

# Biokatalitička redukcija ugljikova dioksida primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala

---

Šubar, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:659839>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Karla Šubar

**BIOKATALITIČKA REDUKCIJA UGLJIKOVA  
DIOKSIDA PRIMJENOM  
NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH  
OTAPALA**

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

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

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na vodstvu i nesebičnoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada te na prenesenom znanju. Hvala joj na strpljenju, utrošenom vremenu i povjerenju. Veliko hvala i dr. sc. Marijanu Logarušiću na uloženom trudu i vremenu tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada te najviše na strpljenju za sva moja pitanja. Hvala i ostatku Laboratorija na ugodnoj radnoj atmosferi i pruženoj pomoći.*

*Posebno se zahvaljujem roditeljima, sestri, dečku i prijateljicama koji su mi bili najveća podrška i motivacija tijekom cijelog mog obrazovanja i koji su mi pružili beskrajnu ljubav te uvijek vjerovali u moj uspjeh.*

## 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

BIOKATALITIČKA REDUKCIJA UGLJIKOVA DIOKSIDA PRIMJENOM NISKOTEMPERATURNIH  
EUTEKTIČKIH OTAPALA

Karla Šubar, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058215217

**Sažetak:** Ovaj diplomski rad istražuje mogućnosti primjene niskotemperaturnih eutektnih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) u biokatalitičkoj redukciji CO<sub>2</sub> primjenom enzima formijata dehidrogenaze (FDH). Ispitana je aktivnost FDH, topljivost CO<sub>2</sub> te stabilnost koenzima u DES-ovima na bazi betaina i kolin-klorida s glicerolom, pri različitim udjelima vode odnosno pufera. Utvrđeno je da je aktivnost FDH veća i topljivost CO<sub>2</sub> bolja u DES-ovima s kolin-kloridom, dok udio vode odnosno pufera značajno utječe na aktivnost FDH, kratkoročnu stabilnost NADH i topljivost CO<sub>2</sub>. Spearmanova korelacijska analiza je dokazala da struktura DES-ova te fizikalno-kemijska svojstva poput viskoznosti, pH i gustoće utječu na aktivnost FDH, kratkoročnu stabilnost NADH i topljivost CO<sub>2</sub>. Matematički modeli za predikciju svojstava DES-ova, temeljeni na fizikalno-kemijskim svojstvima i sigma profilima, pokazali su se korisnim za industrijske primjene i istraživanja. Njihova učinkovitost potvrđena je redukcijom CO<sub>2</sub> u formijat kataliziranom FDH-om, što otvara nove mogućnosti za primjenu DES-ova u biokatalizi.

**Ključne riječi:** *niskotemperaturna eutektna otapala, biokataliza, formijat-dehidrogenaza, NADH, matematičko modeliranje*

**Rad sadrži:** 51 stranicu, 10 slika, 11 tablica, 82 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

**Pomoć pri izradi:** Marijan Logarušić, dr.sc.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 20. prosinca 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

BIOCATALYTIC REDUCTION OF CARBON DIOXIDE USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Karla Šubar, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058215217

**Abstract:** This graduate thesis investigates the possibilities of using Deep Eutectic Solvents (DES) in the biocatalytic reduction of CO<sub>2</sub> using the enzyme formate dehydrogenase (FDH). FDH activity, CO<sub>2</sub> solubility and coenzymes stability were tested in DESs based on betaine and choline chloride with glycerol, at different proportions of water and buffer. Results showed higher FDH activity and better CO<sub>2</sub> solubility in DESs with choline chloride, while the proportion of water or buffer significantly affects the FDH activity, the NADH short-term stability and the CO<sub>2</sub> solubility. Spearman's correlation analysis proved that DESs structure and physico-chemical properties such as viscosity, pH and density influence the FDH activity, the NADH short-term stability and the CO<sub>2</sub> solubility. Mathematical models for the prediction of DES properties, based on physicochemical properties and sigma profiles, have proven useful for industrial applications and research. Their effectiveness was confirmed by the reduction of CO<sub>2</sub> to formate catalyzed by FDH, which opens new possibilities for the application of DES in biocatalysis.

**Keywords:** *deep eutectic solvents, biocatalysis, formate dehydrogenase, NADH, mathematical modeling*

**Thesis contains:** 51 pages, 10 figures, 11 tables, 82 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Marijan Logarušić, PhD

### Reviewers:

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

**Thesis defended:** December 20<sup>th</sup>, 2024



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. UGLJIKOV DIOKSID – KLJUČAN FAKTOR GLOBALNOG ZATOPLJENJA .....	2
2.2. PROBLEMI PROUZROČENI EMISIJOM CO <sub>2</sub> .....	2
2.3. METODE ZBRINJAVANJA I SMANJENJA UGLJIKOVOG DIOKSIDA .....	4
2.4. BOKATALIZA .....	7
2.4.1. Enzimi.....	8
2.4.2. Otapala za provođenje biokatalitičkih reakcija.....	9
2.5. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČNA OTAPALA .....	10
2.5.1. Definicija i svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	11
2.5.2. Primjena DES-ova .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Enzim .....	13
3.1.2. Kemikalije .....	13
3.1.3. Pribor i aparatura .....	14
3.1.4. Računalni programi.....	14
3.2. METODE .....	14
3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	14
3.2.2. Određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava DES-ova.....	16
3.2.2.1. <i>Određivanje pH vrijednosti</i> .....	16
3.2.2.2. <i>Određivanje viskoznosti</i> .....	16
3.2.2.3. <i>Određivanje gustoće</i> .....	16
3.2.3. Priprema pufera i otopina enzima, koenzima i supstrata .....	17
3.2.3.1. <i>Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH=7,5)</i> .....	17
3.2.3.2. <i>Otopina enzima (12,8 mg mL<sup>-1</sup>)</i> .....	17
3.2.3.3. <i>Otopina koenzima (25 mg mL<sup>-1</sup>)</i> .....	17
3.2.3.4. <i>Otopina supstrata (0,5 mg mL<sup>-1</sup>)</i> .....	17
3.2.4. Praćenje aktivnosti FDH u pripremljenim DES-ovima.....	17
3.2.5. Mjerenje topljivosti CO <sub>2</sub> i pH nakon upuhivanja CO <sub>2</sub> .....	18
3.2.6. Mjerenje kratkoročne stabilnosti koenzima NADH nakon upuhivanja.....	18
3.2.7. Redukcija CO <sub>2</sub> katalizirana enzimom FDH .....	19
3.2.7.1. <i>Određivanje koncentracije formijata</i> .....	19
3.2.8. Statistička analiza i matematički modeli enzima FDH .....	20
3.2.8.1. <i>Osnovna statistička analiza, raspodjela podataka i korelacijska matrica</i> .....	20
3.2.8.2. <i>Računanje molekulskih deskriptora DES-ova primjenom COSMO-RS</i>	

<i>programskog paketa</i> .....	20
3.2.8.3. <i>Izrada korelacijskog modela između aktivnosti FDH i molekularnih deskriptora</i> ...	21
3.2.8.4. <i>Model djelomične linearne regresije (DLR)</i> .....	21
3.2.9. Procjena produktivnosti biokatalitičkih procesa .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>24</b>
4.1. PRIPREMA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČNIH OTAPALA I FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA .....	25
4.2. AKTIVNOST ENZIMA.....	30
4.3. TOPLJIVOST CO <sub>2</sub> I NJEGOV UTJECAJ NA STABILNOST NADH.....	31
4.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA I MATEMATIČKO MODELIRANJE.....	33
4.4.1. Matematički modeli za opisivanje učinka aktivacije DES-ova.....	36
4.5. ODABIR NAJPOGODNIJEG OTAPALA OBZIROM NA CILJNA SVOJSTVA .....	38
4.6. REAKCIJA KONVERZIJE CO <sub>2</sub> U FORMIJATA KATALIZIRANA FORMIJAT DEHIDROGENAZOM U DES-U ChCl:Gly <sub>80%</sub> P .....	40
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>43</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>44</b>

# 1. UVOD

U posljednja dva desetljeća, porast koncentracije CO<sub>2</sub> u atmosferi postao je jedan od ključnih globalnih problema. Glavni uzroci ovog porasta su industrijske aktivnosti i uporaba fosilnih goriva, što rezultira ozbiljnim ekološkim posljedicama poput klimatskih promjena i zakiseljavanja oceana. Kako bi se ublažili ovi negativni učinci, znanstvenici i industrija aktivno istražuju održiva rješenja za smanjenje emisije i učinkovitu konverziju CO<sub>2</sub> u korisne produkte (Sekoai i Yoro, 2016). Metode zbrinjavanja i konverzije ugljikova dioksida ključne su u borbi protiv klimatskih promjena. Zbrinjavanje ugljikova dioksida uključuje tehnologije poput hvatanja i skladištenja CO<sub>2</sub>, gdje se CO<sub>2</sub> hvata najčešće iz industrijskih postrojenja ili atmosfere te trajno pohranjuje u geološke formacije. Konverzija CO<sub>2</sub> obuhvaća njegovo pretvaranje u korisne proizvode poput goriva ili kemikalija koristeći kemijske, biološke ili elektrolitičke procese (Yoro i Daramola, 2020). Zbog sve veće težnje za zelenom kemijom, odnosno proizvodnjom i primjenom kemikalija koje bi bile ekološki prihvatljivije i ekonomski isplative, kao jedna od takvih metoda je biokatalitička redukcija CO<sub>2</sub> (Ghisalba i sur., 2010).

Budući da otapala za biokatalitičke procese značajno doprinose ukupnoj količini proizvedenog otpada u većini industrijskih procesa, intenzivno se traga za otapalima koja su netoksična, nehlapljiva, kemijski i fizički stabilna, višekратно upotrebljiva te jednostavna za primjenu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). U potrazi za takvim otapalima, u posljednje vrijeme se sve više izučavaju niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) kao zamjena za štetna otapala. DES-ove karakteriziraju jednostavna priprema, niska toksičnost, biorazgradivost, nezapaljivost te velika kemijska i toplinska stabilnost. Pokazali su i značajan potencijal u poboljšanju biokatalize kroz različite mehanizme, poput poboljšanja topljivost supstrata, djelovanja kao pametnih ko-supstrata, stabilizacije enzima i koenzima te i utjecaja na stereokemiju enzima (Zhang i sur., 2024).

Uzimajući u obzir sve navedeno, cilj ovog rada je bio je istražiti mogućnosti primjene DES-ova na bazi kolin-klorida i betaina u kombinaciji s glicerolom u biokatalitičkoj redukciji CO<sub>2</sub> primjenom enzima formijat dehidrogenaze (FDH). U tu svrhu ispitana je aktivnost FDH, kratkoročna stabilnost NADH te topljivost CO<sub>2</sub> u navedenim otapalima. Uz to, u okviru rada izrađen je matematički model temeljen na linearnoj regresiji, kako bi se opisala povezanost između fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova i aktivnost FDH. U najpovoljnijem otapalu, obzirom na navedene kriterije, odabran je najpogodniji DES te je u njemu provedena i opisana reakcija redukcije CO<sub>2</sub>.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. UGLJIKOV DIOKSID – KLJUČAN FAKTOR GLOBALNOG ZATOPLJENJA**

Iz godine u godinu pojam klimatskih promjena i emisija ugljikovog dioksida sve se češće koristi kako bi se skrenula pozornost na problem globalnog zagrijavanja Zemlje. Ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) je bezbojan plin koji je gušći od zraka. Sastoji se od dva kovalentno vezana atoma kisika koji su vezani za jedan atom ugljika. Ima vrlo važnu ulogu u biljnom i životinjskom životnom ciklusu. Sastavni je dio atmosfere, ukupnog volumnog udjela 0,035 %. Ugljikov dioksid nastaje kroz različite antropogene aktivnosti koje uzrokuju emisije ugljikovog dioksida, fermentaciju organskih spojeva ili ljudsko disanje. Pri manjim koncentracijama ugljikov dioksid nema miris, no pri većim koncentracijama poprima kiseo i pomalo oštar miris (Freund i sur., 2005). Iako ugljikov dioksid sam po sebi nije otrovan, u prekomjernim količinama ima štetan utjecaj na okoliš. Kao jedan od predstavnika stakleničkih plinova u najvećem postotku doprinosi problemu globalnog zagrijavanja, a prema podacima iz 2021. godine ugljikov dioksid je činio 79 % ukupnih emisija stakleničkih plinova u SAD-u (Environmental Protection Agency, 2024). S ciljem smanjenja emisija ugljikovog dioksida razvijeni su razni koncepti kako ne bi dolazilo do emisije (Golubić, 1999).

### **2.2. PROBLEMI PROUZROČENI EMISIJOM CO<sub>2</sub>**

Jedan zajednički izazov s kojim se u posljednje vrijeme suočavaju mnoge zemlje u razvoju je degradacija okoliša kao rezultat neselektivne emisije ugljikovog dioksida u atmosferu (Seneviratne i sur., 2016). Industrijalizacija i urbanizacija doprinijele su povećanju emisija ugljikova dioksida u atmosferu, značajno podižući koncentraciju stakleničkih plinova. Ovaj porast ubrzava globalno zatopljenje i izaziva klimatske promjene (Sekoai i Yoro, 2016). Mnogi dijelovi svijeta suočavaju se sa sušom i postaju neprikladni za komercijalni uzgoj zbog klimatskih promjena. Prema Ahmedu i sur. (2018) degradacija okoliša je poremećaj ravnoteže prirodnog ekosustava kojim se otežava postojanje različitih oblika života, čime se izravno utječe na opstanak drugih života u ekosustavu, a sve je više ekoloških problema koji se pripisuju sve većoj koncentraciji ugljikovog dioksida.

Porast emisije CO<sub>2</sub> ubrzava efekt staklenika povećavajući prosječnu globalnu temperaturu. Rezultat toga su sve intenzivniji vremenski uvjeti, kao što su periodi dugih toplotnih udara koje prate ozbiljne suše, požari te padaline koje izazivaju poplave. Te promjene negativno utječu na poljoprivredu gdje dolazi do smanjenja prinosa usjeva, ali i na zdravlje ljudi. Klimatske promjene uzrokovane emisijom CO<sub>2</sub> ne samo da narušavaju prirodne

ekosustave već i stvaraju ozbiljne socijalne i ekonomske štete (Sekoai i Yoro, 2016). Nadalje, porastom temperature, topljivost ugljikovog dioksida u oceanima se smanjuje. Stoga bi se porastom temperature CO<sub>2</sub> oslobodio iz oceana, povećavajući udio CO<sub>2</sub> u atmosferi. Postoje naznake da bi globalno zatopljenje i topljenje polarnog leda moglo izazvati novo ledeno oba. Moglo bi doći do globalnog zahlađenja smanjenjem slanosti oceana kako se ledenjaci tope (McManus i sur., 2004). Rezultati modela Stotta i sur. (2003), sugeriraju da iako je solarni utjecaj vjerojatno igrao veliku ulogu u kontroli globalnih srednjih temperatura tijekom prve polovice dvadesetog stoljeća, porast stakleničkih plinova odgovoran je za većinu zagrijavanja uočenog tijekom posljednjih 60 godina.

Klimatske promjene predstavljaju jedan od najvećih izazova za globalnu bioraznolikost. Povećanje globalne temperature, promjene u obrascima oborina, sve češći ekstremni vremenski uvjeti i porast razine mora stvaraju neprijateljsko okruženje za mnoge biljne i životinjske vrste. Mnoge vrste koje ne mogu migrirati u povoljnije stanište suočene su s ozbiljnim rizikom od izumiranja. Nestanak jedne vrste može izazvati lančanu reakciju koja pogađa cijeli ekosustav. Na primjer, gubitak oprašivača, poput pčela i leptira, utječe na reprodukciju biljaka, uključujući one koje čine osnovu prehrambenog lanca. Isto tako, degradacija tla zbog smanjenja raznolikosti mikroorganizama i biljaka negativno utječe na poljoprivredu i opskrbu hranom. Ovi gubici ne samo da smanjuju otpornost ekosustava na buduće promjene i prijetnje poput bolesti, nego i ograničavaju prirodne procese koji su ključni za ljudsku dobrobit. Primjerice, šume i močvarna područja, koja su važna za regulaciju ugljika i filtriranje vode, postaju manje učinkovita. Osim ekoloških, posljedice su i ekonomske te socijalne, jer se mnoge zajednice oslanjaju na prirodne resurse za svoj opstanak i razvoj. Stoga je očuvanje bioraznolikosti ključno za održavanje zdravih ekosustava i stabilnosti planeta (Sekoai i Yoro, 2016).

Razmjena ugljikovog dioksida između atmosfere i oceana toliko je brza da je povećanje koncentracije CO<sub>2</sub> već imalo značajne učinke na morsku kemiju (Caldeira i Wickett, 2003) pH površinske vode se u prosjeku za svakih par desetaka godina smanjio za 0,1 jedinicu od preindustrijskih vrijednosti (Haugan i Drange, 1996). Izračuni modela pokazuju da, ukoliko su se nastavile antropogene CO<sub>2</sub> emisije, bi moglo doći do smanjenja pH vrijednosti u oceanima za čak 0,3 do 0,4 jedinice do kraja stoljeća (Orr i sur., 2005). Ovo smanjenje pH bi destabiliziralo kalcit i argonit koji su sastavni minerali ljuštura mnogih morskih organizama te bi to moglo dovesti do poteškoća u izgradnji njihovih kostura, a bi to direktno moglo imati drastične posljedice za morske ekosustave. Ovakve posljedice na morske ekosustave, imale bi ogroman utjecaj i na hranidbeni lanac, ali i golema prostranstva koraljnih greben (Andersson i sur., 2006).

S obzirom na ove složene probleme, smanjenje emisija CO<sub>2</sub> postalo je jedan od glavnih ciljeva u svijetu, a koraci kao što su prijelaz na obnovljive izvore energije, unapređenje energetske efikasnosti, zaštita prirodnih staništa te pošumljavanje ključni su u rješavanju ovog problema.

### 2.3. METODE ZBRINJAVANJA I SMANJENJA UGLJIKOVOG DIOKSIDA

Zbrinjavanje CO<sub>2</sub> odnosi se na ključne strategije u borbi protiv klimatskih promjena i smanjenja efekta staklenika. Ove metode uključuju hvatanje, skladištenje i ponovno korištenje ugljikova dioksida, koji se smatra jednim od glavnih uzročnika globalnog zagrijavanja (slika 1).



**Slika 1.** Zbrinjavanje ugljikovog dioksida (prema Fransen, 2020)

Smanjenje emisije na samom izvoru je ključan pristup u borbi protiv klimatskih promjena jer se fokusira na sprječavanje prije nego što ugljikov dioksid doprije u atmosferu. Ovo uključuje radikalne promjene u načinu na koji proizvodimo i koristimo energiju, a s najvećim naglaskom na prelazak s fosilnih goriva, kao što su ugljen i nafta, na čiste i obnovljive izvore energije. Obnovljivi izvori energije, poput Sunčeve svjetlosti, hidroenergije, vjetroenergije i geotermalne energije, ne samo da smanjuju emisiju ugljikovog dioksida, već su i dugoročna rješenja za energetske sigurnost. Instalacije solarnih panela, vjetroelektrana i hidroelektrana omogućuje proizvodnju energije bez izgaranja fosilnih goriva, čime se i značajno smanjuje emisija ugljikovog dioksida (McManus i sur., 2004).

Osim smanjenja emisije na samom izvoru, pošumljavanje i obnova ekosustava predstavlja prirodnu i održivu strategiju za uklanjanje ugljikova dioksida iz atmosfere te istovremeno obnavljaju degradirane ekosustave i time povećavaju otpornost na klimatske promjene. Drveće i biljke kroz proces fotosinteze, apsorbiraju CO<sub>2</sub>, koji potom pohranjuju u svojoj biomasi i tlu. Zbog toga se sadnja drveća i obnova šuma smatraju jednim od najefikasnijih rješenja za borbu protiv klimatskih promjena. Pošumljavanje uključuje sadnju novih šuma na područjima koja su prethodno bila gola ili degradirana, dok obnova šuma vraća izvorne šumske ekosustave koji su uništeni zbog krčenja, požara ili prekomjerne eksploatacije. Uz šume, obnova drugih ekosustava, poput močvara, travnjaka i morskih trava, također igra ključnu ulogu (Yoro i Daramola, 2020).

Ugljikov dioksid može se hvatati primjenom tehnologija kojima se CO<sub>2</sub> uklanja prije, za vrijeme (korištenjem čistog kisika u *oxy-fuel* metodi) i poslije procesa izgaranja. Postoje dva načina hvatanja ugljikovog dioksida. To su direktno hvatanje CO<sub>2</sub> iz zraka (engl. *Direct Air Capture, DAC*) ili hvatanje ugljikovog dioksida na velikim izvorima sa skladištenjem ili upotrebom (CCS/CCUS).

Hvatanje i skladištenje CO<sub>2</sub> (engl. *Carbon Capture and Storage, CCS*) tehnologija je koja omogućuje smanjenje emisija ugljikova dioksida na izvoru, sprječavajući njegov ulazak u atmosferu. Ova tehnologija se primjenjuje prvenstveno u industrijama s velikim emisijama, poput termoelektrana na fosilna goriva, cementara, čeličana i kemijskih postrojenja. CCS je ključan alat u borbi protiv klimatskih promjena, posebno za sektore u kojima je smanjenje emisija teško postići drugim metodama. Proces CCS-a sastoji se od tri ključne faze koje omogućuju učinkovito smanjenje emisija ugljikova dioksida. Prva faza je hvatanje CO<sub>2</sub>, gdje se ugljikov dioksid odvaja od ostalih plinova nastalih izgaranjem ili industrijskim procesima. Ovo se može postići pomoću različitih tehnologija, poput post-kombustijskog hvatanja (nakon izgaranja), pre-kombustijskog hvatanja (prije izgaranja) ili oksifuelnog procesa (izgaranje u prisutnosti čistog kisika). Nakon što se zarobi, CO<sub>2</sub> se transportira do lokacija za skladištenje u drugoj fazi, transporta CO<sub>2</sub>. Transport se najčešće provodi kroz cjevovode, iako se brodovi također koriste, posebno za skladištenje izvan obale. U završnoj fazi, skladištenju CO<sub>2</sub>, zarobljeni plin se ubrizgava u duboke podzemne formacije poput iscrpljenih naftnih i plinskih polja, slanih akvifera ili bazalta, gdje se može sigurno pohraniti na tisuće godina. U nekim slučajevima, CO<sub>2</sub> se koristi za povećanje proizvodnje nafte ili plina (engl. *Enhanced Oil Recovery, EOR*), čime se dodatno smanjuju emisije i povećava učinkovitost procesa (Budinis i sur., 2018).

Tehnologiju hvatanja i skladištenja, skoro u potpunosti je zamijenila tehnologija hvatanja, korištenja i skladištenja (engl. *Carbon Capture, Utilisation and Storage, CCUS*). Hvatanje, korištenje i skladištenje ugljikovog CO<sub>2</sub>, tehnologija je koja obuhvaća metode koje

se koriste za korištenje i trajno uskladištenje CO<sub>2</sub>. Tehnologija ima mogućnost hvatanja CO<sub>2</sub> direktno iz atmosfere, ali i iz različitih postrojenja, uključujući postrojenja za proizvodnju električne energije i industrijska postrojenja koja koriste fosilna goriva ili biogoriva (IEA, 2019). Plin koji se izdvoji može biti korišten kao sirovina za proizvodnju sintetičkog goriva, kemikalija ili građevinskog materijala. Najveći dio izdvojenog plina se prodaje naftnim kompanijama, koje ga zatim koriste za povećanje proizvodnje naftnih ležišta. Ukoliko se izdvojeni CO<sub>2</sub> ne namjerava dalje koristiti potrebno ga je transportirati do mjesta skladištenja. Sastav i čistoća te prisutnost drugih tvari imaju vrlo značajan utjecaj na sve faze skladištenja CO<sub>2</sub>. Prisutnost određenog postotka drugih tvari kao što su voda, sumporovodik, dušik i kisik djelovat će na fizikalna i kemijska svojstva CO<sub>2</sub>, te na odvijanje pojedinih procesa skladištenja i njihov učinak (CO<sub>2</sub>GeoNet, 2009). Komprimirani ugljikov dioksid transportira se do mjesta skladištenja cjevovodima, brodovima, željeznicama ili cisternama. Cjevovodi su najčešći način transporta. Nakon transportiranja do mjesta skladištenja CO<sub>2</sub> se pod određenim tlakom utiskuje u ležište. Plin se skladišti na način da se utiskuje ispod površine na dubine od 800 m do 250 km. Skladišni prostor mora sadržavati dovoljno veliku poroznu sredinu, koja će onemogućavati migraciju plina.

Još jedna metoda zbrinjavanja CO<sub>2</sub> je koncept izravnog hvatanja ugljikovog dioksida iz atmosfere (engl. *Direct Air Capture, DAC*) koji je uveden 1999. godine (Sanz-Perez i sur., 2016). DAC predstavlja novi pristup sanaciji klimatskih promjena, koji bi doveo do neto negativnih emisija smanjenjem koncentracije ugljikovog dioksida u zraku. Količina ugljikovog dioksida koju treba ukloniti iz atmosfere da bi učinak postao mjerljiv bila bi značajna, pa je to stoga i ogroman tehnološki izazov. Iako se ovaj pristup pokazao vrlo učinkovitim, potrebna je velika količina energije za desorpciju ugljikovog dioksida iz sorbenta. Tehnologija membrane je jedan od vodećih pristupa za hvatanje ugljikova dioksida, uglavnom zato što nudi i nižu cijenu (ekonomski isplativija), jednostavnije je postavljanje i rad. Bitno je istaknuti da kako bi membrane bile privlačne za DAC, selektivna debljina membrane trebala bi biti smanjena na svega nekoliko nanometara kako bi se povećala njena propusnost. U usporedbi s evidentno povoljnim uvjetima u točkastim izvorima ugljikova dioksida, jedna je od glavnih motivacija za DAC da dolazi iz činjenice da skoro jedna trećina emisija ugljikova dioksida dolazi zapravo iz milijardi ne točkastih izvora, posebno transportnih vozila. Osobito izveden s membranama, DAC bi pomogao kompenzirati ove relativno male emitere CO<sub>2</sub> (Stampi-Bombelli i sur., 2020).

Kao posljednja metoda hvatanja i rješavanja problema CO<sub>2</sub> je kataliza ugljikova dioksida. Kataliza je proces kojim se povećava brzina kemijske reakcije, zahvaljujući sudjelovanju tvari koja se naziva katalizator. Prisustvo katalizatora omogućuje drugi reakcijski put sa smanjenom energijom aktivacije, što zatim rezultira većom brzinom reakcije pri istoj temperaturi i koncentraciji reaktanata. Emisije CO<sub>2</sub> u atmosferu globalna su briga, a nedavni



teorijski model pruža kvantitativni pristup njihovoj povezanosti s globalnim zagrijavanjem i klimatskim promjenama. Stehiometrija izgaranja daje rezultat da izgaranjem 1 tone ugljika u fosilnim gorivima rezultira s više od 3,5 tona CO<sub>2</sub> čija se akumulacija u atmosferi sada približava 1 tera toni. Prema modelu koji je razvila Međunarodna agencija za energiju (engl. *International Energy Agency, IEA*), kako bi se ograničilo povećanje temperature unutar 2 °C do 2050. godine, razina CO<sub>2</sub> ne smije prelaziti 15 giga tona godišnje. U tom nastojanju, povećanje energetske učinkovitosti i korištenje obnovljivih izvora imat će najveće učinke. Međutim, procjenjuje se da je udio „hvatanja“ ugljikovog dioksida oko 14 %, što znači da će biti dostupna ogromna količina relativno čistog CO<sub>2</sub>. Stoga prethodni koncept hvatanje i skladištenje CO<sub>2</sub> više nije adekvatan i već je izmijenjen u hvatanje, korištenje i skladištenje CO<sub>2</sub> što uključuje značajno iskorištavanje ugljikovog dioksida, odnosno konverziju ugljikovog dioksida u korisne produkte.

Hvatanje i korištenje CO<sub>2</sub> je ipak održiviji proces od hvatanja i skladištenja jer može djelomično zatvoriti ciklus ugljikova dioksida. Privlačno je skladištiti višak i neizvjesnu opskrbu energijom iz obnovljivih izvora kao stabilnu kemijsku energiju integrirano s korištenjem. Danas postoje mnogi učinkoviti načini iskorištavanja CO<sub>2</sub>, uključujući toplinsku katalizu, fotokatalizu, elektronsku katalizu i biokatalizu. Nekoliko radova je saželo integrirano hvatanje CO<sub>2</sub> i iskorištavanje pri niskim temperaturama, kao što je proizvodnja mravlje kiseline (Sun i sur., 2021). Proces redukcije CO<sub>2</sub> do formijata, temeljen na biokatalitičkim metodama, pokazao se vrlo obećavajućim zbog visoke selektivnosti i energetske učinkovitosti. Takvi integrirani pristupi predstavljaju ključne korake prema razvoju ekonomskih i okolišno prihvatljivih rješenja za upravljanje CO<sub>2</sub>.

## **2.4. BOKATALIZA**

Posljednjih je godina od velikog interesa upotreba biokatalize u industrijskim procesima, koja sve više zamjenjuje kemijsku sintezu. Od ranih 1970-ih, u industrijama s velikom potrebom za optički čistim spojevima, sve se više primjenjuju procesi sinteze posebnih (finih) i tradicionalnih kemikalija, farmaceutskih te agrokemijskih intermedijera koji se temelje na biokatalizi (Bell i sur., 2021). Biokataliza, kao metoda dobivanja organskih spojeva, uključuje katalitičke reakcije uz uporabu bioloških katalizatora. Biokatalizatori mogu biti raznih vrsta, uključujući čiste kulture mikroorganizama (poput kvasaca, bakterija, plijesni i algi), sirove ili pročišćene enzime, biljne i životinjske stanice i tkiva, kao i umjetne enzime (tzv. abzimi). Oni su ekološki prihvatljivi, budući da su potpuno biorazgradivi, neškodljivi za okoliš, proizvode manje otpada te omogućuju energetski učinkovit proces (Milner i Maguire, 2012).

Biokataliza predstavlja primjenu enzimskih katalitičkih svojstava koja omogućuju kemo-

, regio- i enantioselektivne reakcije. Ovo otvara vrata redizajniranju sintetskih puteva za proizvodnju važnih molekula u većim količinama (Kara i Liese, 2019). Za sintezu lijekova, materijala i kemikalija mogu se primijeniti tri pristupa, ovisno o složenosti. Prvi uključuje isključivo kemijske strategije, dok drugi kombinira kemijske i biokatalitičke korake, pri čemu se enzimi koriste zbog svoje selektivnosti i specifičnosti ili za zamjenu ekološki problematičnih procesa. Treći pristup temelji se na potpunoj biološkoj sintezi putem fermentacije ili višestepene biotransformacije (Ghisalba i sur., 2010).

Razvoj sekvencioniranja DNA i dostupnost više od 2000 bakterijskih i gljivičnih genoma omogućili su ubrzanje sinteze gena i smanjenje troškova proizvodnje enzima (Sheldon i Woodley, 2018). Dok su se ranije procesi prilagođavali dostupnim enzimima, danas se enzimi unaprijed prilagođavaju optimiziranim procesima, zahvaljujući tehnologijama poput *in vitro* evolucije, koje poboljšavaju njihovu aktivnost, specifičnost i stabilnost (Alcantara i sur., 2022). Stabilnost enzima tijekom skladištenja i upotrebe dodatno se poboljšava imobilizacijom, čime se osigurava njihova isplativost i ponovna upotreba.

Budući da su enzimi proizvedeni iz obnovljivih izvora, biorazgradivi su, netoksični i ekološki prihvatljivi (Sheldon, 2016). Njihova visoka kemoselektivnost, regioselektivnost i stereoselektivnost čine ih ključnim katalizatorima u organskoj sintezi. Blagi uvjeti reakcija – poput sobne temperature, atmosferskog tlaka i upotrebe vode – omogućuju smanjenje otpada, jer nije potrebno uklanjati, aktivirati ili zaštititi funkcionalne skupine. Široka primjena biokatalize postala je moguća zahvaljujući rekombinantnoj DNA tehnologiji, koja je smanjila troškove i omogućila održivu kemijsku proizvodnju (Sheldon, 2018).

#### 2.4.1. Enzimi

Enzimi, poznati i kao biokatalizatori, ključni su biološki katalizatori koji ubrzavaju biokemijske reakcije u živim organizmima. Osim svoje prirodne uloge, mogu se ekstrahirati iz stanica i koristiti za kataliziranje raznih komercijalno značajnih procesa. Njihova primjena obuhvaća proizvodnju zaslađivača, modifikaciju antibiotika, te upotrebu u sredstvima za čišćenje i deterdžentima (Robinson, 2015). Enzimi su idealni katalizatori u procesima gdje je potrebna visoka specifičnost reakcije, kao što su farmaceutska industrija i proizvodnja finih kemikalija, gdje su reakcije osjetljive na blage uvjete zbog nestabilnosti supstrata i proizvoda ili rizika od neželjenih nusreakcija (Illanes, 2008).

Enzime klasificira Odbor za nomenklaturu Međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB*) u šest glavnih razreda na temelju vrste kemijske reakcije koju kataliziraju, a svakom enzimu dodjeljuje se četveroznamenasti broj. Prva znamenka označava razred enzima, druga podrazred koji definira tip kemijske skupine na koju djeluje, treća označava podskupinu

unutar podrazreda, a četvrta broj unutar podskupine koji identificira specifični enzim (Boyce i Tipton, 2001). Razredi enzima uključuju oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze.

Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije prijenosa elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma, s 22 podrazreda, poput dehidrogenaza koje prenose vodik na koenzim. Transferaze omogućuju prijenos funkcionalnih skupina između donora i akceptora, s 9 podrazreda, ključne za metabolizam. Hidrolaze kataliziraju hidrolizu kovalentnih veza u prisutnosti vode, s 12 podskupina, te pod određenim uvjetima mogu stvarati veze eliminacijom vode. Liazze kataliziraju nehidrolitičko i neoksidativno cijepanje kemijskih veza, s 7 podskupina, koriste se i u sintezi optički aktivnih spojeva. Izomeraze kataliziraju pretvorbu molekula u njihove izomere, s 6 podgrupa, ovisno o vrsti izomera koji nastaju. Ligaze omogućuju kovalentno vezanje dviju molekula, s 6 podgrupa, ovisno o vrsti veze koja se formira. Među navedenim razredima, hidrolaze imaju najveću tehnološku važnost. Njihova otpornost, jednostavan proteinski sastav bez koenzima i često izvanstanična priroda čine ih osobito pogodnima za biokatalitičke procese (Illanes, 2008).

#### 2.4.2. Otapala za provođenje biokatalitičkih reakcija

Biokataliza se najčešće odvija netoksičnim vodenim otapalima, no pritom nastaje otpadna voda koja zahtijeva obradu prije ponovne uporabe ili ispuštanja. Obrada ovakve vode može biti zahtjevna i skupa zbog visokog vrelišta vode, velike energetske potrošnje za isparavanje te stvaranja emulzija, što vodu čini manje poželjnim otapalom u organskim sintezama (Vermue i Tamper, 1995). Biokatalitičke reakcije mogu se provoditi u raznim reakcijskim medijima, uključujući industrijske monofazne i višefazne sustave. Razvoj učinkovitog biokatalitičkog procesa u organskim otapalima ili bezotapalnim sustavima zahtijeva temeljito razumijevanje i pažljivu procjenu ključnih parametara otapala, enzima i njihovih međusobnih interakcija. Dvofazni sustavi, koji nastaju miješanjem dovoljne količine nepolarnog otapala s vodom, često se koriste za prevladavanje ograničenja biokatalize, poput inhibicije enzima supstratom ili produktom, kao i nepovoljne termodinamičke ravnoteže (Kara i Liese, 2019). Otapala za biokatalizu se konstantno usavršavaju i poboljšavaju, a do sada je poznato već nekoliko generacija. Otapalo koje kvalitativno i kvantitativno najviše odgovara načelima zelene kemije je voda, ali zbog svoje visoke polarnosti ona predstavlja problem za hidrofobne organske supstrate netopljive u vodi. Dodatan problem stvara uklanjanje vode iz reakcijske smjese jer su takvi procesi vrlo skupi, a u vodenim medijima se često odvijaju i vrlo nepoželjne reakcije poput hidrolize i racemizacije. Zbog svih navedenih razloga upotreba vode, u gotovo svim industrijski važnim bioprocesima, se nastoji izbjeći (Xu i sur., 2017).

Organska otapala kao reakcijski medij nude brojne prednosti, uključujući povećanu učinkovitost procesa, jednostavnije uklanjanje zbog niže točke vrelišta, smanjenu inaktivaciju ili inhibiciju uzrokovanu supstratima i/ili produktima, manji rizik od denaturacije biokatalizatora te suzbijanje nuspojava reakcija. Međutim, unatoč ovim prednostima, njihova upotreba dolazi s određenim izazovima, kao što su zapaljivost, hlapljivost i potencijalna inhibicija aktivnosti biokatalizatora. Kao alternativna otapala usklađena s načelima zelene kemije, ionske kapljevine napravile su značajan korak naprijed u kemijskoj industriji. Ova otapala prevladavaju mnoge nedostatke tradicionalnih organskih otapala, zahvaljujući svojim tehnološki poboljšanim svojstvima, kao što su ne hlapljivost i nezapaljivost, što ih čini sigurnijima za rukovanje i primjenu. Osim toga, pokazale su se učinkovitima u raznim biokatalitičkim i kemijskim procesima. Međutim, unatoč njihovim prednostima, otvorena pitanja o njihovoj ekološkoj i okolišnoj benignosti zahtijevaju daljnja istraživanja i razvoj još održivijih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

Kao odgovor na ove izazove, eutektička otapala pojavila su se kao inovativna alternativa i stekla naziv "otapala 21. stoljeća". Ova otapala nude dodatne prednosti, uključujući niže troškove proizvodnje, biorazgradivost i smanjen utjecaj na okoliš. Njihova jednostavna sinteza, koja često uključuje prirodne i lako dostupne komponente, čini ih privlačnima za industrijsku primjenu. Razvoj novih zelenih otapala, uključujući eutektička, ključan je za daljnju primjenu održivih kemijskih tehnologija (Alonso i sur., 2016; Paiva i sur., 2014).

## **2.5. NISKOTEMPERATurna EUTEKTIČNA OTAPALA**

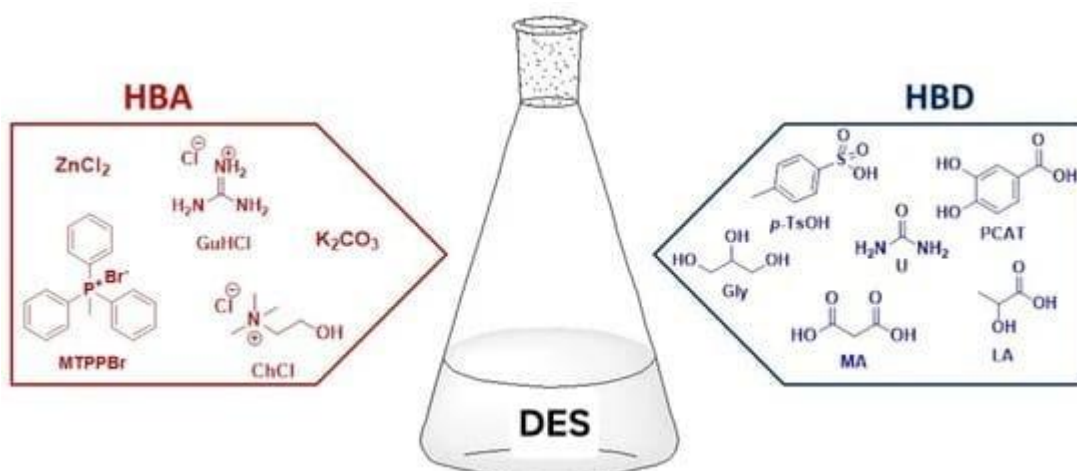
Niskotemperaturna eutektička otapala predstavljaju jednu od najperspektivnijih ekoloških alternativa konvencionalnim organskim otapalima. Njihova primjena dokazala je učinkovitost u raznim kemijskim procesima, uključujući sintezu, ekstrakciju, i pročišćavanje spojeva. Ključna prednost ovih otapala leži u njihovoj prilagodljivosti, odnosno mogu se dizajnirati prema specifičnim potrebama kombiniranjem različitih komponenata te odabirom odgovarajućih metoda pripreme. Ta fleksibilnost omogućuje razvoj inovativnih rješenja u različitim industrijama. Unutar ove skupine posebno se ističu prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*), koja se sve češće istražuju zbog svoje biorazgradivosti i netoksičnosti. Osim što pružaju izvanrednu učinkovitost u procesima ekstrakcije, NADES-i su privlačna opcija i zbog svoje uloge u održivom razvoju. Njihova primjena pomaže smanjenju upotrebe toksičnih otapala, čime doprinosi smanjenju štetnog otpada proizvodnih procesa. Ovaj pristup ne samo da potiče inovacije, već i zadovoljava sve veću potražnju za prirodnim i ekološki prihvatljivim proizvodima (Paiva i sur.,

2014).

### 2.5.1. Definicija i svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

DES-ovi se definiraju kao smjese čije je talište znatno niže od tališta pojedinačnih komponenata koje ih čine. Njihova jedinstvena karakteristika je značajno sniženje temperature tališta, najčešće do sobne temperature, koje može biti i do 100-200 °C niže u odnosu na izvorne spojeve. Ova pojava proizlazi iz specifične supramolekularne strukture DES-a, u kojoj različiti anionski i kationski spojevi djeluju kao Lewisove ili Brønstedove kiseline i baze. Sniženje tališta prvenstveno je rezultat delokalizacije naboja nastale stvaranjem vodikovih veza između donora i akceptora vodikove veze (slika 2). Takve interakcije omogućuju formiranje stabilnih smjesa s nižim energetske stanjem. Primjer tipičnog DES-a je smjesa kolin klorida (2-hidroksietil-trimetilamonijev klorid, talište 302 °C) i uree (talište 133 °C) u molarnom omjeru 1:2, koja se na sobnoj temperaturi ponaša kao kapljevina s talištem od samo 12 °C. Ova svojstva DES-a čine ih atraktivnima za brojne primjene, uključujući zelenu kemiju i biotehnološke procese (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

15).



**Slika 2.** Primjeri akceptora i donora vodikove veze korištenih za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala (DES) (prema Falcini i Gonzalo, 2024)

Niskotemperaturna eutektička otapala obično imaju veću gustoću od vode i većine konvencionalnih otapala, a karakterizira ih i izrazito visoka viskoznost. Ova svojstva mogu se djelomično prilagoditi dodavanjem vode, što omogućuje smanjenje viskoznosti i gustoće. Međutim, pri tome je važno održati integritet mreže vodikovih veza, jer prekomjerni dodatak vode može narušiti strukturu otapala (Radović i sur., 2021). DES otapala mogu se sintetizirati s različitim polaritetima i pH vrijednostima, čime se dodatno povećava njihova prilagodljivost.

Ova raznolikost u svojstvima, zajedno s mogućnošću dizajniranja otapala prema specifičnim potrebama, otvara široke mogućnosti njihove primjene. Zahvaljujući svojoj svestranosti, DES otapala imaju veliki potencijal za korištenje u raznim industrijskim i znanstvenim područjima, gdje se traže prilagođena, učinkovita i ekološki prihvatljiva rješenja.

### 2.5.2. Primjena DES-ova

Zahvaljujući svojim jedinstvenim značajkama, DES-ovi se sve više ističu kao održiva alternativa tradicionalnim otapalima. Njihova pristupačna cijena, jednostavna i ekonomična sinteza te visoka razina sigurnosti čine ih ključnim elementima u razvoju ekološki prihvatljivih industrijskih procesa. Posebno su značajni u područjima zelene kemije i biokatalize, gdje njihova prilagodljivost i niska toksičnost omogućuju inovativna rješenja usklađena s načelima održivog razvoja.

Budući da eutektična otapala imaju svojstvo odličnog otapanja raznih spojeva kao što su proteini, lijekovi, aminokiseline, soli, šećeri i metalni oksidi, zastupljena su u elektrokemijskim procesima elektrodepozicije, odvajanja metala i elektropoliranja. Zahvaljujući svojstvu otapanja CO<sub>2</sub> koriste se za kemijsku fiksaciju CO<sub>2</sub> i pročišćavanju plinova. S obzirom na ekološku prihvatljivost, njihova primjena nalazi se i u nukleofilnim reakcijama, elektrofilnim supstitucijama, kopolimerizacijama, dehidraciji ugljikohidrata, reakcijama redukcije i mnogim drugim procesima (Durand i sur., 2013). Kao što je već prethodno spomenuto, zbog velikog broja akceptora i donora vodikove veze koji se mogu koristiti za pripravu DES-ova, njihova fizikalno-kemijska svojstva se mogu značajno razlikovati. Zahvaljujući tome moguće je dizajnirati njihovu strukturu s ciljem racionalnog osmišljavanja otapala za specifičnu svrhu. Unazad desetak godina, ova otapala se intenzivno proučavaju u području elektrokemije, sintetskoj analizi i biokatalizi, biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji, separacijskim procesima, farmaceutskom inženjerstvu te mnogim drugim područjima. U području sintetske analize i biokatalize se koristi zbog sposobnosti otapanja različitih organskih soli i anorganskih spojeva te stabilizacije i povećanja selektivnosti biokatalizatora, ali i uloge katalizatora (Radović i sur., 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Enzim

Enzim korišten za provedbu enzimske reakcije je NADH-ovisna formijat dehidrogenaza (FDH) iz *Pseudomonas sp.* 101 (Tishkov i sur., 1993).

##### 3.1.2. Kemikalije

**Tablica 1.** Popis korištenih kemikalija u izradi rada

Kemikalija	Proizvođač
Acetamid	Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
Anhidrid octene kiseline	Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
Betain	Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
Dikalijev hidrogenfosfat	Kemika, Zagreb, RH
Etanol 96 % (v/v)	Kemika, Zagreb, RH
Glicerol	Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
Izopropanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
Kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Zagreb, RH
Kolin-klorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
Limunska kiselina	Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
Natrijev acetat	Kemika, Zagreb, RH
Natrijev formijat	Kemika, Zagreb, RH
Natrijev hidroksid	Kemika, Zagreb, RH
Nikotinamid adenin dinukleotid - oksidirani	Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Nikotinamid adenin dinukleotid – reducirani	Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Ugljikov dioksid (99,5 %)	Messer Hrvatska Plin, Zaprešić, RH

### 3.1.3. Pribor i aparatura

**Tablica 2.** Popis korištene opreme u izradi rada

Vrsta opreme	Proizvođač
Analitička vaga, BAS 31 plus	BOECO, Njemačka
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
pH staklena elektroda	Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
Rotacioni viskozimetar	Anton Paar ViscoQC 300, Ashland, Virginia, SAD
UV-Vis spektrofotometar	SpectraMax® ABS Plus, Molecular Devices, San Jose, CA, SAD
Mettler Toledo CO <sub>2</sub> senzor InPro 5000i/120	Greifensee, Švicarska

### 3.1.4. Računalni programi

**Tablica 3.** Popis računalnih programa korištenih u izradi rada

Naziv programa	Proizvođač
BIOVIA TmoleX19 2021	Dassault Systems, Pariz, Francuska
BIOVITA COSMOtherm 2020	Dassault Systems, Pariz, Francuska
MATLab R2022b akademska licenca	MathWorks, Natick, SAD
Statistica 14.0.	Tibco Software Inc, Santa Clara, SAD
WR Mathematica 10.0	Wolfram Research, Champaign, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala

DES-ovi su pripremljeni kombiniranjem prema unaprijed definiranim molarnim omjerima akceptora (engl. *hydrogen bond receptor, HBA*) i donora vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor, HBD*) uz dodatak deionizirane vode (tablica 4). U tu svrhu, pomoću analitičke vage, izvagane su unaprijed izračunate potrebne mase pojedinih komponenti koje su zatim prenesene u Falcon epruvete za pripremu DES-ova. Pipetom je u smjesu dodana



izračunata količina vode, kako bi postigao maseni udio vode u otapalu od 10 %, 30 %, 50 %, 80 % ili 90 % (w/w). Priprema se odvijala u laboratorijskoj termotresilici, postavljenoj na temperaturi od 60 °C i 170 okretaja u minuti. DES-ovi su ostavljeni preko noći kako bi se postigla potpuna homogenost. Nakon završetka sinteze, vizualno je procijenjena homogenost i konzistencija otopine, a ukoliko je sinteza bila uspješna, odnosno ako je nastala bistra, bezbojna i homogena tekućina, DES-ovi su korišteni za izvođenje eksperimenta.

**Tablica 4.** Pripremljena niskotemperaturna euteksička otapala

DES	HBA	HBD	Molarni omjer (HBA : HBD)	Voda/pufer	Udio vode/pufera u DES-u (%)	Kratica
<b>Kolin-klorid: glicerol (ChCl:Gly)</b>	kolin-klorid	glicerol	1:2	Voda	10	ChCl:Gly <sub>10</sub> %V
					30	ChCl:Gly <sub>30</sub> %V
					50	ChCl:Gly <sub>50</sub> %V
					80	ChCl:Gly <sub>80</sub> %V
					90	ChCl:Gly <sub>90</sub> %V
<b>Kolin-klorid: glicerol (ChCl:Gly)</b>	kolin-klorid	glicerol		Pufer	10	ChCl:Gly <sub>10</sub> %P
					30	ChCl:Gly <sub>30</sub> %P
					50	ChCl:Gly <sub>50</sub> %P
					80	ChCl:Gly <sub>80</sub> %P
					90	ChCl:Gly <sub>90</sub> %P
<b>Betain: glicerol (B:Gly)</b>	betain	glicerol	Voda	10	B:Gly <sub>10</sub> %V	
				30	B:Gly <sub>30</sub> %V	
				50	B:Gly <sub>50</sub> %V	
				80	B:Gly <sub>80</sub> %V	
				90	B:Gly <sub>90</sub> %V	
<b>Betain: glicerol (B:Gly)</b>	betain	glicerol	Pufer	10	B:Gly <sub>10</sub> %P	
				30	B:Gly <sub>30</sub> %P	
				50	B:Gly <sub>50</sub> %P	
				80	B:Gly <sub>80</sub> %P	
				90	B:Gly <sub>90</sub> %P	

HBD-donor vodikove veze, HBA-akceptor vodikove veze, V-voda, P-pufer

### 3.2.2. Određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava DES-ova

Pripremljenim DES-ovima određene su pH vrijednost, viskoznost i gustoća pri sobnoj temperaturi od 25 °C. Sva mjerenja su odrađena u tri ponavljanja, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost.

#### 3.2.2.1. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost navedenih DES-ova određene su korištenjem univerzalnog uređaja za mjerenje pH, koja je prethodno kalibrirana. Elektrodu je potrebno uroniti u otapalo te se nakon stabilizacije, očita pH vrijednost na uređaju.

#### 3.2.2.2. Određivanje viskoznosti

Viskoznost niskotemperaturnih eutektičkih otapala je izmjerena pomoću rotacijskog viskozimetra pri temperaturi  $20 \pm 2$  °C. Otopina (2 mL) se stavlja u CC12 nastavak za male volumene te se pokreće pokus odabirom moda rada i uputa prikazanih na displeju uređaja. Za svaki uzorak provode se 3 paralelna mjerenja, a dobiveni rezultati prikazani su kao prosječna vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

#### 3.2.2.3. Određivanje gustoće

Gustoća DES-ova mjerena je pomoću piknometra. U piknometar se doda otprilike 2 mL svakog otapala. Kada se zatvori, višak tekućine izlazi van što omogućuje točno određeni volumen otapala. Gustoća se određuje tako da je prvo, na tehničkoj vagi, izvagan potpuno suh, prazan i čist piknometar i sa staklenim čepom, a potom napunjen piknometar s uzorkom. Masa DES-a je određena preko jednadžbe 1, a zatim iz dobivene mase je izračunata gustoća DES-a preko jednadžbe:

$$m_{DES-a} = m_{puni\ piknometar} - m_{prazni\ piknometar} [kg] \quad [1]$$

$$\rho_{DES-a} = \frac{m_{DES-a}}{V_{pikonemtar}} \left[ \frac{kg}{m^3} \right] \quad [2]$$

gdje je  $m_{DES-a}$  masa DES-a (kg),  $\rho_{DES-a}$  gustoća DES-a ( $kg\ m^{-3}$ ) i  $V_{pikonemtar}$  volumen DES-a u piknometru ( $m^3$ ).

### 3.2.3. Priprema pufera i otopina enzima, koenzima i supstrata

#### 3.2.3.1. Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH=7,5)

4,3522 g  $K_2HPO_4$  i 3,4005 g  $KH_2PO_4$  se otopi u 500 mL destilirane vode te se podesi pH otopine na 7,5 postupnim dodavanjem 4M NaOH.

#### 3.2.3.2. Otopina enzima (12,8 mg mL<sup>-1</sup>)

6,4 mg enzima formijata dehidrogenaze (FDH) se izvaže i otopi u 0,5 mL svakog DES-a i u referentnom puferu. DES-ovi koji su korišteni su kolin klorid-glicerol i betain-glicerol s različitim udjelima pufera ili vode (10 %, 30 %, 50 %, 80 % i 90 % w/w). Pripremljena otopina se promiješa na vortexu uz zagrijavanje kako bi se potpuno otopila smjesa.

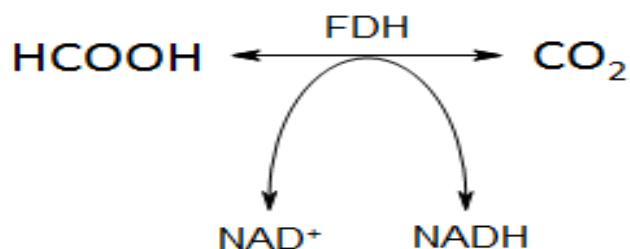
#### 3.2.3.3. Otopina koenzima (25 mg mL<sup>-1</sup>)

6,25 mg  $NAD^+$  se izvaže i otopi u 0,25 mL DES-a kolin-klorid i urea u omjeru 1:2 s 80 % deionizirane vode w/w). Tako pripremljena otopina se promiješa na vortexu te zatim čuva na 4 °C do korištenja. Prije korištenja se otopina ponovno inkubira na sobnu temperaturu te vortexira.

#### 3.2.3.4. Otopina supstrata (0,5 mg mL<sup>-1</sup>)

125,0 mg natrijeva formijata se izvaže i otopi u 0,25 mL deionizirane vode. Pripremljena otopina supstrata se promiješa na vortexu. Početna otopina se priprema svježja svaki dan.

### 3.2.4. Praćenje aktivnosti FDH u pripremljenim DES-ovima



**Slika 3.** Shema reakcije oksidacije formijata u  $CO_2$  koju katalizira formijat dehidrogenaza (Wobus, 2016)

Kako bi se odredila aktivnost FDH korišten je spektrofotometrijski test temeljen na reakciji oksidacije formijata u CO<sub>2</sub> u odabranim DES-ovima i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puferu. Reakciju katalizira FDH uz istovremenu redukciju NAD<sup>+</sup> u NADH (slika 3; tablica 5). Spektrofotometrijsko mjerenje promjene apsorbancije NADH provodilo se pri  $\lambda = 340$  nm budući toliko iznosi valna duljina pri kojoj NADH apsorbira maksimalnu količinu svjetlosti dok njegova oksidirana forma (NAD<sup>+</sup>) u valnom području 300 – 400 nm ne apsorbira svjetlost.

**Tablica 5.** Sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti enzima FDH

Komponenta	Koncentracija otopine	Volumen
Enzim FDH	12,8 mg mL <sup>-1</sup>	30 $\mu$ L
Koenzim NAD <sup>+</sup>	25 mg mL <sup>-1</sup>	1 $\mu$ L
Supstrat Na formijat	0,5 g mL <sup>-1</sup>	5 $\mu$ L
Pufer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	215 $\mu$ L
		<b>= 251 <math>\mu</math>L</b>

### 3.2.5. Mjerenje topljivosti CO<sub>2</sub> i pH nakon upuhivanja CO<sub>2</sub>

Temeljem pretpostavke koju su opisali Obert i Dave (1999), mjerenje topljivosti CO<sub>2</sub> se provodi u staklenoj čaši gdje se CO<sub>2</sub> propuhuje kroz testirane sustave otapala DES-ova i referentnim puferom u volumenu od 5 mL. Propuhivanje se odvija 90 min što je dovoljno za postizanje točke zasićenja te pri brzini protoka CO<sub>2</sub> od 100 mL min<sup>-1</sup>. Kako bi se spriječio gubitak CO<sub>2</sub>, staklena čaša se zatvara parafilmom. Koncentracija CO<sub>2</sub> u otapalu se kontinuirano prati pomoću CO<sub>2</sub> senzora Mettler Toledo.

Osim praćenja topljivosti CO<sub>2</sub>, prati se i pH vrijednost nakon upuhivanja. pH vrijednost je određena korištenjem univerzalnog uređaja za mjerenje pH, prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.1.

### 3.2.6. Mjerenje kratkoročne stabilnosti koenzima NADH nakon upuhivanja

Istraživanje stabilnosti koenzima NADH provedi se u različitim otapalnim sustavima kroz 90 minuta, a apsorpcijski spektri se bilježe u rasponu valnih duljina od 230 do 400 nm pomoću UV-Vis spektrofotometra. Svako mjerenje se ponavlja tri puta radi pouzdanosti rezultata. Spektralno područje apsorpcije NADH-a ima karakterističan maksimum pri 260 nm, koji je posljedica adenzin monofosfatne komponente, te drugi vrh na 340 nm, koji dolazi od neutralne nikotinamidne skupine. Smanjenje apsorbancije na 340 nm prati kinetiku prvog reda pomoću koje se izračuna konstanta brzine degradacije ( $k_{NADH}$ ) (jednadžba 3):

$$k_{NADH} = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{A_0}{A_t} \right) \quad [3]$$

gdje je  $k_{NADH}$  konstanta brzine degradacije prvog reda ( $\text{min}^{-1}$ ),  $A$  je apsorbancija na 340 nm, bilo u trenutku nula,  $A_0$ , ili u trenutku  $t$ ,  $A_t$  (Wu i sur., 1986).

### 3.2.7. Redukcija $\text{CO}_2$ katalizirana enzimom FDH

Reakcija redukcije  $\text{CO}_2$  katalizirane enzimom FDH se provela se u odabranom DES-u (ChCl:Gly<sub>80</sub>%P) i 50 mM puferu kalijevog fosfata (pH 7,5). Odabrano otapalo najprije se zasiti s  $\text{CO}_2$  uvođenjem tijekom 90 minuta  $100 \text{ mL min}^{-1}$  odnosno da se postigne točka zasićenja s  $\text{CO}_2$ .

Enzimska reakcija se pokreće dodavanjem NADH i FDH puferu i ChCl:Gly<sub>80</sub>%P zasićenima s  $\text{CO}_2$  kako bi se postigle konačne koncentracije od  $16,4 \text{ mg mL}^{-1}$  koenzima NADH te  $28,8 \text{ mg mL}^{-1}$  enzima FDH. Reakcije se odvijaju u malim epruvetama radnog volumena  $250 \mu\text{L}$  pomoću magnetske miješalice te pri sobnoj temperaturi (tablica 6). U određenim intervalima su uzimani alikvoti kako bi se pratila potrošnja NADH koja se mjeri spektrofotometrijski na 340 nm te ukazuje na aktivnost enzima u redukciji  $\text{CO}_2$ . Kako bi se potvrdili rezultati i procijenila stabilnost koenzima NADH u uvjetima reakcije, provode se i kontrolne reakcije bez enzima FDH. One omogućuju praćenje stabilnosti NADH u puferu i odabranom DES-u tijekom reakcije.

**Tablica 6.** Sastav reakcijske smjese za reakciju redukcije NADH uz pomoć FDH

Komponenta	Koncentracija
Enzim FDH	$28,8 \text{ mg mL}^{-1}$
Koenzim NADH	$16,4 \text{ mg mL}^{-1}$
ChCl:Gly <sub>80</sub> % P s $\text{CO}_2$ /	$1149 \text{ mg mL}^{-1}$
Pufer $\text{KH}_2\text{PO}_4$ s $\text{CO}_2$	$1029 \text{ mg mL}^{-1}$

#### 3.2.7.1. Određivanje koncentracije formijata

Metoda koja služi za određivanje koncentracije formijata je opisana u radu Lang i Lang (Singh i sur., 2018). Prvo se priprema otopina A i otopina B. Otopina A se priprema tako da se 0,5 g limunske kiseline i 10 g acetamida otopi u 100 mL izopropanola. Otopina B se priprema

tako da se otopi 30 g natrijevog acetata u 100 mL destilirane vode. Nakon pripreme otopina A i B, slijedi metoda. Prvo se uzorci alikvota 25  $\mu$ L koji sadrže formijat pomiješaju s 50  $\mu$ L otopine A, 2,5  $\mu$ L otopine B i 175  $\mu$ L 100 % anhidrida octene kiseline. Smjesa se zatim inkubira 2 h na temperaturi od 50 °C uz povremeno miješanje. Prisutnost formijata bi trebala rezultirati crvenim obojenjem koje se mjeri spektrofotometrijski na 515 nm.

### 3.2.8. Statistička analiza i matematički modeli enzima FDH

#### 3.2.8.1. Osnovna statistička analiza, raspodjela podataka i korelacijska matrica

Sva mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova, kao i rezidualne aktivnosti formijat dehidrogenaze, provedena su u tri ponavljanja, a osnovna statistička analiza — uključujući srednju vrijednost i standardnu devijaciju — provedena je u programskom paketu Statistica 14.0. Za analizu korelacija između eksperimentalnih podataka korištena je Spearmanova korelacijska matrica. Spearmanov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) predstavlja neparametarsku mjeru, a računa se prema jednadžbi 4 :

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N d_i^2}{N^3 - N} \quad [4]$$

u kojoj je  $N$  oznaka za broj podataka,  $d_i$  kvadrat razlike rangova prve (nezavisne) i druge (zavisne) varijable. Kada je određivana značajnost koeficijenta korelacije, kao granična vrijednost značajnih i neznčajnih koeficijenata uzeta je 0,05, odnosno ako je  $\rho < 0,05$  korelacija je značajna, a ako je  $\rho > 0,05$  koeficijent korelacije nije značajan.

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

Za karakterizaciju DES-a kao otapala korišten je termodinamički model COSMO-RS, koji je ujedno i programski paket istog naziva. COSMO-RS, kojeg su razvili Klamt i suradnici (2002), temelji se na kvantno-kemijskim modelima. Prema COSMO-RS teoriji, tekućine se modeliraju kao skup idealiziranih molekula gusto zbijenih površinskim nabojima, označenih grčkim slovom sigma ( $\sigma$ ). Program generira distribucijsku krivulju sigma naboja, poznatu kao sigma profil. Sigma profili za pojedine komponente DES-a dobiveni su korištenjem COSMO-RS paketa, a iz postojeće baze podataka geometrijski i energijski optimiranih molekula izračunata je profil sigma krivulja, kvantitativna reprezentacija naboja na površini molekule. Molekule koje djeluju kao akseptori vodikove veze (HBA) pokazuju pikove u negativnim potencijalima, dok molekule donori vodikove veze (HBD) imaju pikove u pozitivnim

potencijalima. Nepolarne molekule karakterizira područje potencijala blizu nule. Uz elektrostatsku interakciju i vodikove veze, COSMO-RS uzima u obzir i van der Waalove (vdW) interakcije između površinskih segmenata. Za definiranje molekularnih deskriptora za sve komponente DES-a, dobiveni sigma profil za svaki HBA, HBD i vodu podijeljen je u 10 intervala, svaki širine  $0,005 \text{ e}/\text{Å}^2$ , pokrivajući raspon od  $-0,025$  do  $+0,025 \text{ e}/\text{Å}^2$ . Površina ispod svake regije integrirana je zasebno kako bi se dobili numerički podaci za statističku analizu. Zbroj vrijednosti iz svakog od 10 intervala čini sigma profil svake komponente (HBD, HBA, voda), pri čemu su granične vrijednosti intervala prepolovljene i pribrojene susjednim intervalima. Tako je dobiven  $\sigma$  profil svake komponente korištene u izradi DES-ova (HBD, HBA, voda) podijeljen na 10 intervala.

Jednom dobiveni sigma profili (jednadžba 5) pojedinačnih komponenta povezani su s korištenim otapalima radi proučavanja aktivnosti FDH. Za svaki DES izračunato je 10 molekularnih deskriptora koristeći jednadžbu, gdje  $X_j$  predstavlja molarni udio svake pojedinačne komponente  $j$ ,  $\sigma_{\sigma\text{-profile},j}^i$  označava sigma profil te komponente  $j$ , a BK broj komponenta u smjesi. Na ovaj način dobiveno je 10 ulaznih i neovisnih varijabli, koje predstavljaju termofizikalne karakteristike svakog DES-a. Te su varijable označene kao  $\sigma_{DES}^i (i=1-10)$  koriste se za procjenu učinka DES-a na aktivnost FDH enzima.

$$\sigma_{DES}^i = \sum_{j=1}^{BK} X_j \cdot \sigma_{\sigma\text{-profile},j}^i \quad [5]$$

### 3.2.8.3. Izrada korelacijskog modela između aktivnosti FDH i molekularnih deskriptora

Polazna pretpostavka statističke obrade podataka bila je da eksperimentalno dobivene vrijednosti aktivnosti FDH u DES-ovima možemo opisati funkcijom konačnog sigma-profila DES-a u kojem je aktivnost izmjerena. Taj profil prikazan je kao skup deskriptora  $\sigma_{mix}^i$ , prema definicijama u pripadajućim jednadžbama.

$$A_R = f(\rho, \eta, pH, \sigma_{mix}^1, \sigma_{mix}^2, \sigma_{mix}^3, \sigma_{mix}^4, \sigma_{mix}^5, \sigma_{mix}^6, \sigma_{mix}^7, \sigma_{mix}^8, \sigma_{mix}^9, \sigma_{mix}^{10}) \quad [6]$$

### 3.2.8.4. Model djelomične linearne regresije (DLR)

Za opisivanje odnosa između ulaznih varijabli (molekularnih deskriptora DES-a) i izlaznih varijabli (aktivnosti FDH u DES-ovima) korišteni su modeli djelomične linearne regresije (engl. *Piecewise Linear Regression, PLR*). Ulazne varijable odabrane su na temelju

analize Spearmanove korelacijske matrice (jednadžba 7).

$$A_R = (b_{01} + b_{11} \cdot \rho + b_{21} \cdot \eta + b_{31} \cdot pH + b_{41} \cdot \sigma_{\text{mix}}^1 + b_{51} \cdot \sigma_{\text{mix}}^2 + b_{61} \cdot \sigma_{\text{mix}}^3 + b_{71} \cdot \sigma_{\text{mix}}^4 + b_{81} \cdot \sigma_{\text{mix}}^5 + b_{91} \cdot \sigma_{\text{mix}}^6 + b_{101} \cdot \sigma_{\text{mix}}^7 + b_{111} \cdot \sigma_{\text{mix}}^8 + b_{121} \cdot \sigma_{\text{mix}}^9 + b_{131} \cdot \sigma_{\text{mix}}^{10}) \cdot (A_R \leq b_n) + (b_{02} + b_{12} \cdot \rho + b_{22} \cdot \eta + b_{32} \cdot pH + b_{42} \cdot \sigma_{\text{mix}}^1 + b_{52} \cdot \sigma_{\text{mix}}^2 + b_{62} \cdot \sigma_{\text{mix}}^3 + b_{72} \cdot \sigma_{\text{mix}}^4 + b_{82} \cdot \sigma_{\text{mix}}^5 + b_{92} \cdot \sigma_{\text{mix}}^6 + b_{102} \cdot \sigma_{\text{mix}}^7 + b_{112} \cdot \sigma_{\text{mix}}^8 + b_{122} \cdot \sigma_{\text{mix}}^9 + b_{132} \cdot \sigma_{\text{mix}}^{10}) \cdot (A_R > b_n) \quad [7]$$

Princip djelomične linearne regresije temelji se na podjeli podataka u nekoliko regija koje slijede linearne trendove, što omogućuje bolje podudaranje modela s podacima. U ovom istraživanju, rezultati za aktivnost FDH podijeljeni su u dvije regije s jednom prijelomnom točkom. Parametri su procijenjeni putem dviju regresijskih jednadžbi: jedna se primjenjuje kada su vrijednosti zavisne varijable (Y) manje ili jednake vrijednosti prijelomne točke  $b_n$ , dok se druga koristi kada su vrijednosti zavisne varijable (Y) veće od prijelomne točke  $b_n$ . Parametri modela djelomične linearne regresije procijenjeni su pomoću Levenberg-Marquardtovog algoritma u softveru Statistica 14.0.

Skup podataka od 63 točke za svaku izlaznu varijablu nasumično je podijeljen u omjeru 70:30 na kalibracijski skup i skup za predviđane podataka. Primjenjivost razvijenih kalibracijskih modela procijenjena je pomoću koeficijenta determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}^2_{adj}$ ) i korijena srednje kvadratne pogreške za kalibraciju (engl. *Root Mean Square Error for Calibration, RMSEC*). Učinkovitost predviđanja modela procijenjena je pomoću koeficijenta determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^2_{adj}$ ), korijena srednje kvadratne pogreške za predviđanje (engl. *Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP*), standardne pogreške predviđanja (engl. *Standard Error of Prediction, SEP*), omjera predviđanja i odstupanja (engl. *Ratio of Prediction to Deviation, RPD*) te omjera raspona pogreške (engl. *Ratio of the Error Range, RER*) (Fearn, 2002).

### 3.2.9. Procjena produktivnosti biokatalitičkih procesa

Produktivnost pretvorbe CO<sub>2</sub> katalizirane FDH u formijat je procijenjen na temelju kinetike enzimske reakcije uključujući i stopu inaktivacije enzima (Bisswanger, 2017). Michaelis-Mentenovi kinetički parametri procijenjeni su prilagodbom profila koncentracije NADH u diferencijalnu jednadžbu (jednadžba 8) koristeći WR Mathematica 10.0. Promjena u koncentraciji supstrata tijekom vremena bez inaktivacije enzima glasi:



$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = -\frac{v_{max} \cdot c_{NADH}}{K_s + c_{NADH}} \quad [8]$$

gdje  $\frac{dc_{NADH}}{dt}$  označava promjenu koncentracije u jedinici vremena ( $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ),  $v_{max}$  maksimalnu brzinu reakcije koja se postiže kada je enzim u potpunosti zasićen supstratom ( $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ),  $c_{NADH}$  koncentraciju NADH ( $\text{mol L}^{-1}$ ) i  $K_s$  konstanta zasićenja NADH ( $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

Uzimajući u obzir inaktivaciju enzima, dobiva se sljedeći izraz za brzinu reakcije ( $t$ ) (jednadžba 9):

$$v(t) = \frac{v_{max} \cdot c_{NADH}}{K_s + c_{NADH}} \cdot e^{-k_{FDH} \cdot t} \quad [9]$$

gdje je  $v(t)$  brzina reakcije ( $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ),  $k_{FDH}$  konstanta smanjenja brzine ( $\text{s}^{-1}$ ) i  $t$  vrijeme (s).

Produktivnost FDH-katalizirane pretvorbe  $\text{CO}_2$  u formijat može se izračunati integracijom (jednadžba 10) od početka reakcije ( $t = 0$ ) do njenog završetka ( $t = t_f$ ), kako bi se dobilo:

$$\begin{aligned} \text{produktivnost} &= \int_0^{t_f} \frac{v_{max} \cdot c_{NADH}}{K_s + c_{NADH}} \cdot e^{-k_{FDH} \cdot t} \cdot dt \\ &= \frac{v_{max} \cdot c_{NADH}}{K_s + c_{NADH}} \cdot \left( \frac{e^{-k_{FDH} \cdot t_f}}{k_{FDH}} \right) \end{aligned} \quad [10]$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Niskotemperaturna eutektička otapala su pokazali znatan potencijal u poboljšanju biokatalize kroz različite mehanizme. Ova otapala mogu poboljšati topljivost supstrata, djelovati kao pametni ko- supstratii utjecati na stereoselektivnost enzima. Nadalje poznati su i po svojoj sposobnosti da poboljšaju aktivnost enzima i posebno radnu stabilnost u reakcijskim medijima (Zhang i sur., 2024).

Unatoč brojnim prednostima DES-a, modifikacija konvencionalnog vodenog medija ovim otapalima može značajno utjecati na razne aspekte reakcije, ponekad na neželjene načine. Obećavajuća metoda za racionalno projektiranje otapala za određeni biokatalitički sustav uključuje komplementarni pristup koji integrira eksperimentalni pregled s računalnim alatima. DES-ovi koji stabiliziraju enzime često su loš medij za katalitičke reakcije zbog smanjene aktivnosti enzima i visoke viskoznosti otapala, što rezultira malim brzinama reakcije (Taklimi i sur., 2023). Također jedan od glavnih izazova u biokatalitičkim reakcijama potpomognutim DES-om je izolacija proizvoda, kao i regeneracija i ponovna upotreba DES-a.

Redukcija CO<sub>2</sub> — bilo elektrokemijskim ili (bio)katalitičkim putem — proizvodi formijat, prvi stabilni intermedijarni proizvod u konverziji CO<sub>2</sub>. Dobiveni formijat može se dalje pretvoriti u vrijedne kemikalije, poput formaldehida i metanola, putem dodatnih enzimskih reakcija koje uključuju aldehyd-dehidrogenazu i alkohol-dehidrogenazu. Međutim, formijat se sve više prepoznaje kao izvor energije sam po sebi (Villa i sur., 2023). Poznato je da enzim FDH može reducirati CO<sub>2</sub> u mravlju kiselinu koristeći koenzim poput NADH ili NADPH. (Villa i sur., 2023). Složenost ove reakcije proizlazi iz nekoliko ograničenja: (i) niska koncentracija CO<sub>2</sub> dostupna za enzim, što dovodi do niske brzine reakcije, (ii) relativna nestabilnost FDH i koenzima NADH u vodenim okruženjima, (iii) zakiseljavanje reakcijskog medija, prvo otapanjem CO<sub>2</sub>, a zatim stvaranjem mravlje kiseline, što može dodatno inhibirati FDH i degradirati NADH (Calzadiaz-Ramirez i Meyer, 2022; Zhang i sur., 2018). Uklanjanje ovih ograničenja je ključno za stvaranje FDH katalizirane redukcije CO<sub>2</sub> u praktičnom i ekonomski održivom procesu za industrijske i ekološke primjene. Između ostalih pristupa, prelazak na nekonvencionalne medije mogao bi pomoći u rješavanju gore navedenih problema.

Ovo istraživanje je fokusirano na ispitivanje potencijala DES-ova kao otapala u biokatalitičkoj redukciji CO<sub>2</sub> primjenom enzima formijat dehidrogenaze (FDH). Odabir navedenih DES-ova temelji se na dosadašnjim istraživanjima koja ukazuju na to da su DES-ovi na bazi poliola, s kolin kloridom ili betainom kao akseptori vodika, najučinkovitiji mediji za stabilizaciju različitih dehidrogenaza, uključujući i FDH (Bittner i sur., 2022). Također, nedavno

je dokazano da DES na bazi glicerola stabiliziraju NAD koenzime (Radović i sur., 2022). Osim toga, Biswas i sur. (2023) i Leron i sur. (2013) izvijestili su da je među nekoliko DES-a na bazi kolin-klorida koji sadrže ureu, etilen glikol i glicerol kao HBD, onaj s glicerolom ima najveću topljivost CO<sub>2</sub>.

Na temelju svega navedenog, u ovom radu su odabrana dva DES-a na bazi glicerola (Gly) s kolin-kloridom (ChCl) ili betainom kao akceptorima vodika u molarnom omjeru 1:2 te pripremljene odgovarajuće otopine s različitim udjelima vode i 50mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,5) (10 % - 90 %, w/w). U sveukupno 20 različitih DES-ova praćena je aktivnost formijat dehidrogenaze (FDH), kratkoročne stabilnosti NADH nakon zasićenja otapala s CO<sub>2</sub>, topljivost CO<sub>2</sub> te na kraju i dokazana učinkovitost pristupa reakcijom redukcije CO<sub>2</sub> u formijat kataliziranom NADH ovisnom formijat dehidrogenazom (FDH). Svi rezultati su obrađeni statistički kako bi se utvrdilo koja fizikalno-kemijska svojstva DES-a (pH, viskoznost, gustoća te molekularni deskriptori) doprinose aktivnosti enzima i stabilizaciji NADH te su razvijeni matematički modeli koji se temelje na linearnoj regresiji kojom se opisuje veza između fizikalnih svojstava DES-a, molekularnih deskriptora ( $\sigma$ -profila) s njihovim učinkom na aktivnost enzima FDH.

#### **4.1. PRIPREMA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČNIH OTAPALA I FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA**

Jedna od ključnih prednosti korištenja primjene DES-a u biokatalizi je njihova iznimna svestranost i prilagodljivost. Promjenom komponenata, kao što su donor vodikove veze i akceptor vodikove veze, te podešavanjem udjela vode, DES se može prilagoditi specifičnim zahtjevima biokatalitičkih procesa. Prema procjenama, postoji otprilike 10<sup>6</sup> različitih strukturnih varijacija DES-a (Panić i sur., 2021), ali uz stalno otkrivanje novih komponenti, višekomponentnih DES-ova i različitih molarnih omjera (uključujući sadržaj vode), danas se procjenjuje da je broj mogućih kombinacija gotovo neograničen.

Na temelju navedenih razmatranja, za potrebe istraživanja, odabrana su dva DES-a na bazi glicerola (Gly) s kolin-kloridom (ChCl) ili betainom (B) kao akceptorima vodikove veze, u molarnom omjeru 1:2, te su pripremljene odgovarajuće otopine s različitim udjelima vode (od 10 % do 90 %, w/w). Paralelno je pripremljena otopina u 50 mM kalijevom fosfatnom puferu (pH 7,5) kako bi se osigurala pH vrijednost otopine blizu optimalne vrijednosti enzima i na taj način spriječili pad pH prilikom dodavanja CO<sub>2</sub> u reakcijski medij. Valja napomenuti da se otopine DES-a s više od 50 % vode (w/w) ne smatraju DES-ovima prema njihovoj izvornoj definiciji već se smatraju vodenim otopinama DES komponenti (Hammond i sur., 2017). Ipak, te su mješavine uključene u istraživanje budući da visok sadržaj vode unutar DES-a često omogućava enzimima očuvanje njihove katalitičke aktivnosti (Taklimi i sur., 2023).

Pripremljeno je i fizikalno-kemijski karakterizirano ukupno 20 otapala na bazi DES-a (tablica 7). Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti.

**Tablica 7.** Fizikalno-kemijske karakteristike pripremljenih DES-ova

Kratica	$\eta$ (mPa s)	$\rho$ (g cm <sup>-3</sup> )	pH
<b>ChCl:Gly<sub>10</sub> %V</b>	77,88	1,17	7,51
<b>ChCl:Gly<sub>30</sub> %V</b>	18,98	1,14	6,60
<b>ChCl:Gly<sub>50</sub> %V</b>	4,16	1,09	7,12
<b>ChCl:Gly<sub>80</sub> %V</b>	2,27	1,03	6,48
<b>ChCl:Gly<sub>90</sub> %V</b>	1,48	1,02	6,25
<b>ChCl:Gly<sub>10</sub> %P</b>	82,63	1,17	9,19
<b>ChCl:Gly<sub>30</sub> % P</b>	19,61	1,14	8,75
<b>ChCl:Gly<sub>50</sub> % P</b>	5,74	1,11	8,33
<b>ChCl:Gly<sub>80</sub> % P</b>	2,50	1,06	7,75
<b>ChCl:Gly<sub>90</sub> % P</b>	1,31	1,04	7,67
<b>B:Gly<sub>10</sub> %V</b>	353,70	1,21	6,48
<b>B:Gly<sub>30</sub> %V</b>	20,86	1,15	5,96
<b>B:Gly<sub>50</sub> %V</b>	8,84	1,13	5,33
<b>B:Gly<sub>80</sub> %V</b>	2,27	1,04	5,29
<b>B:Gly<sub>90</sub> %V</b>	1,31	1,03	5,47
<b>B:Gly<sub>10</sub> %P</b>	219,05	1,21	7,85
<b>B:Gly<sub>30</sub> % P</b>	32,87	1,17	7,46
<b>B:Gly<sub>50</sub> % P</b>	6,45	1,13	7,45
<b>B:Gly<sub>80</sub> % P</b>	2,27	1,06	7,49
<b>B:Gly<sub>90</sub> % P</b>	1,19	1,04	7,47
<b>Pufer</b>	1,39	1,02	7,50

viskoznost- $\eta$ , gustoća- $\rho$ , pH

Očekivano, gustoća i viskoznost vodenih otopina DES-a bile su značajno pod utjecajem sadržaja vode ili pufera, pri čemu su najviše vrijednosti postignute u smjesama s 10 % vode

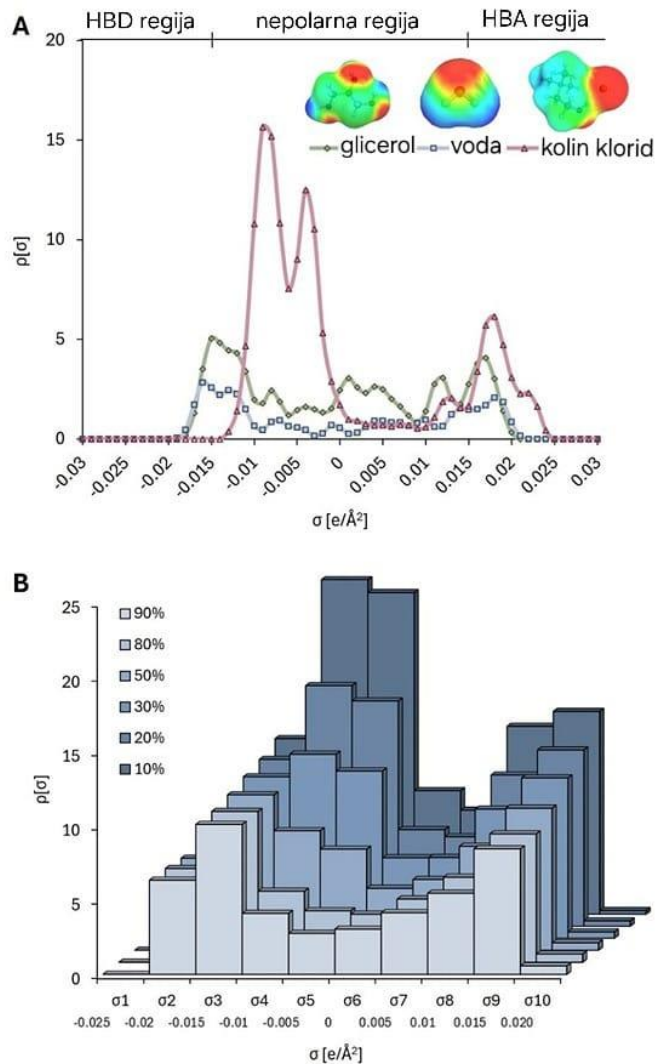
w/w (do 1,21 g/cm<sup>3</sup> i 353,70 mPa s za B:Gly<sub>10</sub> %v te 1,17 g/cm<sup>3</sup> i 82,63 mPa s za ChCl:Gly<sub>10</sub> %v). Općenito, DES-ovi na bazi betaina pokazale su veću gustoću i viskoznost u usporedbi s ekvivalentima na bazi kolin-klorida. Sve ispitivane smjese imale su pH vrijednosti u rasponu od 5,3 do 9,2, pri čemu su smjese na bazi betaina bile kiseliije od onih na bazi kolin-klorida. DES otopine pripremljene u puferu obično su održavale pH vrijednost između 7,5 i 8. Sve su smjese DES-ova ostale stabilne tijekom tri mjeseca skladištenja na sobnoj temperaturi, bez znakova kontaminacije ili taloženja.

Za potrebe statističke analize i matematičkog modeliranja utjecaja stabilizacijskih svojstava DES-ova na odabrane biomolekule (FDH i NADH), što predstavlja jedan od glavnih ciljeva ovog rada, nužno je, uz izmjerena fizikalno-kemijska svojstva, identificirati molekularne deskriptore DES-ova. Molekularni deskriptori predstavljaju numerički opis strukture komponenata DES-ova, čime se omogućuje njihova daljnja analiza i povezivanje sa stabilizacijskim svojstvima (Venkatraman i sur., 2018). Napredan i precizan molekularni deskriptor, poznat kao sigma profil ( $\sigma$ -profil), nenormalizirani je histogram površinskog naboja molekule (Klamt, 2005). Za razliku od drugih prikaza,  $\sigma$ -profili mogu opisati detaljne efekte poput polarizacije i asimetrije u elektronskoj gustoći (Abranches i sur., 2022).  $\sigma$ -profil se sastoji od tri ključne regije: (i) HBD regije s negativnim gustoćama naboja, (ii) nepolarne regije s gotovo neutralnim gustoćama naboja i (iii) HBA regije s pozitivnim gustoćama naboja (slika 4 A). Ova se podjela temelji na specifičnim vrhovima gustoće površinskog naboja ( $\sigma$ ) svakog atoma u HBA ili HBD molekulama (Lemaoui i sur., 2020). U ovom istraživanju,  $\sigma$ -profili svakog DES-a izračunati su pomoću softvera BOVIA COSMOtherm: krivulje  $\sigma$ -profila za svaki HBA i HBD podijeljene su u 10 regija, dok je površina ispod svake regije izračunata na temelju molarnih omjera komponenti i sadržaja vode (tablica 8).

**Tablica 8.** Popis DES-ova i pripadajućih  $\sigma$ -profilu (molekularnih deskriptora)

	DES $\sigma$ -profilu									
	S <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	S <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	S <sup>5</sup>	S <sup>6</sup>	S <sup>7</sup>	S <sup>8</sup>	S <sup>9</sup>	S <sup>10</sup>
Voda	0,000	6,350	10,027	3,520	2,164	2,873	4,055	5,229	8,277	0,578
B:Gly <sub>10</sub> %V	0,005	5,652	10,974	21,584	22,626	8,235	6,377	10,666	12,207	1,914
B:Gly <sub>30</sub> %V	0,003	6,016	10,479	12,150	11,940	5,434	5,164	7,826	10,154	1,216
B:Gly <sub>50</sub> %V	0,001	6,178	10,260	7,968	7,203	4,193	4,627	6,568	9,244	0,907
B:Gly <sub>80</sub> %V	0,000	6,301	10,093	4,775	3,585	3,245	4,216	5,606	8,550	0,670
B:Gly <sub>90</sub> %V	0,000	6,328	10,057	4,091	2,811	3,042	4,128	5,401	8,401	0,620
B:Gly <sub>10</sub> %P	0,005	5,652	10,974	21,584	22,626	8,235	6,377	10,666	12,207	1,914
B:Gly <sub>30</sub> %P	0,003	6,016	10,479	12,150	11,940	5,434	5,164	7,826	10,154	1,216
B:Gly <sub>50</sub> %P	0,001	6,178	10,260	7,968	7,203	4,193	4,627	6,568	9,244	0,907
B:Gly <sub>80</sub> %P	0,000	6,301	10,093	4,775	3,585	3,245	4,216	5,606	8,550	0,670
B:Gly <sub>90</sub> %P	0,000	6,328	10,057	4,091	2,811	3,042	4,128	5,401	8,401	0,620
ChCl:Gly <sub>10</sub> %V	0,005	5,671	11,807	22,499	21,631	8,309	6,995	12,632	13,637	0,246
ChCl:Gly <sub>30</sub> %V	0,002	6,033	10,858	12,380	11,252	5,411	5,428	8,685	10,779	0,423
ChCl:Gly <sub>50</sub> %V	0,001	6,188	10,451	8,041	6,801	4,168	4,755	6,992	9,553	0,499
ChCl:Gly <sub>80</sub> %V	0,000	6,305	10,146	4,786	3,462	3,235	4,251	5,722	8,634	0,555
ChCl:Gly <sub>90</sub> %V	0,000	6,329	10,081	4,095	2,754	3,037	4,144	5,453	8,439	0,567
ChCl:Gly <sub>10</sub> %P	0,005	5,671	11,807	22,499	21,631	8,309	6,995	12,632	13,637	0,246
ChCl:Gly <sub>30</sub> %P	0,002	6,033	10,858	12,380	11,252	5,411	5,428	8,685	10,779	0,423
ChCl:Gly <sub>50</sub> %P	0,001	6,188	10,451	8,041	6,801	4,168	4,755	6,992	9,553	0,499
ChCl:Gly <sub>80</sub> %P	0,000	6,305	10,146	4,786	3,462	3,235	4,251	5,722	8,634	0,555
ChCl:Gly <sub>90</sub> %P	0,000	6,329	10,081	4,095	2,754	3,037	4,144	5,453	8,439	0,567

Za glicerol,  $\sigma$ -profil pokazuje vrhove na negativnim koordinatama (lijeva strana) koji odgovaraju pozitivno polarnim H atomima u -OH skupini, dok vrhovi na pozitivnim koordinatama (desna strana) odgovaraju O atomima u -OH skupini (slika 4) (Cheng i sur., 2018). Te polarne regije međusobno djeluju s odgovarajućim polarnim segmentima u otopini. Proširenje  $\sigma$ -profilu u jako polarne regije ( $-0,022 \text{ e}/\text{\AA}^2 < \sigma < -0,01 \text{ e}/\text{\AA}^2$  na lijevoj strani i  $0,01 \text{ e}/\text{\AA}^2 < \sigma < 0,013 \text{ e}/\text{\AA}^2$  na desnoj strani) asimetrično je, što ukazuje na prevladavajuću površinu pozitivnog polariteta u glicerolu. Taj elektrostatički nesklad sugerira da glicerol ima tendenciju djelovati kao HBD te stoga pokazuje veći afinitet prema HBA u otopini (Cui i sur., 2021). Za razliku od glicerola,  $\sigma$ -profil vode proteže se simetrično u polarne regije, pokazujući uravnoteženu sposobnost djelovanja kao HBD i HBA.

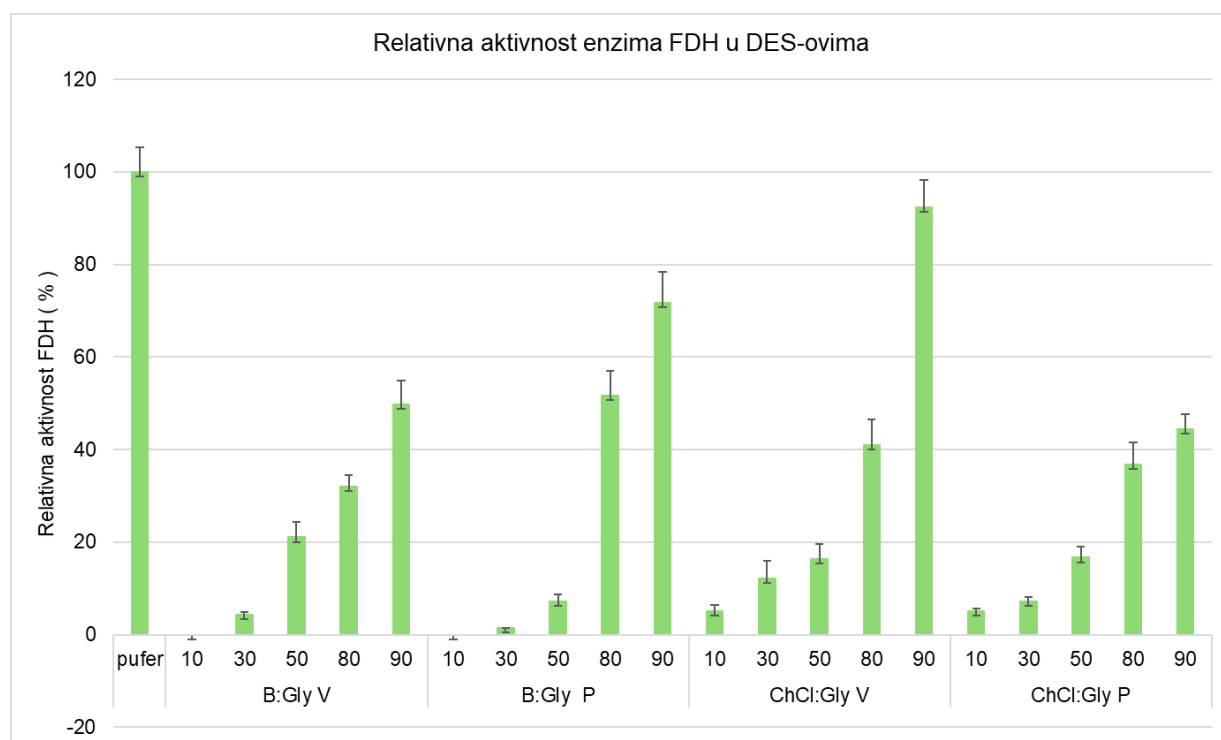


**Slika 4.**  $\sigma$ -površina (A) i  $\sigma$ -profili (B) pojedinačnih sastojaka DES-a (glicerol, voda, kolin-klorid), te  $\sigma$ -profil odgovarajućih DES-ova u puferu (10 – 90 %, w/w)

Kolin-klorid i betain (Radović i sur., 2024) pokazuju najistaknutiji vrh u nepolarnoj regiji, koji odgovara kolinijevom kationu, dok je vrh u HBA regiji povezan s  $\text{Cl}^-$  anionom. Na slici 4A prikazane su  $\sigma$  površine DES komponenti (kolin-klorid, glicerol i voda) generirane pomoću softvera TmoleX19, s bojama koje predstavljaju gradijent naboja: tamnoplava boja označava HBD regije, tamnocrvena HBA regije, a zelena nepolarne regije (Quaid i Reza, 2023). Na slici B vidljivo je da čak i male promjene u kolin-klorid smjesi, poput povećanja sadržaja vode s 10 % na 90 % w/w, rezultiraju promjenama u raspodjeli polariteta. Ovi podaci potvrđuju sposobnost softvera da detektira nijansirane kemijske fenomene, što je važno za istraživanje kemijskog spektra ovih otapala i njihovog potencijalnog utjecaja na enzime i koenzime.

## 4.2. AKTIVNOST ENZIMA

Formijat dehidrogenaza (FDH) je enzim koji katalizira oksidaciju formijata u ugljikov dioksid uz redukciju koenzima  $\text{NAD}^+$  u  $\text{NADH}$ . Njegova aktivnost je praćena spektrofotometrijski prema protokolu koji je opisan u 3.2.4. Pomoću aktivnosti je praćen utjecaj pojedinog otapala na aktivnost, ali i stabilnost enzima.



**Slika 5.** Relativna aktivnost enzima FDH u DES-ovima: betain:glicerol (B:Gly)=1:2 i kolin-klorid:glicerol (ChCl:Gly)=1:2 pri različitim udjelima vode (V) i pufera (P) (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90% w/w) u uvjetima reakcije:  $C_{FDH} = 1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $C_{NADH} = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $C_{\text{formijat}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $T = 25^\circ$

Kao što je i očekivano, FDH je pokazao malu ili nikakvu aktivnost u DES-ovima koji su sadržavali 10 %, 30 % ili 50 % (w/w) vode ili pufera (slika 5), dok je aktivnost dodavanjem vode rasla te dosegla svoj vrhunac u visoko razrijeđenim DES-ovima (90 % vode w/w), iako u usporedbi s puferom su i dalje bile niže. Ono što se također može primijetiti je da su razrjeđenja s vodom u DES-u ChCl:Gly rezultirala boljom enzimskom aktivnošću nego njihovi ekvivalenti razrijeđeni puferom (ChCl:Gly<sub>90%V</sub> i pH 6,3) imao je od oko 92 %, dok je njegov ekvivalent s puferom (ChCl:Gly<sub>90%P</sub>) i pH od 7,5 dao  $A_R$  od svega 45 %, iako su puferirani DES-ovi čak i bliži optimalnom pH. U DES-u B:Gly to nije slučaj, već je kod njega  $A_R$  s 90 % w/w vode (pH 5,47) manja od  $A_R$  s 90 % w/w pufera (pH 7,47).



Ovi rezultati potvrđuju rezultate prethodnih studija koji upućuju da dehidrogenaze zahtijevaju sadržaj vode veći od 10 % u DES-u za održavanje strukturnog integriteta. DES vežu vodu kroz mrežu vodikovih veza, čime smanjuju dostupnost slobodnih molekula vode potrebnih za hidrataciju enzima. Zbog smanjene aktivnosti vode može doći do dehidracije i nepovratne denaturacije enzima (Radović i sur., 2024, Bittner i sur., 2022; Mourelle-Insua i sur., 2019).

#### **4.3. TOPLJIVOST CO<sub>2</sub> I NJEGOV UTJECAJ NA STABILNOST NADH**

Za potrebe probira DES-ova na temelju topljivosti supstrata isti je bio upuhan. Koncentracije zasićenog otopljenog CO<sub>2</sub> ( $c_s$ ) u različitim DES otopinama s dodatkom vode ili pufera procijenjene su nakon što je CO<sub>2</sub> uveden protokom od 100 mL min<sup>-1</sup> sve do postizanja zasićenja. Rezultati se nalaze u tablici 9. Svi DES-ovi s postotkom vode ili pufera manjim od 50 % bili su nepovoljan medij za otapanje CO<sub>2</sub> s  $c_s$  vrijednostima između 282 i 913 mg L<sup>-1</sup>, što je niže od vrijednosti dobivene u referentnom pufer čija je vrijednost iznosila 1029 mg mL<sup>-1</sup>. Za razliku od već navedenih DES-ova, DES-ovi s visokim postotkom vode ili pufera (80 % i 90 %) doveli su do slične topljivosti CO<sub>2</sub> kao u puferu s najvećom topljivosti u DES-ovim ChCl:Gly<sub>90% P</sub> i B:Gly<sub>90%V</sub>, s vrijednostima od 1149 mg L<sup>-1</sup> i 1112 mg L<sup>-1</sup>.

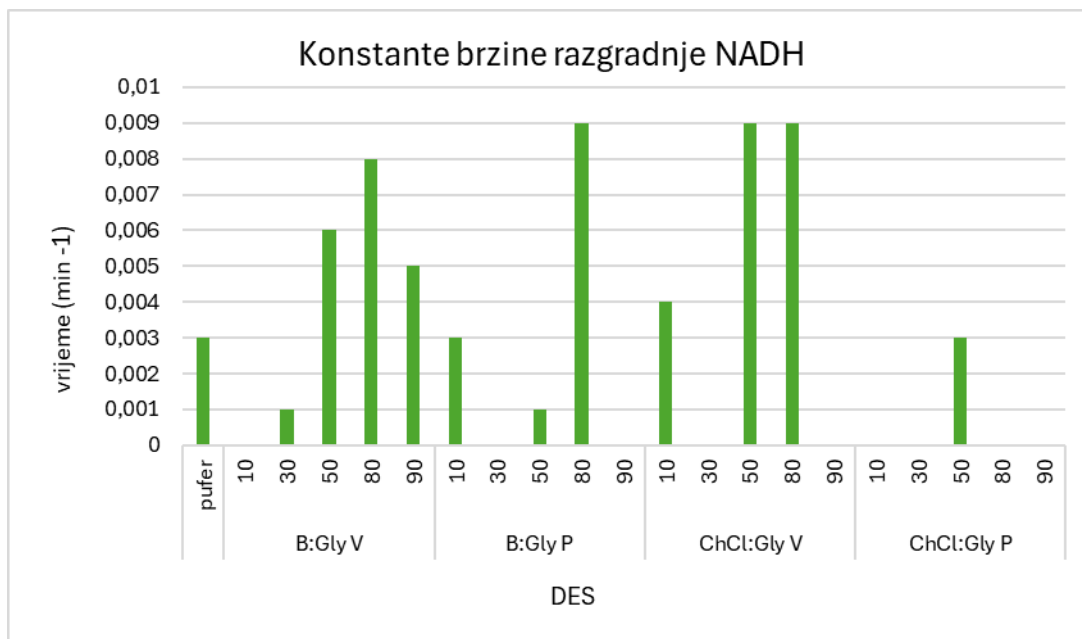
Osim mjerenja vrijednosti topljivosti CO<sub>2</sub> ( $c_s$ ) mjerila se i pH vrijednost koja se smanjila zbog upuhivanja CO<sub>2</sub>, što je i očekivano jer se povećava kiselost. Rezultati promjene pH su u tablici 9.

**Tablica 9.** Popis DES-ova u vodi/puferu (10-90 %, w/w) i puferu (50 mM kalijev fosfatni pufer, pH 7,5) korištenih za istraživanje.

DES		$C_s$ (mg L <sup>-1</sup> )	pH	pH	
DES s bazom kolin klorid	Vodne otopine	ChCl:Gly <sub>10</sub> %V	282	7,51	6,95
		ChCl:Gly <sub>30</sub> %V	480	6,60	6,03
		ChCl:Gly <sub>50</sub> %V	702	7,12	5,68
		ChCl:Gly <sub>80</sub> %V	825	6,48	4,89
		ChCl:Gly <sub>90</sub> %V	965	6,25	4,8
	Puferirane otopine	ChCl:Gly <sub>10</sub> %P	465	9,19	6,88
		ChCl:Gly <sub>30</sub> %P	727	8,75	6,89
		ChCl:Gly <sub>50</sub> %P	913	8,33	6,79
		ChCl:Gly <sub>80</sub> %P	1057	7,75	6,53
		ChCl:Gly <sub>90</sub> %P	1149	7,67	6,49
DES s bazom betain	Vodne otopine	B:Gly <sub>10</sub> %V	311	6,48	4,73
		B:Gly <sub>30</sub> %V	618	5,96	4,26
		B:Gly <sub>50</sub> %V	829	5,33	3,87
		B:Gly <sub>80</sub> %V	1101	5,29	3,75
		B:Gly <sub>90</sub> %V	1112	5,47	3,77
	Puferirane otopine	B:Gly <sub>10</sub> %P	509	7,58	6,39
		B:Gly <sub>30</sub> %P	586	7,46	6,26
		B:Gly <sub>50</sub> %P	765	7,45	6,24
		B:Gly <sub>80</sub> %P	1027	7,49	6,24
		B:Gly <sub>90</sub> %P	1010	7,47	6,31
		Pufer	1029	7,5	6,49

Koncentracija otopljenog CO<sub>2</sub> ( $C_s$ ), pH vrijednostima prije otapanja CO<sub>2</sub> ( $pH$ ) i otopina zasićenih CO<sub>2</sub> ( $pH$ ).

Također, istražena je kratkotrajna stabilnost koenzima NADH u DES-ovima zasićenim CO<sub>2</sub> (slika 6). Prisutnost otopljenog CO<sub>2</sub> ne utječe samo na intrinzična svojstva DES-a već i na ponašanje sustava nakon dodavanja supstrata. Ranije je zabilježeno da zakiseljavanje reakcijskog medija uslijed otapanja CO<sub>2</sub> ubrzava razgradnju NADH, što izravno utječe na pretvorbu CO<sub>2</sub> u mravlju kiselinu (Zhang i sur., 2018). Stoga su NADH otopine u gore opisanim sustavima otapala praćene tijekom 90 minuta, a odgovarajuće konstante razgradnje ( $k_{NADH}$ ) izračunate su pomoću kinetičkog modela prvog reda (slika 6).



**Slika 6.** Konstante brzine razgradnje NADH ( $k_{\text{NADH}}$ ) u DES-ovima s vodom (V) i puferom (P) zasićenim s  $\text{CO}_2$  ( $C_{\text{NADH}} = 25 \text{ mg mL}^{-1}$ )

Općenito, DES-ovi razrijeđeni puferom pokazali su jednaku ili veću učinkovitost u stabilizaciji koenzima tijekom testiranog perioda ( $k_{\text{NADH}} \leq 0,003 \text{ min}^{-1}$ ) u odnosu na referentni pufer ( $k_{\text{NADH}} = 0,003 \text{ min}^{-1}$ ). S druge strane, sustavi otapala na bazi vode s DES-ovima pokazali su se slabijim medijem u tom pogledu, osobito pri visokom udjelu vode ( $k_{\text{NADH}}$  do  $0,009 \text{ min}^{-1}$ ). Ovaj učinak izravno je povezan s nesposobnošću DES-ova razrijeđenih vodom da održavaju pH blizu neutralnog. Primjerice, nakon uvođenja  $\text{CO}_2$  u B:Gly  $_{80\% \text{ V}}$  w/w, pH je pao na 3,75, što je rezultiralo najvećom zabilježenom vrijednošću  $k_{\text{NADH}}$  od  $0,008 \text{ min}^{-1}$ . Nadalje, puferirani DES-ovi na bazi kolin-klorida (ChCl) održavale su viši pH u odnosu na DES-ove na bazi betaina nakon zasićenja s  $\text{CO}_2$ , što je rezultiralo potpunom stabilizacijom NADH tijekom testiranog vremena, osim za ChCl:Gly  $_{50\% \text{ P}}$  w/w ( $k_{\text{NADH}} = 0,003 \text{ min}^{-1}$ ).

#### 4.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA I MATEMATIČKO MODELIRANJE

Povezanost između fizikalno-kemijskih svojstava (pH, viskoznost i gustoća) upotrijebljenih DES-ova, deskriptora DES-ova ( $\sigma$ -profili), aktivnosti FDH i topljivosti  $\text{CO}_2$  analizirane su pomoću Spearmanove korelacijske matrice koja je odabrana zbog neuobičajene raspodjele podataka. Analiza je potvrdila već navedene pretpostavke i nalaze iz eksperimentalnog pregleda: ciljna svojstva reakcije, pod utjecajem sastava DES-a, rezultirala su kontradiktornim ishodima. Naime, aktivnosti FDH pokazale su negativnu korelaciju sa svim

analiziranim varijablama, osim s topljivošću CO<sub>2</sub>, čime se preferira vodeni ili puferirani medij u odnosu na DES-ove s manjim udjelom vodene faze. Nadalje, utvrđene su negativne korelacije između stabilnosti FDH-a i topljivosti CO<sub>2</sub> (tablica 10).

Spearmanova korelacijska matrica (tablica 10) ističe kompleksno međudjelovanje između fizikalno-kemijskih svojstava DES-a (pH, gustoća, viskoznost) i njihovih deskriptora s aktivnošću FDH-a i stabilnošću njegovog kofaktora NADH. Očekivano, zabilježene su značajne negativne korelacije između aktivnosti FDH-a i gustoće/viskoznosti DES-a, što se vjerojatno pripisuje smanjenoj pokretljivosti i difuziji supstrata i enzima.

Na aktivnost FDH-a značajno utječe pH vrijednost. Poznato je da aktivnost enzima (Bisswanger, 2017) i stabilnost NADH-a (Zachos i sur., 2019) ovise o pH. Međutim, brojna izvješća o sposobnosti DES-a da stabiliziraju različite enzime, neovisno o pH, i dalje izazivaju nedoumice. Ovo zanimljivo zapažanje sugerira postojanje dodatnih mehanizama, poput izravnih interakcija između komponenti DES-a i proteina ili susjednih molekula vode, koji mogu utjecati na aktivnost vode u mediju (Damjanović i sur., 2024).

Nadalje, analiza je pokazala da su gotovo svi DES deskriptori značajno utjecali na ciljana svojstva. Konkretno,  $S_{mix}^1$  i  $S_{mix}^2$  (regija HBD, srednja polaritet),  $S_{mix}^3 - S_{mix}^5$  (nepolarna regija, pozitivni naboji),  $S_{mix}^6 - S_{mix}^8$  (nepolarna regija, negativni naboji) te  $S_{mix}^9$  (regija HBA) (Lemaoui i sur., 2020) pokazali su značajan utjecaj na ispitivana svojstva. Aktivnost FDH-a pokazala je negativnu korelaciju sa svim deskriptorima, osim s  $S_{mix}^2$ , koji je pokazao pozitivnu korelaciju. Suprotno tome, stabilnost FDH-a pokazala je pozitivne korelacije sa svim deskriptorima, osim s  $S_{mix}^2$ , koji je pokazao negativnu korelaciju.

Zanimljivo je da analiza sugerira obrnut odnos između aktivnosti i stabilnosti enzima u DES sustavima: otapala bogata HBA i nepolarnim domenama stabiliziraju enzim, dok otapala bogata HBD domenama pojačavaju aktivnost enzima, ali mogu dovesti do destabilizacije. Ovi rezultati naglašavaju osjetljivu ravnotežu između aktivnosti i stabilnosti enzima u DES-ovima, uvjetovanu specifičnim sastavnim svojstvima opisanim  $\sigma$ -deskriptorima. Slična inscenacija između aktivnog i stabilnog (ali neaktivnog) stanja enzima, pod utjecajem sadržaja vode u DES-ovima, potvrđena je i u nedavnoj studiji o ponašanju lizozima u DES sustavima temeljenima na različitim prirodnim osmolitima (Damjanović i sur., 2024).

Tablica 10. Spearmanova korelacijska matrica. Korelacije značajne pri  $p < 0,05$  označene su podebljano.

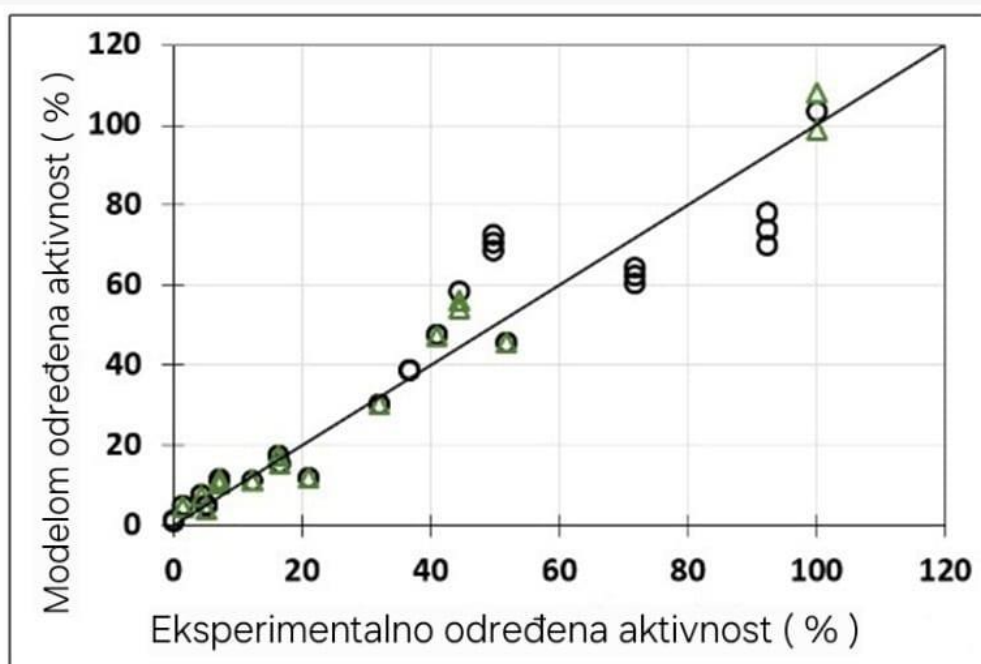
	$A_R$	$c_s$	$\rho$	$\eta$	pH	$S^1_{mix}$	$S^2_{mix}$	$S^3_{mix}$	$S^4_{mix}$	$S^5_{mix}$	$S^6_{mix}$	$S^7_{mix}$	$S^8_{mix}$	$S^9_{mix}$	$S^{10}_{mix}$
$A_R$	1,000														
$c_s$	<b>0,887</b>	1,000													
$\rho$	<b>-0,939</b>	<b>-0,866</b>	1,000												
$\eta$	<b>-0,944</b>	<b>-0,902</b>	<b>0,942</b>	1,000											
pH	<b>-0,323</b>	-0,159	<b>0,461</b>	<b>0,301</b>	1,000										
$S^1_{mix}$	<b>-0,953</b>	<b>-0,908</b>	<b>0,964</b>	<b>0,974</b>	<b>0,316</b>	1,000									
$S^2_{mix}$	<b>0,953</b>	<b>0,908</b>	<b>-0,964</b>	<b>-0,974</b>	<b>-0,316</b>	<b>-1,000</b>	1,000								
$S^3_{mix}$	<b>-0,906</b>	<b>-0,882</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000							
$S^4_{mix}$	<b>-0,906</b>	<b>-0,882</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000						
$S^5_{mix}$	<b>-0,953</b>	<b>-0,908</b>	<b>0,964</b>	<b>0,974</b>	<b>0,316</b>	1,000	<b>-1,000</b>	<b>0,948</b>	<b>0,948</b>	1,000					
$S^6_{mix}$	<b>-0,932</b>	<b>-0,900</b>	<b>0,948</b>	<b>0,964</b>	<b>0,286</b>	<b>0,990</b>	<b>-0,990</b>	<b>0,958</b>	<b>0,958</b>	<b>0,990</b>	1,000				
$S^7_{mix}$	<b>-0,906</b>	<b>-0,882</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000	<b>0,948</b>	<b>0,958</b>	1,000			
$S^8_{mix}$	<b>-0,906</b>	<b>-0,882</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000	<b>0,948</b>	<b>0,958</b>	1,000	1,000		
$S^9_{mix}$	<b>-0,906</b>	<b>-0,882</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000	<b>0,948</b>	<b>0,958</b>	1,000	1,000	1,000	
$S^{10}_{mix}$	-0,202	-0,072	0,177	0,099	<b>0,439</b>	0,144	-0,144	-0,144	-0,144	0,144	0,044	-0,144	-0,144	-0,144	1,000

$A_R$  – relativna aktivnost FDH,  $c_s$  – koncentracija otopljenog CO<sub>2</sub>, DES deskriptori ( $S^1_{mix} - S^{10}_{mix}$ ),  $\rho$  – gustoća,  $\eta$  – viskoznost

#### 4.4.1. Matematički modeli za opisivanje učinka aktivacije DES-ova

Polazna hipoteza ove statističke analize bila je da se aktivnost FDH-a u DES-ovima može opisati kao funkcija fizikalnih svojstava DES-a (gustoća, viskoznost, pH) i  $\sigma$ -profila smjese.  $\sigma$ -profili prikazuju raspodjelu različitih funkcionalnih skupina u smjesi i izraženi su putem deset  $\sigma_{\text{mix}}^i$  deskriptora, navedenih u tablici 10 (od  $\sigma_{\text{mix}}^1$  do  $\sigma_{\text{mix}}^{10}$ ). Djelomična linearna regresija (DLR) korištena je za analizu povezanosti ulaznih varijabli (fizikalna svojstva DES-a i  $\sigma_{\text{mix}}^i$  deskriptori) s izlaznim varijablama (stabilnost FDH-a i NADH-a).

Uz podršku izv. prof. dr. sc. Ane Jurinjak Tušek iz Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo provedena je izrada regresijskih modela. U analizi je primijenjen princip podjele podataka u dvije regije kako bi se bolje obuhvatili nelinearni odnosi među varijablama. Rezultati su prikazani na grafu za FDH-a, gdje većina točaka leži blizu dijagonalne crte, što ukazuje na to da model učinkovito opisuje aktivnost enzima na temelju ulaznih varijabli DES-ova. Dijagonalna crta predstavlja idealni slučaj u kojem model savršeno odgovara eksperimentalnim podacima (slika 7).



**Slika 7.** Usporedba između eksperimentalnih podataka i podataka predviđenih djelomičnim linearnim modelom aktivnost FDH. (○) kalibracijski skup podataka, (△) predikcijski skup podataka.

**Tablica 11.** Djelomični linearni regresijski modeli za predviđanje stabilnosti FDH i stabilnosti NADH na temelju specifičnih ulaznih varijabli.

Izlazna varijabla	Ulazne varijable	Jednadžba modela	$R_{cal}^2$ $R_{cal}^2_{adj}$	RMSEC	$R_{pred}^2$ $R_{pred}^2_{adj}$	RMSEP	RPD	RER
Aktivnost FDH	Viskoznost ( $X_1$ ) Gustoća ( $X_2$ ) pH ( $X_3$ ) DES deskriptori 1-9 ( $X_4$ - $X_{12}$ )	$Y_1 = (31,635 + 0,024 X_1 - 81,589 X_2 - 0,257 X_3 + 0,382 X_4 + 41,465 X_5 - 98,311 X_6 - 93,683 X_7 + 8,822 X_8 + 201,025 X_9 + 123,045 X_{10} + 80,146 X_{11} + 46,359 X_{12})$ (for $Y_1 \leq 30,081$ ) + $(25,079 + 35,851 X_1 + 1782,264 X_2 - 25,075 X_3 + 0,080 X_4 + 42,087 X_5 - 99,096 X_6 - 67,368 X_7 - 36,899 X_8 + 22,587 X_9 + 29,178 X_{10} - 29,264 X_{11} - 70,624 X_{12})$ (for $Y_1 > 30,081$ )	0,914 0,913	7,203	0,905 0,903	7,379	5,589	18,324

\*Oznake: koeficijent determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}$ ), prilagođeni koeficijent determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}^2_{adj}$ ), korijen srednje kvadratne pogreške za kalibraciju (RMSEC), koeficijent determinacije za predviđanje ( $R_{pred}$ ), prilagođeni koeficijent determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^2_{adj}$ ), korijen srednje kvadratne pogreške predviđanja (RMSEP), omjer predviđanja i odstupanja (RPD), omjer raspona pogreške (RER).

Odnos između opaženih podataka i predikcija modela procijenjen je korištenjem više metričkih pokazatelja: koeficijenta determinacije za predikciju ( $R_{pred}^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije za kalibraciju ( $R_{cal}^2_{adj}$ ), korijena srednje kvadratne pogreške predikcije (RMSEP), omjera predikcije i odstupanja (RPD) te omjera raspona pogreške (RER). Kao što je prikazano u tablici 11 i na slici 7, razvijeni modeli s visokom preciznošću opisuju eksperimentalne podatke. Odstupanje između modela i eksperimentalnih podataka za aktivnost FDH iznosilo je (slika 7):  $R_{cal}^2 = 0,914$ ,  $R_{cal}^2_{adj} = 0,913$ ,  $RMSEC = 7,203$ ,  $R_{pred}^2 = 0,905$ ,  $R_{pred}^2_{adj} = 0,903$ ,  $RMSEP = 7,379\%$ ,  $RPD = 5,589$  i  $RER = 18,324$ .

Prema studiji Hussaina i suradnika (2018),  $R^2$  vrijednosti iznad 0,75 smatraju se značajnima, između 0,50 i 0,75 umjerenima, a ispod 0,26 slabima. Nadalje, prema Changu i suradnicima (2001), modeli s  $RPD < 1,4$  smatraju se nepouzdanim, oni s  $RPD$  između 1,4 i 2 pravednima, dok se  $RPD > 2$  opisuje kao izvrsno. Slično tome, prema Simu i suradnicima (2023), modeli s  $RER > 4$  prihvatljivi su za probir podataka,  $RER > 10$  za kontrolu kvalitete, a  $RER > 15$  za kvantifikaciju. Sukladno ovim kriterijima, DLR model za predikciju aktivnosti FDH, temeljen na  $R_{pred}^2$ , smatra se značajnim. Na temelju  $RPD$  vrijednosti, model se može smatrati izvrsnim, dok se prema  $RER$ -u podaci mogu koristiti za kvantifikaciju.

Ovi rezultati sugeriraju da su matematički modeli razvijeni za predikciju ciljnih svojstava DES-ova, temeljeni na lako mjerljivim fizikalno-kemijskim svojstvima i kemijskim deskriptorima, korisni i za industrijske primjene i za istraživačke napore usmjerene na ova otapala. Uz to,

korištenje QSPR modela ne samo da omogućuje predikciju svojstava od interesa već i pruža vrijedne uvide u povezanost strukture DES-ova i njihovih mjerljivih svojstava. Analizirajući utjecaj različitih strukturnih značajki na ciljana svojstva, ovi modeli doprinose razumijevanju temeljnih mehanizama koji oblikuju ponašanje biomolekula u DES-ovima. Ovo znanje može poslužiti kao osnova za dizajn i optimizaciju DES-ova, omogućujući učinkovitije i prilagođenije primjene u raznim područjima.

#### **4.5. ODABIR NAJPOGODNIJEG OTAPALA OBZIROM NA CILJNA SVOJSTVA**

Za odabir najpogodnijeg otapala uzeta su u obzir ciljna svojstva otapala, uključujući aktivnost i stabilnost FDH, stabilnost koenzima, topljivost supstrata te viskoznost otapala. Na temelju ovih svojstava, testirana otapala su rangirana, a reakcija redukcije CO<sub>2</sub> provedena je u najpogodnijem otapalu. U okviru ovog diplomskog rada izmjerene su aktivnost FDH, stabilnost NADH te topljivost CO<sub>2</sub>, dok je stabilnost FDH određena u sklopu diplomskog rada Maje Nikolić (Nikolić, 2024), čiji su rezultati korišteni za usporedbu.

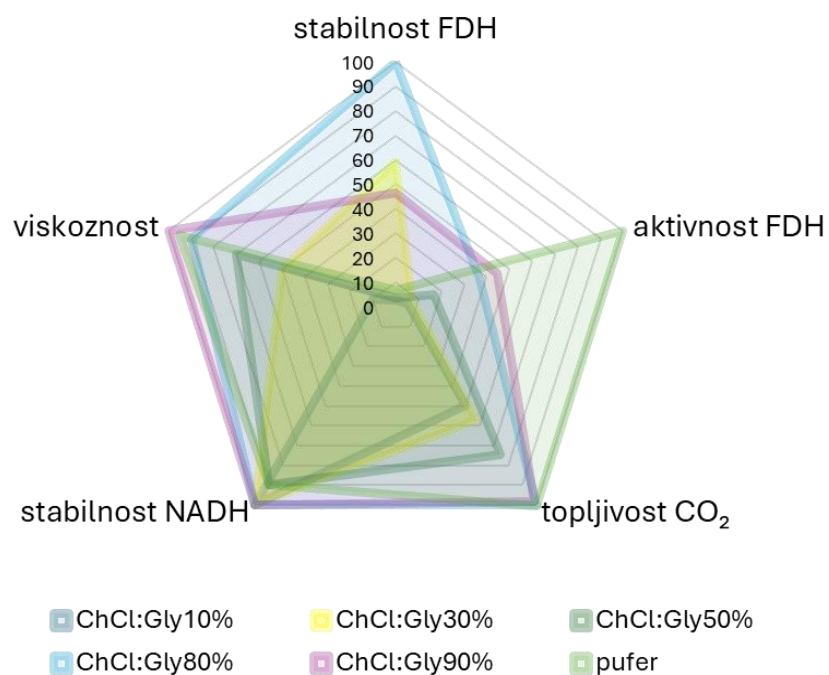
Istraživanje je pokazalo da procjena različitih ciljeva povezanih s analiziranom reakcijom često rezultira proturječnim zaključcima o optimalnom izboru DES-a. Općenito, DES-ovi s udjelom vode ili pufera manjim od 50 % w/w i viskoznošću većom od 18 mPa·s pokazali su izvrsnu sposobnost stabilizacije enzima i koenzima. Međutim, visoka viskoznost ovih sustava predstavlja značajan izazov za provođenje procesa i prijenos u veće mjerilo. Na temelju tih zapažanja, ključan je pronalazak DES-a koji uravnotežuje ova svojstva kako bi se postigla maksimalna učinkovitost procesa. Grafički prikaz na slikama A i B prikazuje kompromis između performansi sustava ChCl:Gly i B:Gly pri različitim udjelima pufera, s obzirom na ciljne parametre (aktivnost/stabilnost FDH, topljivost CO<sub>2</sub>, stabilnost NADH u zasićenim CO<sub>2</sub> otopinama i u usporedbi s referentnim puferom)

Radarski dijagram (slika 8 i 9) prikazuje ocjene u rasponu od 0 do 100, omeđene odgovarajućim granicama za svako svojstvo, čime se vizualizira učinak svakog DES-a u usporedbi s najboljim kandidatom za svako pojedino svojstvo. U analizu nisu uključeni DES-ovi razrijeđeni vodom zbog njihove niske sposobnosti stabilizacije NADH nakon zakiseljavanja medija uvođenjem CO<sub>2</sub>.

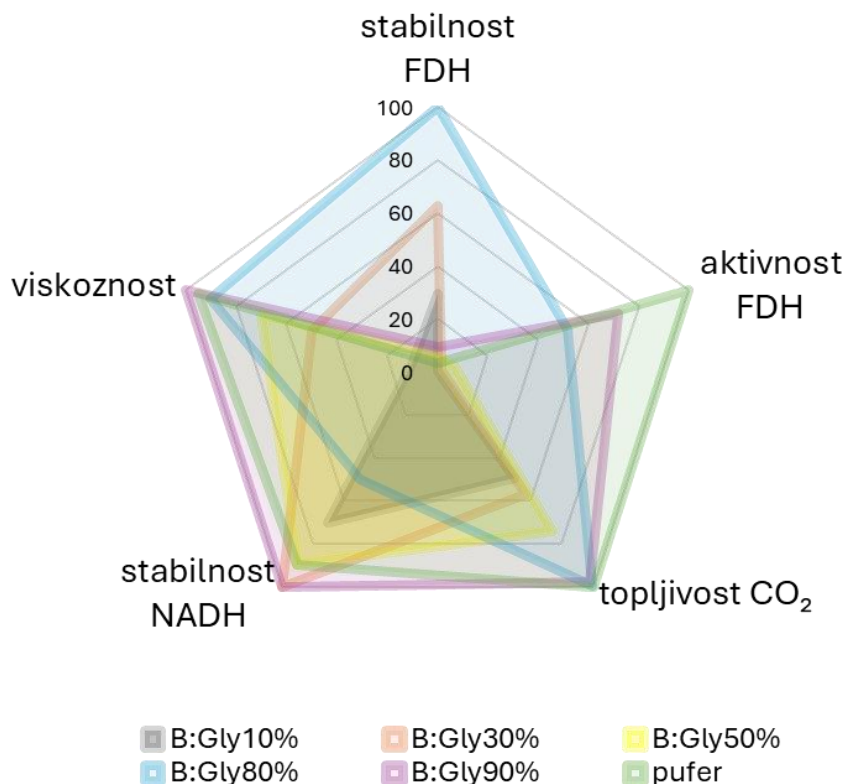
Kako je prikazano, ChCl:Gly<sub>80 %P</sub> ima uravnoteženu raspodjelu među svim ciljnim svojstvima, što ga čini pogodnim za simultanu optimizaciju reakcija gdje su svi ciljevi jednako važni. Konkretno, ovaj DES, koji se u ovom kontekstu može smatrati aditivom, a ne otapalom (Hammond i sur., 2017), ostvario je najbolje rezultate u većini svojstava, osim u aktivnosti FDH-a, gdje je referentni pufer postigao najviše vrijednosti.



Važno je istaknuti da je ChCl:Gly<sub>80%P</sub> (slika 8) pokazao izvrsnu sposobnost stabilizacije koenzima čak i nakon otapanja CO<sub>2</sub> u sustavu. B:Gly<sub>80%P</sub> (slika 9) također je pokazao sličan i uravnotežen profil kao ChCl:Gly<sub>80%P</sub>, ali se pokazao manje učinkovitim u stabilizaciji NADH-a nakon otapanja CO<sub>2</sub>. Ovi rezultati naglašavaju važnost pažljive selekcije DES-a za optimizaciju specifičnih svojstava procesa, uzimajući u obzir kompromis između aktivnosti i stabilnosti sustava.



**Slika 8.** Radarski dijagram koji procjenjuje ChCl:Gly i njihove odgovarajuće otopine u puferu (10 %–90 %, w/w) u smislu ciljanih svojstava (aktivnost i stabilnost FDH, topljivost CO<sub>2</sub> u DES sustavima, stabilnost NADH nakon zasićenja otapala CO<sub>2</sub> i viskoznost DES sustava). Vrijednosti stabilnosti FDH preuzete su iz rada Nikolić (2024).



**Slika 9.** Radarski dijagram koji procjenjuje B:Gly i njihove odgovarajuće otopine u puferu (10 % – 90 %, w/w) u smislu ciljanih svojstava (aktivnost i stabilnost FDH, topljivost CO<sub>2</sub> u DES sustavima, stabilnost NADH nakon zasićenja otapala CO<sub>2</sub> i viskoznost DES sustava). Vrijednosti stabilnosti FDH preuzete su iz rada Nikolić (2024).

#### 4.6. REAKCIJA KONVERZIJE CO<sub>2</sub> U FORMIJAT KATALIZIRANA FORMIJAT DEHIDROGENAZOM U DES-U ChCl:Gly<sub>80</sub>%P

Obzirom da je ChCl:Gly<sub>80</sub>%P proizašao kao sustav otapala koji najviše obećava za FDH kataliziranu konverziju CO<sub>2</sub> u formijat, reakcija je provedena u prethodno zasićenom mediju s CO<sub>2</sub>. Količina formijata koja je proizvedena enzimskom redukcijom CO<sub>2</sub> u odabranom sustavu otapala i u referentnom puferu prikazana je na slici 10. Reakcija provedena u mediju s dodatkom DES-a rezultirala je s 26,5 μmol mL<sup>-1</sup> formijata s volumetrijskom produktivnošću od 6,6 μmol mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> dok je pufer dao 22,7 μmol mL<sup>-1</sup> formijata s volumetrijskom aktivnošću od 5,6 μmol mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Te se razlike mogu pripisati nešto nižoj topljivosti CO<sub>2</sub> u puferu i izraženoj degradaciji NADH u puferu zbog zakiseljavanja otopljenim CO<sub>2</sub> (Wu i sur., 1986).

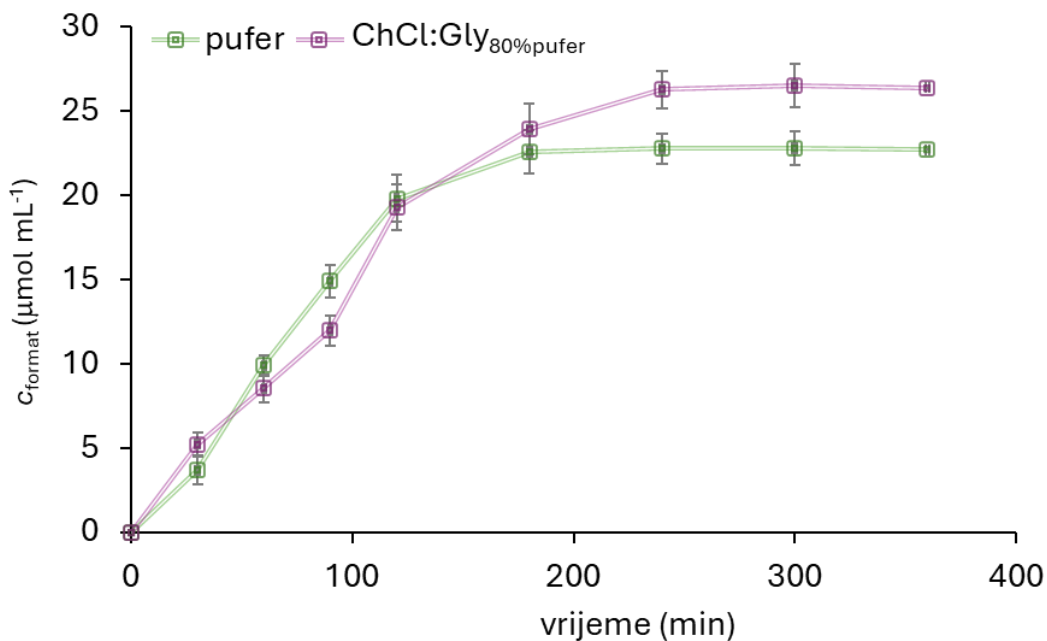
U posebnom eksperimentu praćena je stabilnost NADH, gdje se pokazalo da se nakon 4 sata (vremena trajanja reakcije) koncentracija NADH u puferu smanjila na 78 % početne vrijednosti, dok je u DES mediju ostala iznad 98 %. Ove promjene u koncentraciji odražavaju kombinaciju čimbenika kao što su aktivnost enzima, topljivost CO<sub>2</sub>, dostupnost supstrata i

dinamika razgradnje NADH. Razlike u koncentraciji formijata tijekom prvih 120 minuta mogu se pripisati višoj enzimskoj aktivnosti u puferu u odnosu na DES, ali i većoj topljivosti CO<sub>2</sub> i stabilnosti NADH u DES-u. Ova dinamična interakcija dovodi do toga da je brzina reakcije ponekad veća u puferu, a ponekad u DES-u.

Osim poboljšanja volumetrijske produktivnosti, ključna prednost korištenja ChCl:Gly<sub>80%P</sub> leži u njegovoj sposobnosti stabilizacije (poluživot enzima u DES-u veći je do 15 puta u usporedbi s puferom). Iako ovo DES svojstvo nije u potpunosti iskorišteno u reakciji koja traje samo 4 h, ono ima veliku prednost u kontinuiranim procesima (npr. korištenje enzimskog membranskog reaktora). U stacionarnim uvjetima, proces s DES-om kao otapalom mogao bi značajno povećati produktivnost, budući da je produktivnost u obrnutoj korelaciji s konstantom brzine deaktivacije enzima.

Sukladno navedenom produktivnost odabranog procesa procijenjena za kontinuirani način rada, uzimajući u obzir brzinu inaktivacije enzima. S obzirom na sljedeće pretpostavke: (i) da se proces odvija u stacionarnim uvjetima, (ii) da je enzim kontinuirano deaktiviran tijekom vremena prema kinetici prvog reda, i (iii) da koncentracija supstrata ostaje relativno konstantna, reakcija izvedena u puferu tijekom razdoblja od 10 dana rezultirala bi 185,7 μmol mL<sup>-1</sup> formijata, dok bi reakcija provedena u ChCl:Gly<sub>80 %P</sub> tijekom istog razdoblja rezultirala 639,0 μmol mL<sup>-1</sup> formijata, što je približno poboljšanje od 3,5 puta. Uključen je izračun ukupne produktivnosti procjena Michaelis–Mentenovih kinetičkih parametara uklapanjem profila koncentracije NADH u diferencijalnu jednadžbu koja opisuje promjenu koncentracije supstrata tijekom vremena.

Rezultati (slika 10) su pokazali da su i maksimalna brzina reakcije ( $v_{max}$ ) i konstanta zasićenja NADH ( $K_s$ ) bile veće za sustav otapala s DES. U puferu su konstantne vrijednosti bile  $v_{max} = 0,091 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$  i  $K_s = 6,746 \mu\text{mol mL}^{-1}$ , dok su za sustave s DES konstante bile  $v_{max} = 0,133 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$  i  $K_s = 12,133 \mu\text{mol mL}^{-1}$ . Konačno, pročišćavanje i izolacija produkta nije razmatrana u sklopu ovog rada. Ipak, na temelju dostupne literature, ekstrakcija tekuće-tekuće primjenom ekološki prihvatljivog otapala 2-metiltetrahidrofuran (Laitinen i sur., 2021, Slater i sur., 2016) čini se obećavajućom opcijom za odvajanje razrijeđenih vodenih otopina formijata u kontekstu razvoj održive proizvodnje mravlje kiseline.



**Slika 10.** FDH katalizirana pretvorba CO<sub>2</sub> u formijat u ChCl:Gly<sub>80%</sub> P (ChCl:Gly u puferu kalijevog fosfata) i referentnom 50 mM puferu kalijevog

Obzirom na rezultate prikazane u ovom radu, može se zaključiti da ovo istraživanje doprinosi razumijevanju utjecaja fizikalnih karakteristika, poput pH, viskoznosti i gustoće, na stabilnost enzima i koenzima u DES-ovima te provedbi reakcije redukcije CO<sub>2</sub> uz pomoć FDH kao cilja ilustriranja učinkovite strategije. Korištenjem molekularnih deskriptora i matematičkih modela omogućeno je preciznije predviđanje njihovog ponašanja u biokatalitičkim uvjetima. Rezultati ističu učinkovitost određenih DES kombinacija u očuvanju stabilnosti enzima i koenzima, a provedba same reakcije redukcije CO<sub>2</sub> to dokazuje. Time se otvara put racionalnom dizajnu otapala za optimizaciju biokatalitičkih procesa. Daljnja istraživanja i razvoj računalnih alata ključni su za potpuno iskorištavanje potencijala niskotemperaturnih eutektičnih otapala.

## 5. ZAKLJUČCI

Iz provedenog istraživanja proizlazi:

- 1) Kombinacija različitih komponenti (HBD i HBA) i sadržaja vode u DES-ovima omogućava precizno podešavanje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, poput gustoće, viskoznosti i pH vrijednosti, što ih čini izuzetno svestranim otapalima prilagođenim specifičnim zahtjevima enzima i reakcijskih sistema.
- 2) Korištenje  $\sigma$ -profila pruža detaljan uvid u polarne i nepolarne interakcije DES komponenti, što omogućava racionalni dizajn otapala i bolje razumijevanje njihovog utjecaja na stabilnost i aktivnost biomolekula, poput enzima i koenzima, u različitim uvjetima.
- 3) Visok sadržaj vode u DES-ovima ključan je za očuvanje aktivnosti i strukturnog integriteta formijata dehidrogenaze, pri čemu kolin-klorid otapala razrijeđena vodom pružaju bolju enzimsku aktivnost u usporedbi s puferom, dok DES-ovi na bazi betaina pokazuju suprotan trend, naglašavajući značaj specifičnih interakcija između enzima i otapala.
- 4) DES-ovi razrijeđeni puferom pokazali su superiornu stabilizaciju NADH i održavanje pH u odnosu na sustave razrijeđene vodom, osobito u medijima s bazom kolin-klorida, što ih čini pogodnijim za enzimsku redukciju CO<sub>2</sub>. Međutim, visoki udio vode u DES-ovima rezultirao je smanjenjem pH i ubrzanom razgradnjom NADH, naglašavajući važnost optimizacije otapala za postizanje stabilnosti i učinkovitosti u katalitičkim procesima.
- 5) Reakcija redukcije CO<sub>2</sub> je uspješno provedena u DES-u CHCl:Gly<sub>80</sub>%P te je rezultirala s 26,5  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  formijata s volumetrijskom produktivnošću od 6,6  $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . U posebnom eksperimentu praćena je stabilnost NADH, gdje se pokazalo da je nakon 4 sata (vremena trajanja reakcije) koncentracija NADH u DES-u ostala iznad 98 %. Temeljem tih rezultata ovaj DES je prikladan za daljnje korištenje u kontinuiranom procesu zbog iznimne stabilnosti FDH.
- 6) Kombinacijom računalnog modeliranja i laboratorijskog istraživanja, ovaj rad značajno doprinosi razumijevanju i primjeni DES-ova u biokatalitičkim reakcijama, a osim toga pruža važne uvide u dizajn i samu optimizaciju DES-ova za učinkovite biokatalitičke primjene.

## 6. LITERATURA

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* 70–71. doi:10.1039/B210714G

Abranches DO, Zhang Y, Maginn EJ, Colón YJ (2022) Sigma profiles in deep learning: towards a universal molecular descriptor. *Chem. Commun.* **58**, 5630–5633. doi:10.1039/D2CC01549H

Alcántara AR, Domínguez de María P, Littlechild JA, Schürmann M, Sheldon RA, Wohlgemuth R (2022) Preface to Special Issue on Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry. *ChemSusChem.* **15** (9). doi: 10.1002/cssc.202200640

Alonso DA, Baeza A, Chinchilla R, Guillena G, Pastor IM, Ramon DJ (2016) Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 612–632. doi: 10.1002/ejoc.201501197

Anastas P, Warner J (1998) *Green chemistry: Theory and practice*, Oxford University Press, Oxford, UK.

Andersson AJ, Mackenzie FT, Lerman A (2006) Coastal ocean CO<sub>2</sub>-carbonic acid-carbonate sediment system of the Anthropocene. *Global Biogeochemical Cycles* **20**, GB1S92. doi: 10.1029/2005GB002506

Bell EL, Finnigan W, France SP, Green AP, Hayes MA, Hepworth LJ i sur. (2021) Biocatalysis. *Nat Rev Methods Primers* **1**, 46. doi: 10.1038/s43586-021-00044-z

Budinis S, Krevor S, Mac Dowell N, Brandon N, Hawkes A (2018) An assessment of CCS costs, barriers and potential. *Energy strategy reviews* **22**, 61-81. doi: 10.1016/j.esr.2018.08.003

Biswas R, Metya AK, Abebe KM, Gedf SA, Melese BT (2023) Carbon dioxide solubility in choline chloride-based deep eutectic solvents under diverse conditions. *J. Mol. Model.* **29**, 236. doi:10.1007/S00894-023-05643-Z

Biswanger H (2017) *Enzyme kinetics*, 3. izd., Wiley-VCH, Weinheim. doi:10.1002/9783527806461

Bittner JP, Zhang N, Huang L, Domínguez De María P, 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 Chem.* **24**, 1120–1131. doi:10.1039/d1gc04059f

- Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* **425** (6956), 365-365. doi: 10.1038/425365a
- Calzadiaz-Ramirez L, Meyer AS (2022) Formate dehydrogenases for CO<sub>2</sub> utilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **73**, 95–100. doi:10.1016/J.COPBIO.2021.07.011
- Chang CW, Laird DA, Mausbach MJ, Hurburgh, CR (2001) NearInfrared reflectance spectroscopy–principal components regression analyses of soil properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **65**, 480–490. doi:10.2136/SSSAJ2001.652480X
- Cheng H, Liu C, Zhang J, Chen L, Zhang B, Qi Z (2018) Screening deep eutectic solvents for extractive desulfurization of fuel based on COSMO-RS model. *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* **125**, 246–252. doi:10.1016/J.CEP.2018. 02.006
- Constable DJC, Curzons AD, Cunningham VL (2002) Metrics to 'green' chemistry -which are the best? *Green Chem.* **4**, 521–527.
- CO2GEONET (2009) Što zapravo znači geološko skladištenje CO<sub>2</sub>?. CO2GEONET - Europska mreža izvrsnosti za geološko skladištenje CO<sub>2</sub> <http://www.cgseurope.net/UserFiles/file/CGS%20Europe%20Communication%20workshop/C02.pdf> Pristupljeno 26. listopada 2024.
- Cui Z, Enjome Djocki AV, Yao J, Wu Q, Zhang D, Nan S i sur. (2021) COSMO-SAC-supported evaluation of natural deep eutectic solvents for the extraction of tea polyphenols and process optimization. *J. Mol. Liq.* **328**, 115406. doi:10.1016/j. molliq.2021.115406
- Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Radojčić Redovniković I, Halambek J, Gaurina Srček V (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **99**, 1–12. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.019
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 1631–1639. doi:10. 1002/jctb.4668
- Damjanović A, Logarušić M, Tumir LM, Andreou T, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2024) Enhancing protein stability under stress: osmolyte-based deep eutectic solvents as a biocompatible and robust stabilizing medium for lysozyme under heat and cold shock. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **26**, 21040–21051. doi:10.1039/D4CP02275K
- De Carvalho CC (2017) Whole cell biocatalysts: Essential workers from Nature to the industry. *Microb. Biotechnol.* **10**(2), 250-263. doi: 10.1111/1751-7915.12363.

- Durand E, Villeneuve P, Lecomte J (2013) Deep eutectic solvents: Synthesis, application and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 379–385. doi: 10.1002/ejlt.201200416
- EPA (2024) Sources of Greenhouse Gas Emissions. EPA- Environmental Protection Agency, <https://www.epa.gov/ghgemissions/sources-greenhouse-gas-emissions> Pristupljeno 28.10.2024.
- Falcini C, de Gonzalo G (2024) Deep Eutectic Solvents as Catalysts in the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients and Precursors. *Catalysts*, **14**(2), 120. doi: 10.3390/catal14020120
- Fearn T (2002) Assessing calibrations: SEP, RPD, RER and R2. *NIR News* **13**, 12–13. doi:10.1255/NIRN.689
- Fransen B (2020) Carbon Capture and Utilization (CCU) - EcoMatcher. <https://www.ecomatcher.com/carbon-capture-and-utilization-ccu/> Pristupljeno 27.11.2024.
- Freund P, Bachu S, Simbeck D, Thambimuthu K, Gupta M (2005) Annex I. Properties of CO<sub>2</sub> and carbon-based fuels. Cambridge University, str. 385-395.
- Ghisalba O, Meyer HP, Wohlgemuth R (2010) Industrial Biotransformation. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, str.1-34.
- Golubić J (1999) Promet i okoliš, Fakultet prometnih znanosti, Zagreb.
- Hammond OS, Bowron DT, Edler KJ, Hammond S, Edler KJ, Bowron DT (2017) The effect of water upon deep eutectic solvent nanostructure: an unusual transition from ionic mixture to aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 9782–9785. doi:10.1002/ANIE.201702486
- Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, i sur. (2021) Deep eutectic solvents: a review of fundamentals and applications. *Chem. Rev.* **121**, 1232–1285. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00385
- Haugan PM, Drange H (1996) Effects of CO<sub>2</sub> on the ocean environment. *Energy Conversion and Management* **37**, 1019-1022. doi: 10.1016/0196-8904(95)00292-8
- HE (2024) Hrvatska enciklopedija. HE – Hrvatska enciklopedija, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18053> Pristupljeno 15. 10. 2024.



IEA (2019) A new era for CCUS. IEA – International Energy Agency, <https://www.iea.org/reports/ccus-in-clean-energy-transitions/a-new-era-forccus#growing-ccus-momentum> Pristupljeno 22.10.2024.

Illanes A (2008) Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. *Dordrecht: Springer* **391**, 1-15, 107-115, 155-166. doi: 10.1007/978-1-4020-8361-7

Illanes A, Wilson L, Vera C (2013) Problem solving in enzyme biocatalysis, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.

Kara S, Liese A (2019) Process Considerations for the Application of Enzymes. U: Vogel A, May O (ured.) Industrial Enzyme Applications. John Wiley & Sons, Chichester, str. 71–94.

Kato E, Kurosawa A, (2021) Role of negative emissions technologies (NETs) and innovative technologies in transition of Japan's energy systems toward net-zero CO<sub>2</sub> emissions. *Sustain. Sci.* **16**, 463–475, <https://doi.org/10.1007/s11625-021-00908-z>.

Klamt A (2005) COSMO-RS: from quantum chemistry to fluid phase thermodynamics and drug design. *J. Chem. Eng. Data* **51** (4), 1480. doi:10.1021/je0602317

Laitinen AT, Parsana VM, Jauhiainen O, Huotari M, Van Den Broeke LJP, De Jong W i sur. (2021) Liquid-liquid extraction of formic acid with 2- methyltetrahydrofuran: experiments, process modeling, and economics. *Ind. Eng. Chem. Res.* **60**, 5588–5599. doi:10.1021/acs.iecr.1c00159

Lemaoui T, Darwish AS, Hammoudi NEH, Abu Hatab F, Attoui A, Alnashef IM i sur. (2020) Prediction of electrical conductivity of deep eutectic solvents using COSMO-RS sigma profiles as molecular descriptors: a quantitative structure-property relationship study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **59**, 13343–13354. doi:10.1021/ACS.IECR.0C02542

Leron RB, Caparanga A, Li MH (2013) Carbon dioxide solubility in a deep eutectic solvent based on choline chloride and urea at T = 303.15–343.15 K and moderate pressures. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **44**, 879–885. doi:10.1016/J.JTICE.2013. 02.005

Magueri Z, Dominguez de Maria P (2014) Whole-Cell Biocatalysis in Deep-EutecticSolvents/Aqueous Mixtures. *ChemCatChem.* **6**, 1535–1537. doi: 10.1002/cctc.201400077

McManus J F, Francois R, Gherardi JM, Keigwin LD, Brown-Leger S (2004) Collapse and rapid resumption of Atlantic meridional circulation linked to deglacial climate changes. *Nature* **428**, 834-837. doi: 10.1038/nature02494

Mourelle-Insua Á, Lavandera I, Gotor-Fernández V (2019) A designer natural deep eutectic solvent to recycle the cofactor in alcohol dehydrogenase-catalysed processes. *Green Chem.* **21**, 2946–2951. doi:10.1039/C9GC00318E

Nikolić M (2024) Analiza stabilnosti formijata dehidrogenaze i koenzima NADH u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Obert R, Dave BC (1999) Enzymatic conversion of carbon dioxide to methanol: enhanced methanol production in silica sol-gel matrices. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 12192–12193. doi:10.1021/ja991899r

Orr JC i sur. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* **437**, 681–686. doi: 10.1038/nature04095

Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković, I (2021) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **96**, 14–30. doi:10.1002/JCTB.6545

Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis R L, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071. doi: 10.1021/sc500096j

Quaid T, Reza T (2023) COSMO prediction of siloxane compounds absorption on type 3 and type 5 deep eutectic solvents. *Chem. Eng. J. Adv.* **14**, 100489. doi:10.1016/J.CEJA.2023.100489

Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Radojčić Redovniković I (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **112**, 46–53. doi:10.1016/J.ECOENV.2014.09.034

Radović M, Hok L, Panić M, Cvjetko Bubalo M, Vianello R, Vinković M i sur. (2022) Deep eutectic solvents as a stabilising medium for NAD coenzyme: unravelling the mechanism behind coenzyme stabilisation effect. *Green Chem.* **24**, 7661–7674. doi:10.1039/d2gc02656b

Radović M, Jurinjak Tušek A, Kroutil W, Reiter T, Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M (2024) Rational design of deep eutectic solvents for the stabilization of dehydrogenases: an artificial neural network prediction approach. *Front. Chem.* **12**, 1436049. doi:10.3389/FCHEM.2024.1436049

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otopala–racionalnim dizajnom do zelenog otopala budućnosti. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **70**(9-10), 551-562.

Reda T, Plugge CM, Abram NJ, Hirst J (2008) Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10654–10658. doi:10.1073/pnas.0801290105

Robinson PK (2015) Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays Biochem.* **59**, 1–41. doi: 10.1042/bse0590001

Sanz-Pérez ES, Murdock CR, Didas SA, Jones CW (2016) Direct capture of CO<sub>2</sub> from ambient air. *Chem. Rev.* **116**, 11840–11876. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00173.

Sekoai PT, Yoro KO (2016) Biofuel Development Initiatives in Sub-Saharan Africa: Opportunities and Challenges. *Climate* **4** (2), 33. doi:10.3390/cli4020033

Seneviratne, IS, Donat GM, Pitman JA, Knutti R, Wilby LR, (2016) Allowable CO<sub>2</sub> emissions based on regional and impact-related climate targets. *Nature* **529**, 477–483. doi: 10.1038/nature16542

Sheldon RA (2016) Biocatalysis and Green Chemistry. U: Patel RN (ured.) *Green Biocatalysis*. John Wiley & Sons, Hoboken, str. 1–15.

Sheldon RA, Woodley JM (2018) Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev.* **118**(2), 801–38. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00203

Shuzhuang S, Hongman S, Williams PT, Wu C (2021) Recent advances in integrated CO<sub>2</sub> capture and utilization: a review. *Sustainable Energy & Fuels* **5**, 4546-4559. doi: 10.1039/D1SE00797A

Sim J, McGoverin C, Oey I, Frew R, Kebede B (2023) Near-infrared reflectance spectroscopy accurately predicted isotope and elemental compositions for origin traceability of coffee. *Food Chem.* **427**, 136695. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2023. 136695

Singh RK, Singh R, Sivakumar D, Kondaveeti S, Kim T, Li J i sur. (2018) Insights into cell-free conversion of CO<sub>2</sub> to chemicals by a multienzyme cascade reaction. *ACS Catal.* **8**, 11085–11093. doi:10.1021/acscatal.8b02646

Slater CS, Savelski MJ, Hitchcock D, Cavanagh EJ (2016) Environmental analysis of the life cycle emissions of 2-methyl tetrahydrofuran solvent manufactured from renewable

resources. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **51**, 487–494. doi:10.1080/10934529.2015.1128719

Stampi-Bombelli V, van der Spek M, Mazzotti M (2020) Analysis of direct capture of CO<sub>2</sub> from ambient air via steam-assisted temperature–vacuum swing adsorption. *Adsorption*, **26**, 1183–1197. doi: 10.1007/s10450-020-00249-w

Stott PA, Jones GS, Mitchell JFB (2003) Do models underestimate the solar contribution to recent climate change? *Journal of Climate* **16**, 4079-4093

Taklimi SM, Divsalar A, Ghalandari B, Ding X, Di Gioia ML, Omar KA, Saboury AA (2023) Effects of deep eutectic solvents on the activity and stability of enzymes. *J. Mol. Liq.* **377**, 121562. doi:10.1016/J.MOLLIQ.2023.121562

Tishkov VI, Galkin AG, Marchenko GN, Egorova OA, Sheluho DV, Kulakova LB, Dementieva LA, Egorov AM (1993) Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas* sp.101 formate dehydrogenase mutants containing cys-255-ser and cys-255-met replacements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 976–981. doi: 10.1006/BBRC.1993.1511

Venkatraman V, Evjen S, Knuutila HK, Fiksdahl A, Alsberg BK (2018) Predicting ionic liquid melting points using machine learning. *J. Mol. Liq.* **264**, 318–326. doi:10.1016/J.MOLLIQ.2018.03.090

Vermue MH, Tramper J (1995) Biocatalysis in Non-conventional Media: Medium Engineering Aspects (Technical Report). *Pure Appl Chem.* **67** (2), 345–73.

Villa R, Nieto S, Donaire A, Lozano P (2023) Direct Biocatalytic Processes for CO<sub>2</sub> Capture as a Green Tool to Produce Value-Added Chemicals. *Molecules* **28** (14), 5520. doi: 10.3390/molecules28145520.

Wu JT, Wu LH, Knight, JA (1986) Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin. Chem.* **32**, 314–319. doi:10.1093/ CLINCHEM/32.2.314

Wu S, Snajdrova R, Moore JC, Baldenius K, Bornscheuer UT (2021) Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60**, 88–119, doi: 10.1002/anie.202006648

Xu P, Zheng GW, Zong MH, Li N, Lou WY (2017) Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.* **4**, 34. doi: 10.1186/s40643-017-0165-5

Yoro KO, Daramola MO (2020) Chapter 1—CO<sub>2</sub> emission sources, greenhouse gases, and the global warming effect. *Advances in carbon capture. Methods, Technologies and Applications* 3–28. doi: 10.1016/B978-0-12-819657-1.00001-3

Zachos I, Nowak C, Sieber V (2019) Biomimetic cofactors and methods for their recycling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49**, 59–66. doi:10.1016/J.CBPA.2018.10.003

Zhang N, Domínguez de María P, Kara S (2024) Biocatalysis for the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients in Deep Eutectic Solvents: State-of-the-Art and Prospects. *Catal* **14**, 84. doi:10.3390/ CATAL14010084

Zhang Z, Xu BH, Luo J, Von Solms N, He H, Zhang Y i sur. (2018) Ionic liquids as bifunctional cosolvents enhanced CO<sub>2</sub> conversion catalysed by nadhdependent formate dehydrogenase. *Catalysts* **8**, 304. doi:10.3390/catal80803

Žnidaršič-Plazl P (2014) Enzymatic microreactors utilizing non-aqueous media. *Chim. Oggi - Catal.Today* **32** (1), 54–61. [https://www.teknoscienze.com/tks\\_article/enzymatic-microreactorsutilizing-non-aqueous-media](https://www.teknoscienze.com/tks_article/enzymatic-microreactorsutilizing-non-aqueous-media)

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Karla Šubar 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.

Karla Šubar

Vlastoručni potpis