je lako proizvesti u vlastitom laboratoriju (Cunha i Fernandes, 2018), a ta dizajnerska otapala pokazuju manju toksičnost te veću obnovljivost i biorazgradljivost u usporedbi s konvencionalnim ionskim kapljevina (Pacheco-Fernández i Pino, 2019). Niskotemperaturna eutektička otapala se još nazivaju i „dizajnirana otapala“ zbog brojnih strukturnih mogućnosti i mogućnosti dizajniranja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).



Slika 1. Shematski prikaz stvaranja niskotemperaturnog eutektičkog otapala, ilustrirano s ChCl i ureom (prema Tomé i sur., 2018)

Širok raspon mogućih strukturnih kombinacija koje obuhvaća DES, njihove jedinstvene fizikalno-kemijske karakteristike, kao i mogućnost finog podešavanja njihovih svojstava otapala (npr. pH vrijednost, polaritet, hidrofilnost/hidrofobnost, viskoznost) za određene svrhe, čine ih idealnim zelenim kandidatima za (bio)kemijske, elektrokemijske i materijalne primjene, kao i za ekstrakciju raznih spojeva, kako anorganskih (tj. metali i CO₂) tako i organskih (tj. biljni metaboliti, DNK, proteini) (Cvjetko Bubalo i sur., 2023). Studije su pokazale da se bioaktivni spojevi mogu otopiti 10-100 puta bolje pomoću DES-a nego u vodi ili lipidim (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*), podskupina DES-a, predstavili su i definirali Choi i sur. (2011) kao mješavine isključivo sastavljene od dva ili tri spoja koji se prirodno pojavljuju u biljkama, često primarni metaboliti, kao što su netoksične kvaterne amonijeve soli, amini, šećeri, alkoholi, polioli i organske kiseline. Upravo zbog svog prirodnog podrijetla, od ovih otapala se očekuje da osiguraju prirodno okruženje slično citosolu za različite biomolekule, omogućujući im da zadrže svojstva koja nalikuju onima opaženim u njihovom prirodnom okruženju. Naime, u bezvodnom obliku ili s vodom kao dodatnom komponentom, ovi sustavi ne samo da omogućuju izvrsnu topljivost raznih biomolekula, već također mogu stabilizirati širok raspon komercijalno važnih molekula prirodnog podrijetla (DNA, biološki aktivni spojevi, lijekovi, proteini i enzimi) stvarajući mrežu vodikovih veza koje pogoduju stabilnim strukturnim konformacijama (Cvjetko Bubalo i sur., 2023). Kao funkcionalni tekući mediji, vrste NADES-a mogu otopiti prirodne ili sintetičke kemikalije niske topivosti u vodi (Liu i sur., 2018). Istraživanje NADES-a brzo se proširilo posebno na procjenu izvedivosti njihove primjene u različitim područjima kao što je ekstrakcija (ciljanih) bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora, kao medija za enzimske ili kemijske reakcije, konzervansa labilnih spojeva ili kao nosača spojeva koji nisu topivi u vodi za farmaceutske svrhe (Vanda i sur., 2018).

2.2. STABILIZACIJA PROTEINA U TEKUĆIM FORMULACIJAMA

Stabilizacija proteina prioritet je za nekoliko važnih područja, a ponajprije za farmaceutsku industriju. Glavna prepreka u razvoju proteinskih lijekova je izazov održavanja proteina u nativnom obliku tijekom obrade i također tijekom skladištenja. Kada je protein izvan svog prirodnog okoliša, često je nestabilan i sklon denaturaciji. Budući da je trodimenzionalna struktura proteina često odgovorna za njegovu funkcionalnu aktivnost, mnogo je rada posvećeno pronalaženju spojeva i strategija koje će pomoći stabilizirati proteine izvan njihovog prirodnog okoliša. Dok je dugi vijek trajanja mnogih proteina, uključujući terapijske proteine, postignut liofilizacijom i sušenjem smrzanjem, isti protein u tekućoj formulaciji može biti stabilan samo danima ili tjednima zbog interakcija otapalo-protein (Vrikkis i sur., 2009).

Konačna formulacija mora osigurati stabilnost tijekom biofarmaceutskog 'životnog ciklusa', koji uključuje proizvodnju, otpremu, trenutnu primjenu ili kratkoročno skladištenje prije primjene. U tom kontekstu, osmoliti se rutinski koriste kao pomoćne tvari u farmaceutskim formulacijama proteina kako bi se spriječila ireverzibilna agregacija, modulirala temperatura toplinskog prijelaza i spriječilo smanjenje enzimske aktivnosti (Włodarczyk i sur., 2019).

Osmoliti su male organske molekule koje živi organizmi proizvode i akumuliraju kako bi se prilagodili promjenjivim teškim uvjetima (Singh i sur., 2011). Prema teoriji zamjene vode, šećeri stabiliziraju proteine zamjenjujući vodikove veze između vode i proteina, što rezultira održavanjem prirodne konformacije proteina. Općenito, upotreba osmolita je korisna za formulacije, a te male molekule su učinkovite u zaštiti nativnog oblika proteina od denaturacije (Wlodarczyk i sur., 2018).

Znanstvenici koji se bave formulacijom lijekova suočavaju se s izazovom stvaranja tekućih vodenih formulacija za proteine koji nikada nisu imali evolucijski pritisak da budu iznimno stabilni ili topljivi. Ipak, komercijalni proizvodi obično trebaju rok trajanja od 2 godine da bi bili ekonomski održivi. Za znanstvenike koji se bave formulacijom, prednost razumijevanja mehanizama koji stoje iza stabilizacije i topljivosti proteina u malim molekulama je u tome što bi to omogućilo predviđanje njihove učinkovitosti. To bi zauzvrat omogućilo dizajn tekućih proteinskih formulacija s prihvatljivom vjerojatnošću uspjeha (Bye i sur., 2014).

Većina komercijalnih tekućih formulacija proteina kombinacija je soli, malih organskih molekula, proteina i vode. Postoji ograničen broj prihvaćenih pomoćnih tvari (ekscipijensa, neaktivnih sastojaka u lijekovima) koje prihvaćaju regulatorna tijela, a regulatorne prepreke koče razvoj novih alternativnih stabilizatora (Bye i sur., 2014).

U tekućim formulacijama veliki problem stvara kretanje proteina i lako kretanje potencijalnih denaturirajućih agensa kroz otopinu. Kretanje proteina dovodi do izlaganja osjetljivih mjesta na proteinu, a difuzija degradanta omogućuje potencijalnim degradantima da učinkovito dosegnu ta mjesta. Na ovu dinamiku mogu utjecati bilo koje dodatne vrste u otopini, osim proteina i vode. Stoga pomoćne tvari mogu utjecati na bilo koji proces kemijske razgradnje (Manning i sur., 2018).

Stabilizacija proteina inducirana otapalom specifična je i povezana s pomoćnim tvarima u formulaciji, no postiže se jačanjem snaga stabilizacije proteina, destabilizacijom denaturiranog stanja ili izravnim vezanjem pomoćnih tvari na protein (Wang , 1999). Osim toga, struktura vode koja okružuje presavijeni protein od velike je važnosti za održavanje strukture proteina, pa se ekscipijenti obično dodaju kako bi se nadomjestile nedostajuće interakcije (tj. nastale sušenjem) ili povećale interakcije (tj. stabilizirale) (Mattos i Clark, 2008.). S druge strane, u prisutnosti stabilizirajuće pomoćne tvari, protein je preferirano hidratiziran (ili je ekscipijent preferirano isključen), to jest, više molekula vode nalazi se na površini proteina nego u masi, a takav proces vjeruje se da stabilizira protein (Bayat i sur., 2018; Timasheff, 2002).

2.2.1. Ekscipijensi u formulaciji proteina

Razni ekscipijensi se koriste za stabilizaciju proteina, suzbijanje agregacije proteina, smanjenje površinske adsorpcije ili jednostavno osiguravanje fiziološke osmolalnosti. Stabilizatori obuhvaćaju širok raspon molekula uključujući šećere, soli, polimere, površinski aktivne tvari i aminokiseline, posebice arginin. Učinci ovih pomoćnih tvari na stabilnost proteina u otopini uglavnom su uzrokovani njihovom interakcijom s proteinom i površinom spremnika, i što je najvažnije s vodom. Neki ekscipijensi stabiliziraju proteine u otopini izravnim vezanjem, dok drugi koriste niz temeljno različitih mehanizama koji uključuju neizravne interakcije (Ohtake i sur., 2011). Tradicionalno, pomoćne tvari u tekućim formulacijama biraju se kako bi se povećala topljivost proteina ili kako bi se spriječili neželjeni procesi kao što su denaturacija, agregacija ili oksidacija (Vrikkis i sur., 2009).

Da bi se razumjela uloga pomoćnih tvari (ekscipijesa), mora se razmotriti priroda reakcije razmatanja proteina. Da bi se protein razmotao, nekovalentne veze (vodikove veze, van der Waalsove sile) moraju se prekinuti, a novoizložena hidrofobna jezgra proteina mora se hidratizirati (Makhatadze i Privalov, 1990). Da bi pomoćna tvar utjecala na stabilnost proteina, mora ili izravno promijeniti snagu strukture proteina (promatrano kada je ligand vezan za protein) ili mora doći do promjene u slobodnoj energiji povezanoj s hidratacijom novoizložene jezgre (Bye i sur., 2014).

Aminokiseline, kao što su glicin, arginin i prolin, naširoko su korišteni ekscipijensi, iako se smatra da njihovo djelovanje na stabilnost i topljivost proteina nalikuje onima kozmotropskih soli. Uočeni su složeniji trendovi, vjerojatno zbog složenije strukture aminokiselina u usporedbi s anorganskim solima i kao takve raznolikijih mogućnosti za interakcije s proteinima (Santoro i sur., 1992; Falconer i sur., 2011). Zbog toga je teže predvidjeti kako će osmoliti utjecati na proteine u tekućim formulacijama, posebno jer se pokazalo da miješane otopine osmolita, reprezentativne za staničnu okolinu, imaju neaditivne učinke na stabilnost (Batra i sur., 2009). Nadalje, utvrđeno je da određeni broj osmolita destabilizira proteine pod određenim uvjetima. Klasičan primjer ovoga je arginin, prirodna aminokiselina koja se koristi u formulacijama za povećanje topljivosti proteina i smanjenje agregacije koja bi, ako djeluje kao tradicionalni kaotrop, trebala imati negativan učinak na stabilnost proteina (Bye i sur., 2014).

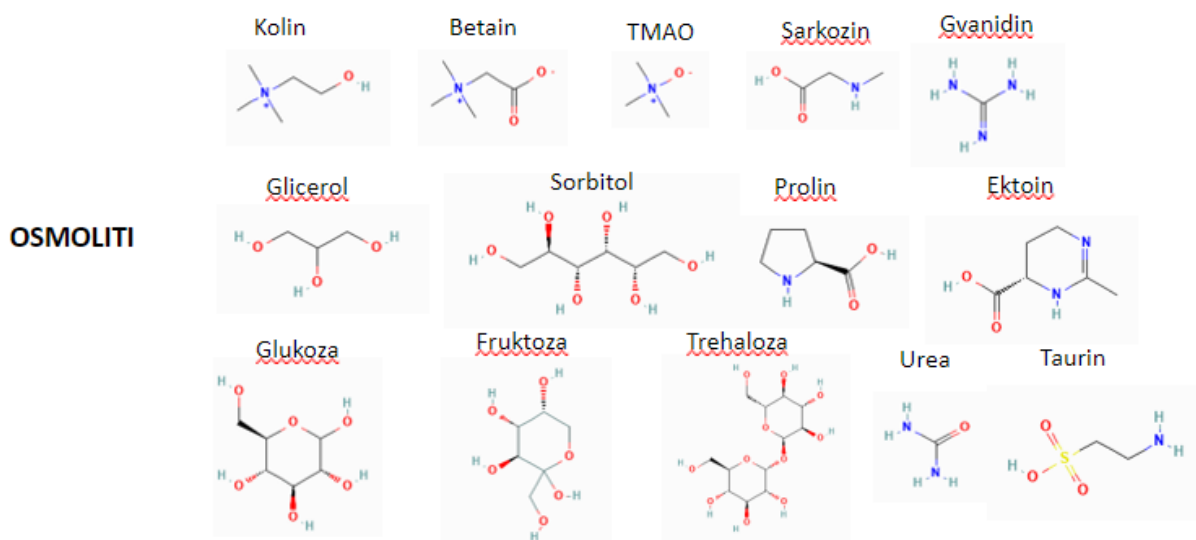
2.2.2. Osmoliti kao ekscipijensi u formulaciji proteina

Osmoliti su male organske molekule koje stanice nakupljaju kao odgovor na okolišne stresove. Predstavljani su aminokiselinama, šećerima, poliolima, tercijarnim sulfonijevim i kvarternim amonijevim spojevima. Ove molekule imaju zaštitno ponašanje i pogoduju ravnoteži

makromolekula prema prirodnom obliku, sprječavajući denaturaciju i potičući savijanje proteina. Proteinske formulacije zbog svoje biološke prirode zahtijevaju veću brigu tijekom proizvodnog procesa s obzirom da može doći do denaturacije, inaktivacije i/ili agregacije proteina. Ovi nedostaci mogu se prevladati korištenjem osmolita kao ekscipijensa u proteinskim formulacijama kao stabilizatora, sredstava za povećanje volumena, pa čak i pufera (Włodarczyk i sur., 2018). Smatra se da su učinci osmolita na stabilnost proteina opći i iznimno učinkoviti, što ih čini glavnim kandidatima za uspješne pomoćne tvari (ekscipijense) te se smatraju moćnim stabilizatorima proteina, koji mogu izbjeći denaturaciju ili agregaciju (Chen i sur., 2015). Prepoznate su tri klase osmolita: polihidrični alkoholi, aminokiseline i njihovi derivati te mješavine metilamina i uree (Bye i sur., 2014; Yancey i sur., 1982).

Gubitak unutarnje vode zbog suše, ekstremnih temperatura ili bolesti koje uzrokuju osmotsku neravnotežu, uobičajena je prijetnja jer rezultira visokim koncentracijama soli i organskih otopljenih tvari. Kako bi održali osmotsku ravnotežu s okolinom i spriječili poremećaje koji mogu uzrokovati strukturne promjene u staničnim proteinima, većina organizama koristi osmolite, električki neutralne i netoksične organske molekule (Czech i sur., 2018). Ovim svestranim organskim spojevima pripisuje se nekoliko bioloških funkcija, među kojima je najizraženija povećanje termodinamičke stabilnosti makromolekula bez ugrožavanja njihove prirodne funkcionalnosti (Cvjetko Bubalo i sur., 2023).

Svi poznati osmoliti mogu se grupirati u nekoliko glavnih kemijskih kategorija: (i) polioli i šećerni polioli (npr. glicerol, sorbitol, ksilitol) (ii) šećeri i njihovi derivati (npr. glukoza, saharoza, trehaloza) akumulirani uglavnom u biljkama, kukcima i polarnim ribama; (iii) aminokiseline i njihovi derivati (npr. glicin, prolin, ektoin, taurin) koji se nalaze uglavnom u prokariotskim stanicama i biljkama; (iv) metilamini (npr. trimetilamin-*N*-oksid - TMAO, sarkozin, betain) koji se nalaze uglavnom u morskim ribama i biljkama; (v) metilsulfonijevi spojevi (npr. dimetilsulfoniopropionat - DMSP) koji se nalaze u morskim organizmima; (vi) Y konjugirani spojevi (npr. uree i gvanidini) koje koriste sisavci i morski svijet (slika 2) (Kushwah i sur., 2020; Hasan i sur., 2019).



Slika 2. Primjer prirodno prisutnih osmolita u organizmima (*prema* Cvjetko Bubalo i sur., 2023)

Na temelju interakcije osmolita s makromolekulama, posebno proteinima, kategorizirani su u dvije velike skupine: "kozmotropi" (stabilizirajući) i "kaotropi" (destabilizirajući) (Street i sur., 2006). Urea, gvanidin hidroklorid (gvanidin HCl) i arginin (Arg) su denaturirajući osmoliti, koji se obično nazivaju kaotropima, jer je uočeno da remete strukturu i funkciju makromolekula. S druge strane, metilamini i metilsulfonijevi spojevi, ugljikohidrati, polioli, aminokiseline i njihovi derivati nazivaju se kozmotropima i kompatibilnim otopljenim tvarima jer guraju ravnotežu savijanja proteina prema izvornom obliku u raznim stresnim situacijama, često suprotstavljajući se destabilizirajućem učinku kaotropa (Yancey, 2004). Iako su općenito netoksični i kompatibilni s citoplazmatskim proteinima u širokim rasponima koncentracija, mnogi kozmotropi mogu biti štetni pri visokim koncentracijama u nedostatku kaotropa. Na primjer, pri visokim koncentracijama TMAO inhibira neke enzime i pojačava stvaranje nefunkcionalnih proteinskih agregata *in vitro* (Cvjetko Bubalo i sur., 2023; Devlin i sur., 2001).

Već duže vrijeme znanstvenici nastoje razjasniti molekularni mehanizam kojim kozmotropi, posebno TMAO, stabiliziraju proteine u prisutnosti kaotropa uree. "Neizravni mehanizam" kaže da osmoliti utječu na ponašanje proteina u savijanju mijenjajući strukturu medija interakcijom s okolnim molekulama vode i naknadno modulirajući (slabeći ili jačajući) mrežu H-veza vode i njezina termodinamička svojstva. Nasuprot tome, pristup "izravnog mehanizma" predlaže da osmolit izravno komunicira s peptidima ili aminokiselinskim bočnim lancima proteinske okosnice kako bi stabilizirao nativno savijanje proteina. S obzirom na vrlo složenu interakciju s makromolekulama nailazimo na paradoks prekomjerne stabilizacije: pokazalo se da kozmotrop (TMAO) stabilizira protein više u prisutnosti kaotropa (uree) nego sam (Rösgen,

2014; Rösger i Jackson-Atogi, 2012). Prisutnost osmolita u određenim kombinacijama i omjerima u prirodi prvenstveno je povezana s činjenicom da, u određenim molarnim omjerima, kozmotropi, poput metilamina i aminokiselina, mogu uravnotežiti štetne učinke uree na proteine i druge makromolekule (Yancey, 2004). Također je zabilježeno da je sadržaj TMAO kozmotropa visok u organizmima dubokih mora samo kada je prisutan očiti kaotrop, uglavnom urea. Zbog toga kombinaciju kozmotropa i kaotropa na ravnotežu savijanja proteina treba razmotriti na način koji priznaje ne samo kumulativne već i sinergijske učinke između komponenti sustava (Cvjetko Bubalo i sur., 2023; Holthauzen i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Betain, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Dimetilsulfoniopropionat, DMSP, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD
- Ektoin, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD
- Gvanidin hidroklorid, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Nile crvena solvatokromna proba, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Taurin, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD
- Trimetilamin-*N*-oksid, TMAO, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD
- Urea, p.a. Sigma-aldrich, St. Louis, SAD

3.1.2. Otopine i puferi

- Kalij-fosfatni pufer (pH 7)

2,336 g K_2HPO_4 i 1,577 g KH_2PO_4 otopi se u destiliranoj vodi u ukupnom volumenu od 250 mL

3.1.3. Enzimi i supstrati

- Suspenzija bakterije *Micrococcus lysodeikticus* u PBS puferu (7 mg/ml)
- Lizozim iz bjelanjka jaja pileta, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete, Deltalab, Španjolska
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Homogenizator/inkubator ES-20/60, Biosan, Latvija
- Laboratorijska tresilica, KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (epruvete, stalak za epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete, laboratorijske čaše)
- Magnetska miješalica s grijanjem, Technica, Železnik, Slovenija
- Mikropipete Eppendorf (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1 mL, 5 mL)
- Piknometar, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- Univerzalni uređaj za mjerenje pH, mV/ORP i iona Mettler Toledo/S220
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYS TM 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema i karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

3.2.1.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

Niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita (osmoDES) pripremaju se tako da se u staklenoj bočici ($V = 20$ mL) pomiješaju dvije ili više komponenti prema zadanom molarnom omjeru uz dodatak 40 % (w/w) vode. Korištene komponente i njihove pripadajuće mase za pripremu osmoDES-ova prikazane su u tablicama 2 i 3. Reakcijska smjesa zagrijava se pola sata na magnetskoj mješalici pri temperaturi od 60 °C. Reakcija je gotova kada nastane bistra, bezbojna i homogena tekućina. Otapala se čuvaju na sobnoj temperaturi do daljnje upotrebe.

Tablica 2. Pripremljena dvokomponentna niskotemperaturna eutektička otapala

Puni naziv DES-a	Kratica	Molarni omjer	m (komponenta 1) [g]	m (komponenta 2) [g]	m (voda) [g]
Ektoin:Urea	Ect:U	1:2	1,85	1,56	2,27
Ektoin:Gvanidin	Ect:G	1:2	1,42	1,91	2,22
Ektoin:Glicerol	Ect:Gly	1:2	1,42	1,84	2,18
Trimetilamin- <i>N</i> -oksid:Urea	TMAO:U	1:1	2,44	1,32	1,76
Trimetilamin- <i>N</i> -oksid:Gvanidin	TMAO:G	1:1	2,44	2,11	1,76
Trimetilamin- <i>N</i> -oksid:Glicerol	TMAO:Gly	1:2	2,22	3,68	2,00
Kolin-klorid:Urea	ChCl:U	1:2	1,82	1,56	2,25
Kolin-klorid:Gvanidin	ChCl:G	1:2	1,40	1,91	2,20
Kolin-klorid:Glicerol	ChCl:Gly	1:2	1,40	1,84	2,16
Betain:Urea	Bet:U	1:1	2,23	1,14	2,24
Betain:Gvanidin	Bet:G	1:2	1,29	2,10	2,26
Betain:Glicerol	Bet:Gly	1:2	1,29	2,03	2,21
Dimetilsulfoniopropionat: Urea	DMSP:U	1:2	1,88	1,32	2,13
Dimetilsulfoniopropionat: Gvanidin	DMSP:G	1:2	1,54	1,72	2,17
Dimetilsulfoniopropionat: Glicerol	DMSP:Gly	1:2	1,54	1,66	2,13

Tablica 3. Pripremljeno višekomponentno niskotemperaturno eutektičko otapalo

Puni naziv DES-a	Kratica	Molarni omjer	m (komponenta) [g]	m (voda) [g]
Trimetilamin- <i>N</i> -oksid:Betain:Taurin:Urea	TMAO:Bet:Tau:U	1:6:0,5:15	0,22:1,41:0,13:1,80	2,20

3.2.1.2. Karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita primjenom infracrvene spektroskopije sa Furijerovim transformacijama

Struktura pripremljenih osmoDES-ova potvrđena je putem infracrvene spektroskopije s Furijerovim transformacijama (FTIR), tehnike koja se oslanja na infracrveno zračenje kako bi analizirala molekularnu strukturu. U postupku, pripremljeni uzorak se postavlja unutar infracrvenog spektrometra, gdje se usmjerava infracrveno zračenje na njega. Infracrveni (IR) spektri su snimljeni na FTIR spektrometru opremljenom modulom prigušene totalne refleksije s dijamantnim ATR kristalom u rasponu od 4000 do 400 cm^{-1} s razlučivošću od 4 cm^{-1} .

3.2.1.3. Karakterizacija fizikalno-kemijskih svojstava niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

Provodila su se mjerenja različitih fizikalno-kemijskih svojstava te su analizirani parametri uključivali su ispitivanje polarnosti, mjerenje pH vrijednosti te određivanje gustoće otapala pri sobnoj temperaturi od 25 °C.

Mjerenje polarnosti

Polarnost svakog eutektičkog otapala određena je pomoću *Nile red* solvatokromne probe. Za tu svrhu, pripremljena je matična otopina solvatokromne probe koncentracije 1,0 g/L u etanolu i čuvala se na temperaturi od 4 °C. Uzorci za spektrofotometar priređeni su u Eppendorf epruветama od 2 mL prema sljedećem postupku: 0,5 mL stock otopine *Nile reda*, razrijeđene 100 puta, pomiješane su s 1,5 mL uzorka. Kontrolna mjerenja obavljena su s upotrebom polarnog otapala, vode, i nepolarnog otapala, heksana. Nakon toga, 800 μl pripremljenog uzorka dodano je u kivetu koji je postavljen u spektrofotometar. Mjerenje apsorbancije obavljeno je u rasponu od 340-800 nm primjenom UV/VIS spektrofotometra.

Mjerenje pH vrijednosti

Vrijednost pH u osmoDES-ovima određena je korištenjem univerzalnog uređaja za mjerenje pH, koji je bio prethodno kalibriran. Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi od 25 °C tako da je elektroda uronjena u otapalo, a nakon stabilizacije izmjerene su vrijednosti pH koje su bile prikazane na uređaju.

Mjerenje gustoće

Gustoća otapala je određena korištenjem piknometra, specifičnog instrumenta dizajniranog za precizno mjerenje gustoće tekućina. Približno 2 mL svakog otapala dodano je u piknometar.

Nakon zatvaranja piknometra, višak tekućine je iscurio van, omogućavajući precizno određeni volumen otapala. Masa piknometra s otapalom zatim je izmjerena pomoću vage. Oduzimanjem mase praznog piknometra od ukupne mase dobivena je masa konkretnog osmoDES-a. Gustoća osmoDES-a zatim je izračunata korištenjem mase otapala i poznatog volumena piknometra.

3.2.2. Određivanje stabilosti proteina lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri visokim temperaturama

3.2.2.1. Praćenje agregacije lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita tijekom inkubacije pri 90 °C

Agregacija proteina lizozima u osmoDES-ovima praćena je korištenjem UV/VIS spektrofotometra. Kod stvaranja agregata, praćene su promjene u zamućenosti proteinske otopine, koje su bile vidljive povećanjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm. Za potrebe eksperimenta, otopina lizozima u osmoDES-ovima i PBS puferu koncentracije 5 mg/ml izložene su toplinskom tretmanu. Kako bi se očuvali uzorci i spriječilo isparavanje tijekom grijanja na visokim temperaturama, kivete s uzorkom su bile pokrivene slojem parafinskog ulja. Uzorci su zatim bili zagrijavani u izotermalnoj komori unutar spektrofotometra na temperaturi od 90 °C tijekom jednog sata.

3.2.2.2. Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri 80 °C

Ispitivanje stabilnosti proteina lizozima provodilo se u osmoDES-ovima te u referentnom puferu i referentnom otapalu, praćenjem promjene enzimske aktivnosti. Promjena enzimska aktivnost praćena je nakon inkubacije lizozima na temperaturi od 80 °C tijekom sat vremena, koristeći UV/VIS spektrofotometrijsku metodu.

Uzorci lizozima koncentracije 5 mg/ml pripremljeni su u različitim osmoDES-ovima te u 10 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7). Za mjerenje enzimske aktivnosti, 525 µl 10 mM kalijevog fosfatnog pufera (pH 7) stavljeno je u plastičnu kivetu, zajedno s 30 µl prethodno pripremljene suspenzije bakterija *Micrococcus lysodeikticus* u sterilnom PBS puferu (7 mg/ml). Nakon dodavanja 30 µl otopine lizozima u odgovarajućem otapalu, reakcija je započela. Neposredno nakon miješanja, kiveta je postavljena u UV/VIS spektrofotometar radi mjerenja apsorbancije na valnoj duljini od 450 nm. Postupak je ponovljen nakon što je lizozim bio inkubiran na temperaturi od 80 °C tijekom jednog sata. Relativna aktivnost (%) izračunata je na temelju početne brzine reakcije koju je enzim postigao nakon inkubacije, u usporedbi s onom

izmjerenoj prije izlaganja uvjetima inkubacije.

3.2.3. Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri niskim temperaturama

Ispitivanje stabilnosti proteina lizozima provodilo se u osmoDES-ovima te u referentnom puferu, praćenjem promjene enzimske aktivnosti. Promjena enzimska aktivnost praćena je kroz pet ciklusa inkubacije pri niskim temperaturama od $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, koristeći UV/VIS spektrofotometrijsku metodu.

Pripremljeni uzorci lizozima s koncentracijom od 5 mg/ml , otopljeni u osmoDES-ovima ili 10mM kalij-fosfatnom puferu ($\text{pH } 7$), podvrgnuti su pet ciklusa postupka zamrzavanja na temperaturama od $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom petodnevnog razdoblja, pri čemu je svaki ciklus trajao 24 sata. Uzorci pohranjeni u hladnjaku su nakon svakog ciklusa zamrzavanja izvađeni i ostavljeni da se odmrznu na sobnoj temperaturi od $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ prije nego što su podvrgnuti daljnjim mjerenjima. Postupak mjerenja enzimske aktivnosti bio je identičan onome što je opisano u odjeljku 3.2.2.2. za termostabilizaciju. Relativna aktivnost (%) izračunata je na temelju početne brzine reakcije koju je enzim postigao nakon razdoblja zamrzavanja, u usporedbi s onom izmjerenoj prije izlaganja uvjetima zamrzavanja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Koncept zelene kemije je sve više prisutan u raznim područjima istraživanja te se koristi u industriji, obrazovanju, zaštiti okolišta i u posljednje vrijeme je vrlo popularan u široj javnosti. Zelena kemija se bavi stvaranjem proizvoda i procesa koji su ekološki prihvatljivi i profitabilni te ne štete zdravlju ljudi (Anastas i Eghbali, 2010). Znanstvenici istražuju niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) kao obećavajuću alternativu zbog njihove sigurnosti, prilagodljivosti i jednostavne pripreme.

Stabilnost proteina je izuzetno bitna u svim kemijskim procesima. Prirodne makromolekule često su nestabilne u vodenoj otopini te samim time može doći do narušavanja native konformacije što dovodi do gubitka biološke funkcije. Stanice kao odgovor na teške uvjete okolišta i kao mehanizam biološke prilagodbe, proizvode i akumuliraju organske spojeve niske molekularne težine koji se nazivaju osmoliti (Włodarczyk i sur., 2019). Upotreba osmolita je vrlo korisna jer su osmoliti učinkoviti u zaštiti nativnog oblika proteina od denaturacije, stabilizaciji te njihova prisutnost u stanici ne mijenja u velikoj mjeri funkcionalnu aktivnost proteina (Włodarczyk i sur., 2018; Singh i sur., 2011).

Postoji velika strukturna sličnost između osmolita i uobičajenih komponenti DES-a. Osmoliti su obično prisutni u stanicama i tkivima u određenim kombinacijama i često u prilično strogim omjerima. Te kombinacije i omjeri su često nevjerojatno slični ili identični onima koji se koriste za pripremu sintetskih DES-ova (Cvjetko Bubalo i sur., 2023). Različite kombinacije osmolita tvore višekomponentne eutektičke sustave koji pomažu u održavanju native konformacije i funkcionalnosti proteina i drugih biomolekula u nepovoljnim uvjetima. Ova nova otkrića pružaju izvrsnu priliku za projektiranje novih otapala i sustava na bazi osmolita koji su izravno inspirirani prirodnim mikrokruženjem biomakromolekula i stoga ga mogu učinkovito oponašati (Cvjetko Bubalo i sur., 2023).

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj pripremljenih otapala na toplinski induciranu agregaciju te termodinamičku stabilnost modelnog proteina pri ekstremnim temperaturama (-80, -14 i 80 °C). Modelni protein korišten u istraživanju bio je lizozim. U tu svrhu pripremljeno je i detaljno karakterizirano dvanaest dvokomponentnih osmoDES-ova, kao i jedan bioinspirirani višekomponentni osmoDES, dizajniran repliciranjem molarnih udjela osmolita u mišićima morskog psa.

4.1.PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA BAZI OSMOLITA

4.1.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita (osmoDES) provodila se jednostavnim postupkom u kojem su polazne komponente pomiješane u određenom molarnom omjeru uz dodatak vode. Otopina je lagano zagrijavana uz miješanje dok se ne dobije homogena, bistra i bezbojna tekućina. Iskorištenja pripreve ovih otapala je 100 % iz čega možemo zaključiti da ne dolazi do nastajanja otpada tijekom sinteze. Upravo to potvrđuje ekološku prihvatljivost i ekonomsku održivost ovih otapala.

Pripremljeni su osmoDES-ovi koji se sastoje od različitih komponenti u specifičnim molarnim omjerima sa 40 % (w/w) udjela vode te su uz to pripremljeni referentni DES-ovi na bazi kolin-klorida s ureom, gvanidin hidrokloridom i glicerolom kao donatorom vodikove veze. Dvokomponentni osmoDES-ovi pripremljena su na bazi ektoina, trimetilamin-*N*-oksida (TMAO), betaina i dimetilsulfoniopropionata (DMSP) koji djeluju kao akceptori vodikove veze (HBA), uz ureu, gvanidin te glicerol kao donor vodikove veze (HBD). Višekomponentni osmoDES izrađen je na temelju analize raspodjele osmolita u mišićima hrskavične ribe (Yancey i sur., 2002), konkretno morskog psa *Dasyatis sabina*, i sastoji se od TMAO:betain:taurin:urea. Udio komponenata potrebnih za stvaranje ovog osmoDES-a izračunat je na temelju njihove koncentracije u odgovarajućim tkivima, a smjese su podvrgnute standardnim uvjetima za stvaranje osmoDES-a (tablica 4).

Tablica 4. Eksperimentalni podaci fizikalno-kemijskih svojstava osmoDES-ova

Kratica	Molarni omjer	Polarnost [kcal/mol]	pH	Gustoća [mg/cm ³]
Ect:U	1:2	48,92	6,77	1195,25
Ect:G	1:2	50,27	5,85	1192,80
Ect:Gly	1:2	49,78	6,27	1147,45
TMAO:U	1:1	49,79	9,60	1093,35
TMAO:G	1:1	49,81	9,04	1116,40
TMAO:Gly	1:2	50,43	9,06	1139,25
ChCl:U	1:2	48,98	7,70	1130,75
ChCl:G	1:2	48,81	4,74	1106,10
ChCl:Gly	1:2	49,60	6,18	1134,55
Bet:U	1:1	49,96	8,11	1140,20
Bet:G	1:2	49,06	5,76	1158,60
Bet:Gly	1:2	49,72	6,85	1146,40
DMSP:U	1:2	48,67	2,02	1190,45
DMSP:G	1:2	48,12	1,03	1186,85
DMSP:Gly	1:2	48,54	0,96	1182,30
TMAO:Bet:Tau:U	1:6:0,5:15	49,34	8,17	1156,95

*Ect-ektain, TMAO-trimetilamin-*N*-oksid, ChCl-kolin-klorid, Bet-betain, DMSP-dimetilsulfoniopropionat, Tau-taurin, U-urea, G-gvanidin, Gly-glicerol

4.1.2. Karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita primjenom infracrvene spektroskopije sa Furijerovim transformacijama

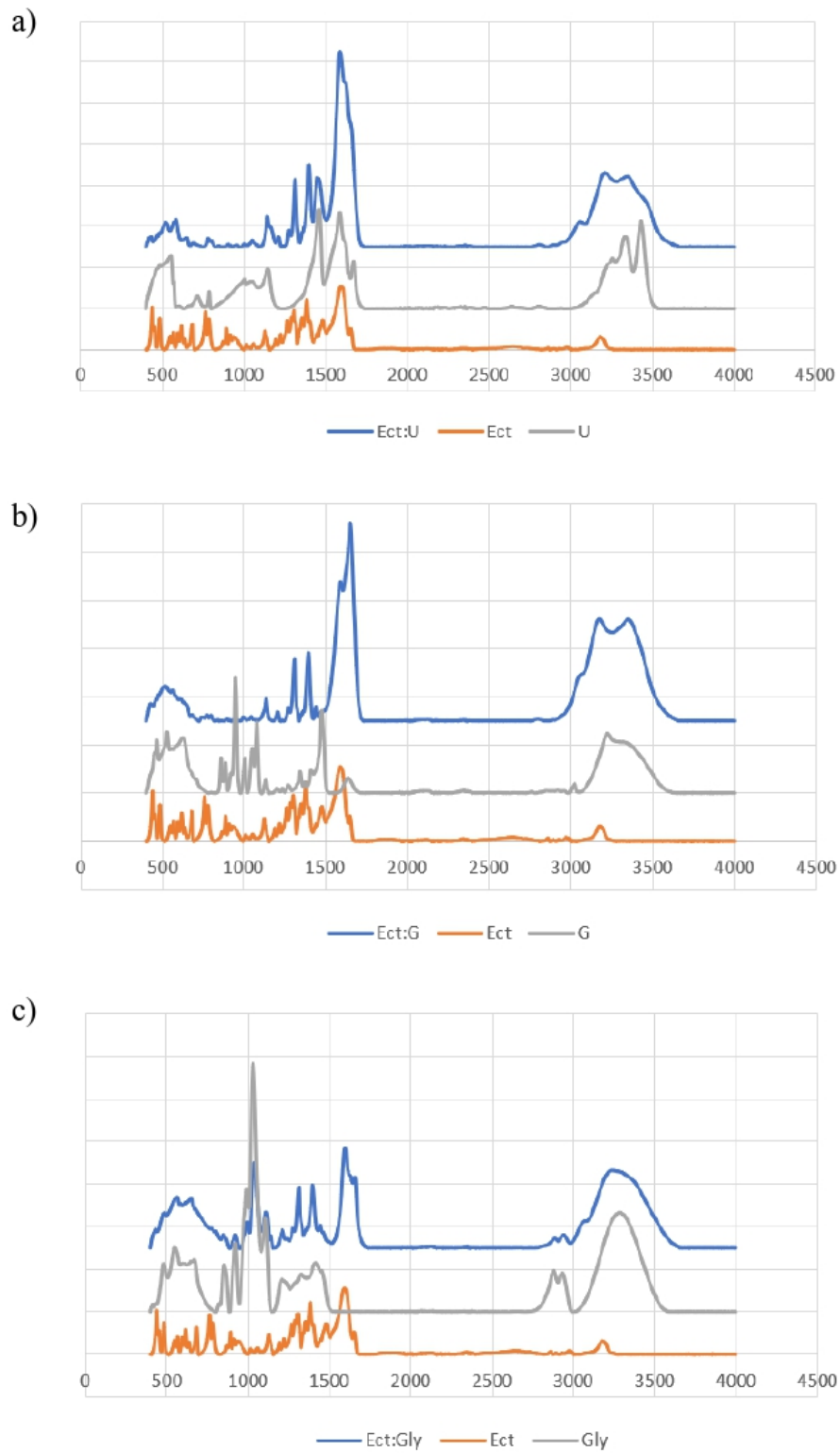
Struktura pripremljenih osmoDES-ova potvrđena je upotrebom analitičke metode infracrvene spektroskopije sa Furijerovim transformacijama (FTIR) koja je relativno jednostavna, ponovljiva, nedestruktivna i potrebne su samo male količine materijala uz minimalnu pripremu uzorka. Osim toga, ova metoda pruža informacije na molekularnoj razini omogućujući istraživanje funkcionalnih skupina, tipova veza i molekularnih konformacija. FTIR spektroskopija je posljedica promjena dipolnog momenta tijekom molekularne vibracije (Movasaghi i sur., 2008).

Infracrvena spektroskopija sa Furijerovim transformacijama (FTIR) korištena je za identificiranje strukture pripremljenih otapala. Rezultati su prikazani infracrvenim (IR) spektrima na slikama 2-7 koji omogućuju identifikaciju funkcionalnih skupina analizirajući apsorpciju infracrvenog zračenja. Infracrveni spektar prikazuje karakteristične vrpce povezane s funkcionalnim skupinama. Spektrometar bilježi promjene u intenzitetu zračenja u ovisnosti o valnoj duljini. Na apscisi (x-osi) se nalazi valni broj (cm⁻¹), dok je na ordinati (y-osi)

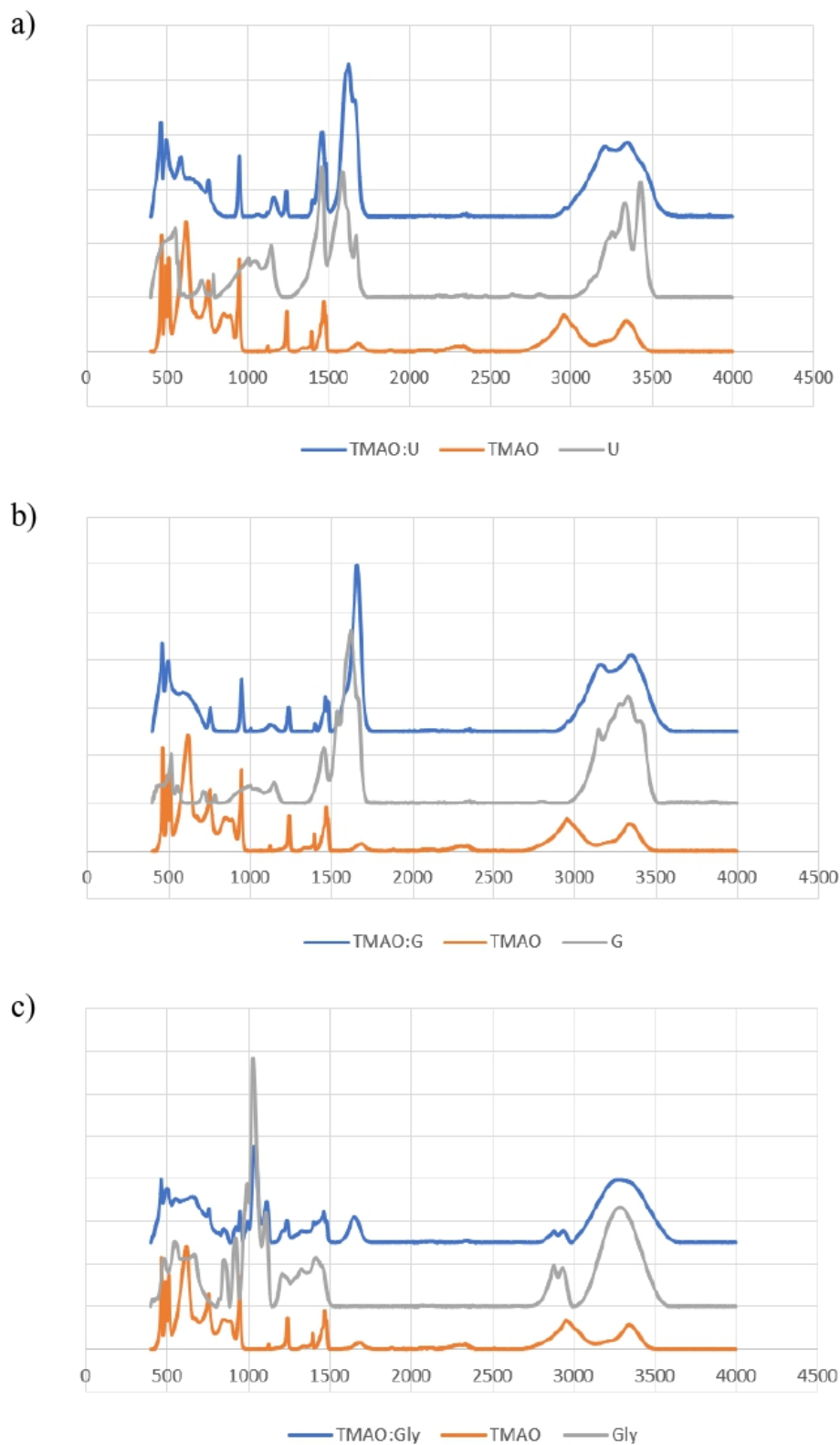
apsorbancija. Rezultat ovog postupka je infracrveni spektar koji vizualno prikazuje kako molekule u uzorku apsorbiraju infracrveno zračenje, potvrđujući njihovu strukturu.

Kod FTIR spektara čistih komponenti na bazi - TMAO (slika 4) vidljivi pikovi su sljedeći: široki pik od 3200 cm^{-1} do 3500 cm^{-1} koji je pripisan vibraciji N–H veze, zatim vrpca na 1600 cm^{-1} do 1700 cm^{-1} pripisana vibraciji pružanja C=N veze. Mali pikovi na 1300 cm^{-1} bili su posljedica –OH savijanja. N–O traka N-oksida pojavila se na 1200 cm^{-1} . Konačno, pikovi na oko 500 cm^{-1} odgovaraju C–N–C vezi u aminima (Lakshmi i sur., 2021). Kod otopina koje se sastoje od kolin-klorida (slika 5) kao HBA najkarakterističnije vrpce uključuju pikove u raspon od 3300 do 3500 cm^{-1} zbog vibracija N-H veze, vrpce prisutnu između 1000 do 1250 cm^{-1} koja proizlazi iz vibracija C-N veze, te vrpce u rasponu od 1600 do 1700 cm^{-1} uzrokovanu vibracijama C=O veze (Jakubowska i sur., 2020). Komponente na bazi betaina kao HBA, kako je prikazano na slici 6, također pokazuju karakteristični pik između 1600 i 1700 cm^{-1} , što ukazuje na prisutnost C=O veze. Kod otapala na bazi DMSP-a kao HBA (slika 7) pojavljuju se karakteristične vrpce na oko 1300 cm^{-1} (CH_2 vibracije), 1030 cm^{-1} (simetrično istežanje C–O–C veze) te vrpca od 3200 cm^{-1} do 3500 cm^{-1} , koja se pripisuje rastežanju OH skupine (Zeng i sur., 2019). Urea (slike 3a-7a i slika 8) posjeduje jednu karbonilnu skupinu, što rezultira pojavom vrpce C=O između 1600 i 1700 cm^{-1} zbog vibracija pružanja C=O veze, te vrpce između 3300 i 3500 cm^{-1} uzrokovane N-H vezama (Du i sur., 2016). Gvanidin (slika 3b-7b) pokazuje nekoliko karakterističnih vrpce uključujući vrpce N-H pri 3300 i 3500 cm^{-1} te vrpce između 1600 i 1700 cm^{-1} zbog vibracija pružanja C=O veze. Budući da gvanidin ima tri C-N veze, vrpca C-N pojavljuje se između 1000 i 1250 cm^{-1} zbog vibracija pružanja C-N veze. Kod glicerola (slika 3c-7c) kao donora vodikove veze, može se primijetiti karakteristična vrpca između 3200 i 3600 cm^{-1} , što ukazuje na vibraciju pružanja OH veze. Također, uočava se vrpca između 2800 i 3000 cm^{-1} , uzrokovana prisutnošću C-H veze (Selvanathan i sur., 2017).

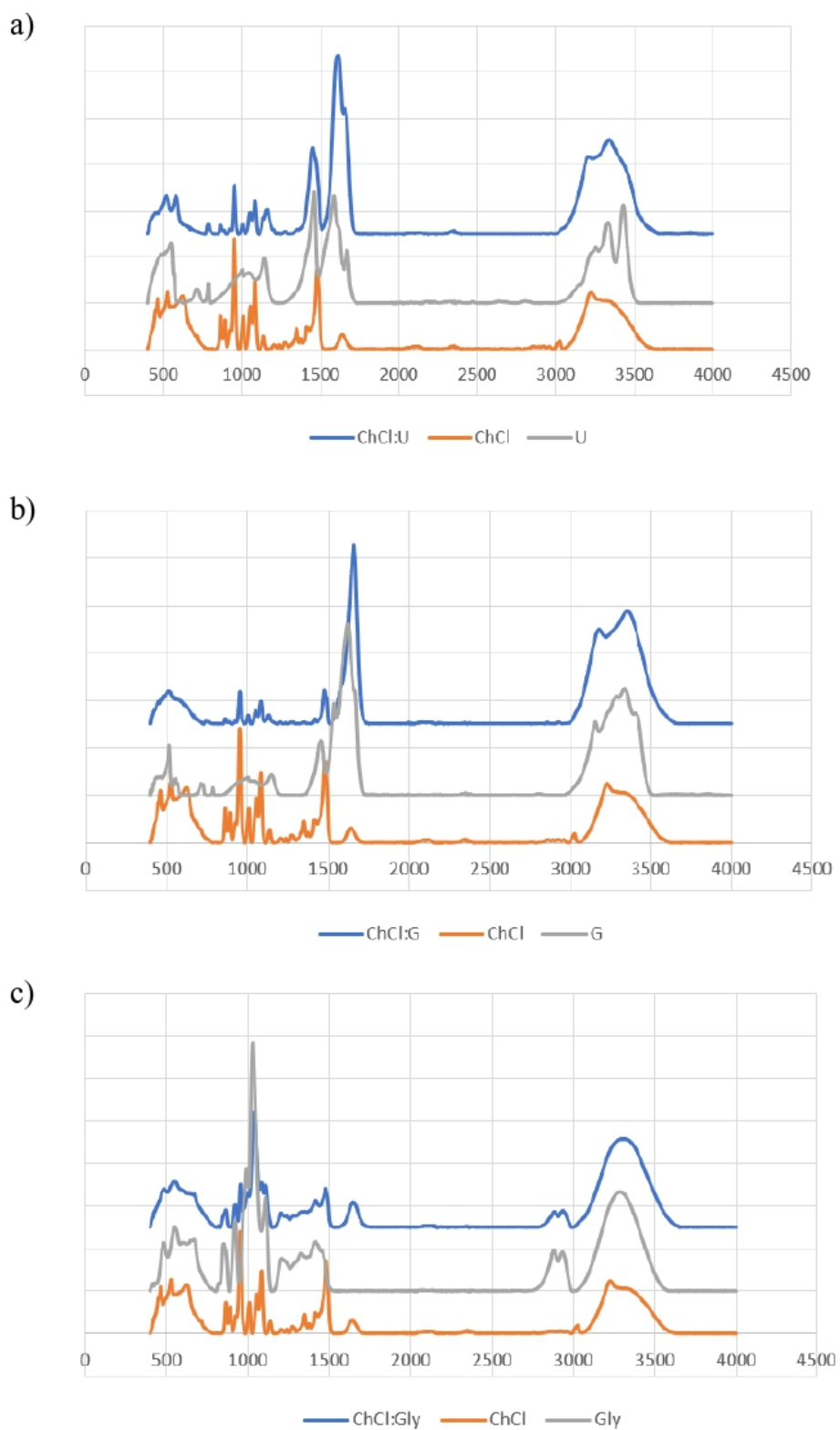
Formiranje osmoDES-ova potvrđeno je analizom FTIR spektara. Vrpca smještena između 3200 i 3600 cm^{-1} je prisutna na svim spektrima razvijenih otapala te ukazuje na prisutnost O-H vodikove veze nastale stvaranjem DES-ova, kako je ilustrirano na slikama 3-8 (Chrzanowska i sur., 2018). Dodatno, u spektru referentnog otapala temeljenog na kolin-kloridu, uočen je nestanak pika povezanog s simetričnim pružanjem grupe CCN (1000 cm^{-1}). Ovaj fenomen može biti povezan s uništenjem kristalne strukture čistih komponenti, što proizlazi iz procesa taljenja. Ovo potvrđuje promjene u molekularnoj strukturi uzrokovane formiranjem DES-ova.



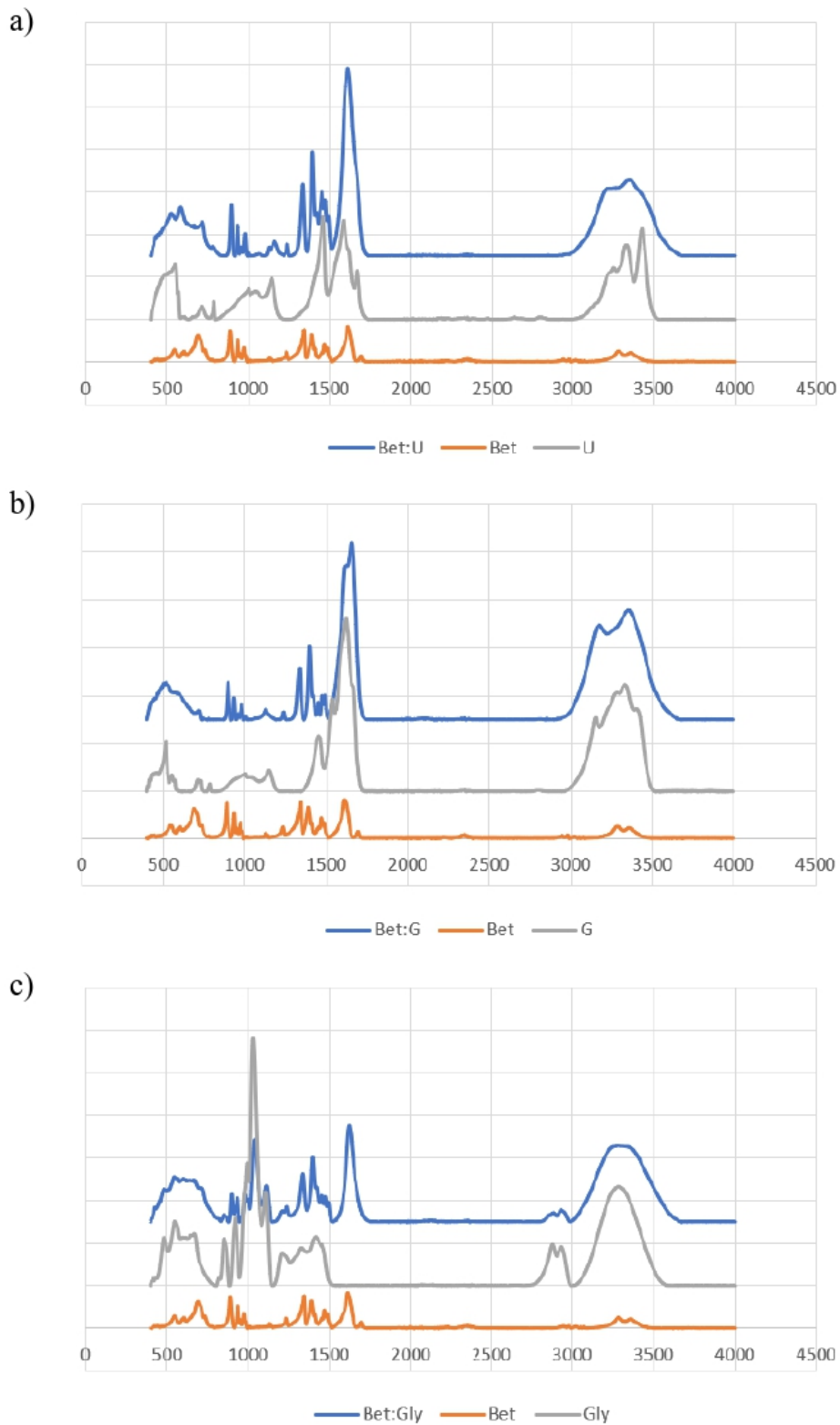
Slika 3. Usporedni prikaz infracrvenih spektara osmoDES-a na bazi ektoina: a) Ect:U, b) Ect:G, c) Ect:Gly i pojedinačnih komponenti od kojih je osmoDES pripremljen



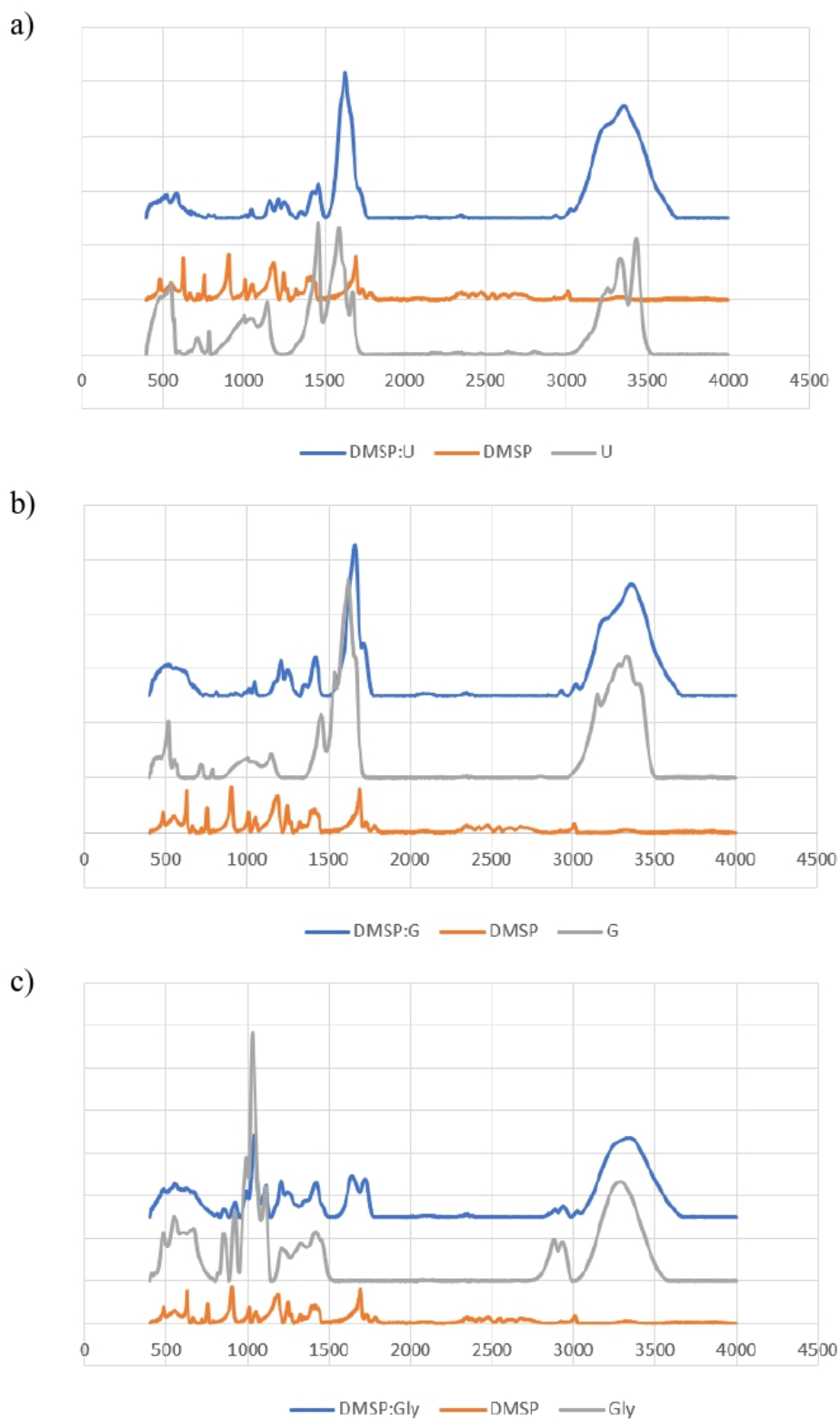
Slika 4. Usporedni prikaz infracrvenih spektara osmoDES-a na bazi TMAO: a) TMAO:U, b) TMAO:G, c) TMAO:Gly i pojedinačnih komponenti od kojih je osmoDES pripremljen



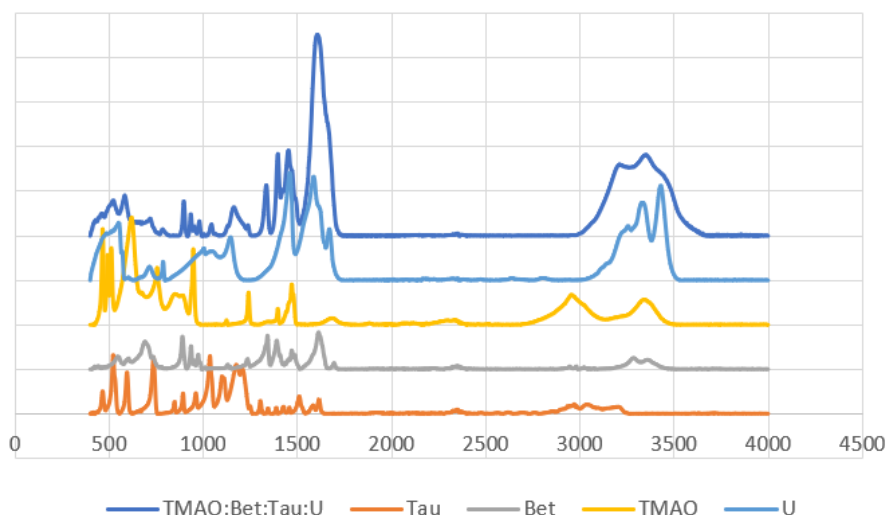
Slika 5. Usporedni prikaz infracrvenih spektara referentnog sustava na bazi kolin-klorida: a) ChCl:U, b) ChCl:G, c) ChCl:Gly te pojedinačnih komponenti od kojih je osmoDES pripremljen



Slika 6. Usporedni prikaz infracrvenih spektara osmoDES-a na bazi betaina: a) Bet:U, b) Bet:G, c) Bet:Gly i pojedinačnih komponenti od kojih je osmoDES pripremljen



Slika 7. Usporedni prikaz infracrvenih spektara osmoDES-a na bazi DMSP-a: a) DMSP:U, b) DMSP:G, c) DMSP:Gly i pojedinačnih komponenti od kojih je osmoDES pripremljen



Slika 8. Usporedni prikaz infracrvenih spektara bioinspiriranog višekomponentnog osmoDES-a: TMAO:betain:taurin:urea i pojedinačnih komponenti od kojih je osmoDES pripremljen

4.1.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

U okviru eksperimentalnog dijela istražene su fizikalno-kemijske karakteristike osmoDES-ova koji se temelje na ektoinu, TMAO, kolin-kloridu, betainu i DMSP-u, te bioinspiriranom koktelu morskog psa, čiji su eksperimentalni rezultati prikazani u tablici 4. Mjereni su parametri: polarnost, pH vrijednost i gustoća na temperaturi od 25 °C.

Provedbom ovih eksperimenata dobili smo vrijedne informacije o sastavu i međusobnim interakcijama komponenata unutar eutektičke smjese. To je znatno pridonijelo našem boljem razumijevanju karakteristika i ponašanja stvorenog osmoDES-a.

Polarnost

Poznavanje polarnosti osmoDES-ova daje uvid u razumijevanje važnih svojstava i interakcija otapala te pomaže u predviđanju njihove učinkovitosti u brojnim kemijskim procesima. Mjeri se pomak maksimuma apsorpcije te se izračunava vrijednost molarne tranzicijske energije (E_{NR}). Visoke vrijednosti E_{NR} odgovaraju nižoj polarnosti spojeva, a niske vrijednosti E_{NR} opisuju višu polarnost spojeva na skali polariteta za *Nile red*. Fizikalno-kemijska svojstva kao što su fotokemijska stabilnost, visoka topljivost u različitim otapalima i niska bazičnost čine *Nile red* prikladnom za mjerenje polariteta DES-a (Farooq i sur., 2020).

Vrijednosti molarne tranzicijske energije (E_{NR}) osmoDES-ova pri valnoj duljini od 450 nm variraju unutar raspona od 48,12 do 50,43 kcal/mol (tablica 4). Dai i sur. (2013) opsežno su

proučavali pripremu i svojstva više od stotinu DES-ova. Razumijevanje polariteta DES-ova bitno je za moduliranje njihovih sposobnosti otapanja i njihovih interakcija s biomolekulama. Pokazalo se da su oni DES-ovi koji posjeduju HBD organske kiseline najpolarniji, a DES-ovi na bazi šećera i poliola su manje polarni. Razlike u vrijednostima polarnosti između ispitanih osmoDES-ova nisu značajno velike. Otapalo DMSP:gvanidin (DMSP:G) pokazuje najveću polarnost, s vrijednošću molarne tranzicijske energije od 48,12 kcal/mol. S druge strane, najmanja polarnost zabilježena je kod otapala TMAO:glicerol (TMAO:Gly) s vrijednošću od 50,43 kcal/mol što je u skladu s očekivanim rezultatima s obzirom da je glicerol polirol koji smanjuje polarnost DES-ova (Dai i sur., 2013).

Vrijednost pH

Mjerenje i poznavanje pH vrijednosti važni su u mnogim primjenama, posebno u kemiji, kemijskom inženjerstvu, znanosti o okolišu i proučavanju korozivnosti različitih tekućina (Ghaedi i sur., 2018). Vrijednost pH se smatra najvažnijom karakteristikom DES-ova koja utječe na njegovu toksičnost. To znači da su DES-ovi, koji sadrže organske kiseline kao što je HBD (npr. oksalna, limunska, jabučna ili vinska kiselina) umjereno toksični (Radošević i sur., 2016; Paiva i sur., 2014). S druge strane, DES koji se sastoji od kolina, šećera i poliola manje je otrovan, vjerojatno zato što su ti sastojci prijeko potrebni za stanični metabolizam i stanice imaju veću toleranciju na njih (Rente i sur., 2022).

Kao što je vidljivo u tablici 4 raspon pH vrijednosti pripremljenih osmoDES-ova varira između 0,96 i 9,60 što ukazuje na raznolikost kiselih i bazičnih svojstava tih otapala.

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je najkiseliji osmoDES DMSP:glicerol (DMSP:Gly) s pH vrijednošću od 0,96, a najveću vrijednost pH, odnosno najveću bazičnost pokazuje otapalo TMAO:urea (TMAO:U) s pH od 9,60, što je u skladu s očekivanjima (Tiecco i sur., 2019). Također je vidljivo da otapala koja sadrže gvanidin kao donora vodikove veze (HBD) imaju nižu pH vrijednost od otapala drugih donora istog akceptora vodikove veze (HBA), osim u slučaju otapala DMSP:Gly gdje je pH vrijednost niža nego kod otapala DMSP:G. Otapala koja sadrže ureu kao HBD imaju viši pH u usporedbi s otapalima drugih donora u kombinaciji s istim akceptorom. Otapala na bazi DMSP-a kao akceptora vodikove veze imaju ukupno najniže vrijednosti pH, dok su najviše pH vrijednosti uglavnom zabilježene kada se koristi TMAO kao akceptor vodikove veze.

Imajući u vidu raspon pH vrijednosti otapala u priloženim podacima, možemo zaključiti da osmoDES-ovi prikazuju raznolik spektar kiselosti i bazičnosti što može biti od iznimnog značaja u dizajniranju osmoDES-ova jer pružaju različite mogućnosti za široku primjenu te se

moгу prilagoditi specifičnim potrebama procesa.

Gustoća

Analizom dobivenih podataka o gustoći prikazanih u tablici 4, vidljivo je da najveću gustoću ima otapalo ektoin:urea koja iznosi 1195,25 mg/cm³, a najmanja gustoća izmjerena je kod otapala TMAO:urea te iznosi 1093,35 mg/cm³. Svi osmoDES-ovi imaju veću gustoću od gustoće vode koja iznosi 1000 mg/cm³. U prosjeku otapala koja sadrže DMSP kao akceptora vodikove veze imaju najveću gustoću u usporedbi sa ostalim otapalima, a otapala koja sadrže TMAO kao akceptora vodikove veze imaju u prosjeku najnižu gustoću.

Varijacija gustoća ovih otapala s obzirom na različite kombinacije akceptora i donora vodikove veze omogućuje prilagodbu otapala prema željenim svojstvima.

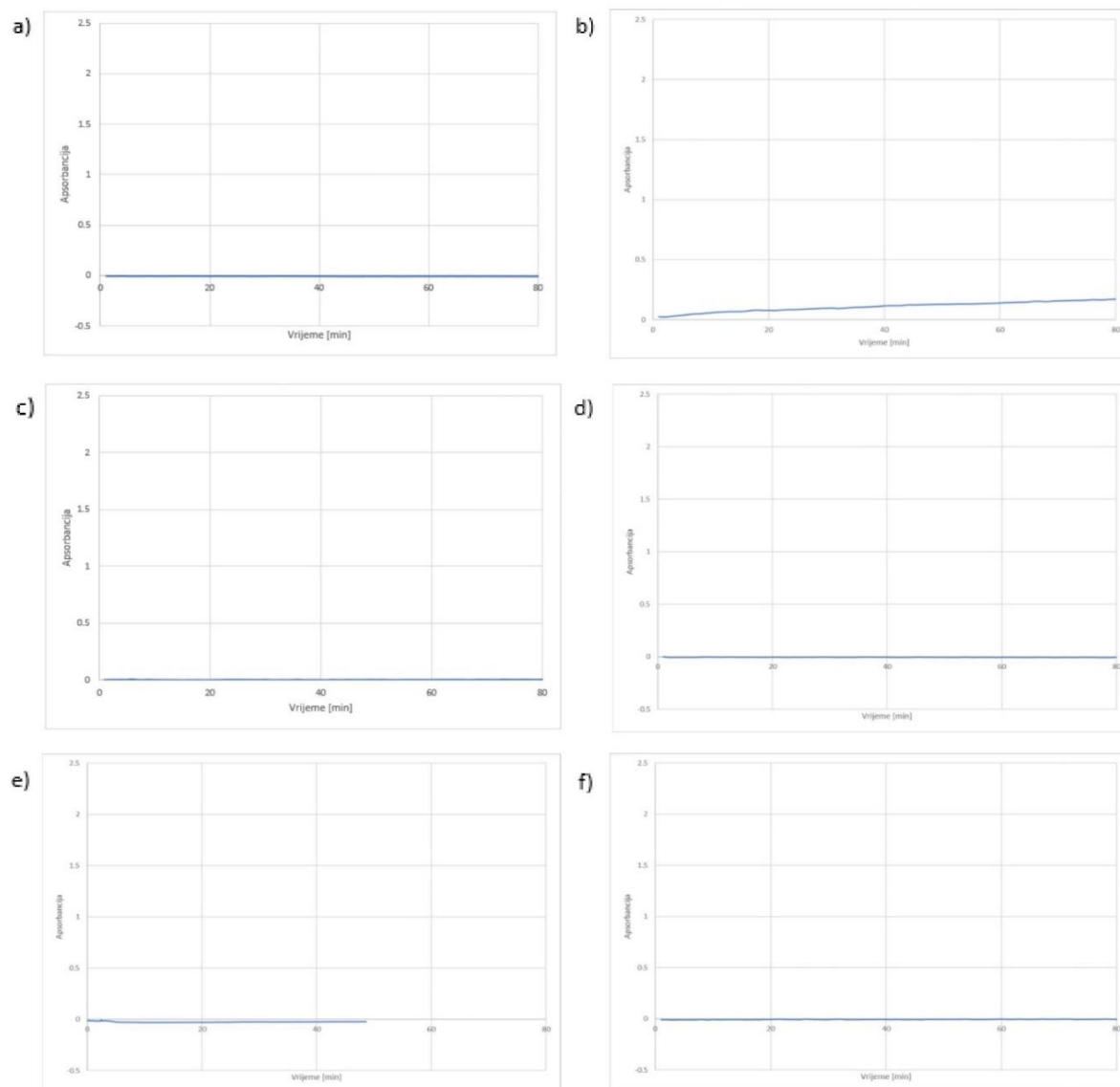
4.2. STABILNOST LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA

4.2.1. Agregacije lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita
Proteinski agregati mogu značajno utjecati na kvalitetu, sigurnost i/ili učinkovitost proizvoda pa je bitno ispitati dolazi li do agregacije proteina u osmoDES-ovima (Wang i Roberts, 2018).

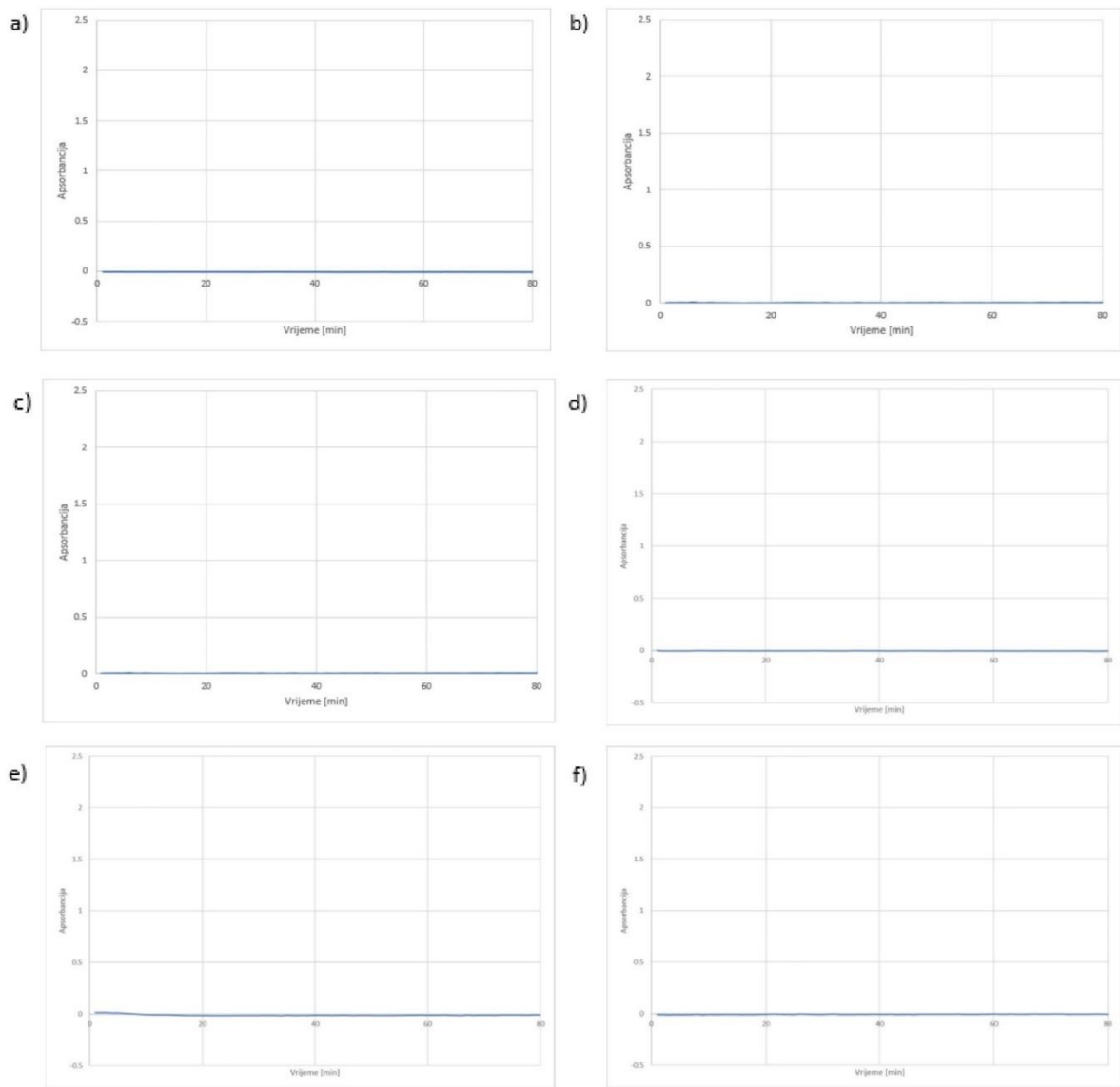
U ovom diplomskom radu provodilo se eksperimentalno proučavanje agregacije proteina lizozima pri 90 °C u referentnom puferu, referentnom sustavu koji uključuje DES-ove kolin-klorid:ureu, kolinklorid:gvanidin, kolin-klorid:glicerol te osmoDES-ovima: ektoin:urea, ektoin:gvanidin, ektoin:glicerol, TMAO:urea, TMAO:gvanidin, TMAO:glicerol, betain:urea, betain:gvanidin, betain:glicerol, DMSP:urea, DMSP:gvanidin, DMSP:glicerol te bioinspiriranom višekomponentnom osmoDES-u TMAO:betain:taurin:urea. Praćenje agregacije vršeno je putem UV/VIS spektrofotometrije. Pri agregaciji proteina, promjene u mutnoći proteinske otopine bilježene su kroz povećanje apsorbancije pri 600 nm. Rezultati ovih eksperimenata prikazani su na slikama 9-11.

Analizom rezultata primijećeno je povećanje apsorbancije u slučaju referentnog pufera te kod osmoDES-a TMAO:urea. Kod ostalih osmoDES-ova i kod referentnog sustava na bazi kolin-klorida nije došlo do takvog povećanja, i apsorbancija je ostala gotovo nepromijenjena. Može se zaključiti da je do agregacije došlo samo u referentnom puferu i u otapalu TMAO:urea, dok to kod drugih osmoDES-ova nije slučaj. S obzirom da je apsorbancija puno veća kod pufera nego kod osmoDES-a TMAO:urea, zaključak je da do agregacije puno više dolazi u puferu.

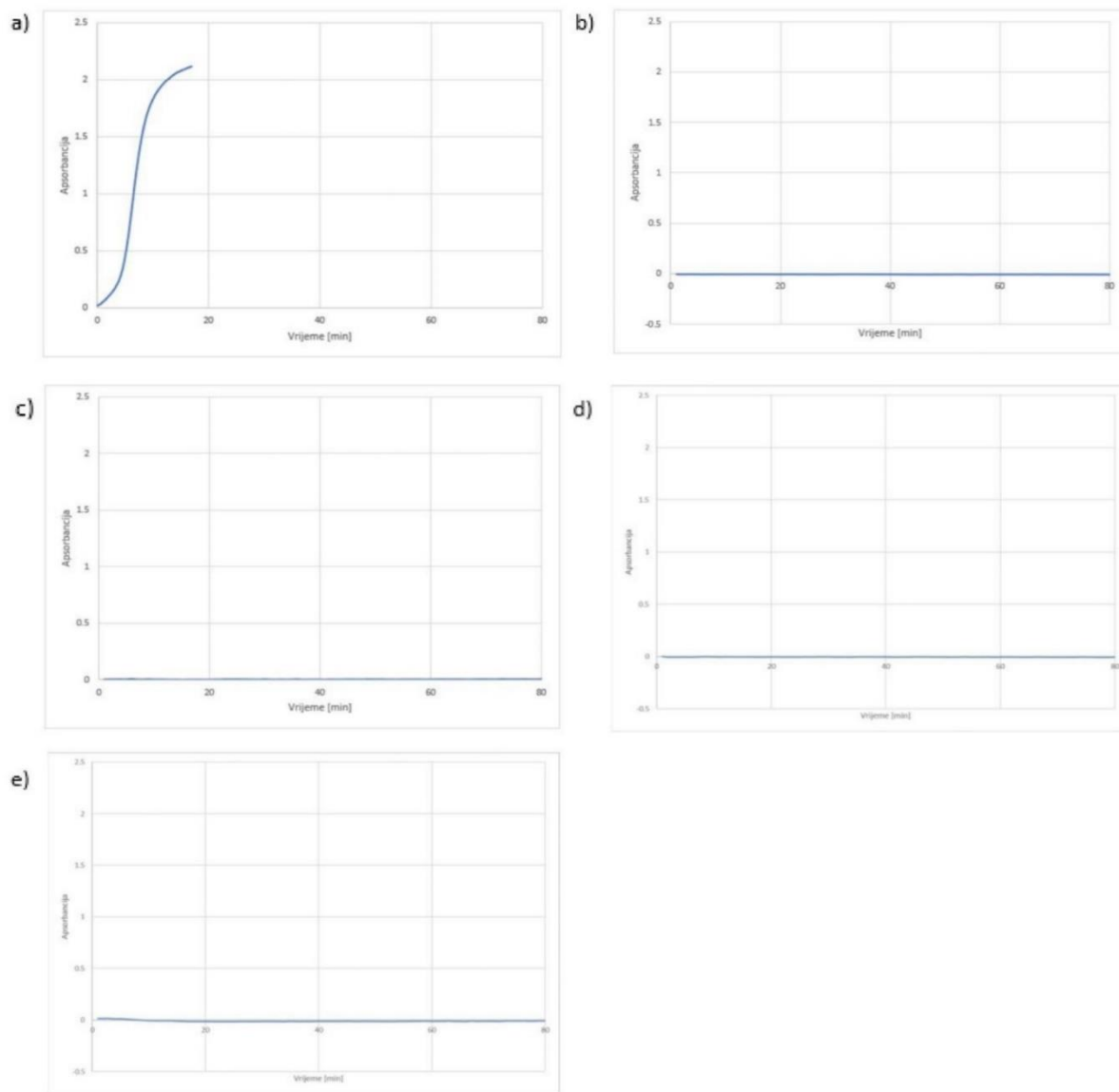
Agregacija može negativno utjecati na protok i učinkovitost procesa te proteinski agregati obično imaju smanjenu ili nikakvu biološku aktivnost (Wang i Roberts, 2018) pa je samim time pohrana u osmoDES-ovima dala znatno povoljnije rezultate u usporedbi s referentnim puferom.



Slika 9. Promjena u apsorbanciji ($\lambda= 600$ nm) tijekom izlaganja lizozima u različitim DES-ovima pri 90 °C: a) ektoin:urea, b) TMAO:urea, c) ektoin:gvanidin, d) TMAO:gvanidin, e) ektoin:glicerol, f) TMAO:glicerol



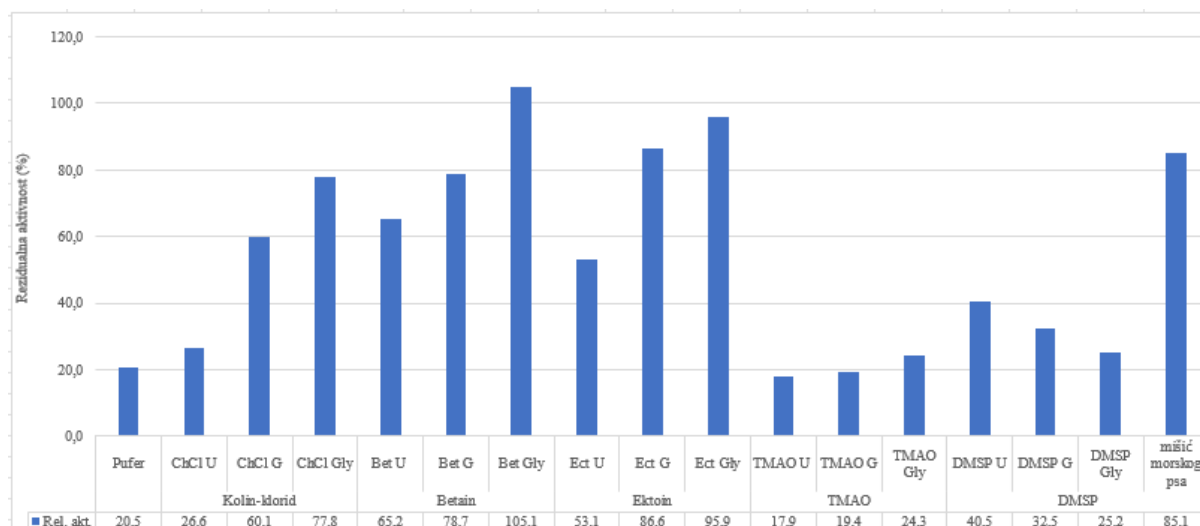
Slika 10. Promjena u apsorbanciji ($\lambda = 600$ nm) tijekom izlaganja lizozima u različitim DES-ovima pri 90 °C: a) kolin-klorid:urea, b) betain:urea, c) kolin-klorid:gvanidin, d) betain:gvanidin, e) kolin-klorid:glicerol, f) betain:glicerol



Slika 11. Promjena u apsorbanciji ($\lambda= 600 \text{ nm}$) tijekom izlaganja lizozima u različitim DES-ovima pri $90 \text{ }^\circ\text{C}$: a) pufer, b) višekomponentni osmoDES TMAO:Betain:Taurin:Urea, c) DMSP:urea, d) DMSP:gvanidin e) DMSP:glicerol

4.2.2. Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektskim otapalima na bazi osmolita

Praćenjem stabilnosti proteina lizozima u osmoDES-ovima procjenjuje se potencijal tih otapala za pohranu biomolekula. Enzimska aktivnost bilježena je prije i nakon izlaganja uzorka temperaturi od $80 \text{ }^\circ\text{C}$ primjenom UV/VIS spektroskopije. Relativna aktivnost (%) izračunata je usporedbom početne brzine reakcije koju je enzim ostvario nakon inkubacije s brzinom reakcije izmjerene prije nego što je uzorak podvrgnut inkubaciji. Rezultati dobiveni praćenjem stabilnosti lizozima u pripremljenim osmoDES-ovima prikazani su na slici 12.



Slika 12. Rezidualna aktivnost proteina lizozima nakon inkubacije pri 80 °C u puferu, referentnom sustavu na bazi kolin-klorida te odgovarajućim dvokomponentnim osmoDES-ovima na bazi betaina, ektoina, TMAO, DMSP-a i višekomponentnom bioinspiriranom osmoDES-u

Kao što se može primijetiti na grafu prikazanom na slici 12, nakon sat vremena inkubacije na 80 °C, gotovo svi pripremljeni osmoDES-ovi pokazuju značajno više vrijednosti rezidualne enzimske aktivnosti u usporedbi s referentnim puferom, koji zadržava samo 20,5 % početne enzimske aktivnosti proteina lizozima. Otapala koja pokazuju manje vrijednosti rezidualne aktivnosti od pufera su TMAO:U sa 17,9 % i TMAO:G sa 19,4 %.

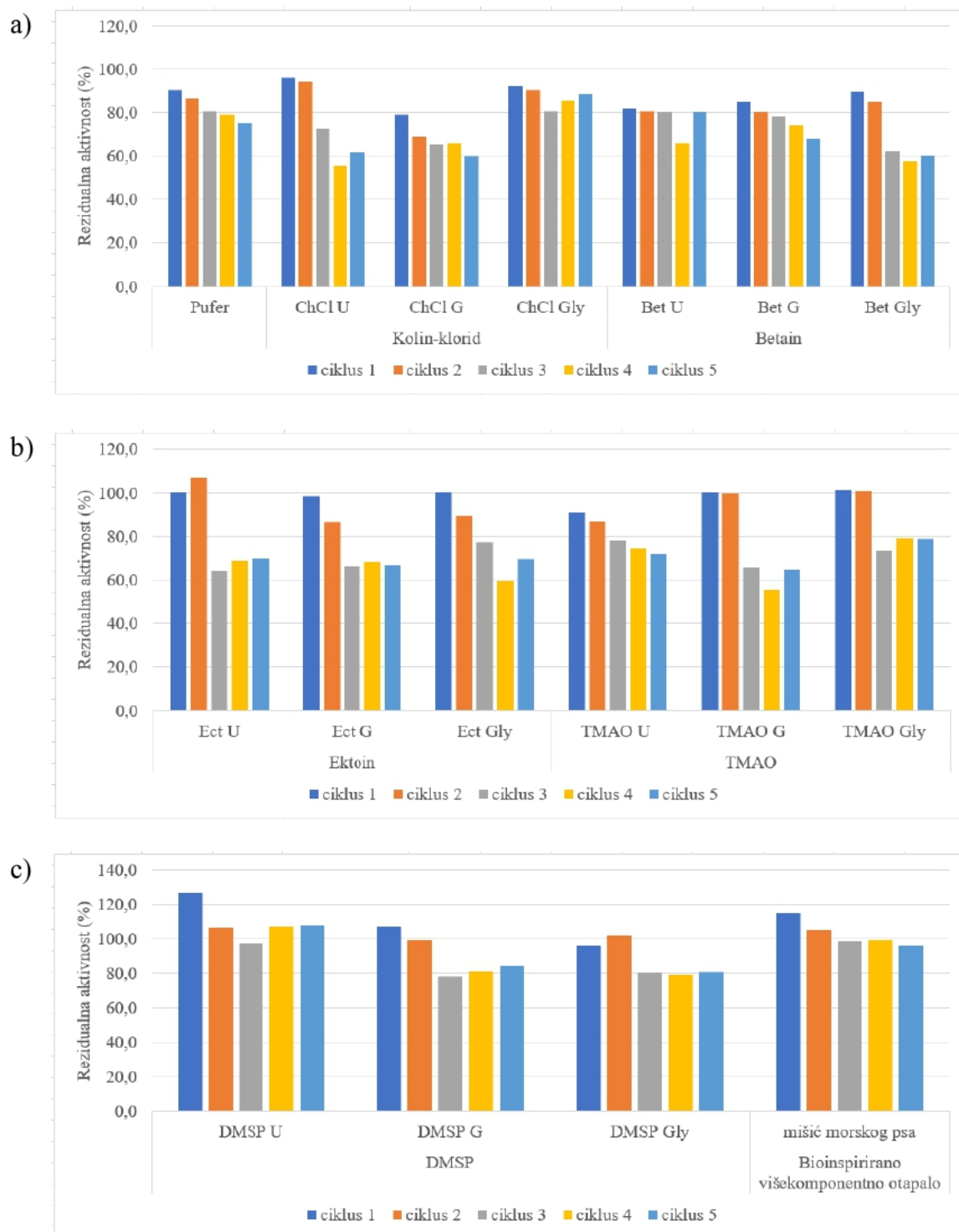
Najjači stabilizirajući efekt primjećen je kod otapala betain:glicerol (Bet:Gly), s relativnom aktivnošću od 105,1 %. Također, otapalo ektoin:glicerol (Ect:Gly) pokazalo se vrlo djelotvornim s relativnom aktivnošću od 95,9 % te otapalo ektoin:gvanidin (Ect:G) također pruža pristojnu stabilizaciju sa zabilježenom relativnom aktivnošću od 86,6 %. Najmanji stabilizacijski učinak pokazuje otapalo TMAO:urea (TMAO:U) s relativnom aktivnošću od 17,9 % te otapala TMAO:gvanidin (TMAO:G) s relativnom aktivnošću 19,4 % i TMAO:glicerol (TMAO:Gly) s relativnom aktivnošću 24,3 %. Ovakvi rezultati ukazuju na to da osmoDES-ovi koji sadrže TMAO kao akceptor vodikove veze imaju najmanji stabilizacijski učinak s obzirom na ostale osmoDES-ove. Zanimljivo je da bioinspiriran višekomponentni osmoDES izrađen na temelju analize raspodjele osmolita u mišićima morskog psa *Dasyatis sabina*, koji također sadrži TMAO, a pokazuje jako dobru stabilizaciju proteina te mu je relativna aktivnost 85,1 %. Takvi rezultati ukazuju na to da prisutnost dodatnih osmolita, kao što su betain, taurin i urea u omjerima inspiriranim prirodnim okruženjem, značajno poboljšava stabilizacijske karakteristike DES-a u očuvanju proteina.

S obzirom na visoke vrijednosti relativne aktivnosti gotovo svih formiranih osmoDES-ova nakon inkubacije, rezultati ukazuju na značajan potencijal DES-ova na bazi osmolita za stabilizaciju proteinskih uzoraka pohranjenih na povišenim temperaturama u usporedbi s konvencionalnom metodom pohrane lizozima u puferu.

4.3. STABILNOST LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA PRI NISKIM TEMPERATURAMA

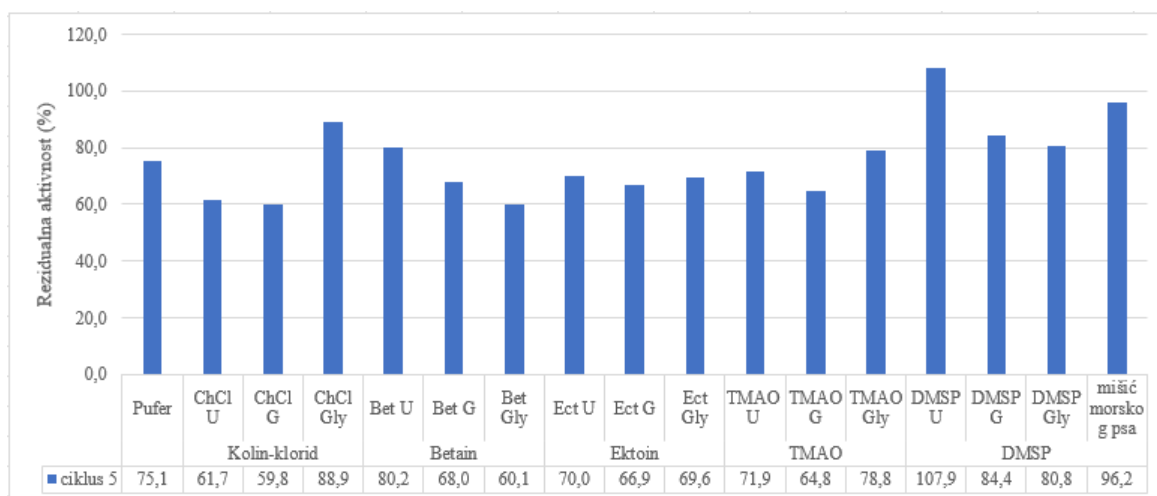
Nakon postizanja iznimnih rezultata u očuvanju termostabilnosti proteina lizozima u osmoDES-ovima, u ovome radu ispitana je njihova sposobnost stabilizacije proteina nakon inkubacije pri niskim temperaturama. Enzimska aktivnost proteina lizozima proučavana je na niskim temperaturama od -14 °C i -80 °C kroz pet uzastopnih dana. Eksperiment je uključivao pet ciklusa zamrzavanja, gdje su uzorci tijekom svakog ciklusa bili pohranjeni u hladnjaku na 24 sata. Stabilnost proteina praćena je pomoću analitičke metode UV/VIS spektrofotometrije, mjerenjem rezidualne enzimske aktivnosti, a rezultate tog praćenja prikazali na slikama 13 i 14.

Rezidualna aktivnost, izražena u postocima, određena je usporedbom početne brzine enzimske reakcije nakon inkubacije s brzinom reakcije zabilježenom prije nego što je uzorak izložen uvjetima inkubacije.



Slika 13. Rezidualna aktivnost proteina lizozima nakon svakog ciklusa inkubacije pri -14 °C: a) pufer, ChCl:U, ChCl:G, ChCl:Gly, Bet:U, Bet:G, Bet:Gly b) Ect:U, Ect:G, Ect:Gly, TMAO:U, TMAO:G i TMAO:Gly c) DMSP:U, DMSP:G, DMSP:Gly i bioinspirano višekomponentno otapalo

Radi lakšeg pregleda, pojednostavljeni rezultati ukupne rezidualne aktivnosti nakon svih provedenih ciklusa zamrzavanja prikazani su na slici 14.



Slika 14. Rezidualna aktivnost lizozima nakon inkubacije pri $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ u puferu, referentnom sustavu na bazi kolin-klorida te odgovarajućim dvokomponentnim osmoDES-ovima na bazi betaina, ektoina, TMAO, DMSP-a i višekomponentnom bioinspiriranom osmoDES-u

Nakon inkubacije otapala pri niskoj temperaturi od $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$, sedam otapala pokazuje veću rezidualnu aktivnost enzima lizozima u usporedbi s puferom, čija aktivnost iznosi 75,1 % početne aktivnosti, a devet otapala ima nešto nižu aktivnost u odnosu na pufer.

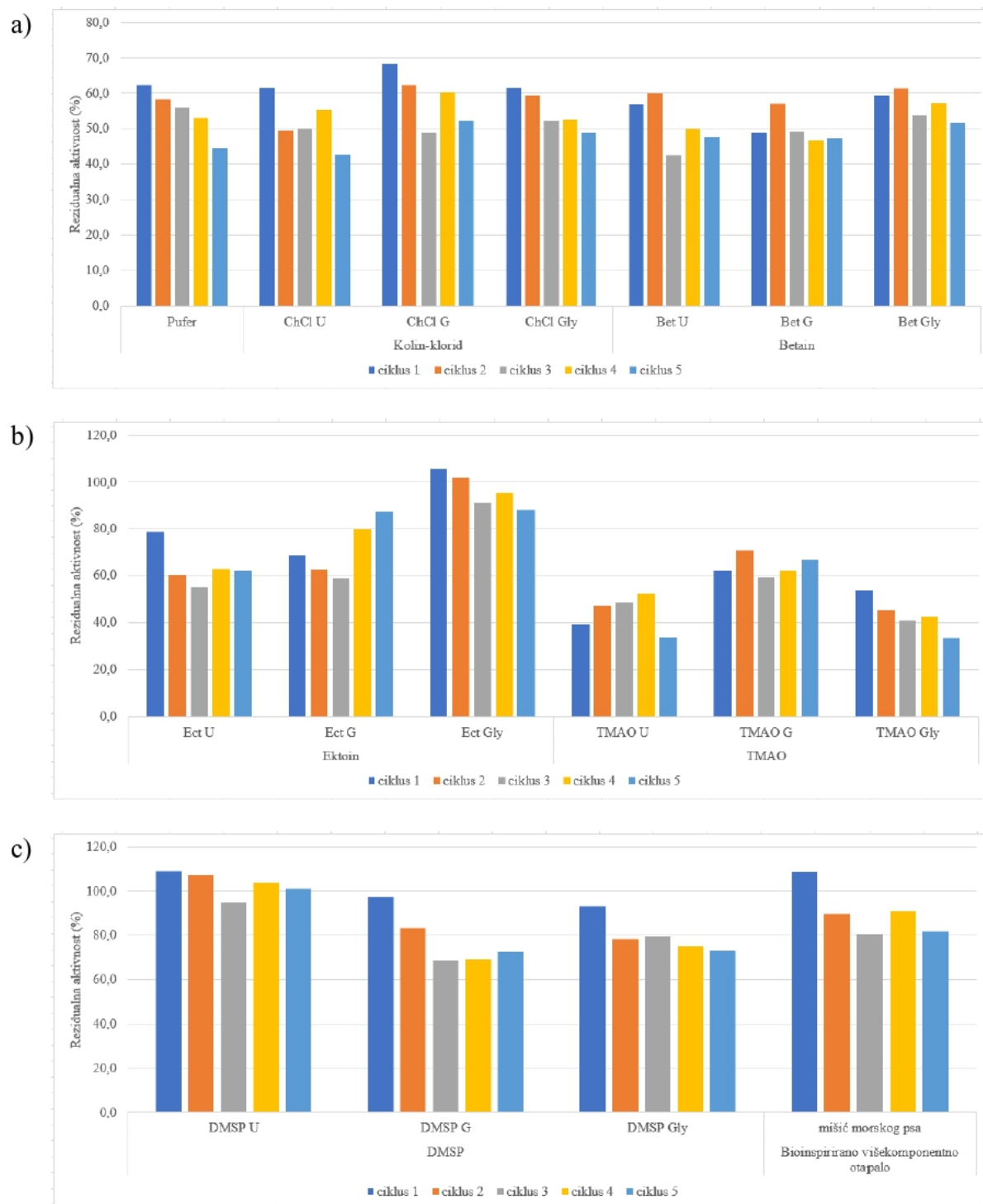
Najvišu aktivnost pokazuje enzima inkubiran u osmoDES-u DMSP:urea (DMSP:U), zadržavajući 107,9 % početne aktivnosti nakon 5 ciklusa zamrzavanja. Postotak aktivnosti lizozima praktički ostaje nepromijenjen u odnosu na početnu enzimsku aktivnost proteina, sugerirajući da navedeni osmoDES ima najizraženiji stabilizacijski učinak na lizozim. S druge strane, najmanju aktivnost pokazuje enzim inkubiran u referentnom sustavu kolin-klorid:gvanidin (ChCl:G), čija enzimska aktivnost opada na 59,8 % početne aktivnosti enzima lizozima te enzim inkubiran u osmoDES-u betain:glicerol (Bet:Gly) čija aktivnost iznosi 60,1 %.

Najveći postotak relativne aktivnosti primjećuje se kod osmoDES-ova koji uključuju DMSP kao akceptor vodikove veze, dok je najniža aktivnost utvrđena kod referentnog sustava koji uključuju kolin-klorid kao akceptor vodikove veze.

Otapala na bazi DMSP-a kao akceptora vodikove veze jedina pokazuju veće vrijednosti u odnosu na pufer sa svim korištenim donorima vodikove veze, a to su DMSP:urea (DMSP:U) s vrijednošću rezidualne aktivnosti od 107,9 %, DMSP:gvanidin (DMSP:G) s vrijednošću od 84,4 % te DMSP:glicerol (DMSP:Gly) s vrijednošću od 80,8 %. Može se primijetiti da bioinspirirani višekomponentni osmoDES pripremljen prema uzorku raspodjele osmolita u mišićima morskog psa *Dasyatis sabina* TMAO:betain:taurin:urea pokazuje jako visoku

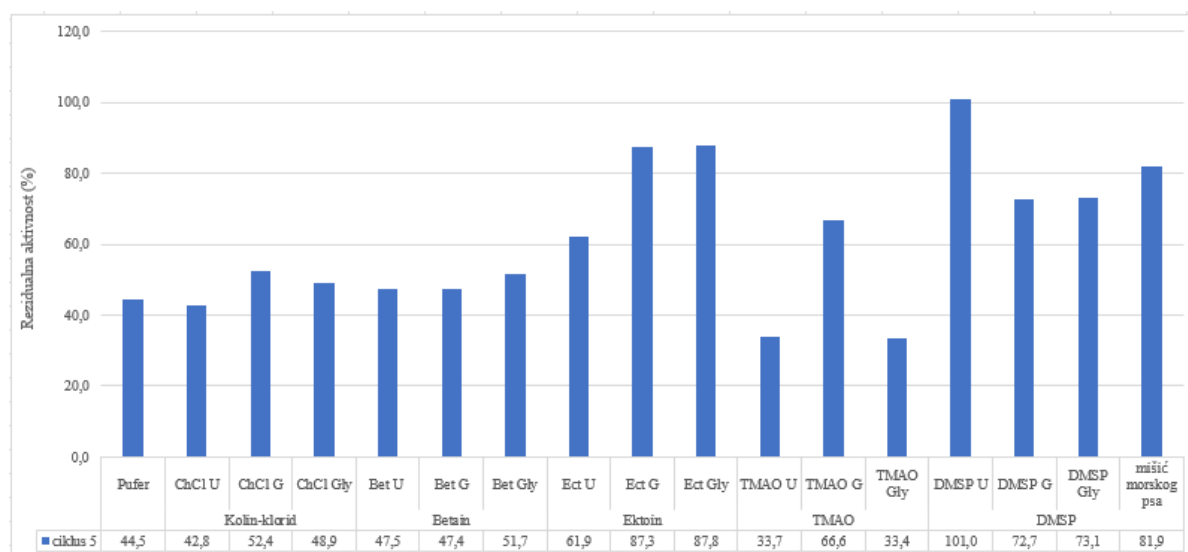
rezidualnu aktivnost u iznosu od 96,2 % što znači da to otapalo ima jako dobar stabilizacijski učinak na lizozim. Višekomponentni osmoDES pokazuje bolje rezultate od otapala koji kao akceptor vodikove veze sadrže samo TMAO ili samo betain što ukazuje na to da dodatak drugih osmolita u smjesu utječe na sposobnost stabilizacije proteina.

Praćena je enzimaska aktivnost lizozima u ekstremnim uvjetima na temperaturi od -80 °C tijekom 5 ciklusa zamrzavanja u trajanju od 5 dana, a rezultati rezidualne aktivnosti pojedinačnih osmoDES-ova nakon svakog ciklusa prikazani su na slikama 15 i 16.



Slika 15. Rezidualna aktivnost proteina lizozima nakon svakog ciklusa inkubacije pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:
a) pufer, ChCl:U, ChCl:G, ChCl:Gly, Bet:U, Bet:G, Bet:Gly b) Ect:U, Ect:G, Ect:Gly,
TMAO:U, TMAO:G i TMAO:Gly c) DMSP:U, DMSP:G, DMSP:Gly i bioinspirano
višekomponentno otapalo

Radi lakšeg pregleda, pojednostavljeni rezultati ukupne rezidualne aktivnosti nakon svih provedenih ciklusa zamrzavanja prikazani su na slici 16.



Slika 16. Rezidualna aktivnost lizozima nakon inkubacije pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u puferu, referentnom sustavu na bazi kolin-klorida te odgovarajućim dvokomponentnim osmoDES-ovima na bazi betaina, ektoina, TMAO, DMSP-a i višekomponentnom bioinspiriranom osmoDES-u

Eksperimentalni rezultati ukazuju na to da skoro svi pripremljeni osmoDES-ovi pružaju bolji stabilizacijski učinak na protein lizozim u usporedbi s referentnim puferom koji zadržava 44,5 % početne aktivnosti. Jedina otapala koja pokazuju manju rezidualnu aktivnost u odnosu na pufer su osmoDES-ovi TMAO:urea (TMAO:U) s vrijednošću od 33,7 % i TMAO:glicerol (TMAO:Gly) s vrijednošću od 33,4 % te referentni sustav kolin-klorid:urea s enzimskom aktivnošću koja opada na 42,8 % početne aktivnosti lizozima.

Najbolji stabilizacijski učinak pokazuje osmoDES DMSP:urea (DMSP:U) s vrijednošću od 101 % te njega slijede otapala ektoin:glicerol (Ect:Gly) s rezidualnom aktivnošću od 87,8 % te ektoin:gvanidin (Ect:G) s rezidualnom aktivnošću od 87,3 %. Općenito najbolji stabilizacijski učinak pokazuju otapala koja sadrže DMSP i ektoin kao akceptore vodikove veze, a najslabiji otapala koja sadrže TMAO.

Iznimno dobre rezultate pokazuje bioinspirirani višekomponentni osmoDES pripremljenom prema uzorku raspodjele osmolita u mišićima morskog psa *Dasyatis sabina* koji nakon inkubacije pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zadržava 81,9 % početne aktivnosti. Ti rezultati su bolji u odnosu na otapala koja sadrže samo TMAO ili samo betain kao akceptore vodikove veze što opet ukazuje na to da dodatak drugih osmolita u smjesu utječe na sposobnost stabilizacije proteina.

Budući da je velika većina pripremljenih osmoDES-ova pokazala povoljnije učinke u usporedbi s referentnim puferom, primjećuje se značajan potencijal osmoDES-ova za pohranu i očuvanje aktivnosti proteinskih uzoraka pri ekstremnim temperaturama. Eksperimentalno je potvrđeno

da snižavanje temperature ne smanjuje sposobnost osmoDES-ova za stabilizaciju proteina. OsmoDES-ovi pozitivno djeluju ne samo pri visokim temperaturama, već i pri ekstremno niskim što otvara nove perspektive za primjenu tih otapala u procesima stabilizacije i pohrane enzima te drugih biomakromolekula. Novi bioinspirirani višekomponentni osmoDES je pokazao izuzetna stabilizacijska svojstva te time pruža inovativne pristupe za očuvanje proteina i aktivnosti.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih iz provedenog eksperimentalnog dijela izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita (osmoDES) koja se sastoje od ektoina, TMAO, kolin-klorida, betaina i DMSP-a kao akceptora vodikove veze te uree, gvanidina i glicerola kao donora vodikove veze uspješno su pripremljena u specifičnim molarnim omjerima i uz dodatak 40 % (w/w) vode uz 100 %-tno iskorištenje reakcije.
2. Bioinspirirani višekomponentni osmoDES izrađeno na temelju analize raspodjele osmolita u mišićima morskog psa *Dasyatis sabina* uspješno je pripremljen.
3. Tijekom toplinski inducirane agregacije pri temperaturi od 90 °C samo je u jednom osmoDES-u došlo do agregacije koja nije bila značajna, dok u ostalim osmoDES-ovima agregacija nije primijećena, za razliku od pufera u kojem je agregacija bila velika.
4. Rezidualna aktivnost proteina u većini osmoDES-ova je znatno veća, pri visokim temperaturama od 80 °C, u usporedbi s referentnim puferom te samim time pokazuju bolju stabilizaciju proteina. Najveća rezidualnu aktivnost enzima primijećena je kod osmoDES-a betain:glicerol.
5. Skoro pola pripremljenih osmoDES-ova pokazuje veću rezidualnu aktivnost odnosno stabilizacijski učinak na protein nakon inkubacije na temperaturi od -14 °C, u usporedbi s referentnim puferom, dok pri temperaturi od -80 °C velika većina osmoDES-ova pokazuje veći stabilizacijski učinak na protein lizozim u odnosu na pufer. Najveća rezidualna enzimaska aktivnost nakon inkubacije pri -14 °C te pri -80 °C zabilježena je u osmoDES-u DMSP:urea što ga čini najpogodnijim otapalom za pohranu i očuvanje aktivnosti proteinskih uzoraka.
6. Novi bioinspirirani višekomponentni osmoDES je pokazao izuzetna stabilizacijska svojstva što ukazuje na to da dodatak drugih osmolita u smjesu utječe na sposobnost stabilizacije proteina.

6. LITERATURA

- Alfonsi K, Colberg J, Dunn PJ, Fevig T, Jennings S, Johnson TA, Kleine HP, Knight C, Nagy MA, Perry DA, Stefaniak M (2008) Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem* **10**, 31–36. <https://doi.org/10.1039/b711717e>
- Anastas P, Eghbali N (2010) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev* **39**, 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>
- Batra J, Xu K, Zhou H (2009) Nonadditive effects of mixed crowding on protein stability. *Proteins* **77**, 133–138. <https://doi.org/10.1002/prot.22425>
- Bayat M, Gourabi H, khammari A, Ahmad F, Saboury AA (2018) A comparative study of structure, stability and function of sc-tenecteplase in the presence of stabilizing osmolytes. *J Biotechnol* **280**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.014>
- Bye JW, Platts L, Falconer RJ (2014) Biopharmaceutical liquid formulation: a review of the science of protein stability and solubility in aqueous environments. *Biotechnol Lett* **36**, 869–875. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1445-6>
- Chen JH, Chi MC, Lin MG, Lin LL, Wang TF (2015) Beneficial Effect of Sugar Osmolytes on the Refolding of Guanidine Hydrochloride-Denatured Trehalose-6-phosphate Hydrolase from *Bacillus licheniformis*. *BioMed Res Int* **2015**, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/806847>
- Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, i sur. (2011) Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol* **156**, 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>
- Chrzanowska E, Gierszewska M, Kujawa J, Raszkowska-Kaczor A, Kujawski W (2018) Development and Characterization of Polyamide-Supported Chitosan Nanocomposite Membranes for Hydrophilic Pervaporation. *Polymers* **10**, 868. <https://doi.org/10.3390/polym10080868>
- Cunha SC, Fernandes JO (2018) Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC Trends Anal Chem* **105**, 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>
- Cvjetko Bubalo M, Andreou T, Panić M, Radović M, Radoševića K, Radojčić Redovnikovića I (2023) Natural multi-osmolyte cocktails form deep eutectic systems of unprecedented

- complexity: discovery, affordances and perspectives. *Green Chem* **25**, 3398-3417. <https://doi.org/10.1039/D2GC04796A>
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green solvents for green technologies. *J Chem Technol Biotechnol* **90**, 1631–1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process* **109**, 52–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>
- Czech L, Hermann L, Stöveken N, Richter A, Höppner A, Smits S, i sur. (2018) Role of the Extremolytes Ectoine and Hydroxyectoine as Stress Protectants and Nutrients: Genetics, Phylogenomics, Biochemistry, and Structural Analysis. *Genes* **9**, 1-58. <https://doi.org/10.3390/genes9040177>
- Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- De Marco BA., Rechelo BS, Tótoli EG, Kogawa AC, Salgado HRN (2018) Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharm J* **27**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>
- Devlin GL, Parfrey H, Tew DJ, Lomas DA, Bottomley SP (2001) Prevention of Polymerization of M and Z α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) with TrimethylamineN-Oxide. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 727–732. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.6.4407>
- Du C, Zhao B, Chen XB, Birbilis N, Yang H (2016) Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid. *Sci Rep* **6**, 29225. <https://doi.org/10.1038/srep29225>
- Falconer RJ, Chan C, Hughes K, Munro TP (2011) Stabilization of a monoclonal antibody during purification and formulation by addition of basic amino acid excipients. *Chem Technol Biotechnol* **86**, 942–948. <https://doi.org/10.1002/jctb.2657>
- Farooq MQ, Abbasi NM, Anderson JL (2020) Deep Eutectic Solvents in Separations: Methods of Preparation, Polarity, and Applications in Extractions and Capillary Electrochromatography. *J Chromatogr A* **1633**, 461613. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461613>

- Ghaedi H, Ayoub M, Sufian S, Hailegiorgis SM, Murshid G, Khan SN (2018) Thermal stability analysis, experimental conductivity and pH of phosphonium-based deep eutectic solvents and their prediction by a new empirical equation. *J Chem Thermodyn* **116**, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.08.029>
- Häckl K, Kunz W (2018) Some aspects of green solvents. *C R Chim* **21**, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.010>
- Hasan T, Kumari K, Devi SC, Handa J, Rehman T, Ansari NA, Singh LR (2018) Osmolytes in vaccine production, flocculation and storage: a critical review. *Hum Vaccin Immunother* **15**, 514–525. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1526585>
- Holthauzen LMF, Auton M, Sinev M, Rösgen J (2011) Protein Stability in the Presence of Cosolutes. *Methods Enzymol* **492**, 61–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381268-1.00015-X>
- Jakubowska E, Gierszewska M, Nowaczyk J, Olewnik-Kruszkowska E (2020) Physicochemical and storage properties of chitosan-based films plasticized with deep eutectic solvent. *Food Hydrocoll* **108**, 106007. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106007>
- Jukić M, Đaković S, Filipović-Kovačević Ž, Kovač V, Vorkapić-Furač J (2005) Dominantni trendovi zelene kemije. *Kem Ind* **54**, 255–272
- Kushwah N, Jain V, Yadav D (2020) Osmolytes: A Possible Therapeutic Molecule for Ameliorating the Neurodegeneration Caused by Protein Misfolding and Aggregation. *Biomolecules* **10**, 132. <https://doi.org/10.3390/biom10010132>
- Lakshmi GBVS, Yadav AK, Mehlawat N, Jalandra R, Solanki PR, Kumar A (2021) Gut microbiota derived trimethylamine N-oxide (TMAO) detection through molecularly imprinted polymer based sensor. *Sci Rep* **11**. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80122-6>
- Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* **81**, 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>
- Makhatadze GI, Privalov PL (1990) Heat capacity of proteins II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects. *J Mol Biol* **213**, 385–391. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80198-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80198-6)

- Manning MC, Liu J, Li T, Holcomb RE (2018) Rational Design of Liquid Formulations of Proteins. *Adv Protein Chem Struct Biol* **112**, 1–59. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.01.005>
- Mattos C, Clark AC (2008) Minimizing frustration by folding in an aqueous environment. *Arch Biochem Biophys* **469**, 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.07.007>
- Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman (2008) Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev* **43**, 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Ohtake S, Kita Y, Arakawa T (2011) Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv Drug Deliv Rev* **63**, 1053–1073. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.011>
- Pacheco-Fernández I, Pino V (2019) Green Solvents in Analytical Chemistry. *Curr Opin Green Sustain Chem* **18**, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.12.010>
- Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents - solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng* **2**, 1063-1071, <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- Radošević K, Železnjak J, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I, Slivac I, Gaurina Srček V (2016) Comparative in vitro study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line. *Ecotoxicol Environ Saf* **131**, 30-36, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.005>
- Rente D, Cvjetko Bubalo M, Panić M, Paiva A, Caprin B, Radojčić Redovniković I i sur. (2022) Review of deep eutectic systems from laboratory to industry, taking the application in the cosmetics industry as an example. *J Clean Prod* **380**, 135147, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135147>
- Rösgen J (2014) Synergy in Protein–Osmolyte Mixtures. *J Phys Chem B* **119**, 150–157. <https://doi.org/10.1021/jp5111339>
- Rösgen J, Jackson-Atogi R (2012) Volume Exclusion and H-Bonding Dominate the Thermodynamics and Solvation of Trimethylamine-N-oxide in Aqueous Urea. *J Am Chem Soc* **134**, 3590–3597. <https://doi.org/10.1021/ja211530n>

- Santoro MM, Liu Y, Khan SMA, Hou LX, Bolen DW (1992) Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochem* **31**, 5278–5283. <https://doi.org/10.1021/bi00138a006>
- Selvanathan V, Azzahari AD, Halim AAA, Yahya R (2017) Ternary natural deep eutectic solvent (NADES) infused phthaloyl starch as cost efficient quasi-solid gel polymer electrolyte. *Carbohydr Polym* **167**, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.023>
- Sheldon RA, Woodley JM (2017) Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev* **118**, 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
- Singh L, Poddar N, Dar T, Rahman S, Kumar R, Ahmad F (2011) Forty years of research on osmolyte-induced protein folding and stability. *J Iran Chem Soc* **8**, 1–23. <https://doi.org/10.1007/bf03246197>
- Street TO, Bolen DW, Rose GD (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 13997–14002. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606236103>
- Tiecco M, Cappellini F, Nicoletti F, Del Giacco T, Germani R, Di Profio P (2019) Role of the hydrogen bond donor component for a proper development of novel hydrophobic deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **281**, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.107>
- Timasheff SN (2002) Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochem* **41**, 13473–13482. <https://doi.org/10.1021/bi020316e>
- Tomé LIN, Baião V, da Silva W, Brett CMA (2018) Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Appl Mater Today* **10**, 30–50. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.005>
- Vanda H, Dai Y, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH (2018) Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *C R Chim* **21**, 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>
- Vrikkis RM, Fraser KJ, Fujita K, MacFarlane DR, Elliott GD (2009) Biocompatible Ionic Liquids: A New Approach for Stabilizing Proteins in Liquid Formulation. *J Biomech Eng* **131**, 074514. <https://doi.org/10.1115/1.3156810>
- Wang W, (1999) Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* **185**, 129–188. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00152-0)

Wang W, Roberts CJ (2018) Protein Aggregation - Mechanisms, Detection, and Control. *Int J Pharm* **550**, 251-268. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.043>

Włodarczyk SR, Costa-Silva TA, Pessoa-Jr A, Madeira P, Monteiro G (2019) Effect of osmolytes on the activity of anti-cancer enzyme L-Asparaginase II from *Erwinia chrysanthemi*. *Process Biochem* **81**, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.009>

Włodarczyk SR, Custódio D, Pessoa A, Monteiro G (2018) Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* **131**, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.019>

Yancey PH (2004) Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. *Sci Prog* **87**, 1–24. <https://doi.org/10.3184/003685004783238599>

Yancey PH, Blake WR, Conley J (2002) Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* **133**, 667–676. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00182-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00182-4)

Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Sci* **217**, 1214–1222. <https://doi.org/10.1126/science.7112124>

Zeng K, Li H, Shi H, Wu J, Xu J, Li Y, Zhao C (2019) Synthesis and thermal properties of silicon-containing benzoxazine. *High Perform Polym* **32**, 095400831985061. <https://doi.org/10.1177/0954008319850615>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Marija Karin 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