

# Utjecaj eutektskih otapala na lipazom kataliziranu hidrolizu (R,S)-1-feniletil-acetata

---

**Vukšić, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:159:609397>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Martina Vukšić, 791/MB

**Utjecaj eutektskih otapala na lipazom  
kataliziranu hidrolizu  
(*R,S*)-1-feniletil-acetata**

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

Rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta 9550.

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo i Manieli Panić, mag. ing., na strpljenju, susretljivosti i brojnim savjetima koji su mi uvelike pomogli prilikom pisanja ovog rada. Hvala i dr. sc. Ani Jurinjak Tušek na stručnoj pomoći i udijeljenom znanju. Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci tijekom cijelog studija.*

## 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  
Znanstveni polje: Biotehnologija

### UTJECAJ EUTEKTIČKIH OTAPALA NA LIPAZOM KATALIZIRANU HIDROLIZU (*R,S*)-1-FENILETIL-ACETATA

*Martina Vukšić, 791/MB*

**Sažetak:** U svrhu uspostavljanja visokoučinkovitih procesa proizvodnje industrijski važnih kemikalija, u posljednjih nekoliko godina eutektička otapala intenzivno se proučavaju kao *zelena* zamjena za škodljiva otapala u procesima organske sinteze i biokatalize. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene lipaze B kao biokatalizatora u hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata u kolinijevim eutektičkim otapalima. Uspoređujući sve ispitane parametre ( $\eta$ ,  $V_P$ ,  $ee$  i  $V_E$ ), zaključuje se da su eutektička otapala superiornija za lipazom kataliziranu hidrolizu od konvencionalnih organskih otapala, pri čemu se otapalo ChGlc s 50 % vode pokazalo kao najbolje. U istoimenom otapalu kao i u puferu, ispitana je termička stabilnost lipaze kroz vremenski period od 72h u temperaturnom rasponu od 20-80 °C. Pri tome je ustanovljeno da u tercijarnim mješavinama DES-a ChGlc nakon 72 h inkubacije, najveći postotak inicijalne aktivnosti lipaza zadržava pri temperaturi od 40 °C. Osim toga, ustanovljeno je da lipaza pokazuje veću termičku stabilnost u eutektičkim otapalima nego u puferu.

**Ključne riječi:** biokataliza, lipaza, eutektička otapala, (*R,S*)-1-feniletil-acetat, termička stabilnost

**Rad sadrži:** 49 stranica, 13 slika, 6 tablica, 45 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Doc. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Ana Jurinjak Tušek, Manuela Panić, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*
2. Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo*
3. Izv.prof. dr.sc. *Vlatka Petravić Tominac*
4. Doc.dr.sc. *Mojca Čakić Semenčić* (zamjena)

**Datum obrane:** 29. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **THE EFFECT OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS ON LIPASE CATALYZED HYDROLYSIS OF (R,S)-1-PHENYLETHYL-ACETATE**

*Martina Vukšić, 791/MB*

**Abstract:** For the purpose of establishing new sustainable processes for the production of industrially important compounds, in recent years deep eutectic solvents have been intensively studied as a possible replacement for organic solvents for biocatalytic and organic reactions. Within this work, the hydrolysis of (R,S)-1-phenylethyl acetate within cholinium-based deep eutectic solvents was studied. Comparing all the tested parameters ( $\eta$ ,  $V_P$ ,  $ee$  and  $V_E$ ), it is clear that deep eutectic solvents are superior to conventional organic solvents for lipase catalyzed hydrolysis, where solvent ChGlc with 50 % of water was found to be the best between all used. Thermal stability of lipase at different temperatures through a certain period of time, was also examined. It was established that after 72 hours of incubation in tertiary DES mixtures, lipase retains its highest activity at 40 °C. Thermal stability of lipase was proven to be higher in deep eutectic solvents than in buffer.

**Keywords:** biocatalysis, deep eutectic solvents, (R,S)-1-phenylethyl-acetate, thermal stability

**Thesis contains:** 49 pages, 13 figures, 6 tables, 45 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** PhD. Ana Jurinjak Tušek, Manuela Panić, mag. ing.

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
2. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
3. PhD. *Vlatka Petravić Tominac*, Associate professor
4. PhD. *Mojca Čakić Semenčić*, Assistant professor (Substitute)

**Thesis defended:** September 29<sup>th</sup>, 2017.

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Biotransformacije .....	2
2.1.1. Općenito o biotransformacijama.....	2
2.1.2. Biokatalizatori u biotransformacijama.....	3
2.1.3. Karakterizacija biokatalizatora .....	5
2.1.3.1. Mehanizmi djelovanja enzima i Michaelis-Menteničina kinetika.....	5
2.1.3.2. Aktivnost, selektivnost i stabilnost enzima.....	9
2.2. Eutektička otapala.....	12
2.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala .....	12
2.2.2. Primjena eutektičkih otapala.....	14
2.2.2.1. Primjena eutektičkih otapala u biotransformacijama .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
3.1. Materijali .....	17
3.1.1. Kemikalije.....	17
3.1.2. Enzimski preparat .....	17
3.1.3. Oprema i uređaji .....	17
3.2. Metode rada .....	18
3.2.1. Sinteza eutektičkih otapala .....	18
3.2.2. Lipazom katalizirana hidroliza ( <i>R,S</i> )-1-feniletil-acetata .....	19
3.2.2.1. Određivanje koncentracije ( <i>R,S</i> )-1-feniletil-acetata.....	21
3.2.3. Određivanje termičke stabilnosti lipaze u otapalu ChGlc s različitim udjelima vode i u puferu .....	23
3.2.3.1. Procjena kinetičkih parametara .....	23
3.2.3.2. Statistička obrada rezultata .....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
4.1. Sinteza eutektičkih otapala .....	25
4.2. Lipazom katalizirana hidroliza ( <i>R,S</i> )-1-feniletil-acetata .....	26
4.3. Termička stabilnost lipaze u otapalu ChGlc s različitim udjelima vode i u puferu.....	34
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>45</b>



# 1. UVOD

U procesu proizvodnje i primjene te u konačnici zbrinjavanja, velike količine proizvoda kemijske, farmaceutske i agrokemijske industrije bivaju ispuštene u okoliš. Stoga se u posljednja dva desetljeća puno govori o potrebi zaštite okoliša, pri čemu se velika pozornost pridaje zelenim i održivim tehnologijama. Na nužnost smanjenja primjene štetnih organskih otapala i reagensa sveprisutnih u industriji, ukazuje nam *zelena* kemija, program implementacije održivog razvoja u kemijskoj tehnologiji. Prema smjernicama *zelene* kemije, idealno otapalo treba biti netoksično, kemijski i fizički stabilno, jednostavno za rukovanje, treba imati nisku hlapljivost te mogućnost višekratne uporabe. Posljednjih se godina kao nova *zelena* otapala intenzivno proučavaju eutektička otapala, a koje odlikuje neznatna hlapljivost, nezapaljivost, velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost te posebice mogućnosti reciklacije, čime prema principima *zelene* kemije, udovoljavaju kriterijima idealnog otapala. Također, zbog velikog broja mogućih struktura ovih otapala, te samim time i dizajniranja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, eutektička otapala su se pokazala prikladnima za raznovrsnu uporabu u organskoj kemiji, (bio)katalitičkim procesima te procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenata.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene eutektičkih otapala u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata primjenom lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antarctica* (CALB) te potom ispitati termičku stabilnost lipaze u najpogodnijem eutektičkom otapalu kroz vremenski period od  $t = 72$  h.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biotransformacije

#### 2.1.1. Općenito o biotransformacijama

Zanimljivi organski spojevi općenito se dobivaju ekstrakcijom biljaka ili životinjskih organa, potpunom (totalnom) kemijskom sintezom, djelomičnom (parcijalnom) kemijskom sintezom koja počinje iz prirodnih proizvoda, prirodnom ili kontroliranom biosintezom te enzimskom transformacijom prirodnih proizvoda ili supstrata dobivenih kemijskom sintezom (biotransformacije) (Faber, 2011).

Biotransformacije se definiraju kao pretvorba organskih spojeva u industrijski važne kemikalije djelovanjem biološkog sustava, tj. mikroorganizama ili enzima koji potječu iz njih. Drugim riječima, biotransformacije treba smatrati selektivnim enzimskim modifikacijama definiranih čistih spojeva u definirane konačne proizvode. Mikroorganizmi i njihovi ekstrakti su već dugo vremena iskorištavani za kemijske reakcije, u velikoj mjeri fermentacijske procese u svrhu dobivanja alkoholnih pića, octa ili pak namirnica kao što je jogurt. Iako je povijest biotransformacija više vezana uz procese fermentacije u 19. stoljeću, ubrzani razvoj ove discipline započeo je tijekom 20. stoljeća upotrebom mikroorganizama za dobivanje kemijskih spojeva kao što su šećeri i aminokiseline, te različitih farmaceutika nakon otkrića penicilina. Razvoj biotransformacijskih znanosti u posljednja dva desetljeća predstavlja jedan od najboljih primjera sinergističkih odnosa u svim disciplinama biološke i kemijske znanosti, uključujući mikrobiologiju, molekularnu biologiju i enzimologiju (Grogan, 2009).

Primjena biokatalitičkih procesa u industriji značajno je porasla u zadnjih dvadeset godina, ponajprije zahvaljujući velikom napretku u genetičkom inženjerstvu te povećanoj potrebi za enantiomerno čistim spojevima (eng. *Enantiomerically Pure Compounds*, EPC) u farmaceutskoj industriji i poljoprivredi. Učinkovita primjena biotransformacija u industrijskom mjerilu ovisi o dostupnosti i cijeni odgovarajućih enzima i mikroorganizama, pripremi procesa (hranjive podloge, reakcijske smjese ili biokatalizatora), izdvajanju proizvoda iz prirasle biomase te njegovom pročišćavanju, prednostima pred postojećim kemijskim metodama i procesima, vremenskim zahtjevima za razvojem novog procesa, problemu otpadnih voda i otapala, odobrenju procesa i krajnjeg proizvoda te javnom mišljenju (Faber, 2011).

Svrha i ciljevi biotransformacija uključuju uvođenje kiralnih centara u molekule, odvajanje racemata, selektivnu pretvorbu odgovarajućih funkcionalnih skupina sličnih reaktivnosti, regioselektivnu funkcionalizaciju neaktivnog ugljika te pretvorbu nestabilnih molekula u blagim reakcijskim uvjetima (Bommarius i Riebel, 2004). U biotransformacijama najznačajniju primjenu imaju hidrolitičke transformacije koje se izvode uporabom proteaza, esteraza i lipaza. Od svih tipova enzimski kataliziranih reakcija, one se najlakše i najjednostavnije izvode. Pri tome se poseban naglasak stavlja na primjenu lipaza zahvaljujući njihovoj komercijalnoj dostupnosti iz raznih mikroorganizama, aktivnosti i stabilnosti u organskim otapalima te djelovanju bez potrebe za kofaktorima. Upravo zbog toga se upotrebljavaju u proizvodnji biodizela, prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, medicini, obradi otpadnih voda te formulaciji detergenata. Posebno je značajna njihova primjena u farmaceutskoj industriji, gdje se koriste u proizvodnji enantiomerno čistih amina enantioselektivnim katalitičkim aciliranjem te u komercijalnom procesu rezolucije metilnog estera, ključnog prekursora u pripravi diltiazema. Iako im je industrijska primjena ograničena upravo zbog njihove ograničene dostupnosti, esteraze pokazuju visoku aktivnost i stereoselektivnost prema 2-arilpropionskim kiselinama, koje se koriste npr. u enantioselektivnoj sintezi (*S*)-naproxena [(+)-(*S*)-2-(6-metoksi-2-naftil)propionske kiseline] koja predstavlja nesteroidni antiinflamatorni lijek. Naime, (*S*)-naproxen je oko 150 puta učinkovitiji od (*R*)-naproxena koji također može prouzrokovati neželjene gastrointestinalne poremećaje. Neke proteaze također posjeduju esteraznu aktivnost i mogu katalizirati selektivne hidrolize, ali i stvaranje esterskih veza (Bommarius i Riebel, 2004).

### 2.1.2. Biokatalizatori u biotransformacijama

Svi živi organizmi sastoje se od jedne ili više stanica koje mogu sintetizirati različite enzime - katalizatore u biotransformacijama. Enzimi mogu biti prisutni u stanici u većim ili manjim koncentracijama ovisno o prirodi enzima, tipu stanice te stadiju njezina razvitka. Većina sintetiziranih enzima djeluje intracelularno (djeluju na mjestu sinteze), no neke enzime stanica luči ekstracelularno (djeluju izvan mjesta sinteze). U biotransformacijama se kao biokatalizatori koriste enzimi (sirovi ili pročišćeni), biljne i životinjske stanice i tkiva, čiste kulture mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni, alge) te umjetni enzimi (abzimi) (Grogan, 2009).

Primjena enzima kao katalizatora u organskoj sintezi ima određene prednosti i nedostatke (tablica 1) (Faber, 2011).

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci enzima kao biokatalizatora (Bommarius i Riebel, 2004).

<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Enzimi su vrlo djelotvorni katalizatori (primjenjuju se u koncentracijama od <math>10^{-3} - 10^{-4} \%</math> i ubrzavaju reakciju za faktor <math>10^8 - 10^{10}</math> koji može narasti i do <math>10^{12}</math>)</li> <li>✓ Potpuno se razgrađuju u okolišu za razliku od teških metala</li> <li>✓ Djeluju u blagim uvjetima (pH-područje 5-8 i temperaturni raspon <math>T = 20-40 \text{ }^\circ\text{C}</math>)</li> <li>✓ Djeluju općenito pri istim ili sličnim uvjetima pa se nekoliko biokatalitičkih reakcija može izvoditi u jednoj tikvici (međusobno su snošljivi)</li> <li>✓ Mogu katalizirati različite reakcije (hidroliza, oksidacija, adicija i eliminacija, halogeniranje i dehalogeniranje, alkiliranje i dealkiliranje, izomerizacije, acilinske i aldolne reakcije, Michaelova adicija)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Prirodni enzimi dolaze u samo jednom enantiomernom obliku</li> <li>▪ Enzimi trebaju odgovarajuće radne parametre (povišene temperature, ekstremne pH-vrijednosti i visoke koncentracije soli uzrokuju deaktiviranje enzima)</li> <li>▪ Enzimi ispoljavaju najveću katalitičku aktivnost u vodi (voda je obično najmanje pogodno otapalo za većinu organskih reakcija zbog visoke točke vrelišta i visoke topline uparavanja)</li> <li>▪ Enzimi su podložni inhibiciji supstratom ili produktom</li> <li>▪ Enzimi mogu uzrokovati alergijske reakcije koje se mogu spriječiti pažljivim rukovanjem</li> </ul>

Cijele stanice obavljaju funkciju biokatalizatora u obliku kulture u fazi rasta, stacionarnoj fazi, u obliku spora ili se pak primjenjuju kao imobilizirana kultura. Najkorisniji oblik mikrobnog staničnog biokatalizatora je čista kultura mikroorganizma koja sadrži visoku razinu jednog ili više enzima koji će izvesti željenu biotransformaciju. Mogućnost uporabe miješane kulture dvaju ili više različitih tipova mikroorganizama (kokulture) od kojih će jedan provesti željenu biotransformaciju, nije preporučljiv jer su miješane kulture često nestabilne zbog promjene dinamike populacije u kokulturi iz čega mogu proizaći nepredvidive varijacije

u rezultatu biotransformacije. Provođenje reakcija s cijelim stanicama kao biokatalizatorima je jeftina i jednostavna tehnika, budući da se reakcije odvijaju u vodenom mediju bez dodatka kofaktora, a izdvajanje biokatalizatora iz reakcijske smjese je također olakšano. Kod primjene imobiliziranih kultura, biokatalizator zadržava aktivnost kroz dulji vremenski period, a osim toga, može se i ponovno upotrijebiti. Velika prednost uporabe takvih kultura je i lako uklanjanje i pročišćavanje produkta iz reakcijske smjese. Nedostatak njihove primjene je smanjenje katalitičke aktivnosti enzima zbog ograničenja difuzije supstrata/produkta, što se nastoji izbjeći povećanjem gustoće imobiliziranih stanica (Faber, 2011).

Iako se biljne i životinjske stanice zbog sporijeg rasta upotrebljavaju u manjoj mjeri, imaju određene prednosti u odnosu na mikroorganizme (tablica 2) (Bommarius i Riebel, 2004).

**Tablica 2.** Prednosti biljnih i životinjskih stanica te mikroorganizama kao biokatalizatora (Bommarius i Riebel, 2004).

Prednosti biljnih i životinjskih stanica	Prednosti mikroorganizama
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Provode enantioselektivnu transformaciju specifičnih egzogenih supstrata dodanih uzgojenim stanicama</li> <li>➤ Kao medij se može koristiti voda bez dodatka izvora ugljika</li> <li>➤ Laka dostupnost u velikim količinama na svim područjima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Zbog velike brzine staničnog metabolizma brže provode biotransformacije</li> <li>➤ Mogu transformirati široki spektar supstrata</li> <li>➤ Manje su osjetljivi na uvjete različitih tehnika kultiviranja</li> </ul>

### 2.1.3. Karakterizacija biokatalizatora

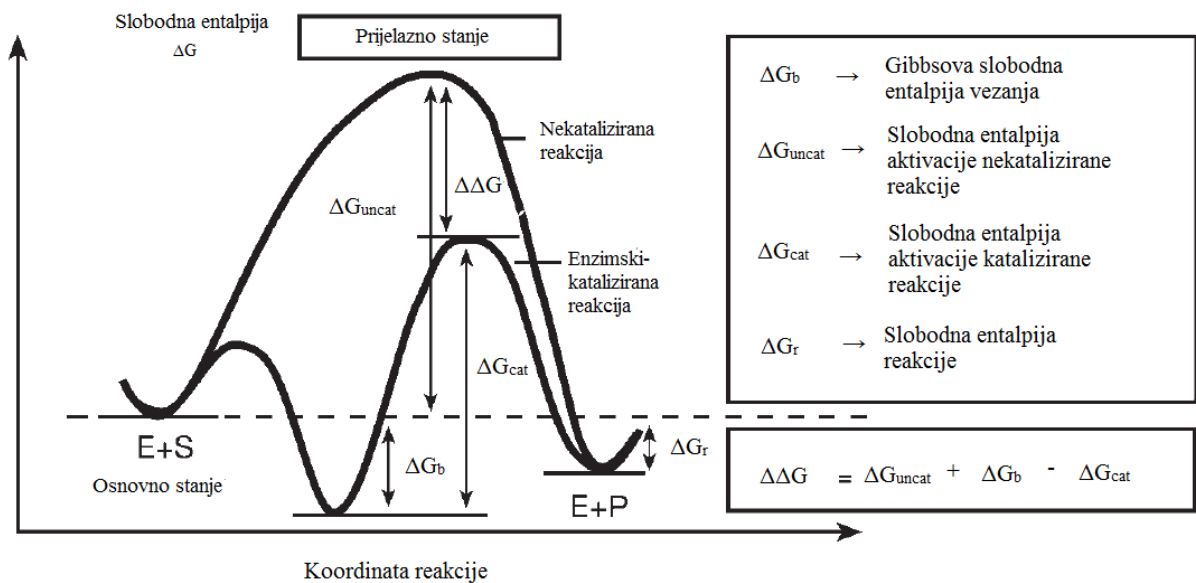
#### 2.1.3.1. Mehanizmi djelovanja enzima i Michaelis-Menteničina kinetika

Enzimi su klasa multifunkcionalnih multivalentnih makromolekula koje imaju sposobnost vezanja malih molekula te utjecanja na ravnotežu reakcija. Enzimi su proteini i sastoje se od jednog ili više linearnih lanaca čiji je aminokiselinski sastav gotovo uvijek, uz vrlo rijetke iznimke, 20 zajedničkih aminokiselina. Iznimka su formijati dehidrogenaza,

pirolizin te glutation peroksidaza, u čijem sastavu je i 21. aminokiselina selenocistein (Mehl, 2003).

Mehanizam enzimske reakcije temelji se na reverzibilnom udruživanju slobodnog enzima  $E$  i slobodnog supstrata  $S$  u enzim-supstrat kompleks ( $ES$  kompleks).  $ES$  kompleks zatim prolazi kroz prijelazno stanje do enzim-produkt kompleksa ( $EP$  kompleks) te potom do osnovnog stanja slobodnog enzima  $E$  i slobodnog produkta  $P$ . Iz navedenog slijeda reakcija, proizlazi zakon koji uključuje promatrane varijable ovisno o njihovim koncentracijama. U enzimskoj katalizi, prvi takav zakon napisali su Michaelis i Menten 1913. godine. Prema tome se odgovarajuća kinetika naziva Michaelis-Menteničina kinetika (MM-kinetika). Zakon ističe zasićenje reakcije s obzirom na supstrat (nulti red pri visokoj, prvi red pri niskoj koncentraciji supstrata) te s obzirom na enzim (prvi red reakcije) (Bommarius i Riebel, 2004).

Ideja MM-kinetike enzimske reakcije, koja se sastoji od koraka vezanja i slijedećeg reakcijskog koraka, utjelovljena je u koordinatnom dijagramu ( $\Delta G$ - $\zeta$ ) slobodno-entalpijske reakcije, opisujući promjenu u Gibbsovoj slobodnoj entalpiji  $\Delta G$  kroz opseg reakcije  $\zeta$  (slika 1). U nekataliziranoj reakciji, jedan ili više supstrata ili reaktanata nalaze se u svom početnom ili osnovnom stanju. Tijekom reakcije reaktanti prolaze kroz točku maksimalne slobodne entalpije  $\Delta G_{tr,uncat}$ , što se naziva prijelaznim stanjem, te nastavljaju do početnog tj. osnovnog stanja produkta. MM-kinetiku opisuju dvije kinetičke konstante:  $v_{max}$  (najveća moguća brzina reakcije koja bi se mogla (teorijski) postići pri određenoj koncentraciji enzima) i  $K_M$  (jednaka je koncentraciji supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine ( $v_{max}/2$ )). U enzimskoj reakciji, početni slobodni enzim  $E$  i slobodni supstrat  $S$  nalaze se u svojim osnovnim stanjima. Iz osnovnog stanja, enzim i supstrat se udružuju u  $ES$  kompleks. Ako je  $[S] > K_M$ , onda  $ES$  kompleks formira intermedijer, što označava lokalni minimum slobodne entalpije. Ako je  $[S] < K_M$ , onda je slobodna entalpija  $ES$  kompleksa veća od slobodne entalpije enzima u osnovnom stanju. Kad je  $[S] = K_M$ , razine slobodne entalpije su jednake.  $ES$  kompleks prolazi kroz drugo prijelazno stanje  $\Delta G_{tr,cat}$  na svom putu do  $EP$  kompleksa i zatim u osnovno stanje slobodnog enzima  $E$  i slobodnog produkta  $P$  (Bommarius i Riebel, 2004).



**Slika 1.** Slobodna entalpija reakcijskog koordinatnog dijagrama za enzimsku reakciju (Bommarius i Riebel, 2004).

Maksimum Gibbsove slobodne entalpije između osnovnog stanja supstrata i produkta formira Gibbsovu slobodnu entalpiju aktivacije sa energetsom razlikom  $\Delta G^\ddagger$  koja određuje konstantu brzine reakcije. Kao svaki katalizator, enzim smanjuje vrijednost  $\Delta G^\ddagger$  i time ubrzava reakciju. Agens koji povećava vrijednost  $\Delta G^\ddagger$  naziva se antikatalizator.

Od ideje enzimске kinetike kao koraka združivanja i koraka reakcije zajedno sa odgovarajućom energetsom krivuljom u reakcijskom koordinatnom dijagramu Gibbsove slobodne entalpije ( $\Delta G-\zeta$ ), nastaje reakcijska shema (jednadžba 1):



Pri tome je zahtijevani mehanizam reakcije modeliran zakonom koji je nazvan po Langmuiru i Hinshelwoodu i kasnije također po Hougenu i Watsonu (LHHW). LHHW i MM oboje pretpostavljaju limitirajući broj aktivnih mjesta koja mogu biti zasićena sa supstratom. Kinetička shema prema Michaelis-Menten za reakciju s jednim supstratom pretpostavlja tri moguća osnovna reakcijska koraka: nastajanje  $ES$  kompleksa, disocijacija  $ES$  kompleksa u enzim  $E$  i supstrat  $S$  te ireverzibilna reakcija do produkta  $P$ . Iz ove sheme, pretpostavlja se da korak nastajanja produkta  $P$  iz kompleksa  $ES$  u  $E$  i  $P$  ograničava brzinu reakcije, pa je  $ES$  kompleks modeliran na način da reagira direktno sa slobodnim enzimom i molekulom produkta za koji se pretpostavlja da disocira sa enzima bez nastajanja  $EP$  kompleksa (jednadžba 2):



Prema MM, pretpostavlja se da je asocijacija i disocijacija slobodnog enzima, slobodnog supstrata i *ES* kompleksa u ravnoteži (Haldane, 1965), što prikazuje jednadžba 3:

$$K_S = \frac{[ES]}{[E] \cdot [S]} \quad [3]$$

Sa ovom pretpostavkom i masenom ravnotežom svih enzimskih komponenata izraženom jednadžbom 4:

$$[E]_{uk} = [E]_{slob} + [ES] \quad [4]$$

proizlazi jednadžba 5:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} = k_{cat} \frac{[E]_{uk}[S]}{K_M + [S]} \quad [5]$$

gdje je:

$v$  - brzina enzimske reakcije,

$v_{max}$  - maksimalna brzina enzimske reakcije,

$K_M$  - koncentracija supstrata pri kojoj se postiže polovica maksimalne brzine,

$[S]$  - koncentracija supstrata,

$k_{cat}$  - konstanta brzine reakcije,

$[E]_{uk}$  - ukupna koncentracija enzima u reakciji.

Suprotno  $[E]_{slob}$ ,  $[E]_{uk}$  je moguće pratiti. Jednadžba je napisana s  $K_M$  konstantom umjesto s ravnotežnom konstantom  $K_S$ . Osim ako je enzimska reakcija jako brza, u gotovo svim slučajevima vrijedi odnos:  $K_M \approx K_S$ .

U prethodnoj jednadžbi je brzina reakcije tradicionalno obilježavana sa  $v$  (koncentracija/vrijeme) a reakcijska konstanta sa  $k_{cat}$  (vrijeme<sup>-1</sup>). Jednadžba opisuje kinetiku Michaelis-Menteničine reakcije uzimajući u obzir koncentraciju supstrata i zasićenje pri visokim koncentracijama supstrata. Maksimalna brzina reakcije pri zasićenju supstratom označava se sa  $v_{max}$ , a računa se prema jednadžbi 6:

$$v_{max} = k_{cat}[E] \quad [6]$$



$K_M$  vrijednost odgovara koncentraciji supstrata pri polovičnoj zasićenosti ( $v_{\max}/2$ ) i mjeri afinitet vezanja supstrata na enzim. Visoka  $K_M$  vrijednost odgovara slabom vezanju, dok niska vrijednost odgovara čvrstom vezanju enzima i supstrata. Pri niskoj koncentraciji supstrata, preciznije ako je  $[S] \ll K_M$ , jednačina 6 je pojednostavljena na sljedeći način (jednačina 7):

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{K_M} \quad [7]$$

i označava prvi red reakcije, uzimajući u obzir koncentraciju supstrata. Suprotno tome, kod visoke koncentracije supstrata, preciznije ako je  $[S] \gg K_M$ , jednačina 6 je pojednostavljena na sljedeći način (jednačina 8):

$$v = v_{\max} \quad [8]$$

i označava nulti red reakcije, uzimajući u obzir koncentraciju supstrata. U svim situacijama brzina reakcije  $v$  je proporcionalna koncentraciji enzima  $[E]$  (Bommarius i Riebel, 2004).

### 2.1.3.2. Aktivnost, selektivnost i stabilnost enzima

Svaki katalizator kao i biokatalizator, može se okarakterizirati s tri osnovne veličine: aktivnošću, selektivnošću i stabilnošću (Bommarius i Riebel, 2004).

Ukupna enzimaska aktivnost se izražava internacionalnim jedinicama ili „jedinicama“ (eng. *Units*):

$$1 \text{ Unit} \equiv 1 \text{ IU} \equiv 1 \text{ U} \equiv 1 \mu\text{mol min}^{-1}$$

Aktivnost enzima može se izraziti kao specifična aktivnost enzima s obzirom na masu katalizatora i kao volumetrijska aktivnost bazirana na jedinici volumena:

$$1 \text{ U}(\text{mg proteina})^{-1} = 1 \mu\text{mol}(\text{min mg proteina})^{-1} \equiv \text{specifična aktivnost}$$

$$1 \text{ U mL}^{-1} = 1 \mu\text{mol}(\text{min mL})^{-1} \equiv \text{volumetrijska aktivnost}$$

Aktivnost enzima jednostavna je za mjerenje i nužna čak i u osnovnim eksperimentalnim protokolima. U usporedbi s drugim katalizatorima, većina enzima je aktivna i stabilna pri određenoj temperaturi i pH-vrijednosti (uglavnom između  $T = 15 - 50 \text{ }^\circ\text{C}$  te pH-vrijednost = 5 - 10), a najčešće se određuje pri uvjetima temperature od  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$  i pH-vrijednosti 7,5,

osim ako nije drukčije specificirano. Prag specifične aktivnosti za korisni biokatalizator je 1U (mg čistog proteina)<sup>-1</sup>. Specifična aktivnost može biti poboljšana optimiranjem reakcijskih uvjeta, promjenom strukture nosača enzima ili čak enzima. Volumetrijska aktivnost biokatalizatora može biti poboljšana dodatkom više biokatalizatora u sustav. Aktivnost predstavlja frekvenciju preokreta, a definira se na sljedeći način (jednadžba 9):

$$\text{frekvencija preokreta (TOF)} = \frac{\text{broj katalitičkih događaja}}{\text{vrijeme} \cdot \text{broj aktivnih mjesta}} \quad [9]$$

Frekvencijom preokreta (eng. *turnover number*, TOF) može se usporediti uspješnost enzimskih reakcija kataliziranih različitim katalizatorima/biokatalizatorima. Prema definiciji, TOF može biti određen samo ako je poznat broj aktivnih mjesta enzima. Za enzimsku reakciju koja slijedi MM-kinetiku, frekvencija preokreta računa se prema jednadžbi 10 (Bommarius i Riebel, 2004):

$$\text{TOF} = \frac{1}{k_{\text{cat}}} \quad [10]$$

Biokatalizatori su najčešće selektivniji od ne-bioloških katalizatora, bilo da je u pitanju enantio-, kemo- ili regioselektivnost. S obzirom na primjenu biokatalizatora u svrhu postizanja enantiomerne čistoće produkata, enantioselektivnost je najvažnija vrsta selektivnosti u kontekstu biokatalize, a kontrolira se enantiomernim odnosom ili *E* vrijednošću i enantiomernim viškom (*ee*). Enantiomerni odnos ili *E* vrijednost služi kao mjera enantioselektivnosti u određenom stupnju konverzije (Chen, 1982), a računa se prema jednadžbi 11:

$$E = \frac{(k_{\text{cat}}/K_M)_A}{(k_{\text{cat}}/K_M)_B} = \ln \frac{([A]/[A]_0)}{([B]/[B]_0)} \quad [11]$$

gdje je:

*E* - enantiomerni odnos,

*k*<sub>cat</sub> - konstanta brzine reakcije,

*K*<sub>M</sub> - konstanta saturacije (zasićenja),

[*A*] - koncentracija *faster-reacting* enantiomera,

[*B*] - koncentracija *slower-reacting* enantiomera.

Druga mjera enantioselektivnosti je enantiomerni višak, koji obuhvaća ukupnu selektivnost do točke izolacije proizvoda, a računa se prema jednadžbi 12:

$$e.e. = \frac{[A]-[B]}{[A]+[B]} \cdot 100\% \quad [12]$$

gdje je:

*e.e.* - enantiomerni višak,

[A] - koncentracija *faster-reacting* enantiomera,

[B] - koncentracija *slower-reacting* enantiomera.

Prag enantioselektivnosti biokatalizatora je  $E = 100$  ili 99 % *e.e.*, ovisno o tome procjenjuje li se sama reakcija ili reakcijski produkt (Bommarius i Riebel, 2004).

Pod stabilnošću enzima općenito se podrazumijeva temperaturna ili termička stabilnost, iako na stabilnost enzima utječu različiti faktori kao što su: inhibitori enzima, koncentracija kisika u reakcijskoj smjesi, pH-vrijednost ili pak mehanički stres. Termička stabilnost proteina, karakterizirana je temperaturom taljenja  $T_m$ , tj. temperaturom na kojoj se protein nalazi u ravnoteži između nativne N (eng. *Native*) i nesmotane U (eng. *Unfolded*) konformacije ( $N \leftrightarrow U$ ), odnosno na kojoj je protein napola smotan. Na temperaturu taljenja s jedne strane utječe sekvenca aminokiselina te broj disulfidnih mostova, a s druge strane otapalo, dodani tip soli te njena koncentracija (Kaushik, 1999). Strukturne usporedbe među enzimima izoliranih iz mezofilnih i termofilnih organizama, potvrdile su brojne protein-stabilizirajuće učinke, među kojima se ističu i tzv. solni mostovi koji su u većem udjelu pronađeni u termostabilnim i hipertermostabilnim proteinima (Karshikoff, 2001). Utjecaj koncentracije soli na temperaturu taljenja, prikazan je jednadžbom 13:

$$T_m = T_0 + K \cdot c_s \quad [13]$$

gdje je:

$T_m$  - temperatura taljenja,

$T_0$  - temperatura taljenja u odsutnosti soli,

$c_s$  - koncentracija soli,

$K$  - pripadajući koeficijent.

Skladišna stabilnost tijekom vremena pod ustaljenim uvjetima temperature, pH-vrijednosti i koncentracije dodanih tvari može biti izražena jednadžbom raspada prvog reda (Bommarius i Riebel, 2004) (jednadžba 14):

$$[E]_t = [E]_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad [14]$$

gdje je:

$[E]_t$  - koncentracija aktivnog enzima u vremenu  $t$ ,

$[E]_0$  - koncentracija aktivnog enzima u vremenu 0,

$k_d$  - konstanta brzine deaktivacije koja je proporcionalna količini aktivnog proteina (Craig, 1996).

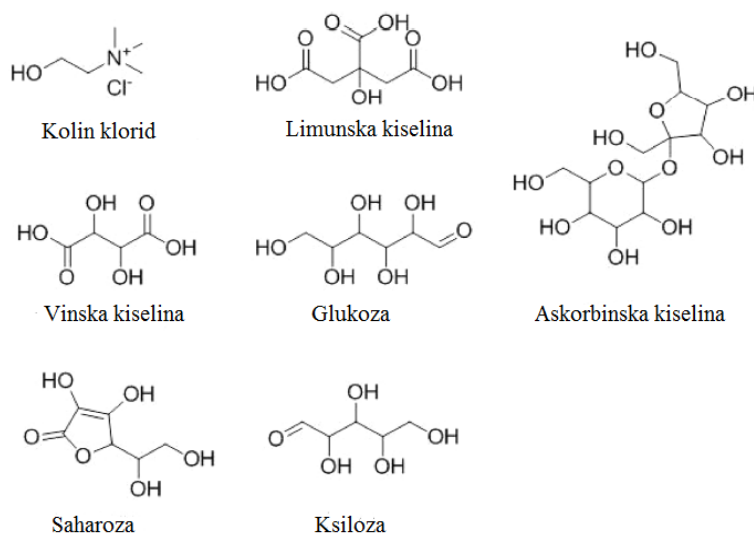
## 2.2. Eutektička otapala

### 2.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva eutektičkih otapala

Zbog toksičnosti i hlapljivosti organskih otapala, dolazi do isparavanja hlapljivih organskih komponenata u atmosferu. U sklopu koncepta *zelene* tehnologije, istražuju se nova otapala koja bi mogla zamijeniti organska otapala. Tijekom zadnja dva desetljeća, ionske kapljevine privukle su ogromnu pažnju znanstvene zajednice, a broj članaka u literaturi vezanih uz ovu tematiku, eksponencijalno je rastao (Paiva i sur., 2014). Međutim, ionske kapljevine su slabo biorazgradive i toksične te samim time nisu održive. Navedeni nedostaci u načelu se odnose na imidazolijeve i piridinijeve ionske kapljevine te je razvoj alternativnih otapala posljednjih godina usmjeren ka prirodnim ionskim kapljevinama i eutektičkim otapalima (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) koja su pokazala najveći potencijal u području *zelene* kemije.

Eutektička otapala su smjesa akceptora vodika kao što su netoksične kvaterne amonijeve soli (npr. kolin-klorid) i prirodno dobivenog, nenabijenog donora vodikove veze (npr. amini, šećeri, alkoholi, karboksilne kiseline) u određenom molarnom omjeru (slika 2). Komponente u DES-u povezane su vodikovim vezama, a zbog delokalizacije naboja, dolazi do sniženja točke tališta smjese, u odnosu na točke tališta polaznih materijala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Kada su komponente koje sačinjavaju DES-ove, primarni metaboliti kao što su aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili derivati kolina, takva otapala se nazivaju prirodna eutektička otapala ili NADES (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*) koja u potpunosti

zadovoljavaju kriterije idealnog *zelenog* otapala prema načelima *zelene* kemije (Paiva i sur., 2014).



**Slika 2.** Kemijske strukture različitih komponenata koje mogu formirati prirodna eutektična otapala (Paiva i sur., 2014).

Najznačajniji DES-ovi se temelje na kolin-kloridu (Ch), karboksilnim kiselinama i drugim donorima vodikove veze kao što su urea, limunska kiselina, jantarna kiselina ili glicerol. Klasični primjer je mješavina kolin-klorida ( $t_f = 302\text{ }^\circ\text{C}$ , 2-hidroksietil-trimetilamonij klorida) i uree ( $t_f = 133\text{ }^\circ\text{C}$ ) u molarnom omjeru 1:2, koja je u tekućem agregatnom stanju pri sobnoj temperaturi ( $t_f = 12\text{ }^\circ\text{C}$ ) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

Eutektička otapala se smatraju netoksičnima, no zbog njihove očekivane veće industrijske primjene, njihov citotoksični i genotoksični učinak treba i nadalje istraživati. Dosadašnja istraživanja su pokazala da DES-ovi bazirani na Ch-u nemaju citotoksični utjecaj na bakterijske kulture, dok su DES-ovi temeljeni na fosfonijevom anionu pokazali slabu antibakterijsku aktivnost (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). To je objašnjeno oštećenjem stanične stijenke bakterija u prisustvu delokaliziranih naboja u ovim tipovima tekućina. U navedenim istraživanjima Hayyana i sur. (2013a, 2013b) zapaženo je da je citotoksičnost DES-ova bila veća nego citotoksičnost svake tvari zasebno, što ukazuje na mogući sinergistički učinak tih tvari u DES-u. Razlog tome može biti sama kemijska priroda DES-a (nastala kao posljedica interakcije donora vodikove veze i organske soli), ali i loš prijenos kisika u kulturi stanica u hranjivoj podlozi zbog povećane viskoznosti DES-a (Hayyan i sur., 2013a; 2013b). Toksičnost DES-a također je uzrokovana njegovim inhibitornim učinkom na

acetilkolinesterazu (AChE), esencijalni enzim koji je prisutan u živčanom sustavu gotovo svih viših organizama (Hou i sur., 2013).

U radu Radošević i sur. (2015) dokazana je i korelacija između biorazgradnje i citotoksičnosti otapala. Ispitivanja njihove toksičnosti provode se na enzimima i bakterijama kao *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* i *Listeria monocytogenes* (Hou i sur., 2013; Gouveia i sur., 2014), morskoj bakteriji *Vibrio fischeri* (Ventura i sur., 2014) te na staničnoj kulturi larva račića *Artemia salina* (Gouveia i sur., 2014). Biodegradaciju eutektskih otapala također su proučavali Hou i sur. (2013), te zaključili da se DES-ovi mogu razgraditi djelovanjem mikroorganizama.

### 2.2.2. Primjena eutektskih otapala

Većina eutektskih otapala su ekološki prihvatljive tekućine čija je snažna sposobnost doniranja i prihvaćanja protona i elektrona, ujedno i njihova glavna karakteristika. Ta specifična odlika čini ih odličnim kandidatima za otapanje raznolikih materijala kao što su soli, proteini, lijekovi, aminokiseline, surfaktanti, šećeri i polisaharidi. Budući da služe i za otapanje različitih metalnih oksida, DES-ovi se mogu koristiti u elektrokemijskim procesima kao što su elektrodpozicija ili elektropoliranje, ili pak za odvajanje metala. Osim toga, neka istraživanja su potvrdila njihovu snažnu sposobnost otapanja CO<sub>2</sub>, što ih čini jako privlačnim sustavima za pročišćavanje plinova, katalizu i kemijsku fiksaciju CO<sub>2</sub>. Zanimljivo je i da se ove mješavine primjenjuju kao ekstrakcijski agensi (ekstrakcija polifenolnih komponenata, ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala, ekstrakcija glicerola iz biodizela). Eutektska otapala se mogu koristiti i kao medij koji poboljšava kontakt između reaktanata i na taj način promiču organsku sintezu ili biokatalizu. Pored toga, također se mogu koristiti kao katalizator i/ili kao medij prihvatljiv za okoliš u elektrofilnim supstitucijama, nukleofilnim reakcijama, Diels-Alder kondenzacijama, kopolimerizacijama, dehidraciji ugljikohidrata, katalitičkom sparivanju C-C veza, reakcijama redukcije te multikomponentnim reakcijama (Durand i sur., 2013). Budući da su eutektska otapala bazirana na spojevima sigurnim za ljudsku konzumaciju, primjenjuju se u terapiji kostiju i raznim drugim područjima unutar biomedicine (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

### 2.2.2.1. Primjena eutektičkih otapala u biotransformacijama

U biotransformacijama eutektička se otapala mogu koristiti kao čista otapala, kootapala u vodenom mediju i kao dio dvofaznog sustava (Faber, 2011). Naime, Gorke i suradnici su 2008. prvi put dokazali da je moguće provesti reakcije alkoholize i aminolize alifatskih estera u eutektičkim mješavinama bez vidljive enzimске denaturacije. Osim toga, dokazana je veća učinkovitost DES-a u lipazom kataliziranim reakcijama u odnosu na ionske kapljevine i organska otapala, te pozitivni učinak DES-a kao kootapala u enzimski kataliziranoj reakciji hidrolize epoksida gdje je postignuta veća brzina reakcije nego u vodi.

Zhao i sur. (2011) su dokazali da higroskopnost i viskoznost DES-ova ovisi o prirodi anionskih vrsta i/ili donoru vodikove veze. Istraživali su utjecaj molarnog omjera soli i glicerola na aktivnost i selektivnost lipaze. Uočili su da smanjenje udjela glicerola uzrokuje smanjenje aktivnosti lipaze. To je pripisano većoj koncentraciji aniona u mješavini što dovodi do destabilizacije enzima. Lipazom B izoliranom iz kvasca *Candida antarctica* i imobiliziranom na akrilu, provodili su transesterifikaciju etil-sorbata i 1-propanola te pri tome potvrdili superiornost DES-ova nad organskim otapalima.

Durand i sur. (2012) ustanovili su veliki potencijal DES-ova kolin-klorid:urea (ChU) i kolin-klorid:glicerol (ChGly) kao medija u lipazom kataliziranoj reakciji alkoholize vinil-laurata sa 1-butanolom. S druge strane, niska selektivnost ostvarena u DES-u kolin-klorid:etilen-glikol, uzrokovana je sporednim reakcijama između vinil-laurata i donora vodikove veze (etilen-glikola). Ovi su eksperimenti pokazali da reaktivnost u eutektičkim mješavinama ovisi ne samo o prirodi nukleofilnog supstrata, nego i o prirodi komponenata DES-a. Neki donori vodikove veze mogu reagirati sa supstratima, što dovodi do nastajanja nusproizvoda i promjene inicijalnog omjera eutektičke mješavine. Prema tome, promjena fizikalno-kemijskih svojstava otapala (posebno viskoznosti) može imati posljedice na aktivnost i recikliranje. Međutim, većina DES-ova je kemijski inertna, što ih čini obećavajućim otapalima za lipazom katalizirane reakcije alkoholize, pri čemu se najbolje konverzije (jednake kao u toluenu) postižu u otapalima ChU i ChGly (Durand i sur., 2012).

Budući da su eutektička otapala jeftina i bazirana na prirodnim komponentama, predstavljaju potencijalnu zamjenu za ionske kapljevine u kombinaciji sa superkričnim tekućinama kao što je superkrični CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>). U dvofaznom separacijskom sustavu, reakcija bi se odvijala u fazi ionske kapljevine, dok bi se produkt od interesa ekstrahirao u gornju superkričnu fazu. Budući da su ionske kapljevine praktički netopive u scCO<sub>2</sub>, otapalo se ne bi gubilo u superkričnoj fazi. Štoviše, prisutnost ionske kapljevine povećava

selektivnost  $\text{scCO}_2$  prema komponenti od interesa (Paiva i sur., 2011). Mana ove strategije je visoki trošak i biorazgradivost ionskih kapljevina. Zbog specifično visoke topljivosti  $\text{scCO}_2$  u DES-ovima te njihovog niskog tlaka para, DES-ovi bi bili skoro netopljivi u  $\text{scCO}_2$ . To otvara nove mogućnosti za jeftine i okolišno prihvatljive biokatalitičke procese u dvofaznim sustavima (Paiva i sur., 2014).



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Destilirana voda
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glukoza, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- heksan, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- heptan, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Jabučna kiselina, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalij-fosfatni pufer, pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Fisher Chemical, UK)
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ksilitol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ksiloz, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R,S*)-1-feniletil-acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

#### 3.1.2. Enzimski preparat

Novozym 435 (lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama s udjelom vode 1-2 (w/w %)) - Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD.

#### 3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka

- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- pH/ion metar S220, Mettler Toledo, SAD
- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan
- Tikvice s okruglim dnom

### 3.2. Metode rada

#### 3.2.1. Sinteza eutektičkih otapala

U tikvicama s okruglim dnom pomiješaju se izračunate količine kolin-klorida i odgovarajućih donora vodika prema molarnim omjerima (tablica 3). Zatim se u svaku smjesu dodaje određena količina vode (30, 50 i 80 % (v/v)), nakon čega se reakcijska smjesa zagrijava na magnetskoj miješalici pri temperaturi od 50 °C tijekom 2 sata, sve dok ne nastane homogena, prozirna i bezbojna tekućina. Dobivena eutektička otapala zatvore se parafilmom i skladište na tamnom mjestu prije daljnje primjene kao otapala za biokatalizu. pH-vrijednost otopina eutektičkih smjesa izmjerena je pomoću multimetra pH/ion metra S220, Mettler Toledo pri temperaturi od 25 °C (tablica 3).

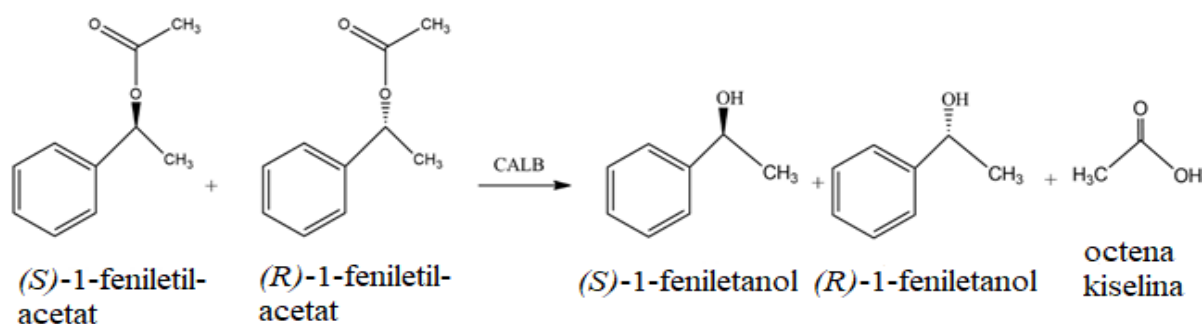
**Tablica 3.** Eutektička otapala sintetizirana u ovom radu.

Eutektičko otapalo	Molarni omjer	Udio vode (% , v/v)	Kratica	Cijena (\$ kg <sup>-1</sup> )	pH-vrijednost
Kolin-klorid:glukoza	1:1	30	ChGlc <sub>30</sub> %	54,72	5,2
		50	ChGlc <sub>50</sub> %		4,0
		80	ChGlc <sub>80</sub> %		4,1
Kolin-klorid:glicerol	1:2	30	ChGly <sub>30</sub> %	48,28	3,3
		50	ChGly <sub>50</sub> %		3,5
		80	ChGly <sub>80</sub> %		3,9
Kolin-klorid:ksiloza	2:1	30	ChXyl <sub>30</sub> %	63,99	3,8
		50	ChXyl <sub>50</sub> %		4,1
		80	ChXyl <sub>80</sub> %		4,3
Kolin-klorid:ksilitol	5:2	30	ChXylol <sub>30</sub> %	90,95	6,6
		50	ChXylol <sub>50</sub> %		6,2
		80	ChXylol <sub>80</sub> %		5,2
Kolin-klorid:jabučna kiselina	1:1	30	ChMa <sub>30</sub> %	38,15	0,67
		50	ChMa <sub>50</sub> %		1,06
		80	ChMa <sub>80</sub> %		1,64

### 3.2.2. Lipazom katalizirana hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata

Reakcija enantioselektivne, lipazom katalizirane hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata (slika 3), započeta je dodatkom 2976  $\mu\text{L}$  otapala (organsko otapalo heptan odnosno heksan, 0,025 M kalij-fosfatni pufer ili eutektičko otapalo), 24  $\mu\text{L}$  supstrata ((*R,S*)-1-feniletil-acetat) i 5 mg pripravka Novozym 435 (lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica*). Reakcija se odvija uz miješanje pri temperaturi od 25 °C, tijekom 280 min. Pri provođenju reakcije u organskim otapalima, u odabranim vremenskim intervalima izuzima se 50  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom. Prilikom provođenja reakcije u eutektičkim otapalima i puferu, u odabranim vremenskim intervalima izuzima se alikvot od 200  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese iz koje se (*R,S*)-1-feniletil-acetat ekstrahira s 200  $\mu\text{L}$  heptana, uz

snažno miješanje na vrtložnoj mješalici (2000 okretaj  $\text{min}^{-1}$ ) kroz 3 min, a 50  $\mu\text{L}$  heptanskog ekstrakta koji se potom izuzme, analizira se plinskom kromatografijom.



**Slika 3.** Enzimaska hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata.

Kako bi se usporedila uspješnost hidrolize u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se iskorištenje, volumetrijska produktivnost, enantiomerni višak te specifična produktivnost enzima.

**Iskorištenje procesa esterifikacije  $\eta$  (%)** izračuna se prema jednadžbi 15:

$$\eta = \frac{c_E}{c_T} \cdot 100 \quad [15]$$

gdje je:

$c_E$  - izmjerena koncentracija (*R*)-1-feniletanola ( $\text{mol L}^{-1}$ ),

$c_T$  - teorijski moguća koncentracija (*R*)-1-feniletanola ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

**Volumetrijska produktivnost  $V_P$  ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )** esterifikacije izračuna se prema jednadžbi 16:

$$V_P = \frac{c_{p2} - c_{p1}}{t} \quad [16]$$

gdje je:

$c_{p1}$  - početna molarna koncentracija (*R*)-1-feniletanola ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),

$c_{p2}$  - molarna koncentracija (*R*)-1-feniletanola na kraju procesa ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),

$t$  - vrijeme trajanja procesa (min).

**Enantiomerni višak** (eng. *enantiomeric excess, e.e.*), (%) izračuna se prema jednadžbi 17:

$$e.e. = \frac{(R_{1\text{-feniletanol}} - S_{1\text{-feniletanol}})}{(R_{1\text{-feniletanol}} + S_{1\text{-feniletanol}})} \cdot 100 \quad [17]$$

gdje je:

$R_{1\text{-feniletanol}}$  - površina ispod pika (*R*)-1-feniletanola,

$S_{1\text{-feniletanol}}$  - površina ispod pika (*S*)-1-feniletanola.

**Specifična produktivnost enzima**  $V_E$  ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) izračuna se prema jednadžbi 18:

$$V_E = \frac{n_{P2} - n_{P1}}{m_E \cdot t} \quad [18]$$

gdje je:

$n_{P1}$  - početna množina (*R*)-1-feniletanola ( $\mu\text{mol}$ ),

$n_{P2}$  - množina (*R*)-1-feniletanola na kraju procesa ( $\mu\text{mol}$ ),

$m_E$  - masa pripravka Novozym 435 (mg),

$t$  - vrijeme trajanja procesa (min).

#### 3.2.2.1. Određivanje koncentracije (*R,S*)-1-feniletetil-acetata

Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletetil-acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

#### **Kromatografski uvjeti za određivanje:**

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ )
- Pokretna faza: He
- Protok: 56,3 mL  $\text{min}^{-1}$
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Temperatura kolone:  $T_1=80\text{ }^\circ\text{C}$  (2 min),  $T_2=140\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\Delta t=5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ )
- Vrijeme trajanja analize: 21 min

$R_t$  za (*R,S*)-1-feniletetil-acetat iznosi 15,72 min,  $R_t$  ((*R*)-1-feniletanol)=15,54 min i  $R_t$  ((*S*)-1-feniletanol)=16,06 min.

### ***Izrada baždarnog dijagrama***

Pripreme se otopine (*R,S*)-1-feniletil-acetata u heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 i 0,05 mol L<sup>-1</sup>. Nakon toga se na ordinatu nanose izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika, dok se na apscisu nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Zatim se pomoću računala nacrtaju dijagram ovisnosti množinske koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata o površini ispod pika te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunaju nepoznate koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata u uzorcima.

Koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata tijekom hidrolize u organskim otapalima (heptanu i heksanu) računa se izravno prema jednadžbi pravca dobivenoj iz baždarnog dijagrama, dok se koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata  $c_E$  (mol L<sup>-1</sup>) tijekom hidrolize u eutektičnom otapalu i puferu računa prema jednadžbi 19:

$$c_E = \frac{c_{E \text{ heptan}}}{K_p} \quad [19]$$

gdje je:

$c_{E \text{ heptan}}$  - ravnotežna koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata u heptanu (mol L<sup>-1</sup>),

$K_p$  - koeficijent razdjeljenja (*R,S*)-1-feniletil-acetata između heptana i eutektičkog otapala.

Koeficijent razdjeljenja (*R,S*)-1-feniletil-acetata ( $K_p$ ) heptan/eutektičko otapalo određuje se na sljedeći način:

U staklenu kivetu se doda 2988 μL eutektičkog otapala, 12 μL (0,025 M) (*R,S*)-1-feniletil-acetata i 3000 μL heptana. Uzorak se miješa na vrtložnoj mješalici tijekom 3 min pri temperaturi od 25 °C. Koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata u heptanu određuje se plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja  $K_p$  izračunava se kao omjer ravnotežne koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata u heptanu i eutektičkom otapalu prema jednadžbi 20:

$$K_p = \frac{c_{\text{heptan}}}{c_D} \quad [20]$$

gdje je:

$c_{\text{heptan}}$  - koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata u heptanu (mol L<sup>-1</sup>),

$c_D$  - koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata u eutektičkom otapalu (mol L<sup>-1</sup>).

### 3.2.3. Određivanje termičke stabilnosti lipaze u otapalu ChGlc s različitim udjelima vode i u puferu

Utjecaj temperature inkubacije lipaze u eutektičkom otapalu (tzv. skladišna termička stabilnost) na aktivnost iste, praćen je u ChGlc koje se pokazalo kao najpogodnije za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata među svim ispitanim eutektičkim otapalima obzirom na izračunate vrijednosti  $V_P$ ,  $V_E$ ,  $ee$  i  $\eta$ , a osim toga, praćen je i u puferu. Novozym 435 (2,5 mg) inkubiran je u 5 mL eutektičkog otapala ChGlc s različitim udjelima vode (30, 50 i 80% (v/v)), odnosno u istom volumenu pufera, pri temperaturama od 20 °C, 40 °C, 60 °C odnosno 80 °C. U različitim vremenskim intervalima kroz 72 h (0, 4, 8, 16, 24, 48 i 72 h), provedena je reakcija enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata dodatkom 0,03 mol L<sup>-1</sup> supstrata u reakcijsku smjesu prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2. Termička stabilnost enzimskog pripravka u određenom otapalu izražena je kao rezidualna aktivnost enzimskog pripravka nakon inkubacije u određenom vremenskom intervalu.

#### 3.2.3.1. Procjena kinetičkih parametara

Termička deaktivacija se opisuje kao proces *jedan korak-dva stanja* u kojem je nativni (aktivni) oblik katalizatora transformiran u denaturirani (inaktivni) oblik jednomolekularnom nepovratnom reakcijom prvog reda. Kinetički govoreći, pad enzimske aktivnosti izražen kao omjer izmjerene aktivnosti ( $A_t$ ) nakon tretmana zagrijavanjem u vremenu  $t$  i inicijalne kontrolne aktivnosti ( $A_0$ ) opisan je jednostavnom eksponencijalnom jednadžbom prvog reda sa  $k$  kao konstantom brzine reakcije prema jednadžbi 21 (Lappe i sur., 2009):

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-k \cdot t} \quad [21]$$

#### 3.2.3.2. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) uzoraka u skupini prema jednadžbi 22:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{t=1}^N x_i \quad [22]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama  $S_{\bar{x}}$  (jednadžba 23):

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N - 1)}} \quad [23]$$

gdje je:

$N$  - ukupan broj uzoraka u skupini,

$x_i$  - pojedinačne vrijednosti uzoraka.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Biotransformacije se smatraju selektivnim enzimskim modifikacijama definiranih čistih spojeva u definirane konačne proizvode. Budući da jedna od primjena biotransformacija uključuje uvođenje kiralnih centara u molekule i odvajanje racemata uz pomoć biokatalizatora, u ovom radu je prikazana enzimska reakcija hidrolize kiralnog acetata, (*R,S*)-1-feniletil-acetata, kojom su dobivena dva enantiomera ((*R*)-1-feniletanol i (*S*)-1-feniletanol) različitih strukturnih, te time i bioloških karakteristika. Primjerice, (*R*)-1-feniletanol koristi se kao kiralni građevni blok i kao sintetski intermedijer za fine kemikalije u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji (Suan i Sarmidi, 2004), dok se oba enantiomerna oblika koriste kao kiralni reagensi za određivanje enantiomerne čistoće i za asimetrično otvaranje cikličnih anhidrida i epoksida (Frings i sur., 1999).

Enzimске reakcije imaju prednost pred klasičnim reakcijama kemijske sinteze zbog visoke enantio- i regioselektivnosti, a naročito ako se izvode u zelenim otapalima. Eutektička otapala pripadaju skupini zelenih otapala i predstavljaju novu generaciju stabilnih i nehlapljivih otapala koja se posljednjih godina intenzivno proučavaju u svrhu zamjene tradicionalnih i škodljivih otapala u kemijskoj tehnologiji i biotehnologiji. Njihova primjena u proizvodnji industrijski važnih kemikalija predmet je mnogih znanstvenih istraživanja na području kemijske tehnologije i biotehnologije. Stoga je u ovom radu, u cilju ekološki prihvatljivog postupka hidrolize estera, ispitana mogućnost provođenja imobiliziranom lipazom katalizirane hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u eutektičkim otapalima (tablica 3). Kako bi se usporedila uspješnost enantioselektivne hidrolize u eutektičkim te konvencionalnim otapalima, reakcija je također provedena u organskim otapalima (heptan, heksan) i puferu. Budući da je stabilnost enzima u određenom otapalu vrlo važan parametar u utvrđivanju prihvatljivosti određenog otapala za primjenu u velikom mjerilu, u radu je također određena i termička stabilnost lipaze u eutektičkom otapalu ChGlc s 30 %, 50% i 80% vode.

### 4.1. Sinteza eutektičkih otapala

U svrhu rada pripravljena su eutektička otapala klasičnim postupcima organske sinteze (tablica 4). Priprava eutektičkih otapala odvijala se jednostavnim postupkom u kojem se polazne sirovine pomiješaju u određenim molarnim omjerima te se kontinuirano zagrijavaju uz miješanje dok se ne dobije homogena viskozna kapljevina. Iskorištenje reakcije je 100%,

što je značajna prednost prilikom sinteze eutektičkih otapala. Dodatkom određene količine vode u smjesu, dobivena su eutektička otapala s 30 %, 50 % i 80 %-tnim udjelom vode. Također, izmjerena je pH-vrijednost otopina eutektičkih otapala pri temperaturi od 25 °C, a rezultati su prikazani u tablici 4.

**Tablica 4.** Eutektička otapala s pripadajućim pH-vrijednostima.

Eutektičko otapalo	Molarni omjer	Udio vode (% , v/v)	Kratica	pH-vrijednost
Kolin-klorid:glukoza	1:1	30	ChGlc <sub>30</sub> %	5,2
		50	ChGlc <sub>50</sub> %	4,0
		80	ChGlc <sub>80</sub> %	4,1
Kolin-klorid:glicerol	1:2	30	ChGly <sub>30</sub> %	3,3
		50	ChGly <sub>50</sub> %	3,5
		80	ChGly <sub>80</sub> %	3,9
Kolin-klorid:ksiloza	2:1	30	ChXyl <sub>30</sub> %	3,8
		50	ChXyl <sub>50</sub> %	4,1
		80	ChXyl <sub>80</sub> %	4,3
Kolin-klorid:ksilitol	5:2	30	ChXylol <sub>30</sub> %	6,6
		50	ChXylol <sub>50</sub> %	6,2
		80	ChXylol <sub>80</sub> %	5,2
Kolin-klorid:jabučna kiselina	1:1	30	ChMa <sub>30</sub> %	0,67
		50	ChMa <sub>50</sub> %	1,06
		80	ChMa <sub>80</sub> %	1,64

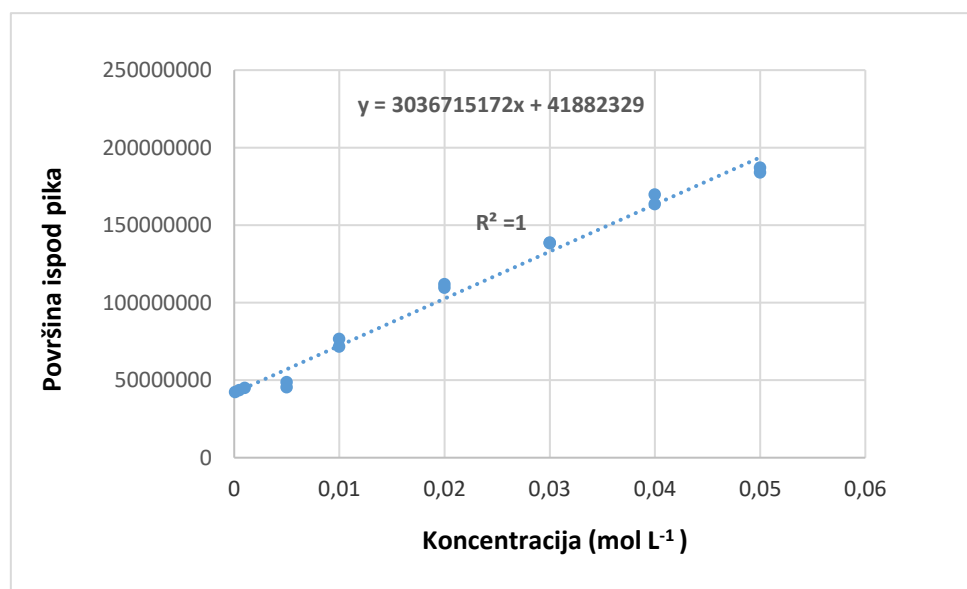
#### 4.2. Lipazom katalizirana hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata

Lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* (CALB) zanimljiva je zbog potencijalne primjene u brojnim industrijskim procesima kao što je sinteza triglicerida, esterifikacija terpenkih alkohola i sl. CALB adsorbirana na različitim nosačima, pokazala se izrazito regioselektivnom u esterifikaciji šećera, nukleozida i steroida te osobito enantioselektivnom u otapanju sekundarnih alkohola hidrolizom ili esterifikacijom u organskim otapalima (Arroyo, 1999). S druge strane, zbog toksičnosti, zapaljivosti i

hlapljivosti organskih otapala, danas su mnoga istraživanja usmjerena na pronalazak novih reakcijskih medija za enzimski katalizirane reakcije. U tu svrhu, razvijena su eutektička otapala koja su primjenu pronašla kao kootapala ili pak reakcijski medij za biokatalitičke reakcije (Kim i sur., 2016). Obzirom na navedeno, u ovom radu ispitana je mogućnost primjene eutektičkih otapala u enantioselektivnoj hidrolizi kiralnog estera (*R,S*)-1-feniletil-acetata, pri čemu je kao biokatalizator korištena imobilizirana lipaza izolirana iz kvasca *Candida antarctica* (pripravak Novozym 435).

Reakcija hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata provedena je u 5 različitih kolinijevih eutektičkih otapala (tablica 3), a u svrhu provjere uspješnosti hidrolize, reakcija je također provedena i u organskim otapalima (heptan, heksan) te u 0,025 M kalij-fosfatnom puferu. Ukratko, u 3 mL reakcijske smjese s  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (*R,S*)-1-feniletil-acetata (supstrat), dodano je 5 mg pripravka Novozym 435. Smjesa je zatim intenzivno miješana na vrtložnoj mješalici pri temperaturi od  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , a tijekom reakcije je praćen izdvajanjem uzorka i analizom pomoću plinske kromatografije.

Prethodno je izrađen baždarni dijagram (*R,S*)-1-feniletil-acetata prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta (slika 4). Kako bi se izračunala koncentracija (*R,S*)-1-feniletil-acetata u eutektičkim otapalima, određen je koeficijent razdjeljenja (*R,S*)-1-feniletil-acetata između heptana i eutektičkog otapala ( $K_P$ ) (jednadžba 20), a vrijednosti su prikazane u tablici 5.

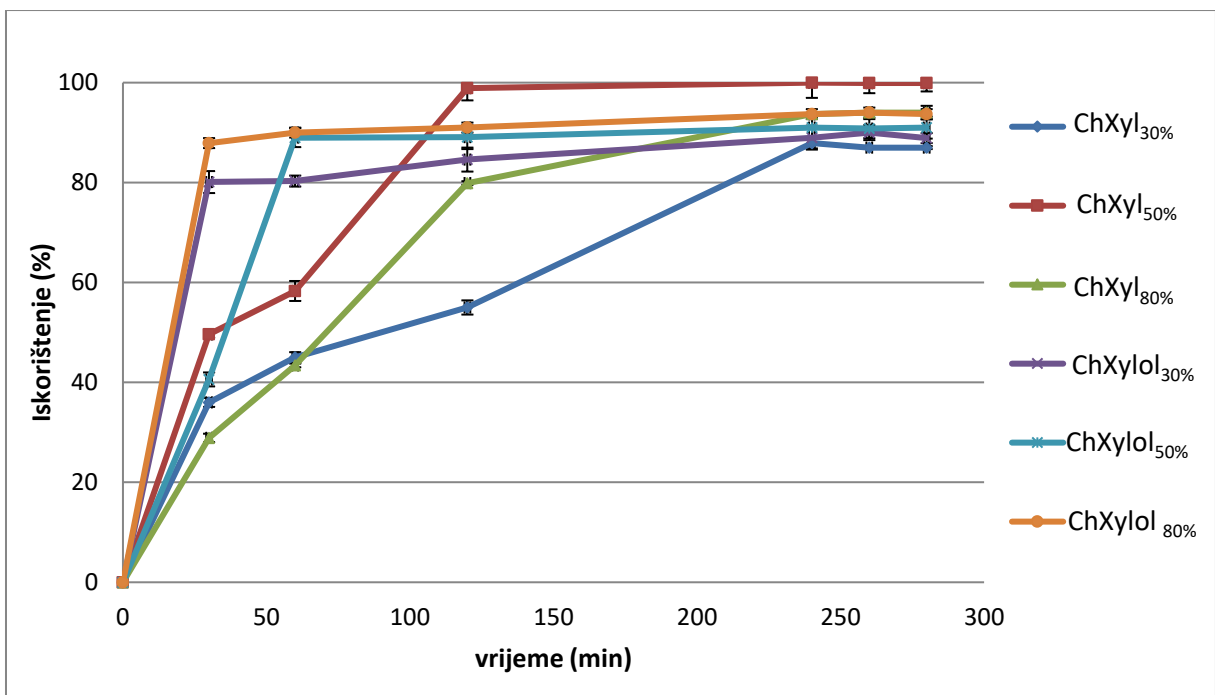
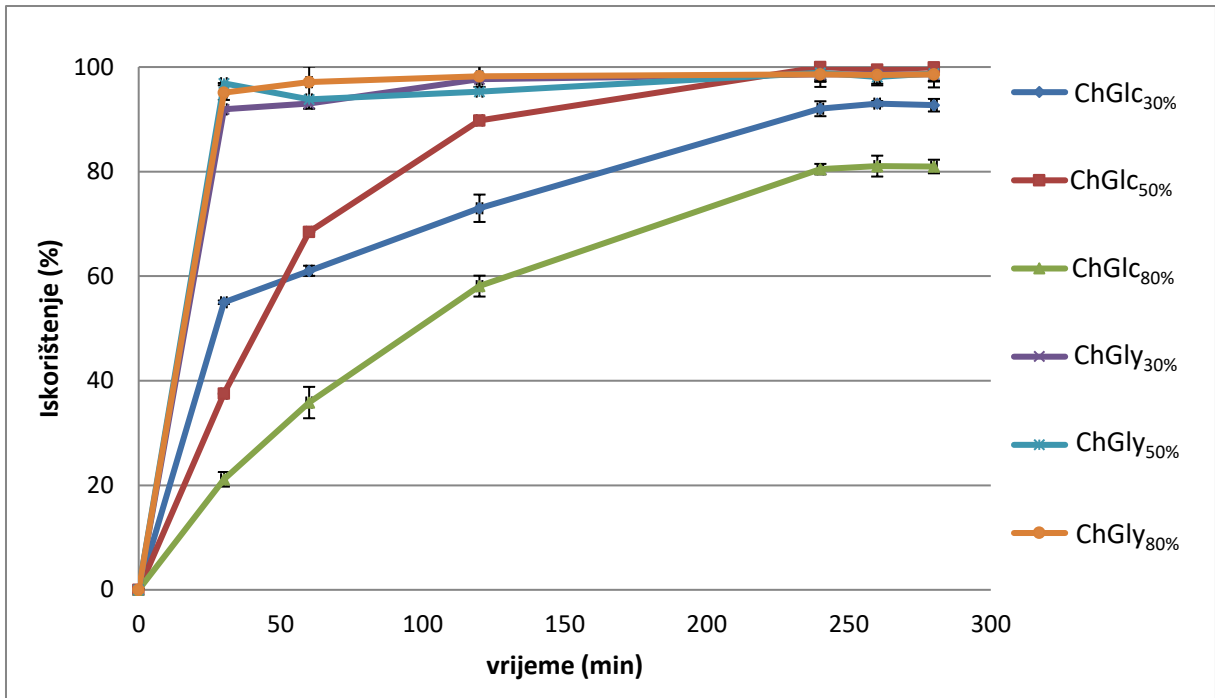


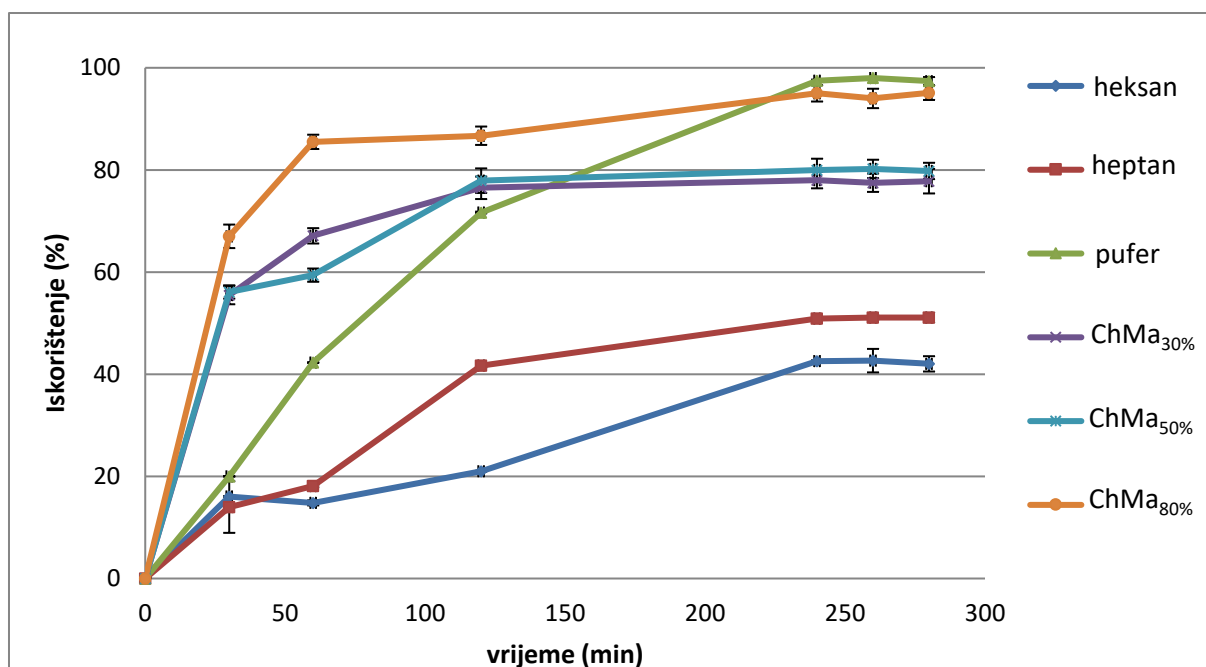
**Slika 4.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*R,S*)-1-feniletil-acetata; A = površina ispod pika; c = koncentracija ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

**Tablica 5.** Koeficijent razdjeljenja između heptana i eutektičkih otapala.

Otapalo	Udio vode (% , v/v)	$K_P$
ChGlc	30	0,95
	50	0,95
	80	0,86
ChGly	30	0,95
	50	0,94
	80	1,00
ChXyl	30	0,69
	50	0,99
	80	1,00
ChXylol	30	0,92
	50	0,96
	80	0,88
ChMa	30	0,80
	50	0,89
	80	0,83
$KH_2PO_4$		0,94

Tijek hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u eutektičkim otapalima, organskim otapalima te puferu prikazan je na slikama 5a – c.





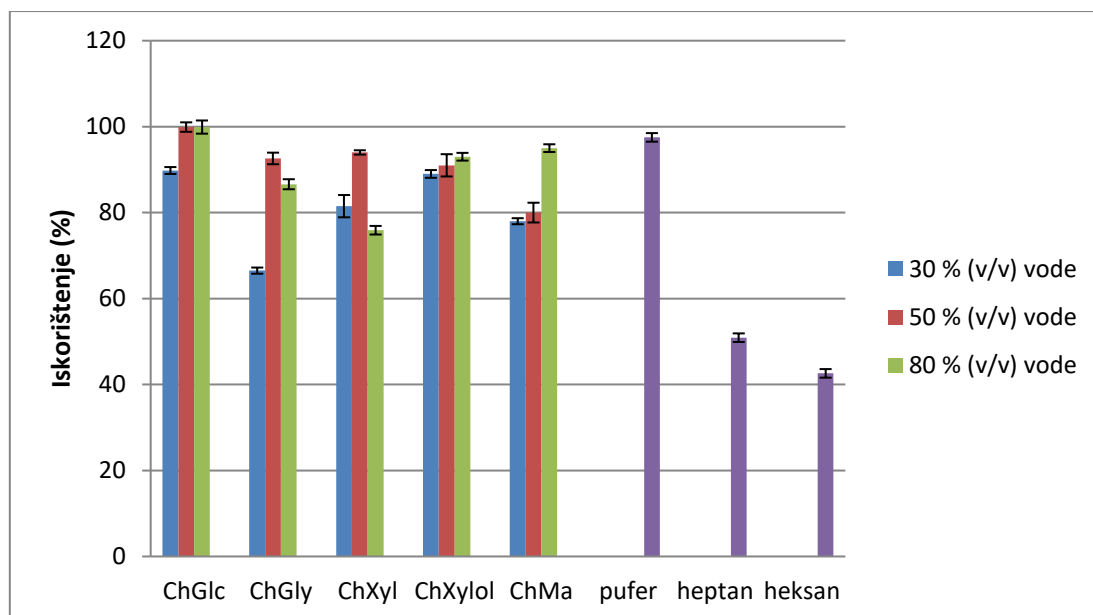
**Slika 5.** Tijek lipazom katalizirane hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u a) i b) eutektičkim otapalima te c) eutektičkim otapalima, organskim otapalima (heptan i heksan) i puferu. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 5,0 mg Novozym 435; 25 °C.

Iz grafičkog prikaza tijeka hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata na slici 5a, može se primjetiti da je između ispitanih eutektičkih otapala ChGlc i ChGly, hidroliza brža u eutektičkom otapalu ChGly, u kojem se tijekom prvih 30 min postižu iskorištenja veća od 90 %, bez razlike ovisno o udjelu vode u otapalu. Iskorištenje reakcije u otapalu ChGlc<sub>50 %</sub> ( $\eta = 99,9 \% \pm 2,70$ ) je najveće i nakon 280 min je slično onome u otapalima ChGly<sub>30 %</sub> ( $\eta = 98,6 \% \pm 1,20$ ), ChGly<sub>50 %</sub> ( $\eta = 98,8 \% \pm 2,70$ ) i ChGly<sub>80 %</sub> ( $\eta = 98,6 \% \pm 1,30$ ). Međutim, reakcija u otapalu ChGly se odvija puno brže. Osim za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata, eutektička otapala bazirana na glicerolu, pokazala su se kao dobar medij i u biokatalitičkoj proizvodnji biodizela te u enzimskoj transesterifikaciji triglicerida sa etanolom (Zhao i sur., 2013). Na slici 5b može se primjetiti sličan učinak otapala na enantioselektivnu hidrolizu kao i na slici 5a, a u eutektičkom otapalu ChXyl<sub>50%</sub> postignuto je jednako iskorištenje kao i ChGlc<sub>50 %</sub>.

Na slici 5c vidljivo je da se znatno niža iskorištenja na kraju enantioselektivne hidrolize postižu u otapalima ChMa<sub>30 %</sub> ( $\eta = 77,8 \% \pm 2,4$ ) i ChMa<sub>50 %</sub> ( $\eta = 79,8 \% \pm 1,6$ ), a pretpostavlja se da je uzrok preniska pH-vrijednost DES-a ChMa (0,67-1,64). Izuzetak je otapalo ChMa<sub>80 %</sub> u kojem je iskorištenje reakcije veće od onoga postignutog u otapalima s 30% i 50 % vode u ChMa, iz čega zaključujemo da je visoki sadržaj vode u nekim

slučajevima poželjan za uspješno odvijanje reakcije hidrolize. Utjecaj pH-vrijednosti na uspješnost reakcije ispitali su i Yilmaz i sur. (2010) te su dokazali da optimalna pH-vrijednost inkapsulirane lipaze iznosi oko 5,0. S druge strane, Pereira i sur. (2001) odredili su optimalne pH-vrijednosti za imobiliziranu (pH-vrijednost = 6) i slobodnu lipazu (pH-vrijednost = 7) iz kvasca *Candida rugosa*.

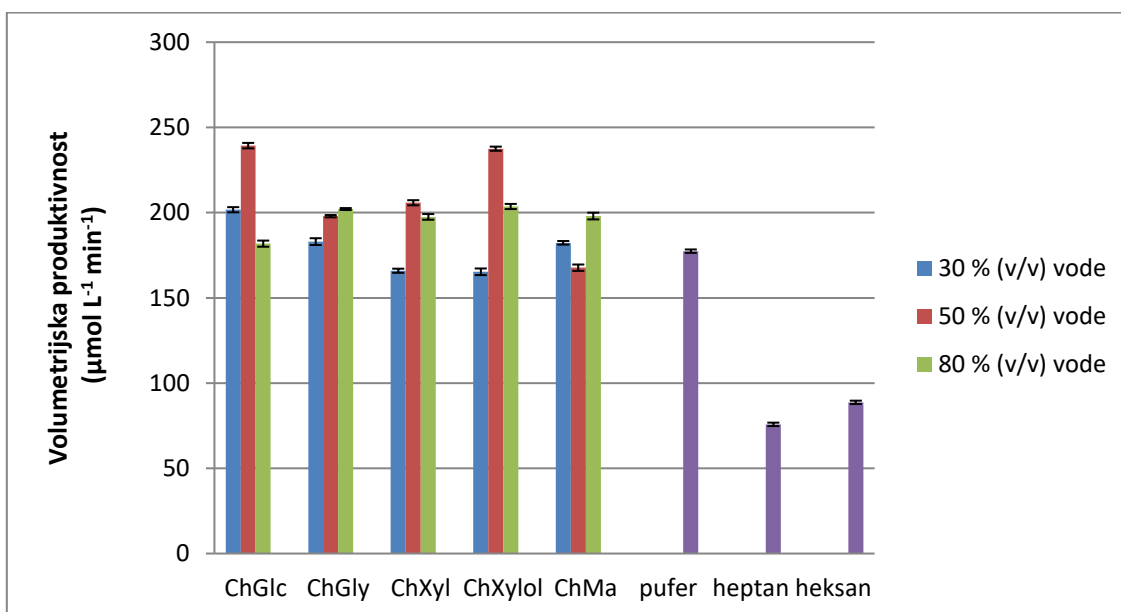
Iako je iz grafičkih prikaza tijeka hidrolize moguće uvidjeti utjecaj pojedinih vodenih otopina eutektičkih otapala na uspješnost hidrolize, u svrhu bolje interpretacije rezultata, prema formulama [15], [16], [17] i [18] izračunata su iskorištenja, volumetrijska produktivnost, enantiomerni višak te specifična produktivnost reakcije hidrolize u pojedinim otopinama, a rezultati su prikazani na slikama 6, 7, 8 i 9.



**Slika 6.** Iskorištenje lipazom katalizirane reakcije ( $\eta$ ) u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti:  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 5,0 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min.

Iskorištenja ( $\eta$ ) lipazom katalizirane enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u eutektičkim otapalima iznose od  $66,5 \% \pm 0,7$  u  $\text{ChGly}_{30\%}$  do  $99,9 \% \pm 1,1$  u  $\text{ChGlc}_{50\%}$  te su viša nego u organskim otapalima ( $50,9 \% \pm 1,55$  u heptanu i  $42,6 \% \pm 1,62$  u heksanu), ali su gotovo jednaka kao u puferu ( $\eta = 97,5 \% \pm 0,72$ ) (slika 6). Na slici 6 vidljiv je i utjecaj različitog udjela vode u eutektičkim otapalima na iskorištenja reakcije, a rezultati su u skladu s istraživanjem Durand i sur. (2014) te Yongxian i sur. (2011), gdje je dokazano da sadržaj vode ima veliki utjecaj na katalitičku aktivnost enzima. DES-ovi su izrazito viskozna otapala (Paiva i sur., 2014; Cvjetko Bubalo i sur., 2015a) pa veći udio vode u otapalu

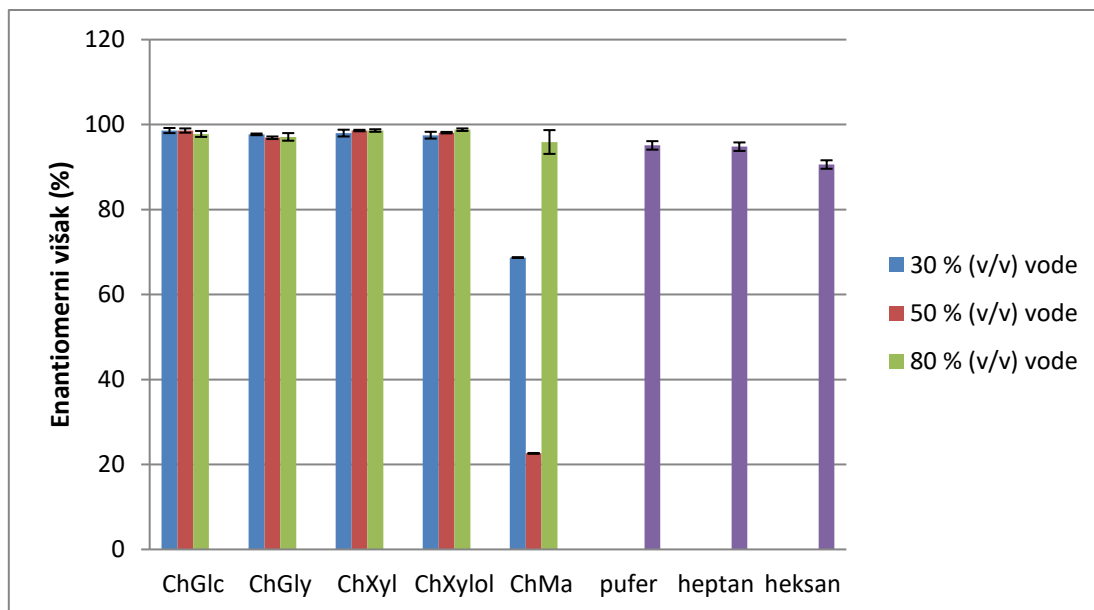
pozitivno utječe na iskorištenje reakcije zbog smanjenja viskoznosti dodatkom vode u eutektičko otapalo (Dai i sur., 2013) (slika 6), ali prevelika količina vode u eutektičkom otapalu može utjecati i negativno na iskorištenje reakcije (slika 6) pa je potrebno optimirati sadržaj vode za svaku reakciju. Načelno, postizanje optimalnog sadržaja vode može se objasniti kao uspostavljanje ravnoteže u sustavu u kojem se supstrat ne veže s otapalom, a hidrofilni karakter eutektičnog otapala omogućuje vezanje molekula vode koje se stvaraju tijekom reakcije esterifikacije i sprječava ispoljavanje njihovog nukleofilnog karaktera u hidrolitičkim reakcijama (Durand i sur., 2014).



**Slika 7.** Volumetrijska produktivnost ( $V_P$ ) lipazom katalizirane reakcije u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti:  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (*R,S*)-1-feniletil-acetata;  $5,0 \text{ mg}$  Novozym 435;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $240 \text{ min}$ .

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti lipazom katalizirane hidrolize ( $V_P$ ) u eutektičkim otapalima (slika 7) kreću se u rasponu od  $165,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm 1,94$  (ChXylol<sub>30%</sub>) do  $239,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm 1,61$  (ChGlc<sub>50%</sub>), što je ujedno i najbolja postignuta vrijednost. Znatno niže vrijednosti su postignute u organskim otapalima ( $75,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm 0,57$  u heptanu te  $88,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm 1,16$  u heksanu) za razliku od pufera u kojem je reakcijom hidrolize postignuta slična volumetrijska produktivnost kao i u eutektičkim otapalima.

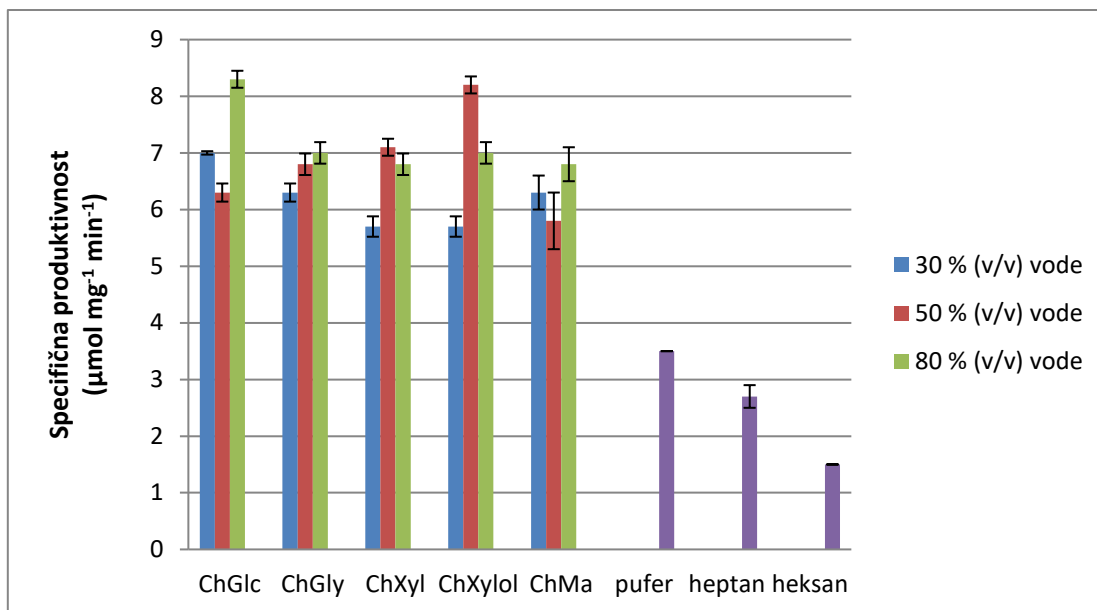




**Slika 8.** Enantiomerni višak (*ee*) lipazom katalizirane reakcije u različitim otapalima.

Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 5,0 mg Novozym 435; 25 °C; 240 min.

Enantiomerni višak hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u svim ispitanim eutektičkim otapalima kreće se u rasponu od 96,9 % ± 0,3 do 98,8 % ± 0,3 uz ChMa kao iznimku gdje najniža vrijednost iznosi 22,6 % ± 0,1. Vrijednosti su približno jednake i u referentnim otapalima (95,1 % ± 2,1 u puferu, 94,8 % ± 1,0 u heptanu, 90,6 % ± 1,03 u heksanu) (slika 8). U pravilu, enantiomerni višak u svim eutektičkim otapalima se povećava povećanjem udjela vode. To dokazuje i najveća postignuta vrijednost enantiomernog viška hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u eutektičkom otapalu ChXylol<sub>80%</sub> (*ee* = 98,8 % ± 0,3), pri čemu nastaje (*R*)-1-feniletanol koristan u proizvodnji lijekova i finih kemikalija (Gašo Šokač i sur., 2014), dok (*S*)-1-feniletanol gotovo i ne nastaje.



**Slika 9.** Specifična produktivnost ( $V_E$ ) lipazom katalizirane reakcije u različitim otopalima. Reakcijski uvjeti:  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (*R,S*)-1-feniletil-acetata;  $5,0 \text{ mg}$  Novozym 435;  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $240 \text{ min}$ .

Specifična produktivnost enzima hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata katalizirane lipazom, niža je u referentnim otopalima nego su svim ispitanim eutektičkim otopalima (slika9).

Uspoređujući iskorištenje ( $\eta$ ), volumetrijsku produktivnost ( $V_P$ ), enantiomerni višak ( $ee$ ) te specifičnu produktivnost enzima ( $V_E$ ) u eutektičkim otopalima, puferu i konvencionalnim organskim otopalima, vidljivo je da su se eutektička otopala pokazala učinkovitijima u enantioselektivnoj hidrolizi (*R,S*)-1-feniletil-acetata, što ih čini potencijalnom zamjenom za konvencionalna organska otopala (Liang i sur., 2015). Kao najpovoljnije otopalo za hidrolizu (*R,S*)-1-feniletil-acetata istaknulo se eutektičko otopalo ChGlc<sub>50%</sub> s vrijednostima:  $\eta = 99,9 \% \pm 1,1$ ,  $V_P = 239,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm 1,61$ ,  $ee = 98,6 \% \pm 0,5$  i  $V_E = 6,3 \text{ } \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm 0,16$ .

#### 4.3. Termička stabilnost lipaze u otopalu ChGlc s različitim udjelima vode i u puferu

Pravilno skladištenje enzima, jedan je od ključnih faktora za održavanje aktivnosti. Basri i sur. (1994) utvrdili su da lipaze pokazuju punu aktivnost prilikom skladištenja pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Generalno, enzimi su aktivni kada se čuvaju pri niskim temperaturama vjerojatno zbog tendencije prelaska lipaza u svoju originalnu konformaciju, koja je katalitički aktivna.

Također, različita je aktivnost između imobiliziranog i slobodnog enzima. Dok slobodni enzim zadržava rezidualnu aktivnost od 15 % nakon 12 dana, aktivnost inkapsuliranih lipaza pada sporije, pri čemu u istom vremenu zadržavaju 93-95 % svoje inicijalne aktivnosti. Imobilizirani enzim je stabilniji zahvaljujući višekratnom vezanju enzima na nosač, što ujedno sprječava intermolekularne procese poput proteolize ili agregacije te dovodi do nastajanja stabilnije enzimske molekule (Basri i sur., 1994).

Zahvaljujući velikom napretku u znanosti, toplinom inducirana inaktivacija enzima ili denaturacija proteina danas je dobro poznata u literaturi (Arroyo i sur., 1999; Aymard i Belarbi, 2000; Anthon i Barrett, 2002; Dąbkowska i Szewczyk, 2009; Yilmaz i sur., 2010; Sant'Anna i sur., 2012; Cvjetko Bubalo i sur., 2015a; Kim i sur., 2016). Već više od 10 godina, znanstvenici se fokusiraju na pronalazak prirodnog reakcijskog medija za enzimske reakcije koji će poslužiti kao alternativa za hlapiva i toksična organska otapala.

Kim i sur. (2016) istraživali su primjenu DES-ova baziranih na kolin-kloridu te DES-ova koji sadrže po dva donora vodikove veze kao kootapala u svrhu poboljšanja aktivnosti i termičke stabilnosti lipaze izolirane iz kvasca *Candida rugosa*. Generalno, DES-ovi koji sadrže glicerol, pokazali su se jako uspješnima u poboljšanju aktivnosti i termičke stabilnosti lipaze, za razliku od DES-ova koji sadrže formamid. Autori su dokazali da je termička stabilnost i skladišna stabilnost lipaze povezana sa kiselošću donora vodikove veze u DES-u. Naime, proučavali su termičku stabilnost lipaze u vodenoj otopini ChGly i uočili da je na temperaturi većoj od 45 °C, rezidualna aktivnost lipaze nakon 1 h inkubacije, dva puta veća nego aktivnost lipaze u puferu. Osim padom enzimske aktivnosti, termička deaktivacija se također opisuje i vrijednošću poluvremena inaktivacije lipaze, koja se definira jednadžbom 24 (Sant'Anna i sur., 2012):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad [24]$$

gdje je:

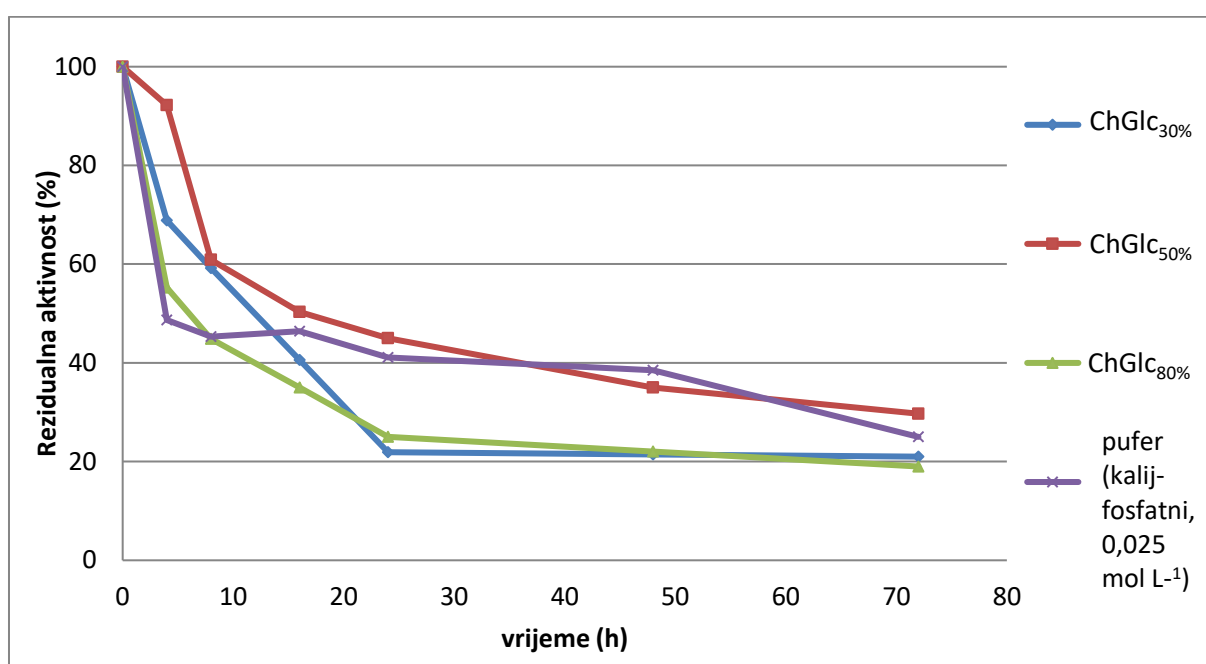
$t_{1/2}$  - vrijednost poluvremena inaktivacije lipaze,

$k$  - konstanta brzine reakcije.

Zanimljivo je naime, da je vrijednost poluvremena inaktivacije lipaze u vodenoj otopini ChGly bila 9,2 puta veća od vrijednosti poluvremena lipaze u puferu. Glicerol i etilen-glikol kao donori vodikove veze u DES-u, pozitivno su djelovali na termičku stabilnost lipaze,

za razliku od formamida i tiouree koji nisu učinkovito djelovali na poboljšanje aktivnosti i stabilnosti lipaze (Huang i sur., 2014).

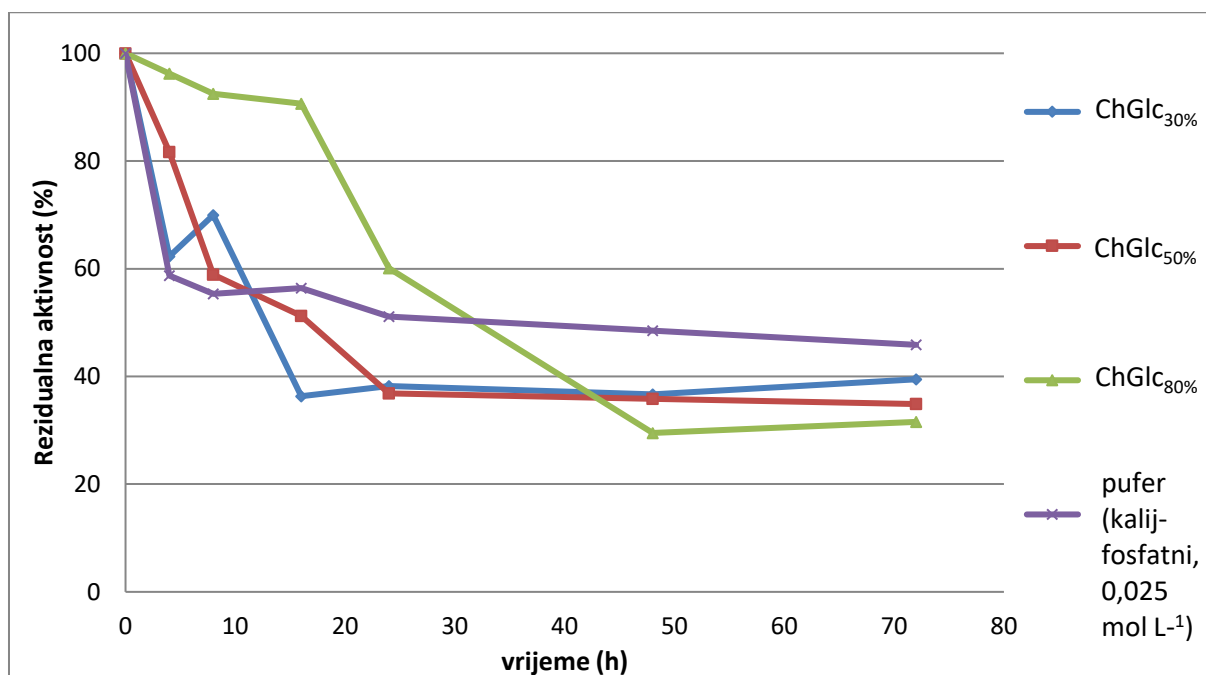
U ovom radu, zbog najviših postignutih vrijednosti  $\eta$ ,  $V_P$ ,  $ee$  i  $V_E$ , termička stabilnost lipaze određena je kao rezidualna aktivnost lipaze nakon inkubacije u otapalu ChGlc s različitim udjelima vode na određenoj temperaturi u određenom vremenskom periodu (slika 10-13). Određene su i konstante brzine svake reakcije, a rezultati su prikazani u tablici 6. Za usporedbu je stabilnost lipaze praćena i u puferu, a rezultati su prikazani na slikama 10-13. Kao modelna reakcija za praćenje stabilnosti lipaze korištena je enantioselektivna hidroliza (*R,S*)-1-feniletil-acetata.



**Slika 10.** Rezidualna aktivnost lipaze u eutektičkom otapalu ChGlc sa 30, 50 i 80 %-tnim udjelom vode te puferu nakon inkubacije pri 20 °C u ovisnosti o vremenu. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 5,0 mg Novozym 435; 20 °C; 72 h.

Slika 10 prikazuje rezidualnu aktivnost lipaze u ChGlc s različitim udjelima vode i u puferu na 20 °C u ovisnosti o vremenu. Nakon 4 h inkubacije, očuvano je između 55 % rezidualne aktivnosti lipaze u ChGlc<sub>80</sub> % i 92% u ChGlc<sub>50</sub> % s obzirom na početnu vrijednost prije inkubacije. Nakon 8 h inkubacije očuvano je između 44 % rezidualne aktivnosti lipaze u ChGlc<sub>80</sub> % i 59 % u ChGlc<sub>30</sub> %. Nakon 24 h inkubacije, aktivnost lipaze u otapalu s 50 %-tnim udjelom vode, iznosila je 45 % i bila je duplo veća od aktivnosti lipaze u otapalima ChGlc<sub>30</sub> %

i ChGlc<sub>80</sub> % koja je ostala kontinuirana do kraja inkubacije. Nakon 72 h inkubacije, kao najbolje otapalo pokazalo se ChGlc<sub>50</sub> % sa 30 %-tnom enzimskom aktivnošću.

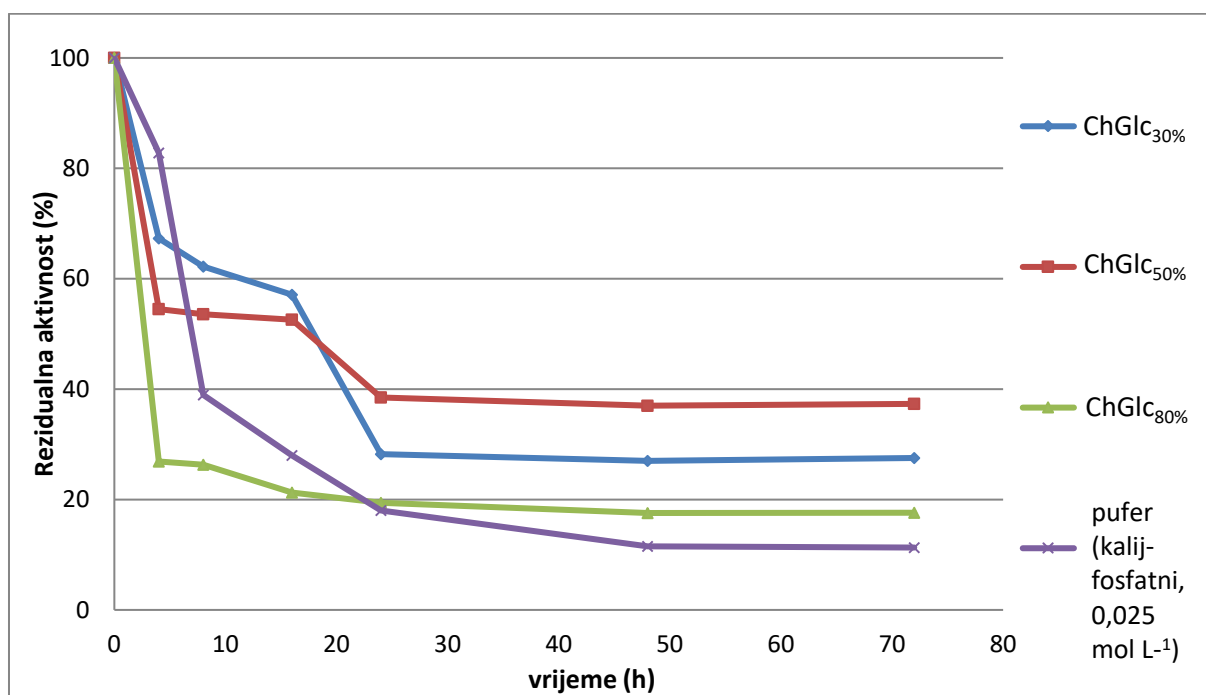


**Slika 11.** Rezidualna aktivnost lipaze u eutektičkom otapalu ChGlc sa 30, 50 i 80 %-tnim udjelom vode te puferu nakon inkubacije pri 40 °C u ovisnosti o vremenu. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L<sup>-1</sup> (R,S)-1-feniletil-acetata; 5,0 mg Novozym 435; 40 °C; 72 h.

Slika 11 prikazuje rezidualnu aktivnost lipaze u ChGlc s različitim udjelima vode i u puferu na 40 °C u ovisnosti o vremenu. Rezidualna aktivnost lipaze u puferu nakon 4 h inkubacije, iznosila je oko 58 %, dok je lipaza zadržala 82 % aktivnosti u ChGlc<sub>50</sub> % ili čak do 96 % aktivnosti u ChGlc<sub>80</sub> % što ukazuje na bolju termičku stabilnost u eutektičkim otapalima. Nakon 16 h inkubacije, lipaza je u ChGlc<sub>30</sub> % zadržala aktivnost od 36 %, dok je istu aktivnost imala u otapalu ChGlc<sub>50</sub> % nakon 24 h inkubacije, što ukazuje na bolju termičku stabilnost u otapalima s većim udjelom vode. Nakon 72 sata inkubacije, aktivnost lipaze u svim eutektičkim otapalima iznosila je između 32 % i 40 %. Iako se u istom periodu aktivnost lipaze pokazala boljom u puferu (45 %), ipak je tijekom vremena najsporije opadala u ChGlc s najvećim udjelom vode.

Slična stabilnost lipaze izolirane iz kvasca *Candida rugosa* u otapalima kolin-klorid:etilen-glikol:formamid, kolin-klorid:glicerol i kolin-klorid:glicerol:etilen-glikol inkubiranim na temperaturi od 40 °C, primjećena je i u istraživanju Kim i sur. (2016).

Autori su dokazali da je vrijednost poluvremena inaktivacije lipaze (jednadžba [24]), u otapalu ChGly<sub>90%</sub> 9,2 puta veća od lipaze u puferu.



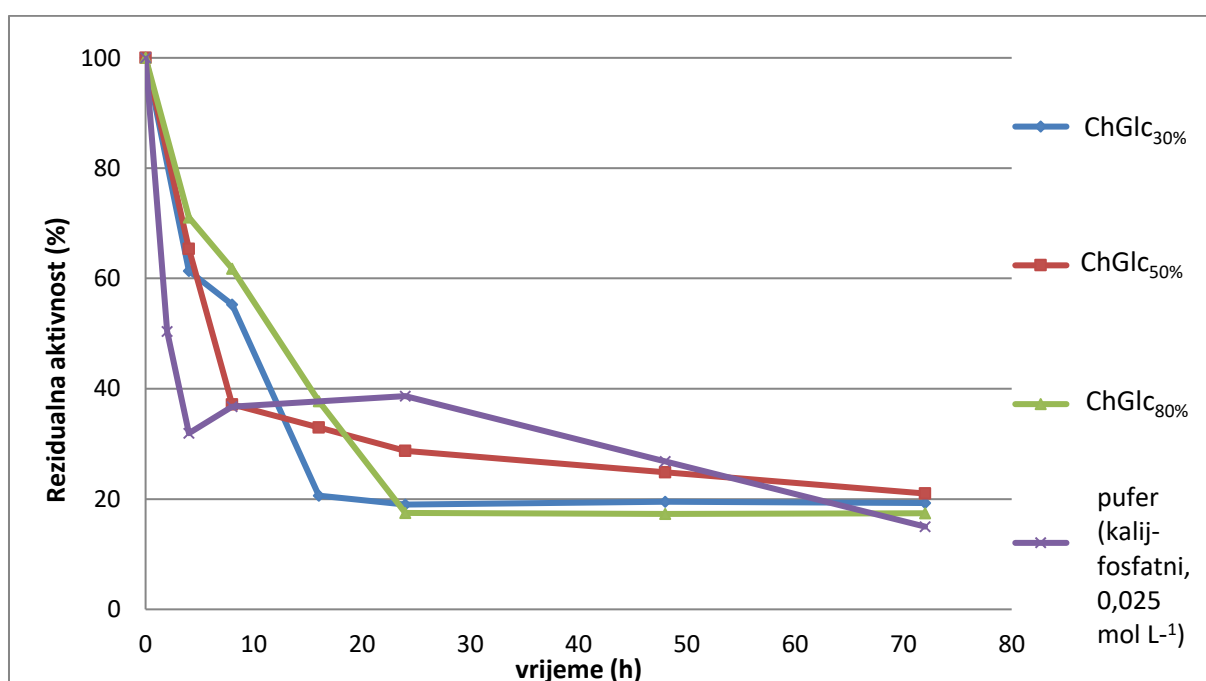
**Slika 12.** Rezidualna aktivnost lipaze u eutektičkom otapalu ChGlc sa 30, 50 i 80 %-tnim udjelom vode te puferu nakon inkubacije pri 60 °C u ovisnosti o vremenu. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 5,0 mg Novozym 435; 60 °C; 72 h.

Slika 12 prikazuje rezidualnu aktivnost lipaze u vodenim otopinama DES-a i u puferu na 60 °C u ovisnosti o vremenu. Nakon 4 h inkubacije, aktivnost lipaze bila je veća u otapalu s 30 % vode (67,3 %) nego u onome s 50 % vode (54,5 %). Međutim, u vremenskom periodu između 16 i 24 h inkubacije, došlo je do značajnijeg pada aktivnosti lipaze u otapalu s 30 % vode (28 %), dok je lipaza u otapalu s 50 % vode, sačuvala za 10 % veću aktivnost. U periodu od 24-72 sata inkubacije, aktivnost lipaze ostala je kontinuirana u svim eutektičkim mješavinama.

Slične su rezultate postigli Cvjetko Bubalo i sur. (2015a) u istraživanju u kojem su pratili stabilnost Novozym 435 u reakciji esterifikacije provedenoj u ChEG s različitim udjelima vode te u referentnim otapalima. Produženje vremena inkubacije do 15-og dana nije rezultiralo značajnijim gubitkom enzimske aktivnosti. Sličnu su pojavu uočili Durand i sur. (2012) u kolinijevom eutektičkom otapalu sa glicerolom kao donatorom vodikove veze. Autori su naime dokazali da ne dolazi do dodatnog gubitka enzimske aktivnosti nakon početnog izmjerenog pada (30 %) tijekom prvih 24 sata inkubacije. To su objasnili potrebom enzima da

poprimi svoju konačnu strukturu. Cvjetko Bubalo i sur. (2015a) pokazali su da je nakon perioda inkubacije od 15 dana, rezidualna aktivnost enzima u vodenim otopinama ChEG iznosila između 27 % i 46 %, što znači da bi testirani DES trebao omogućiti provođenje dugotrajnih i kompleksnih reakcija ili da bi se mogao koristiti u kontinuirano upravljanim procesima. DES kolin-klorid:etilen-glikol pripravljen je zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida i etilen glikola u molarnom omjeru 1:2. Razrjeđivanjem je pripravljen DES s određenim molarnim udjelom vode (kolin-klorid:etilen-glikol:voda = 1:2:1, ChEG<sub>1mol</sub> H<sub>2</sub>O) i upravo je u takvom DES-u uočena superiornija stabilnost enzima, iako jasan trend između sadržaja vode i rezidualne aktivnosti enzima nije uočen.

Sličnost se uočava u reakciji hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata gdje je najbolja aktivnost nakon 72 sata inkubacije ostvarena u otapalu ChGlc<sub>50</sub> % i iznosila je 37,3 %. Aktivnost lipaze u puferu značajnije je pala u periodu od 4-8 h inkubacije kada je iznosila oko 40 %, dok je nakon 72 sata inkubacije iznosila svega 11,3 %. Time je još jednom dokazana bolja termička stabilnost lipaze u eutektičkim otapalima.



**Slika 13.** Rezidualna aktivnost lipaze u eutektičkom otapalu ChGlc sa 30, 50 i 80 %-tnim udjelom vode te puferu nakon inkubacije pri 80 °C u ovisnosti o vremenu. Reakcijski uvjeti: 0,03 mol L<sup>-1</sup> (*R,S*)-1-feniletil-acetata; 5,0 mg Novozym 435; 80 °C; 72 h.

Slika 13 prikazuje rezidualnu aktivnost lipaze u vodenim otopinama DES-a i u puferu na 80 °C u ovisnosti o vremenu. U periodu od 0-4 h inkubacije, aktivnost lipaze najbrže je

pala u puferu i iznosila je oko 32 % s obzirom na neinkubiranu lipazu. U istom tom periodu najveća aktivnost lipaze ostala je sačuvana u otapalu ChGlc<sub>80</sub>% i iznosila je 71%. Nakon 8 sati inkubacije, aktivnost lipaze u ChGlc<sub>30</sub>% drastično se smanjila (20 %) dok je u otapalu ChGlc<sub>80</sub>% bila gotovo duplo veća. To nam ukazuje na činjenicu da je termička stabilnost lipaze veća u eutektičkim otapalima s većim udjelom vode. Nakon 72 sata inkubacije, lipaza je najmanju aktivnost sačuvala u puferu, dok je ona najveća zabilježena u otapalu ChGlc<sub>50</sub>%.

Iz prethodne četiri slike (slika 10-13) možemo zaključiti da lipaza pokazuje veću stabilnost u eutektičkim otapalima nego u puferu. Ispitujući utjecaj udjela vode u DES-ovima na stabilnost lipaze, dokazano je da su otapala s 50 %-tnim i 80 %-tnim udjelom vode, pogodnija za bolju termičku stabilnost lipaze i bolji prinos produkta. Najsporiji pad aktivnosti lipaze uočen je u ChGlc<sub>80</sub>% u periodu do 48 sati inkubacije pri 40 °C, a u sva tri otapala nakon 72 sata inkubacije, lipaza je zadržala najbolju aktivnost koja je iznosila između 30 i 40 % inicijalne aktivnosti. Na temperaturi većoj od 60 °C dolazi do značajnijeg gubitka enzimske aktivnosti koja nakon 72 sata inkubacije iznosi između 15 % u puferu i 21 % u ChGlc<sub>50</sub>%. Primjećujemo i da je aktivnost lipaze u svim ispitanim otapalima najbrže pala pri inkubaciji na 80°C (slika 10-13).

Termička stabilnost imobilizirane lipaze B iz kvasca *Candida antarctica* određena je i u organskom otapalu i u ionskim kapljevinama (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Sažeto, termička stabilnost lipaze u ionskim kapljevinama, slična je kao i u eutektičkim otapalima, dok se organsko otapalo heptan pokazalo kao najpovoljnije otapalo.

Prema jednadžbi [21], izračunata je i brzina inaktivacije enzima (k) u određenom otapalu i pri određenoj temperaturi, a rezultati su prikazani u tablici 6.



**Tablica 6.** Konstanta brzine inaktivacije Novozym 435 u eutektičkim otapalima i puferu pri određenim temperaturama.

Otapalo	T/°C	k/h <sup>-1</sup>	Standardna pogreška
ChGlc <sub>30</sub> %	20	0,069	0,02
	40	0,036	0,011
	60	0,047	0,009
	80	0,185	0,021
ChGlc <sub>50</sub> %	20	0,059	0,022
	40	0,057	0,018
	60	0,047	0,016
	80	0,226	0,08
ChGlc <sub>80</sub> %	20	0,138	0,055
	40	0,019	0,003
	60	0,371	0,228
	80	0,119	0,016
Pufer (kalij-fosfatni, 0,025 M)	20	0,198	0,089
	40	0,021	0,011
	60	0,111	0,018
	80	0,226	0,094

Lipaza je najnestabilnija, tj. najbrže se inaktivira u eutektičkom otapalu s 50 %-tnim udjelom vode na temperaturi od 60 °C pri brzini  $k = 0,371 \text{ h}^{-1}$ , s brzinom identičnom pri inkubaciji u puferu na 80 °C (tablica 6). Lipaza se najsporije inaktivira inkubacijom u ChGlc<sub>30</sub>%, ChGlc<sub>80</sub> % te puferu pri 40 °C ( $k = 0,019\text{-}0,036 \text{ h}^{-1}$ ) što je i optimalna temperatura ovog enzima (Kim i sur., 2016).

Termička stabilnost lipaze je povezana sa strukturom i oblikom lipaze (Zhu i sur., 2001). Na visokoj temperaturi, enzim podliježe djelomičnoj razgradnji zbog toplinom izazvanog razaranja nekovalentnih interakcija unutar enzima (Dave i Madamwar, 2006). Proces inaktivacije enzima moguć je zbog razmotavanja proteina (Luckarift i sur., 2004), ali i

razlike u sastavu otopine koja okružuje enzim tijekom tretmana inkubacije (Arroyo i sur., 1999). Osim toga, dokazano je i da pH-vrijednost medija korištenog za inkubaciju enzima, ima značajan učinak na kinetiku inaktivacije (Anthon i Barrett, 2002), a i udio vode u otapalu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

Cvjetko Bubalo i sur. (2015a) vršili su procjenu kinetičkih parametara za reakciju provedenu u DES-u ChEG s različitim udjelima vode. Poželjna enzimska aktivnost ostvarena je s etilen-glikolom kao donorom vodikove veze, ne samo zbog povećane nukleofilnosti nego i činjenicom da otapalo podržava stabilizaciju nastalih intermedijera preko vodikovih veza, što dovodi do smanjenja barijere energije aktivacije, odnosno do povećanja reaktivnosti. Rezultati procjene kinetičkih parametara u lipazom kataliziranoj reakciji esterifikacije, pokazali su da je formacija produkta najbrža u DES-u ChEG (1:2) koji je razrijeđen dodatkom 2 mola vode (ChEG<sub>2mol H<sub>2</sub>O</sub>), a najsporija u DES-u ChEG (1:2) koji je razrijeđen dodatkom 0,5 mola vode (ChEG<sub>0,5mol H<sub>2</sub>O</sub>). To je dosljedno sa pretpostavkom da dodatak vode unaprijeđuje brzinu reakcije.

Nadalje, veća otpornost lipaze na razgradnju prednost je imobiliziranog enzima (Zhu i sur., 2001). Poznato je da imobilizacija enzima na netopljivim nosačima ima različite učinke na stanje ionizacije i disocijacije enzima kao i na njegovu okolinu (Yilmaz i sur., 2010). Imobilizacija osigurava aktivnost enzima kroz dulji period, njegovu višestruku uporabu te jednostavniju obradu produkta. Yilmaz i sur. (2010) ustanovili su da je temperaturni raspon imobilizirane lipaze veći nego onaj kod slobodne lipaze, čime su potvrdili da je metoda imobilizacije sačuvala enzimsku aktivnost kroz širi temperaturni raspon. Jedan od glavnih razloga imobilizacije enzima je predviđeno povećanje stabilnosti unatoč različitim silama deaktivacije. Razlog tome je ili ograničenje konformacijom na mobilnost enzima kao rezultat elektrostatskih interakcija te formiranja vodikovih veza između enzima i nosača (što bi moglo spriječiti promjenu konformacije enzima pri visokoj temperaturi) ili pak nisko ograničenje difuzije supstrata na visokoj temperaturi. Prema tome, imobilizirani enzimi pokazali su veću katalitičku aktivnost na višoj reakcijskoj temperaturi (Ye i sur., 2005).

Eutektička otapala mogu značajno poboljšati aktivnost, termičku stabilnost, pH-stabilnost i skladišnu stabilnost lipaze kada se koriste kao kootapala u vodenim otopinama (Kim i sur., 2016). U ovom radu dokazano je da se odabirom eutektičkih otapala, kao i uvjeta u kojima se provodi reakcija, može značajno utjecati na iskorištenje, volumetrijsku i specifičnu produktivnost te enantiomerni višak hidrolize, u usporedbi sa dosada korištenim konvencionalnim organskim otapalima. Eutektička otapala zbog svog pozitivnog učinka na okoliš, imaju primjenu u biokatalitičkim reakcijama, što je ujedno u skladu s načelima *zelene*

kemije kojima bi se trebalo težiti. Provođenjem termičke deaktivacije lipaze B izolirane iz kvasca *Candida antarctica* u tercijskim mješavinama DES-a ChGlc i puferu, utvrđeno je da temperatura ima značajan utjecaj na aktivnost enzima u reakciji hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata. Naime, dokazano je da enzimska aktivnost raste povećanjem temperature do 40 °C, a iznad te vrijednosti dolazi do termičke deaktivacije. Dąbkowska i Szewczyk (2009) ustanovili su da povećanje temperature reakcije uzrokuje smanjenje enantioselektivnosti.

Budući razvoj prirodnih eutektičnih otapala oslanjati će se na fundamentalnoj karakterizaciji ovih otapala, razumijevanju ponašanja faza pojedinih komponenata, te interakcija uspostavljenih između parova koji sačinjavaju eutektičnu mješavinu. Predviđa se veliki doprinos u istraživanjima na području fizikalne kemije i termodinamike sustava. Osim toga, predviđa se da će DES-ovi kao nova generacija otapala, zasigurno značajno pridonijeti više održivom industrijskom razvoju (Paiva i sur., 2014).

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Eutektička otapala pripravljena su zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida i donora vodika (glukoza (Glc), glicerol (Gly), ksiloza (Xyl), ksilitol (Xylol), jabučna kiselina (Ma)) u određenim molarnim omjerima. Razrjeđivanjem su pripravljena otapala s različitim udjelom vode.
2. Iskorištenja enantioselektivne hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata u svim eutektičkim otapalima bila su u rasponu od 66,5 % ± 0,7 do 99,9 % ± 1,5, dok su u referentnim organskim otapalima (heptan, heksan) bila u rasponu od 42,58 % ± 1,62 do 50,92 % ± 1,55. Dodatak određene količine vode u eutektička otapala utječe pozitivno na iskorištenje enantioselektivne hidrolize.
3. Kao najbolje eutektičko otapalo za provođenje lipazom katalizirane reakcije hidrolize (*R,S*)-1-feniletil-acetata, pokazalo se ChGlc<sub>50</sub> %, budući da je u njemu ostvareno najveće iskorištenje ( $\eta = 99,99\% \pm 1,1$ ), volumetrijska produktivnost ( $V_P = 239,3 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1} \pm 1,61$ ), enantiomerni višak ( $ee = 98,6\% \pm 0,5$ ) i specifična produktivnost ( $V_E = 6,3 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1} \pm 0,16$ ) reakcije. Racionalnim odabirom eutektičkih otapala, ovisno o sadržaju vode, moguće je utjecati na aktivnost enzima i uspješnost hidrolize.
4. Praćenjem termičke stabilnosti lipaze u DES-u ChGlc s različitim udjelima vode i puferu, s obzirom na rezidualnu aktivnost lipaze nakon inkubacije pri određenim temperaturama, ustanovljeno je da lipaza pokazuje veću aktivnost u eutektičkim otapalima, nego u puferu. Na termičku stabilnost lipaze utječe i udio vode u eutektičkom otapalu, a ChGlc s 30 %-tnim i 50 %-tnim udjelom vode je najpogodnije za termičku stabilnost lipaze. Najveću aktivnost lipaza zadržava pri optimalnoj temperaturi od 40 °C.

## 6. LITERATURA

Anthon, G. E., Barrett, D. M. (2002) Kinetic Parameters for the Thermal Inactivation of Quality-Related Enzymes in Carrots and Potatoes. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4119–4125.

Arroyo, M., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V. (1999) Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 3–12.

Aymard, C., Belarbi, A. (2000) Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 612–618.

Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z., Razak, C. N. A., Salleh, A. B. (1994) Immobilization of hydrophobic lipase derivatives on to organic polymer beads. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **59**, 37–44.

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

Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. (1982) Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294–7299.

Craig, D. B., Arriaga, E. A., Wong, J. C. Y., Lu, H., Dovichi, N. J. (1996) Studies on single alkaline phosphatase molecules: reaction rate and activation energy of a reaction catalyzed by a single molecule and the effect of thermal denaturation – the death of an enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5245–5253.

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

Dąbkowska, K., Szewczyk, K. W. (2009) Influence of temperature on the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers. *Biochem. Eng. J.* **46**, 147–153.

Dai, Y., VanSpronsen, J., Witkamp, G-J., Verpoorte, R., Choi, R. H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61– 68.

Dave, R., Madamwar, D. (2006) Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. *Process Biochem.* **41**, 951–955.

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., Villeneuve, P. (2012) Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem.* **47**, 2081–2089.

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Villeneuve, P. (2014) Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **116**, 16–23.

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.

Faber, K. (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. Izd., Springer. str. 1–268.

Frings, K., Koch, M., Hartmeier, W. (1999) Kinetic resolution of 1-phenylethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 303.

Gašo Sokač, D., Nujić, M., Bušić, V., Habuda-Stanić, M. (2014) Biocatalytic reductions by plant tissue - Green alternative to alcohol production. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **6**, 51–60.

Gorke, J. T., Srienc, F., Kazlauskas, R. J. (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.* **10**, 1235–1237.

Gouveia, W., Jorge, T. F., Martins, S., Meireles, M., Carolino, M., Cruz, C., Almeida, T. V., Araújo, M. E. M. (2014) Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere.* **104**, 51–56.

Grogan, G. (2009) *Practical Biotransformations*. A John Wiley and Sons, Ltd. str. 1–8, 147–151.

Haldane, J. B. S. (1965) *Enzymes*. M. I. T. Press, Cambridge/ MA, USA.

Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere.* **90**, 2193–2195.

- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., Alnashef, I. M., Mirghani, M. E. S. (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere*. **93**, 455–459.
- Hou, X. D., Liu, Q. P., Smith, T. J., Li, N., Zong, M. H. (2013) Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium amino acids ionic liquids. *PLoS One*. **3**, 8.
- Huang, Z., Wu, B. P., Wen, Q., Yang, T. X., Yang, Z. (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**, 1975–1981.
- Karshikoff, A., Ladenstein, R. (2001) Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: ‘a traffic rule’ for hot roads. *Trends. Biochem. Sci.* **26**, 550–556.
- Kaushik, J. K., Bhat, R. (1999) A mechanistic analysis of the increase in the thermal stability of proteins in aqueous carboxylic acid salt solutions. *Protein Sci.* **8**, 222–233.
- Kim, S. H., Park, S., Yu, H., Kim, J. H., Kim, H. J., Yang, Y-H., Kim, K. J., Kan, E., Lee, S. H. (2016) Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **128**, 65–72.
- Lappe, R., Cladera-Olivera, F., Dominguez, A. P. M., Brandelli, A. (2009) Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8A. *J. Food Eng.* **91**, 223–227.
- Liang, J., Zhang, Y., Sun, A., Deng, D., Hu, Y. (2015) Enantioselective Resolution of ( $\pm$ )-1-Phenylethanol and ( $\pm$ )-1-Phenylethyl Acetate by a Novel Esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **3**, 558–575.
- Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., Stone, M. O. (2004) Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat. Biotechnol.* **22**, 211–223.
- Mehl, R. A., Anderson, J. C., Santoro, S. W., Wang, L., Martin, A. B., King, D. S., Horn, D. M., Schultz, P. G. (2003) Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 935–939.

- Paiva, A., Vidinha, P., Angelova, M., Rebocho, S., Barreiros, S., Brunner, G. (2011) Biocatalytic separation of (R, S)-1-phenylethanol enantiomers and fractionation of reaction products with supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids.* **55**, 963–970.
- Paiva, P., Craivero, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.
- Pereira, E. B., Castro, H. F., Moraes, F. F., Zanin, G. M. (2001) Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91**, 739–752.
- 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. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46–53.
- Sant’Anna, V., Cladera-Olivera, F., Brandelli, A. (2012) Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk. *Food chemistry.* **130**, 84–89.
- Suan, C. L., Sarmidi, M. R. (2004) Immobilised lipase-catalysed resolution of (R, S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **28**, 111.
- Ventura, S. P. M., Silva, F. A., Gonçalves, A. M. M., Pereira, J. L., Gonçalves, F., Coutinho, J. A. P. (2014) Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotox. Environ. Safe.* **102**, 48–54.
- Ye, P., Xu, Z. K., Che, A. F., Wu, J., Seta, P. (2005) Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. *Biomaterials.* **26**, 6394–6403.
- Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M. (2010) Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester with sol-gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **62**, 162–168.
- Yongxian, F., Zhangming, X., Huawei, Z., Junqing, Q. (2011) Kinetic Resolution of Both 1-Phenylethanol Enantiomers Produced by Hydrolysis of 1-Phenylethyl Acetate with *Candida antarctica* Lipase B in Different Solvent Systems. *Kinet. Catal.* **52**, 686–690.



Zhao, H., Baker, G. A., Holmes, S. (2011) New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1908–1916.

Zhao, H., Zhang, C., Crittle, T. D. (2013) Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **85–86**, 243–247.

Zhu, K., Jutila, A., Tuominen, E. K. J., Patkar, S. A., Svendsen, A., Kinnunen, P. K. J. (2001) BBA - Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. *Protein Struct. Mol. Enzyme.* **1547**, 329–338.