

# Primjena eutektičkih otapala u reakcijama kataliziranim alkohol dehidrogenazom

---

**Biškup, Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:286923>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Marija Biškup**

7567/BT

**Primjena eutektičkih otapala u reakcijama kataliziranim  
alkohol dehidrogenazom**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova (HRZZ, br. 7712)

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

**Zagreb, 2020.**

*Zahvala mentorici, doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo, na prenesenom znanju, savjetima, strpljenju i susretljivosti prilikom izrade završnog rada.*

*Zahvaljujem i svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na pomoći i svim savjetima tijekom eksperimentalnog rada u laboratoriju.*

*Hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na pruženoj podršci i motivaciji tijekom dosadašnjeg školovanja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Primjena eutektičkih otapala u reakcijama kataliziranim alkohol dehidrogenazom**

***Marija Biškup, 0058212283***

**Sažetak:** Zahvaljujući sposobnosti kataliziranja redukcija karbonilnih grupa u prokiralnim spojevima do kiralnih alkohola, koji su važni međuprodukti u proizvodnji lijekova i kemikalija, dehidrogenaze su enzimi od velike industrijske važnosti. U novije vrijeme cilj je industrijsku proizvodnju uskladiti s načelima zelene kemije, stoga se velike količine hlapljivih, zapaljivih i toksičnih organskih otapala nastoje zamijeniti sigurnijim otapalima za ljudsko zdravlje i okoliš. Nova generacija takvih otapala su eutektička otapala koje karakteriziraju niska hlapljivost, biorazgradivost i jednostavna sinteza. Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnosti primjene eutektičkih otapala u reakcijama kataliziranim alkohol dehidrogenazom. Pripravljena su različita eutektička otapala, s kolin-kloridom u sastavu, u kojima je ispitana aktivnost te su praćene promjene u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze. U istim je otapalima također praćena stabilnost koenzima NADH i NAD<sup>+</sup> koji su potrebni za aktivnost alkohol dehidrogenaze. Eutektička otapala na bazi kolin-klorida s ureom u sastavu najbolje su stabilizirala oba oblika nikotinamidnog koenzima, no niti jedno eutektičko otapalo nije se pokazalo kao povoljan medij za odvijanje enzimске reakcije alkohol dehidrogenaze.

**Ključne riječi:** biokatalizatori, biotransformacije, dehidrogenaze, eutektička otapala, nikotinamidni koenzim

**Rad sadrži:** 37 stranica, 15 slika, 6 tablica, 45 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Manuela Panić, asistent

**Datum obrane:** 15. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTARY CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **Application of deep eutectic solvents in alcohol dehydrogenase-catalyzed reactions**

***Marija Biškup, 0058212283***

**Abstract:** Due to their ability to catalyze the reduction of carbonyl groups in prochiral compounds to chiral alcohols, which are important intermediates in the production of pharmaceuticals and chemicals, dehydrogenases are enzymes of great industrial importance. Recently, a tendency is to coordinate industrial production with the principles of green chemistry, so large amounts of volatile, flammable and toxic organic solvents are being replaced by solvents which are safer for human health and the environment. A new generation of such solvents are deep eutectic solvents characterized by low volatility, biodegradability, and easy synthesis. The aim of this study was to investigate the possibilities of using deep eutectic solvents in alcohol dehydrogenase-catalyzed reactions. Various choline-chloride based deep eutectic solvents were prepared in which enzyme activity was measured and changes in the conformation of the enzyme alcohol dehydrogenase were monitored. In the same solvents, the stability of the coenzymes NADH and NAD<sup>+</sup> required for alcohol dehydrogenase activity was also monitored. Choline-chloride based deep eutectic solvents containing urea best stabilized both forms of nicotinamide coenzyme, but neither deep eutectic solvent proved to be a suitable medium for the enzymatic reaction of alcohol dehydrogenase.

**Keywords:** biocatalysts, biotransformations, dehydrogenases, deep eutectic solvents, nicotinamide coenzyme

**Thesis contains:** 37 pages, 15 figures, 6 tables, 45 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

**Technical support and assistance:** PhD Manuela Panić, Assistant

**Defence date:** September 15<sup>th</sup> 2020

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Biotransformacije .....	3
2.1.1. Općenito o biotransformacijama i biokatalizatorima .....	3
2.1.2. Enzimi u biotransformacijama .....	5
2.1.3. Industrijske biotransformacije.....	7
2.2. Zelena otapala za zelene tehnologije .....	8
2.2.1. Što su zelena otapala? .....	9
2.2.2. Eutektička otapala .....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	14
3.1. Materijali .....	14
3.1.1. Enzimski pripravak.....	14
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Pufferi i matične otopine .....	14
3.1.4. Oprema i uređaji .....	15
3.2. Metode .....	15
3.2.1. Priprava eutektičkih otapala.....	15
3.2.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze .....	16
3.2.3. Praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenaze primjenom spektrofluorimetrije.....	17
3.2.4. Praćenje stabilnosti koenzima NADH i NAD <sup>+</sup> primjenom spektrofotometrije.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
4.1. Priprava eutektičkih otapala.....	21
4.2. Aktivnost alkohol dehidrogenaze u eutektičkim otapalima.....	22
4.3. Konformacijske promjene alkohol dehidrogenaze u eutektičkim otapalima .....	23
4.4. Stabilnost koenzima NADH i NAD <sup>+</sup> u eutektičkim otapalima .....	25

5. ZAKLJUČCI.....	33
6. LITERATURA.....	34

## 1. UVOD

Danas je, osim tradicionalnih kemijskih metoda koje se primjenjuju, sve učestalija primjena bioloških sustava u industrijskim procesima. Biološki reagensi, u koje pripadaju i enzimi, koriste se za uklanjanje specifičnih toksičnih spojeva transformacijom istih u neškodljive, tj. za biorazgradnju te u biokatalizi za proizvodnju definiranih proizvoda, nerijetko finih kemikalija i onih koje se godišnje proizvode u multitonskim količinama (*eng. bulk chemicals*), iz definiranih supstrata. Za aktivnost mnogih enzima optimalni su blagi reakcijski uvjeti kao što su relativno niske temperature, često 10 – 50 °C i umjereni raspon pH, 4 – 9. Osim toga, enzimске se reakcije mogu provoditi bez uporabe ekstremnih tlakova i bez dodatka metala u reakcijsku smjesu. Navedeni uvjeti doprinose ekološki prihvatljivijem načinu provođenja brojnih reakcija u usporedbi s neenzimskim reakcijama koje često zahtijevaju izrazito kiselo ili lužnato okruženje, velika ulaganja u energiju potrebnu za zagrijavanje sustava ili toksične metalne katalizatore (Holland, 2002). Osim u preparativnoj organskoj kemiji, sve je veći interes za uporabu enzima na industrijskoj razini. Veliki industrijski potencijal pokazuje enzim alkohol dehidrogenaza iz skupine oksidoreduktaza koji se ističe u enantioselektivnoj sintezi kiralnih alkohola, važnih međuprodukata u proizvodnji mnogih lijekova i kemikalija, redukcijom karbonilnih grupa u prokiralnim spojevima (Goldberg i sur. 2007; Kataoka i sur., 2003). Proizvodnja mnogih kemikalija, lijekova, kozmetike, goriva, ambalaža i dr. izrazito je poboljšala kvalitetu života ljudi u 20. stoljeću, no proizvodni procesi su, između ostalog, doveli do značajnog onečišćenja okoliša (Lancaster, 2002). U novije vrijeme promiče se ekološki benigna proizvodnja koja implicira pokretanje proizvodnih sustava koji su ekološki i ekonomski prihvatljiviji. Pored toga, održivi razvoj, svjetski pokret kemijske industrije, pruža smjernice za upravljanje resursima s krajnjim ciljem minimiziranja korištenja neobnovljivih izvora. U ekološkom kontekstu bitan je i pojam zelene kemije koji se odnosi na dizajn novih kemijskih tehnologija sa svrhom smanjivanja ili eliminiranja uporabe opasnih tvari (Bommarius i Riebel, 2004.) S ciljem smanjenja uporabe štetnih organskih otapala, poseban se naglasak stavlja na razvoj ekološki prihvatljivih zelenih otapala među kojima se ističu eutektička otapala koje karakteriziraju niska hlapljivost, biorazgradivost, jednostavna sinteza, niska cijena, velika sposobnost otapanja te izvedivost strukturnog dizajna (Hou i sur., 2018).

Prema navedenom, svrha ovog rada bila je ispitati mogućnost implementacije različitih eutektičkih otapala u reakcijama redukcije kataliziranim dehidrogenazama. Ispitana je aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze u pripremljenim eutektičkim otapalima te su promjene



u konformaciji ovog enzima praćene spektrofluorometrijski. S obzirom na ovisnost korištenog enzima o nikotinamidnim koenzimima, ispitana je i stabilnost koenzima  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADH}$  u eutekćkim otapalima.

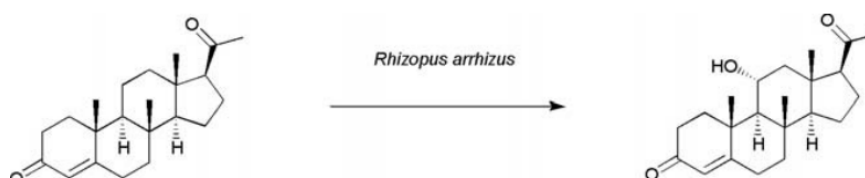
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biotransformacije

#### 2.1.1. Općenito o biotransformacijama i biokatalizatorima

Pojam biotransformacije odnosi se na biokatalizatorima, enzimima ili stanicama, katalizirane reakcije pretvorbe definiranih prekursora u definirane ciljne produkte (Bommarius i Riebel, 2004). U usporedbi s drugim biokatalitičkim procesima, karakterizira ih sličnost kemijske strukture supstrata i produkta. Prije razvoja biotransformacija, mikroorganizmi su se kao biokatalizatori koristili samo u fermentacijskim bioprocima od kojih se razlikuju po tome što se pretvorba između supstrata i produkta odvija često u jednom ili dva koraka, dok su fermentacijski procesi često složeniji i odvijaju se u više koraka (Vasić-Rački, 2006).

Uporaba biokatalizatora u usporedbi s uobičajenim katalizatorima u organskoj sintezi ima brojne prednosti. Biokatalizatori pokazuju visoku kemo-, stereo- i regioselektivnost. Na slici 1 prikazana je regio- i stereoselektivnost biotransformacijskog postupka na primjeru hidroksilacije progesterona isključivo na položaju 11 steroidne jezgre i to samo u  $\alpha$ -konfiguraciji (Grogan, 2009). Nadalje, biokatalizatori su uglavnom stabilni i aktivni u blagim reakcijskim uvjetima te u vodenom mediju čime je lakše postići proces usklađen sa zelenim tehnologijama (detaljnije objašnjeno u poglavlju 2.2.1.). Primjena biokatalizatora je održiva jer su isti netoksični, biorazgradivi, a ponekad ih je moguće i reciklirati. Ipak, biokatalizatori često pokazuju slabiju specifičnu aktivnost od kemijskih katalizatora, nestabilni su pri ekstremnoj temperaturi i pH vrijednosti, razvoj biokatalizatora i biokataliziranih procesa je dugotrajan te je ograničena dostupnost enzima za određene reakcije. Također, neki biokatalizatori za svoju aktivnost trebaju kosupstrate i/ili kofaktore što poskupljuje proces sinteze proizvoda (Bommarius i Riebel, 2004; Milner i Maguire, 2012).



**Slika 1.** Regio- i stereoselektivna hidroksilacija progesterona katalizirana s plijesni *Rhizopus arrhizus* (Grogan, 2009)

Kao biokatalizatori u biotransformacijama najčešće se koriste mikrobne stanice i enzimi izolirani iz istih. Osim navedenog, kao biokatalizatori se mogu koristiti i kulture biljnih i životinjskih stanica te katalitička tijela i molekule ribonukleinske kiseline, ali njihova uporaba u

istraživanjima te naposljetku u industrijskim transformacijama nije toliko učestala. Mikroorganizmi su dobri biokatalizatori jer su sveprisutni, lako dostupni i lako se prilagođavaju na različite uvjete pa mogu iskorištavati veliki raspon tvari za rast i preživljavanje. Iz skupine prokariota, u biotransformacijama se koriste isključivo eubakterije, npr. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., bakterije mliječne kiseline, bakterije octene kiseline. Među mikrobnim eukariotima, u biotransformacijama se ističu višestanični filamentozni fungi rodova *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus* i dr. i jednostanični kvasci. Povoljne karakteristike kvasaca su brzi rast i dostupnost, a primjer dobrog biokatalizatora je *Candida* koja sadrži enzim formijat dehidrogenazu pa je njezina primjena česta u reakcijama regeneracije kofaktora. Filamentozne funge karakterizira sposobnost biorazgradnje pa mogu razgrađivati ksenobiotičke supstrate, npr. drvo. Biljne kulture imaju veliki biosintetski potencijal, no njihov je uzgoj složeniji i dugotrajniji od uzgoja mikrobnih kultura stoga njihova primjena nije velika. Osim što same biljne stanice mogu imati ulogu biokatalizatora, one su i izvor korisnih enzima koji se izoliraju iz njih, npr. enzima glikoziltransferaze. Enzimi iz životinjskih izvora danas se rijetko koriste jer analogni enzimi mikrobnog podrijetla pokazuju jednaku ili veću aktivnost zahvaljujući primjeni genetičkog inženjerstva u biotehnologiji (Grogan, 2009).

Uzgoj cijelih stanica kao biokatalizatora ima nižu cijenu u odnosu na nabavu pročišćenih izoliranih enzima, a uporaba stanica osigurava i regeneraciju kofaktora unutar stanice, jednostavno uklanjanje biokatalizatora iz reakcijske smjese filtracijom ili centrifugiranjem, a pogodna je i za biotransformacije u više koraka za koje je potrebno više enzima ili za koje je izolacija enzima složena. S druge strane, ovakav sustav zahtjeva složeniju i, posljedično, skuplju opremu potrebnu za uzgoj stanica. Zbog postojanja stanične membrane može biti otežan prijenos supstrata u stanicu i proizvoda iz iste. Nadalje, budući da se u živoj stanici ne događa samo jedna željena, već i konkurentne reakcije, nekontrolirani metabolički procesi mogu dovesti do neželjenih sporednih reakcija, a nusprodukti mogu biti toksični za stanicu ili teško izdvojivi iz biokatalizatora. Ukoliko se stanice ne recikliraju, prije zbrinjavanja potrebno ih je inaktivirati sterilizacijom u autoklavu ili tretiranjem kemijskim dezinfekcijskim sredstvom (Grogan, 2009; Johannes i sur., 2006). Kataliziranje biotransformacija izoliranim enzimima zahtjeva jednostavnu aparaturu i omogućuje veću produktivnost u usporedbi s korištenjem cijelih stanica zbog mogućeg dodatka veće koncentracije katalizatora u odnosu na postupke u kojima se kao biokatalizator koriste cijele stanice (Faber, 2004). Osim toga, ovakav sustav omogućava odvijanje čiste reakcije bez neželjenih sporednih reakcija metabolizma. Za ovako katalizirane reakcije potreban je pročišćeni enzim do odgovarajućeg stupnja čistoće, koji se često dobavlja u praškastom obliku. To osigurava jednostavnost rada budući da se enzim u

praškastom obliku upotrebljava kao uobičajeni kemijski reagens, ali poskupljuje proces. Nedostatak reakcije s izoliranim enzima je potrebno dodavanje skupih kofaktora u reakcijsku smjesu, ukoliko su potrebni za rad enzima, jer se ne regeneriraju izvan stanice (Grogan, 2009).

### 2.1.2. Enzimi u biotransformacijama

Prema tipu kemijske reakcije koju kataliziraju, enzimi se mogu podijeliti u 7 osnovnih skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze i translokaze (Anonymous 1; Grogan, 2009). U tablici 1 naveden su tipovi reakcija koje kataliziraju osnovne skupine enzima te primjeri enzima značajnih u biotransformacijama.

**Tablica 1.** 7 osnovnih skupina enzima, tipovi reakcija koje kataliziraju i primjeri enzima koji se koriste u biotransformacijama (Anonymous 1; Grogan, 2009)

<b>SKUPINA ENZIMA</b>	<b>TIP REAKCIJE KOJI KATALIZITAJU</b>	<b>PRIMJERI ENZIMA KOJI SE KORISTE U BIOTRANSFORMACIJAMA</b>
<b>Oksidoreduktaze</b>	Reakcije oksidacije i redukcije	Laktat dehidrogenaza
<b>Transferaze</b>	Reakcije prijenosa grupa	Flavonol-3-O-glukanotransferaza
<b>Hidrolaze</b>	Reakcije cijepanja veze pomoću vode	Kimotripsin izomeraza
<b>Liaze</b>	Reakcije adicije vode/amonijaka na dvostruku vezu	Fumaraza Fenilalanin-amonij liaza
<b>Izomeraze</b>	Reakcije izomerizacije	Glukoza-6-fosfat izomeraza
<b>Ligaze</b>	Sintezu kovalentnih veza uz istodobnu hidrolizu koenzima ATP-a na ADP i Pi	Aspartat-amonij ligaza
<b>Translokaze</b>	Prijenos iona ili molekula kroz membranu ili njihovo razdvajanje unutar membrane	

Značajnije biotransformacije koje kataliziraju enzimi iz skupine oksidoreduktaza su hidroksilacije, keto-aldehidne međupretvorbe, redukcije dvostrukih veza ugljik-ugljik i oksidacije amina. Nadalje, reakcije oksidacije imaju ulogu u funkcionalizaciji neaktivnih molekula, npr. ugljikovodika te su predmet brojnih istraživanja u području biotransformacija (Grogan, 2009). Zahvaljujući visokoj stereoselektivnosti reakcija koje osiguravaju enzimi, danas su biotransformacije hidroksilacije steroida u prednosti u odnosu na kemijski katalizirane reakcije na industrijskoj razini (Gröger i Asano, 2012). Dehidrogenaze iz skupine oksidoreduktaza mogu se koristiti u asimetričnoj sintezi kiralnih spojeva. Naime, Temiño i sur. (2005) navode kako se stereoselektivna sinteza kiralnih alkohola najbolje može postići asimetričnom redukcijom prokiralnih ketona posredstvom alkohol dehidrogenaza. Odvijanje brojnih oksidoredukcijskih reakcija ovisi o neproteinskom kofaktoru. U oko 80 % reakcija ovog

tipa kofaktor je nikotinamid adenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ), a kao alternativa potrebi dodavanja skupog kofaktora u smjesu, razvijaju se sustavi za regeneraciju među kojima je najpoznatiji sustav formijat/formijat dehidrogenaza koji se temelji na regeneraciji  $\text{NAD}^+$  uz pomoć enzima formijat dehidrogenaze (Johannes i sur., 2006).

U enzimskoj skupini transferaza značajne su kinaze, koje se u biotransformacijama mogu iskoristiti za sintezu fosfoestera i glukoziltransferaze, koje sudjeluju u reakcijama nastajanja glikozida. Problematika reakcija kataliziranih glukoziltransferazama je ovisnost o aktiviranim donorima šećernih jedinica – nukleotidima, koji su skupi (Grogan, 2009).

Treća skupina enzima su hidrolaze koje se najčešće primjenjuju u industriji. Hidrolaze se mogu primjenjivati npr. u proizvodnji međuprodukata za farmaceutske proizvode ili pesticide. U biotransformacijama se najčešće koriste lipaze i proteaze. Proteaza kimotripsin primjenjuje se u mnoge svrhe u području organske sinteze te je vrlo važna njena primjena u cijepanju esterskih veza u reakcijama enantioselektivne analize s ciljem dobivanja optički čistih produkata – alkohola i karboksilnih kiselina (Grogan, 2009; Johannes i sur., 2006).

Izomeraze se često koriste za heksoza-pentoza izomerizacije, među kojima je važna glukoza-6-fosfat izomeraza, koja katalizira ekonomski značajnu biotransformaciju glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat. Važne su i racemaze kojima se postižu inverzije apsolutnih konformacija molekula (Grogan, 2009).

Sljedeće dvije skupine, liaze i ligaze, najmanje se primjenjuju u industriji. Izvrsna sreteoselektivnost, kao i kod hidrolaza, iskorištena je u skupini liaza koje se primjenjuju za dobivanje optički čistih alkohola i amina u preparativnoj organskoj kemiji (Grogan, 2009; Johannes i sur., 2006). Grogan (2009) za ligaze navodi kako, iako su potencijalno korisne, za njih postoje ograničenja u literaturi o biotransformacijama.

Translokaze su posljednje klasificirana skupina enzima, vezana uz procese koji uključuju stanice kao katalizatore, zbog uloge ovih enzima u održavanju biološke aktivnosti stanica. Primjerice, ADP/ATP translokaze nužne su za izmjenu citosolnog adenozin difosfata (ADP) i mitohondrijskog adenozin trifosfata (ATP) kroz unutarnju mitohondrijsku membranu te su tako posrednici u opskrbi stanice energijom, a karnitin-acilkarnitin translokaze zadužene su za transport kompleksa karnitin-masna kiselina i karnitina kroz unutarnju mitohondrijsku membranu, što je važno za metabolizam masnih kiselina (Anonymous 1).

### 2.1.3. Industrijske biotransformacije

U posljednjem desetljeću 20. stoljeća započeo je brzi porast broja biotransformacijskih procesa primijenjenih na industrijskoj razini. Biotransformacijski procesi primjenjuju se u proizvodnji širokog spektra proizvoda: od finih kemikalija i farmaceutika, do agrokemikalija i proizvoda prehrambene i kozmetičke industrije. U industrijskom mjerilu, kao i u laboratorijskom, kao biokatalizatori koriste se i enzimi i stanice koji mogu biti slobodni ili imobilizirani. Dok se u kemijskoj industriji biotransformacije primjenjuju u malim i velikim industrijskim, u farmaceutskoj se industriji često primjenjuju u vrlo malim mjerilima u kojima se proizvodi između 1 i 100 kg proizvoda godišnje, kao dio programa razvoja lijekova za koje je potrebno osigurati dovoljno farmaceutskog materijala za klinička ispitivanja u kratkom vremenu (Straathof i sur., 2002).

Straathof i sur. (2002), uspoređujući 134 industrijski primijenjena biotransformacijska procesa, izvješćuju da su najzastupljeniji biokatalizatori hidrolaze (44 %) te redoks biokatalizatori (30 %), koji uključuju i oksidoreduktaze i stanice koje kataliziraju redukcije ili oksidacije, dok su ostali enzimi puno manje zastupljeni. Biokatalizatori redoks reakcija, kao i liaze, veliku ulogu imaju u asimetričnoj sintezi kiralnih spojeva, dok su hidrolaze više vezane uz kinetičke rezolucije enantiomera. Razvoju biotransformacijskih procesa značajno doprinosi visoka selektivnost (naročito enantioselektivnost) enzima koja omogućuje proizvodnju kiralnih prekursora (za proizvodnju npr. optički čistih lijekova ili aditiva za hranu) i biološki aktivnih spojeva, a o kiralnosti ovise svojstva i aktivnosti mnogih spojeva (Muñoz Solano i sur., 2012; Straathof i sur., 2002).

Među industrijski najzastupljenijim enzimskim biokatalizatorima – hidrolazama, bitne uloge u industrijskim biotransformacijama, osim serinskih peptidaza, koje koriste u sintezi peptida i kataliziraju (trans)esterifikacije u reakcijama kinetičke rezolucije, imaju lipaze. Lipaze za svoju aktivnost ne trebaju kofaktore te su izrazito dobri katalizatori u reakcijama dobivanja alkohola,  $\beta$ -laktama, kiselina i amina. Primjer industrijski vrlo važne lipaze je CalB - lipaza izolirana iz kvasca *Candida antarctica*. Zbog svoje niske supstratne specifičnosti primjenjuje se u raznovrsnim biotransformacijama, poput desimetrizacije prokiralnog spoja u kiralni ili transacilacije supstrata (Muñoz Solano i sur., 2012; Nestl i sur., 2011).

Primjeri proizvoda nekih biotransformacijskih procesa u industrijskom mjerilu te količina njihove godišnje proizvodnje prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Proizvodi industrijskih biotransformacija u različitim mjerilima godišnje proizvodnje (Ghisalba i sur., 2010)

<b>PROIZVOD</b>	<b>GODIŠNJA PROIZVODNJA U TONAMA</b>
<b>Glukozno-fruktozni sirup</b>	12000000
<b>Limunska kiselina</b>	1000000
<b>Akrilamid</b>	250000
<b>Vitamin C</b>	>100000
<b>Nikotinamid</b>	15000
<b>6-aminopenicilinska kiselina</b>	10000
<b>Aspartam</b>	10000
<b>7-aminocefalosporanska kiselina</b>	4000
<b>(S)-Naproxen</b>	>1000
<b>L-karnitin</b>	Nekoliko stotina
<b>L-DOPA</b>	>150

Među navedenim primjerima 6-aminopenicilinska kiselina (6-APA) i 7-aminocefalosporanska kiselina (7-ACA) važni su u farmaceutskoj industriji jer se koriste kao prekursori u sintezi novih  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Od 1973. godine, u industriji se primjenjuje dobivanje 6-APA biotransformacijom s imobiliziranim enzimom penicilin amidazom koji katalizira deacilaciju penicilina G ili V. Ova biotransformacija zamjenjuje nekoliko kemijskih reakcija u kemijskoj sintezi 6-APA. Spoj 7-ACA proizvodi se iz cefalosporina C visoke čistoće kemijsko-enzimskim postupkom u dva koraka, pri čemu je prvi kemijski, a drugi kataliziran imobiliziranim enzimom glutaril amidazom. Ovom enzimskom biotransformacijom smanjen je broj složenih koraka kemijske sinteze vođenih na  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  te je skraćeno vrijeme sinteze 7-ACA (Vasić-Rački, 2006). Kemijska sinteza nikotinamida, esencijalne supstancije za funkcioniranje metabolizma, također se može zamijeniti biokatalizom u industrijskim mjerilima. Biotransformacijski proces provodi se u tri kontinuirane visokoselektivne reakcije iz nikotininitrila s izoliranim stanicama bakterije *Rhodococcus rhodochrous* J1 koja sadrži potreban enzim nitril hidratazu (Ghisalba i sur., 2010).

## **2.2. Zelena otapala za zelene tehnologije**

U industrijskim procesima uporaba otapala gotovo je neizbježna radi otapanja čvrstih supstrata, prijenosa topline i mase. Izbor prikladnog otapala, koje mora biti pogodno za

uporabu u reakcijskim sustavima, važan je i zbog utjecaja prvenstveno viskoznosti istog na procese separacije i pročišćavanja proizvoda. Voda ima veliku primjenu u industrijskim procesima i čini se kao prvi izbor za otapalo jer je nezapaljiva, netoksična, lako dostupna i jeftina, ali nije pogodna za otapanje mnogih organskih i organometalnih spojeva. Također, nakon završetka procesa, kada treba ukloniti otapalo, za uklanjanje vode potrebno je uložiti puno energije što poskupljuje proces. Uobičajena učinkovita otapala za mnoge procese su organska otapala koja su toksična, lako hlapljiva, zapaljiva te im je potrebno pronaći *zeleniju* alternativu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

### **2.2.1. Što su zelena otapala?**

Anastas i Warner predstavili su 1998. godine 12 načela zelene kemije koja promiču smanjenje uporabe i proizvodnje štetnih spojeva te primjenu obnovljivih sirovina u različitim procesima. Iako svih 12 načela nije moguće istovremeno ispoštovati, cilj je osmisлити proces u kojem se primjenjuje što veći broj istih (Jukić i sur., 2004). U skladu s načelima zelene kemije, javila se potreba za zamjenom otapala dobivenih preradom nafte, otapalima iz obnovljivih izvora, odnosno, zamjenom opasnih organskih otapala onima koja su sigurnija za zdravlje i okoliš. Kao nova, zelena, ekološki prihvatljivija otapala ističu se ionske kapljevine, superkritični i subkritični fluidi te otapala dobivena iz obnovljivih, odnosno prirodnih izvora, među kojima su najznačajnija eutektička otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Ionske kapljevine (*eng. Ionic Liquids, ILs*) su organske soli sa talištem nižim od 100 °C. Sastavljene su isključivo od iona, i to najčešće od organskog kationskog dijela koji uključuje supstituiranu molekulu koja sadrži pozitivno nabijeni atom dušika, fosfora ili sumpora te organskog ili anorganskog anionskog dijela (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Ionske kapljevine svrstavaju se u zelena otapala zbog poželjnih svojstava nehlapljivosti, nezapaljivosti te toplinske, kemijske i elektrokemijske stabilnosti (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Osim navedene niske točke tališta, karakterizira ih nizak tlak para, velika viskoznost, gustoća veća od gustoće vode i površinska napetost manja od površinske napetosti vode, a veća od *n*-alkana. Budući da pripadaju skupini polarnih otapala, pogodna su za otapanje mnogih anorganskih, organskih spojeva te polimera. U usporedbi sa uobičajenim otapalima u kojima mogu biti prisutne Van der Waalove interakcije, dipol-dipol interakcije te vodikove veze, u ionskim kapljevinama, radi njihove specifične ionske prirode, javljaju se i ionske interakcije koje, također, omogućuju dobru topljivost polarnih tvari. S obzirom na brojnost kationa i aniona koji se mogu kombinirati u pripravi ionskih kapljevine kako bi se dobila otapala različitih svojstava, iste se mogu nazvati dizajnerskim otapalima. Primjena ovih otapala istraživana je u mnogim područjima kao što su procesna tehnologija, biotehnologija, kemijska tehnologija, farmaceutika, elektrokemija i dr.,



no uporaba istih, iako je otvorila put prema *zelenijim* procesima, ima svoje nedostatke. Problem predstavlja visoka cijena, korištenje organskih otapala ili neobnovljivih sirovina (npr. naftne sirovine) u uobičajenim procesima pripreme ionskih kapljevina kao i potencijalna opasnost za okoliš (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Paiva i sur. (2014) isto tako kao nedostatke ovih otapala navode lošu biorazgradivost, biokompatibilnost te održivost.

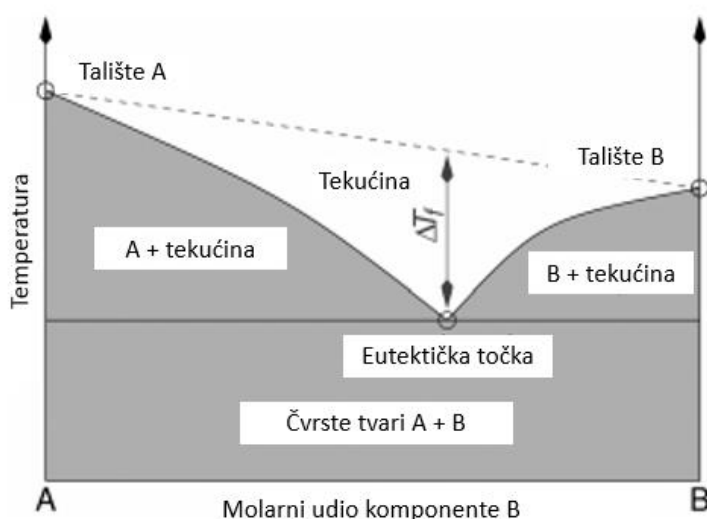
Druga vrsta zelenih otapala su superkritični fluidi (*eng. Supercritical Fluids, SCFs*). Oni imaju svojstva između tekućina i plinova, a pripremaju se zagrijavanjem tekućine do temperature koja je viša od kritične temperature te komprimiranjem pri tlaku višem od kritične vrijednosti tlaka za određeni fluid. Prikladno otapalo za pripremu SCF-a bira se uzimajući u obzir ekološke i ekonomske čimbenike, superkritična svojstva te sposobnost otapanja različitih tvari, a među različitim ispitivanim fluidima ističu se ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ) i voda koji se najčešće koriste kao ekstrakcijska sredstva. Ugljikov dioksid pogodan je za pripremu SCF-a zbog netoksičnosti, dostupnosti, povoljnih kritičnih svojstava (kritična temperatura  $T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ; kritični tlak  $p_c = 7,38 \text{ MPa}$ ) i jednostavnog uklanjanja s proizvoda. U usporedbi s ionskim kapljevinama, superkritični  $\text{CO}_2$  nije štetan za okoliš niti ljudsko zdravlje budući da  $\text{CO}_2$  ima status komponente sigurne za uporabu (*eng. Generally recognized as safe, GRAS status*) (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Superkritični  $\text{CO}_2$  dobro otapa nepolarne, ali i slabo polarne spojeve, male ili srednje molekulske mase, međutim, s povećanjem tlaka u fluidu, moguće je izdvajanje i većih, polarnijih i manje hlapljivih spojeva (Brunner, 2005). Za razliku od ugljikovog dioksida, voda je izrazito polarna molekula, te se u uobičajenim uvjetima ne može koristiti kao otapalo za ekstrakciju slabo polarnih ili nepolarnih spojeva, ali dovođenjem vode iz sobnih uvjeta u superkritično ( $T_c = 374 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $p_c = 22,1 \text{ MPa}$ ) ili subkritično stanje (temperatura vode je viša od temperature vrenja, ali niža od kritične temperature, a visoki tlak održava vodu u tekućem stanju), svojstva vode se značajno mijenjaju pa dobiveni fluid postaje povoljan medij za brojne organske spojeve. Dok je primjena superkritične vode, zbog izrazito reaktivnog okruženja, ograničena na ekstrakciju vrlo stabilnih spojeva, broj primjena subkritične vode sve se više povećava čemu dodatno pogoduju niska cijena, netoksičnost, efikasnost i visoka ekstrakcijska selektivnost (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Glicerol i derivati dobiveni iz glicerola ističu se među otapalima koja su dobivena iz obnovljivih izvora, npr. iz otpadnih materijala i biomase, koji se, osim uloge otapala u katalizi, organskim reakcijama i separacijama, mogu iskoristiti kao preteče za sintezu drugih zelenih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Važno svojstvo glicerola kao otapala je dobro otapanje anorganskih soli, kiselina, baza, enzima i mnogih kompleksa prijelaznih metala koje dobro otapa i voda, ali i organskih, često hidrofobnih spojeva kao što su ugljikovodici koji se slabo

miješaju ili ne miješaju s vodom. Glicerol je pri normalnom tlaku nehlapljiv spoj i ima visoku temperaturu vrelišta koja iznosi 290 °C što pogoduje ubrzanju reakcija zbog mogućnosti vođenja pri višim temperaturama. Visoko vrelište također pogoduje mogućnosti provođenja destilacije pri izdvajanju proizvoda procesa. Druga svojstva glicerola i derivata koja doprinose zelenim tehnologijama su netoksičnost, biorazgradivost, lako izdvajanje iz reakcijskih smjesa i mogućnost recikliranja, nezapaljivost te velika dostupnost glicerola zahvaljujući proizvodnji biljnog ulja i biodizela u kojima nastaje i glicerol. Uz sve navedeno, prednost uporabe glicerola je njegova niska cijena, posebno glicerola tehničke čistoće. Usprkos brojnim prednostima uporabe glicerola kao otapala, ovaj spoj ima veliku viskoznost što otežava prijenos mase, nije pogodan za kompleksne katalizatore prijelaznih metala, a visoka kemijska reaktivnost hidrofilnih skupina ograničavaju njegovu uporabu otapala u kemijski inertnoj okolini (Gu i Jérôme, 2010).

### 2.2.2. Eutektička otapala

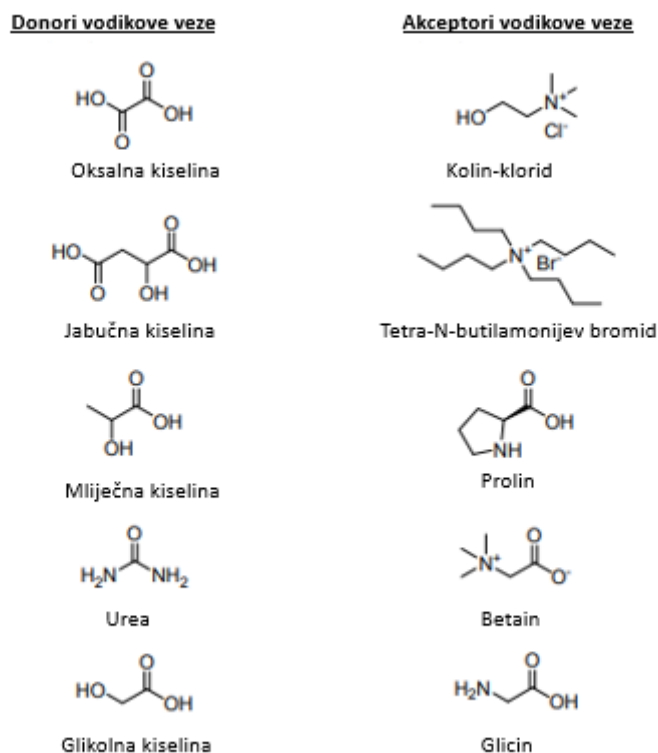
Nova, naprednija generacija zelenih otapala su eutektička otapala (*eng. Deep Eutectic Solvents, DES*). DES je smjesa dviju ili više čvrstih, ili tekućih komponenti, koje u određenom omjeru snižavaju visoku temperaturu tališta pa smjesa postaje tekućina pri sobnoj temperaturi i ima znatno niže talište od tališta pojedinih komponenata. Fazni dijagram opisane smjese prikazan je na slici 2. Za snižavanje temperature tališta smjese odgovorna je delokalizacija naboja koja se događa zbog stvaranja vodikovih veza uslijed pripreve DES-a kompleksiranjem između molekule akceptora vodika i molekule donora vodikove veze (Paiva i sur., 2014).



**Slika 2.** Fazni dijagram binarne smjese eutektičkog otapala (Smith i sur., 2014)

Kod pripreve DES-ova, akceptori vodikove veze, najčešće kvaterni amonijeve soli, ulaze u interakcije s metalnim ionima ili donorima vodikove veze, među kojima se ističe kolin-

klorid, te oni formiraju kompleks. Kolin-klorid je pogodan spoj za pripremu eutektičkih otapala zbog biorazgradivosti, male cijene i niske toksičnosti (Zhang i sur., 2012). Na slici 3 dat je prikaz spojeva koji se često koriste u pripravi DES-ova.



**Slika 3.** Strukture nekih donora i akceptora vodikove veze u pripravi eutektičkih otapala (Van Osch i sur., 2017)

Kada se kao komponente za pripremu eutektičkih otapala koriste primarni metaboliti organizama, kao što su aminokiseline, organske kiseline, derivati kolina ili šećeri, može se govoriti o prirodnim eutektičkim otapalima (*eng. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*), koji u potpunosti predstavljaju principe zelene kemije (Paiva i sur., 2014).

Priprava eutektičkog otapala ne odnosi se na kemijsku reakciju, već na formiranje vodikove veze između komponenti koje čine otapalo, i smatra se ekološki održivim procesom jer prilikom iste ne nastaje otpad, tj. atomska učinkovitost iznosi 100 % (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Ova zelena otapala pripremaju se iz smjese koncentrirane otopine u kojoj je otopljena svaka komponenta otapala. Također, mogu se pripremiti iz otopine jedne od komponenta otapala u kojoj je druga u disociranom obliku, dok je treći način pripreme iz čvrste smjese dviju komponenti zagrijavanjem do definirane temperature (Paiva i sur., 2014). Osim najčešće korištenog blagog zagrijavanja komponenti uz mogući prethodni dodatak vode, postupci

pripreve određenih DES-ova mogu se poboljšati primjenom liofilizacije, vakuum uparavanja, ultrazvuka i mikrovalova (Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Cvjetko Bubalo i sur. (2016) su objavili uspješnu pripravu otapala kolin-klorid : glukoza, molarnog omjera 1:1, uz dodatak 10 % vode istovremenom primjenom ultrazvuka i mikrovalova. U usporedbi s klasičnom metodom pripreve ovog otapala, vrijeme pripreve uz primjenu ultrazvuka i mikrovalova skraćeno je s 3 h na 25 min, dakle više od 7 puta.

Eutektička otapala razvijena su kao dio četvrte generacije ionskih kapljevina i karakteriziraju ih neka zajednička svojstva kao što su nehlapljivost, nezapaljivost i velika viskoznost. Nadalje, eutektička otapala se, kao i ionske kapljevine, ubrajaju u dizajnerska otapala zbog velikog broja mogućih struktura koje rezultiraju velikim brojem otapala različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Međutim, eutektička otapala su sigurnija za zdravlje i okoliš jer se temelje na spojevima koji su sigurni za uporabu. Osim niske toksičnosti, prednosti uporabe DES-ova su niska cijena sirovina i jednostavna priprava otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Zbog pozitivnih sigurnosnih, ekoloških i ekonomskih aspekta, DES-ovi su prikladni za primjenu u ekstrakcijskim postupcima (naročito za izolaciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala), biokatalizi, organskoj sintezi, elektrokemiji, kemiji materijala, biomedicini (Cvjetko Bubalo i sur., 2015; Zhang i sur., 2012).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Enzimski pripravak

Liofilizirana alkohol dehidrogenaza (ADH) izolirana iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD).

#### 3.1.2. Kemikalije

- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol (96 %, v/v), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilen-glikol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicin, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Glicerol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- NAD<sup>+</sup>, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- NADH, Alfa Aesar, Ward Hill, SAD
- Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev pirofosfat dekahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Tris baza, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Urea, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

#### 3.1.3. Pufferi i matične otopine

- Glicin-pirofosfatni puffer (pH=9)  
Priprema: Otopi se 8,34 g Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> • 10 H<sub>2</sub>O i 0,42 g glicina u 250 mL redestilirane vode te se podesi pH otopine 9 dodatkom 1 M otopine HCl.
- Tris-HCl puffer (pH=7,5)  
Priprema: Otopi se 60,57 g Tris baze u 350 mL deionizirane vode i pH vrijednost se podesi dodatkom 12 M otopine HCl. Nakon podešavanja pH odmjerna tikvica se dopuni deioniziranom vodom do 500 mL.

- PBS pufer (pH=7,1)  
Piprema: Otopi se 8,0 g natrijeva klorida, 0,2 g kalijeva klorida, 1,44 g dinatrijeva hidrogenfostata te 0,24 g kalijeva dihidrogenfosfata i u odmjerneji tikvici dopuni se destiliranom vodom do 1000 mL.
- Matične otopine NAD<sup>+</sup> ( $\gamma_{\text{NAD}^+} = 15 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $\gamma_{\text{NAD}^+} = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$ )
- Matična otopine NADH ( $\gamma_{\text{NADH}} = 15 \text{ mg mL}^{-1}$ )
- Matične otopine ADH ( $\gamma_{\text{ADH}} = 30 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $\gamma_{\text{ADH}} = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ )

### 3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Laboratorijska tresilica, KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerneji tikvice, menzure, kivete, tikvice s okruglim dnom, stalak za epruvete)
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikropipete (20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 1 mL, 5 mL )
- Spektrofluorimetar, Cary Eclipse, Varian, USA
- Multimetar pH/ion metar, S220, Mettler Toledo, Columbus, SAD
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYS™ 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprava eutektičkih otapala

Pripravljena su eutektička otapala (*eng. Deep Eutectic Solvents*, DES) s dva različita molarna omjera vode, za praćenje promjena u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze i stabilnosti nikotinamidnih koenzima, te eutektička otapala s dva različita masena udjela vode, za određivanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze. U tikvicu s okruglim dnom dodani su kolin-klorid, etilen-glikol/glicerol/urea i voda u količinama preračunatim iz molarnih omjera, komponenata, odnosno masenih udjela vode koji su navedeni u tablicama 3 i 4. Smjesa komponenata miješana je tijekom 2 sata na magnetnoj miješalici pri temperaturi 50 °C, nakon čega je dobiveno homogeno, prozirno i bezbojno eutektičko otapalo. Pomoću multimetra pH/ion metra izmjerene su pH vrijednost pri temperaturi od 25 °C.

**Tablica 3.** DES-ovi pripravljeni za određivanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze

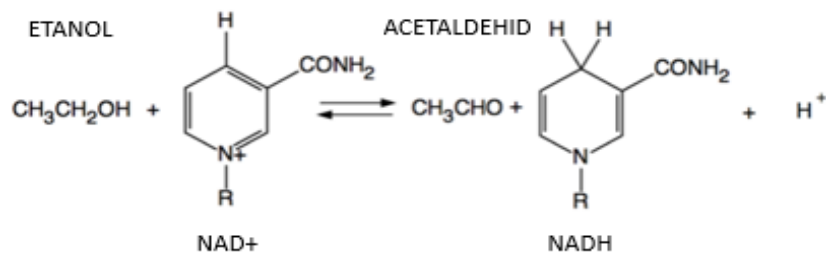
DES	Kratica	Molarni omjer komponenata	Maseni udio vode [%]
<b>Kolin-klorid : etilen-glikol</b>	ChEg40%	1:2	40
	ChEg80%	1:2	80
<b>Kolin-klorid : glicerol</b>	ChGly40%	1:2	40
	ChGly80%	1:2	80
<b>Kolin-klorid : urea</b>	ChU40%	1:2	40
	ChU80%	1:2	80

**Tablica 4.** DES-ovi pripravljeni za praćenje promjena u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze i stabilnosti nikotinamidnih koenzima

DES	Kratica	Molarni omjer komponenata
<b>Kolin-klorid : etilen-glikol : voda</b>	ChEg <sub>4</sub>	1:2:4
	ChEg <sub>8</sub>	1:2:8
<b>Kolin-klorid : glicerol : voda</b>	ChGly <sub>4</sub>	1:2:4
	ChGly <sub>8</sub>	1:2:8
<b>Kolin-klorid : urea : voda</b>	ChU <sub>4</sub>	1:2:4
	ChU <sub>8</sub>	1:2:8

### 3.2.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze

Aktivnost enzima ADH određivana je spektrofotometrijskim testom koji se temelji na reakciji oksidacije etanola u acetaldehid uz istovremenu redukciju NAD<sup>+</sup> u NADH u glicin-pirofosfatnom puferu pH vrijednosti 9 i u DES-ovima. Shematski prikaz reakcije dat je na slici 4.



**Slika 4.** Shema reakcije oksidacije etanola u acetaldehid katalizirane enzimom alkohol dehidrogenazom (Anonymous 2, 2017)

Spektrofotometrijski je mjerena promjena apsorbancije nastalog NADH pri  $\lambda = 338$  nm jer reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetlosti upravo te valne duljine, dok njegov oksidirani oblik (NAD<sup>+</sup>) u valnom području 300 – 400 nm ne apsorbira svjetlost.

Iz promjene apsorbancije u vremenu  $\Delta ABS/\Delta t$  izračuna se volumetrijska aktivnost enzima ADH prema izrazu [1]:

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

Gdje je:  $f$  – faktor razrjeđenja;  $V_r$  – volumen uzorka (cm<sup>3</sup>);  $V_u$  – ukupni volumen (cm<sup>3</sup>);  $\epsilon_{340}$  – ekstinkcijski koeficijent (cm<sup>2</sup> μm<sup>-1</sup>) koji iznosi 6,22 cm<sup>2</sup> μm<sup>-1</sup> za  $\lambda = 340$  nm;  $d$  – promjer kivete (cm).

Volumetrijska aktivnost je izražena u međunarodnoj jedinici enzimske aktivnosti U po jedinici volumena (U cm<sup>-3</sup>) pri čemu je 1 U = 1 μmol min<sup>-1</sup>.

Za test je u kivetu od 1 mL odpipetirano 19,8 μL EtOH (96 %, v/v), 10 μL otopine NAD<sup>+</sup> masene koncentracije 0,5 g mL<sup>-1</sup>, 950,2 μL otapala, tj. 75 mM glicin-pirofosfatnog pufera  $pH = 9$ , ili DES-a, te 20 μL suspenzije enzima masene koncentracije 0,4 mg mL<sup>-1</sup> da bi započela reakcija čiji se tijek prati na spektrofotometru.

### 3.2.3. Praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenaze primjenom spektrofluorimetrije

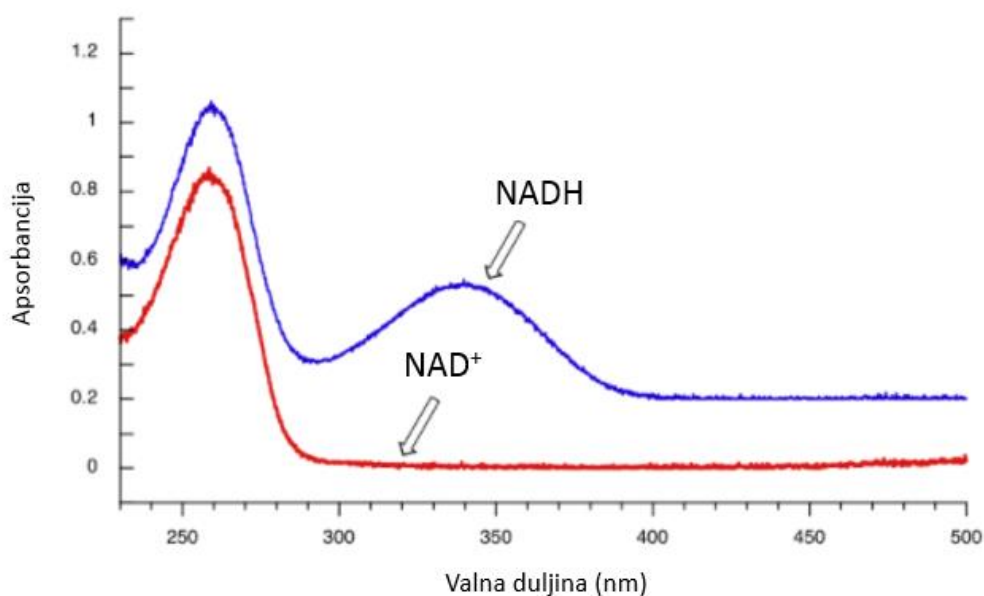
Za praćenje promjena u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze (ADH), pripremljena je matična otopina ADH, masene koncentracije 30 mg mL<sup>-1</sup>, u glicin-pirofosfatnom puferu. U 3 mL otapala, tj. glicin-pirofosfatnog pufera i svakog pripravljenog DES-a, dodano je 10 μL matične otopine ADH i uzorak je temperiran pri 25 °C, 5 minuta prije snimanja spektra.



Mjerenje je provedeno spektrofotometrijski pri temperaturi od 25 °C uz valnu duljinu pobuđivanja (ekscitacije)  $\lambda_{eks.} = 293$  nm i valnu duljinu emisije  $\lambda_{em.} = 300 - 400$  nm.

### 3.2.4. Praćenje stabilnosti koenzima NADH i NAD<sup>+</sup> primjenom spektrofotometrije

Za praćenje stabilnosti koenzima NADH i NAD<sup>+</sup>, pripremljene su matične otopine ovih molekula masene koncentracije 15 mg mL<sup>-1</sup> u referentnim puferima: otopina NADH u glicin-pirofosfatnom puferu, a otopina NAD<sup>+</sup> u PBS puferu. U 5 mL otapala, tj. PBS pufera za NAD<sup>+</sup>, glicin-pirofosfatnog i Tris-HCl pufera za NADH te svakog pripravljenog DES-a (tablica 4) za oba koenzima, dodano je 10  $\mu$ L matične otopine koenzima. Otopine su inkubirane tijekom 15 dana pri 4 °C. Promjene u apsorpcijskom spektru praćene su u rasponu od 250 nm do 400 nm; apsorpcijski maksimum za NADH očitavan je na valnim duljinama 262 nm i 338 nm, a za NAD<sup>+</sup> na 338 nm (slika 5).



**Slika 5.** Prikaz apsorpcijskih maksimuma koenzima NAD<sup>+</sup> i NADH (Anonymous 3, 2014)

S obzirom na to da su dobivene vrijednosti apsorbancije u korelaciji s topljivošću koenzima u različitim otapalima, radi lakše interpretacije rezultata, za svaki uzorak računa se vrijednost relativne apsorbancije u odnosu na apsorbanciju uzorka prije inkubacije.

Relativna apsorbancija uzorka na valnoj duljini od 262 nm ( $A_{262Rel}$ ), odnosno 338 nm ( $A_{338Rel}$ ) računa se prema izrazima [2] i [3]:

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

Gdje je:  $A_{262n}$  – izmjerena apsorbanacija uzorka na 262 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 4 °C;  $A_{262p}$  – izmjerena apsorbanacija uzorka na 262 prije inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 4 °C.

$$A_{338\text{Rel}} = \frac{A_{338n}}{A_{338p}} \quad [3]$$

Gdje je:  $A_{338n}$  – izmjerena apsorbanacija uzorka na 338 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 4 °C;  $A_{338p}$  – izmjerena apsorbanacija uzorka na 262 prije inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 4 °C.

Odstupanja vrijednosti apsorbanacije na 262 nm ( $\Delta_{262}$ ) i 338 nm ( $\Delta_{338}$ ) nakon 15 dana inkubacije u odnosu na početnu apsorbanaciju izražena u postocima (%) računaju se prema izrazima [4] i [5]:

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

Gdje je:  $A_{262;15}$  – apsorbanacija izmjerena na 262 nm nakon 15 dana inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 4 °C.

$$\Delta_{338} = (1 - A_{338;15}) \cdot (-100) \quad [5]$$

Gdje je:  $A_{338;15}$  – apsorbanacija izmjerena na 338 nm nakon 15 dana inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 4 °C.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Jedno od 12 načela koja su osnova procesima zelene kemije odnosi se na uporabu sigurnijih otapala i pomoćnih tvari te se istim naglašava da *uporabu pomoćnih kemijskih tvari (npr. otapala, sredstava za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće* (Jukić i sur., 2004). Anastas i Eghbali (2010) primjećuju da su otapala jedno od najistraživanijih područja vezanih uz koncept zelene kemije budući da masa otapala često čini većinu mase koja se troši u sintezama i procesima te, posljedično, otapala čine većinu industrijskog otpada. Otapala u skladu s načelima kemije trebala bi biti sigurna za ljudsko zdravlje i prihvatljiva za okoliš. Utjecajem na razvoj novih otapala, zelena kemija utječe i na biokatalizirane procese koji se odvijaju u istima (Xu i sur., 2017).

Aktivnost, stabilnost i selektivnost tri su osnovna svojstva kojima se karakterizira svaki katalizator, odnosno biokatalizator. Ukupna enzimska aktivnost uobičajeno se izražava jedinicama aktivnosti,  $U$ , za koje vrijedi:  $1 U \equiv 1 \mu\text{mol min}^{-1}$ . Osim ukupne aktivnosti važne su specifična aktivnost koja daje informacije o aktivnosti s obzirom na masu enzima te volumetrijska aktivnost koja opisuje enzimsku aktivnost po jedinici volumena. Stabilnost (bio)katalizatora opisana je kao aktivnost integrirana tijekom vremena i, uz selektivnost, iznimno je važna karakteristika za primjenu u procesima. Selektivnost enzima, naročito regio- i enantioselektivnost, nerijetko je veća u odnosu na selektivnost ostalih katalizatora, stoga su enzimi prikladni katalizatori za selektivne sinteze kemijskih vrsta koje sadrže kiralne centre ili različite funkcijske skupine (Bommarius i Riebel, 2004). De Carvalho (2011) ističe važnost proizvodnje enantiomerno čistih spojeva jer su isti bitni za proizvodnju kiralnih građevnih blokova, lijekova, agrokemikalija, prehrambenih aditiva i dr. Naime, postoje slučajevi u kojima je jedan enantiomer neaktivan te blokira biološki receptor na koji bi se trebao vezati aktivan izomer. Nadalje, neželjeni enantiomer neke molekule može biti toksičan, a postoje i primjeri enantiomera koji pokazuju različita farmakološka svojstva, tj. djeluju kao dva različita lijeka. Važnu ulogu u sintezi kiralnih spojeva imaju enzimi iz skupine dehidrogenaza s obzirom na to da imaju sposobnost kataliziranja redukcija prokiralnih molekula kao što su aldehidi i ketoni do odgovarajućih kiralnih alkohola (Gröger i sur., 2012; Šinko, 2005). Da bi dehidrogenaze mogle katalizirati reakcije, potrebni su im kofaktori, tj. koenzimi NAD(P)H, odnosno NAD(P)<sup>+</sup> (Grogan, 2012).

U ovom su radu, kao *zelenija* alternativa organskim otapalima i ionskim kapljevina, pripravljena različita eutektička otapala koja sadrže kolin-klorid. U pripremljenim otapalima ispitana je aktivnost te su primjenom spektroofluorimetrije praćene promjene u konformaciji

enzima alkohol dehidrogenaze. S obzirom na to da su dehidrogenaze ovisne o koenzimima, ispitana je stabilnost koenzima NADH i NAD<sup>+</sup> u istim eutektskim otapalima.

#### 4.1. Priprava eutektskih otapala

Jednostavnim miješanjem dviju komponenata uz dodatak vode u različitim molarnim omjerima, te masenim udjelima vode, pripravljena su različita eutektska otapala (*eng. Deep Eutectic Solvents, DES*). Komponente, odnosno molarni omjeri komponenata, maseni udjeli vode te izmjerene pH vrijednosti pripremljenih DES-ova prikazane u tablicama 5 i 6. Akceptor vodikove veze u pripremljenim otapalima je kolin-klorid, dok su kao donori vodikove veze korišteni etilen-glikol, glicerol i urea. Tijekom priprave DES-ova nije nastao otpad.

**Tablica 5.** DES-ovi pripremljeni za određivanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze s pripadajućim pH vrijednostima

DES	Kratica	Molarni omjer komponenata	Maseni udio vode [%]	pH vrijednost
<b>Kolin-klorid : etilen-glikol</b>	ChEg40%	1:2	40	8,5
	ChEg80%	1:2	80	7,8
<b>Kolin-klorid : glicerol</b>	ChGly40%	1:2	40	6,3
	ChGly80%	1:2	80	6,6
<b>Kolin-klorid : urea</b>	ChU40%	1:2	40	8,5
	ChU80%	1:2	80	7,9

**Tablica 6.** DES-ovi pripremljeni za praćenje promjena u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze i stabilnosti nikotinamidnih koenzima s pripadajućim pH vrijednostima

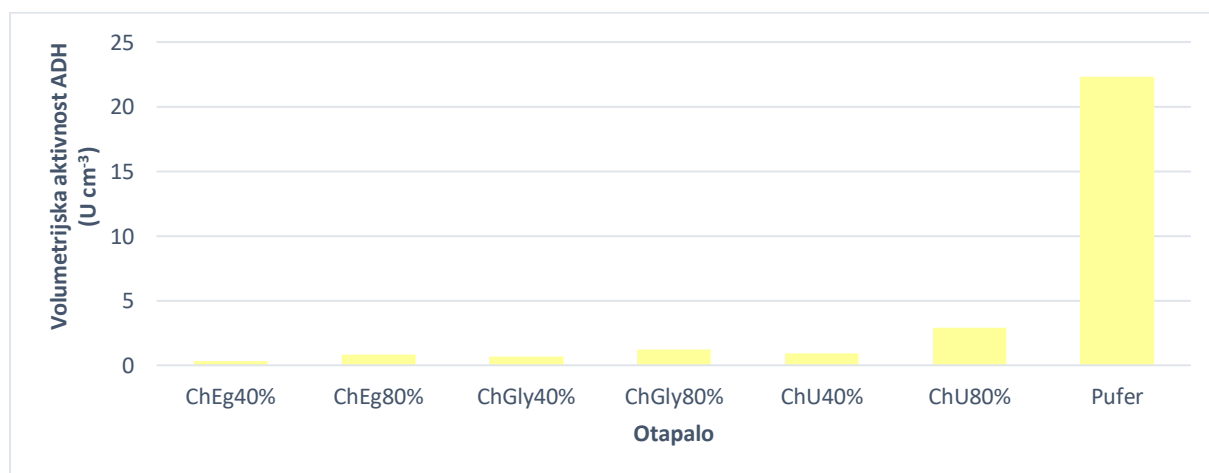
DES	Kratica	Molarni omjer komponenata	pH vrijednost
<b>Kolin-klorid : etilen-glikol : voda</b>	ChEg <sub>4</sub>	1:2:4	8,8
	ChEg <sub>8</sub>	1:2:8	8,2
<b>Kolin-klorid : glicerol : voda</b>	ChGly <sub>4</sub>	1:2:4	6,6
	ChGly <sub>8</sub>	1:2:8	6,5
<b>Kolin-klorid : urea : voda</b>	ChU <sub>4</sub>	1:2:4	8,4
	ChU <sub>8</sub>	1:2:8	8,1

## 4.2. Aktivnost alkohol dehidrogenaze u eutektičkim otapalima

Alkohol dehidrogenaze su podskupina enzima iz skupine dehidrogenaza koje kataliziraju reverzibilne redukcije aldehida, ketona,  $\alpha$ -,  $\beta$ - ili  $\omega$ -ketoestera do odgovarajućih hidroski spojeva, a tijekom navedenih redukcija oksidira se koenzim NAD(P)H koji je potrebno istovremeno regenerirati (Gröger i sur., 2012).

Radi određivanja aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH), iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, u različitim otapalima, provedena je oksidacija etanola u acetaldehid, koja se događa uz istovremenu redukciju koenzima  $\text{NAD}^+$  u NADH (slika 4), koja je praćena spektrofotometrijski. Provođenjem iste reakcije, Dabirmanesh i sur. (2011), proučavali su aktivnost ADH u različitim imidazolijevim ionskim kapljevinama, kao ekološki prihvatljivijim otapalima, u odnosu na tradicionalna organska otapala. U ovom radu se određuje aktivnost ADH u eutektičkim otapalima koje su, među zelenim otapalima, alternativa ionskim kapljevinama. Prednosti DES-ova kao otapala za biokatalizirane reakcije jesu niska cijena, biorazgradivost te biokompatibilnost, a postoje i primjeri enzima koji pokazuju visoku biokatalitičku aktivnost u istima, primjerice lipaze, među kojima se ističe industrijski važna lipaza iz kvasca *Candida antartica*, CalB (Paiva i sur., 2014).

Na slici 6 prikazane su izmjerene aktivnosti ADH u DES-ovima navedenima u tablici 5 te u glicin-pirofosfatnom puferu kao referentnom otapalu. Aktivnosti ADH u DES-ovim izrazito su niske i kreću se u rasponu  $0,3 - 2,9 \text{ U cm}^{-3}$ , dok je aktivnost u puferu značajno viša i iznosi  $22,3 \text{ U cm}^{-3}$ . Također je vidljivo da se povećanjem udjela vode u DES-ovima povećava i aktivnost enzima u istima što se može povezati sa smanjenjem viskoznosti otapala s odgovarajućim povećanjem udjela vode te povećanim kontaktom između supstrata i enzima (Xu i sur., 2017).



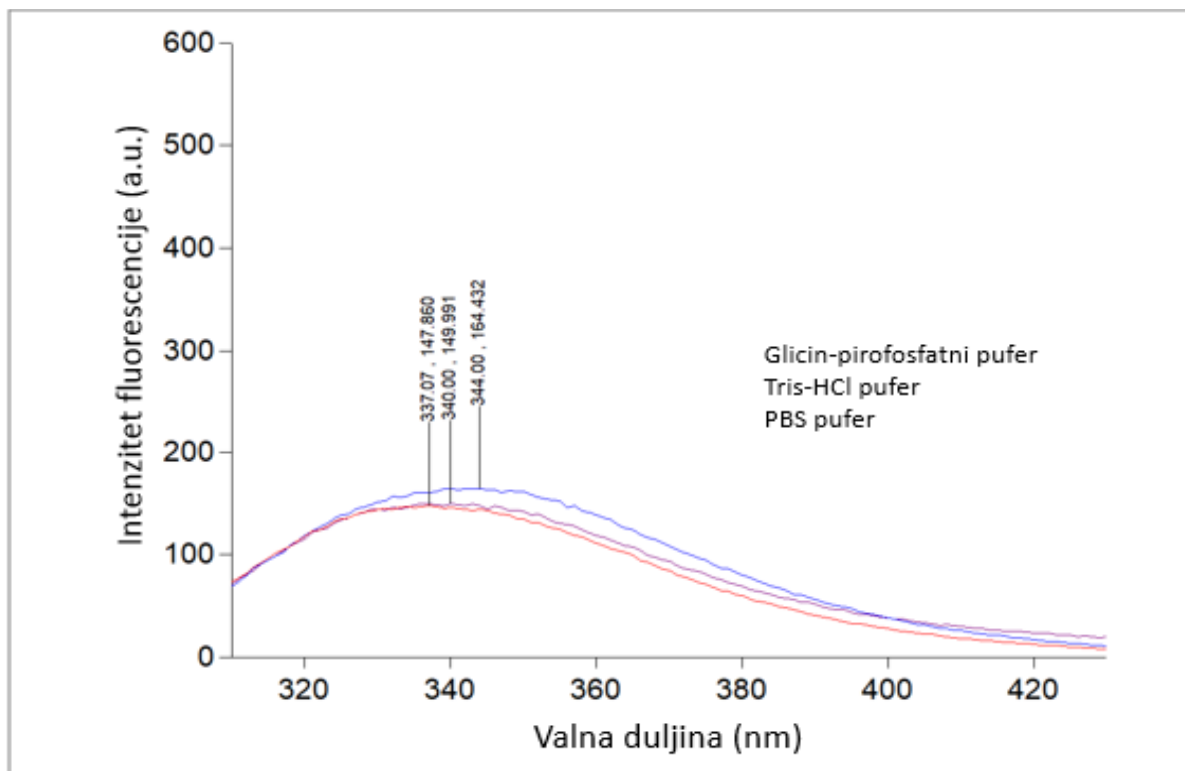
**Slika 6.** Volumetrijska aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze u različitim otapalima

### 4.3. Konformacijske promjene alkohol dehidrogenaze u eutektičkim otapalima

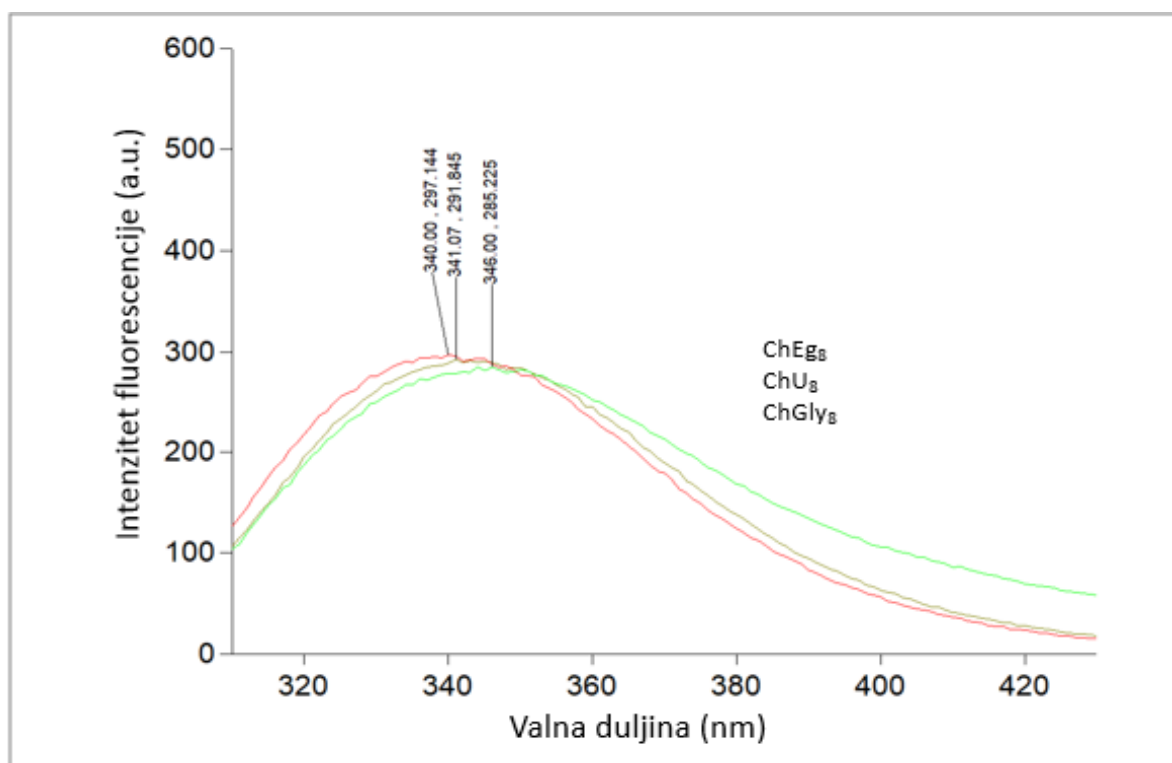
Promjene u konformaciji enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) praćene su primjenom spektrofluorimetrije. Ova se analitička metoda često koristi za proučavanje ponašanja proteina zbog visoke osjetljivosti. Unutarnji fluorofori u proteinima, tj. dijelovi molekule koji fluoresciraju, te tako omogućuju provedbu spektrofluorimetrije, su aromatski aminokiselinski ostaci: triptofan, tirozin i fenilalanin. Najčešće se snima spektar fluorescentne emisije triptofana zbog visoke osjetljivosti na promjene u lokalnom okruženju ove aminokiseline. Spektar fluorescentne emisije odnosi se na grafički prikaz intenziteta fluorescencije u ovisnosti o valnoj duljini. Promjenama u emisijskom spektru triptofana mogu se pratiti konformacijske promjene, povezivanje podjedinica, vezanje supstituenata ili denaturacija proteina. Općenito, emisijski spektri vrlo su varijabilni i ovise o kemijskoj strukturi fluorofora i otapala (Lakowicz, 2013). Aminokiselinski ostatak triptofana ima maksimum apsorpcije u području valnih duljina oko 280 nm, a maksimum emisije u području oko 340 nm. Promjene konformacije proteina mogu rezultirati pomacima emisijskih maksimuma triptofana prema manjoj (blue shift) ili većoj (red shift) valnoj duljini i promjenama u maksimalnom intenzitetu fluorescencije, pri čemu su obje vrste promjena vidljivih na spektru posljedica promjene polarosti mikrookoline fluorofora. Pomak maksimuma emisije prema manjim valnim duljinama događa se ukoliko se triptofanski ostatak nalazi *zakopan* unutar proteina u nativnoj formi, dok do pomaka prema većim valnim duljinama dolazi pri odmatanju proteina, odnosno kada triptofanski ostaci postaju izloženiji otapalu te formiraju vodikove veze (Jia i sur., 2014; Lakowicz, 2013). Visoki kvantni prinosi s obzirom na intenzitet fluorescencije opažaju se kada se protein nalazi u hidrofobnom okruženju, dok se niski intenzitet primjećuje u slučaju kada su triptofanski ostaci odmotanog proteina izloženi hidrofobnom okruženju (Misra, 2019). Intenzitet fluorescencije proteina također može biti smanjen uslijed specifičnog vezanja fluorofora s određenim molekulama, npr. koenzimima, supstratom ili analogima supstrata što dovodi do tzv. prigušivanja (*eng. quenching*) fluorescencije (Luisi i Favilla, 1970).

Na slici 7 prikazani su spektri fluorescencije enzima ADH u različitim puferima, dok su na slici 8 prikazani spektri fluorescencije ADH u DES-ovima. Iz rezultata se može očitati da su pomaci valnih duljina emisijskih maksimuma minimalni što ukazuje na to da se nisu dogodile značajne promjene u sekundarnoj strukturi proteina (Nian i sur., 2019), no vidljive su značajne razlike u intenzitetu fluorescencije u puferima i DES-ovima. Usporedbom ovih rezultata s izmjerenom aktivnošću enzima, koja je značajno viša u puferu nego u DES-ovima, zaključuje

se da u ispitanim DES-ovima dolazi do značajnijih konformacijskih promjena ADH koje se očituju u smanjenoj aktivnosti ovog enzima (slika 6).



**Slika 7.** Spektar fluorescencije ADH u puferima



**Slika 8.** Spektar fluorescencije ADH u DES-ovima

#### 4.4. Stabilnost koenzima NADH i NAD<sup>+</sup> u eutektskim otapalima

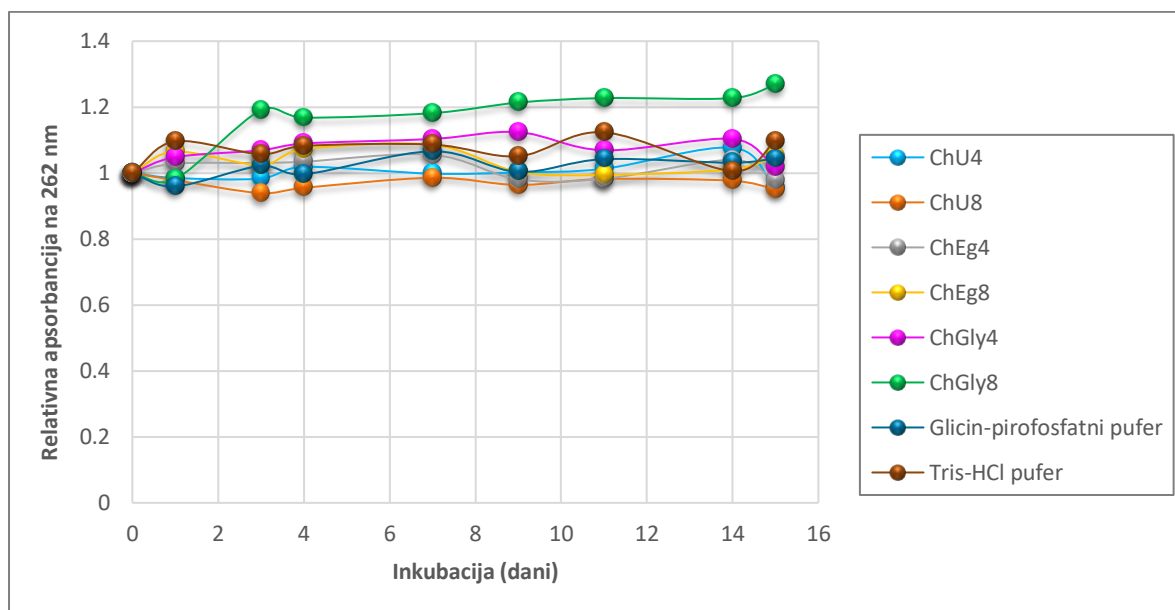
Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) važna je molekula koja sudjeluje u različitim biokemijskim reakcijama. Ima ulogu kofaktora, tj. koenzima u mnogim redoks reakcijama, bez kojeg se iste ne bi mogle odvijati, a sudjeluje i kao kosupstrat u brojnim važnim neredoks reakcijama, koje su dijelovi različitih signalnih i regulatornih putova u metabolizmu (Sorci i sur., 2010).

U biotransformacijskim procesima koenzimi se ili proizvode i recikliraju u mikroorganizmima, tj. stanicama koje su primijenjene kao biokatalizatori, ili dodaju izravno u reakcijsku smjesu, ukoliko se kao biokatalizatori koriste izolirani enzimi (Grogan, 2009). Stabilnost koenzima koji se dodaju u enzimске biotransformacijske procese u otapalima je važna radi pripreme stabilnih matičnih otopina za skladištenje koenzima, te za provođenje samih reakcija, kako ne bi došlo do degradacije koenzima. Rover Jr i sur. (1998) proveli su ispitivanje stabilnosti NADH u različitim uvjetima temperature, pH vrijednosti otopine u kojoj se koenzim nalazi i u različitim puferima, a rezultati su pokazali kako stabilnost NADH ovisi o svim mjerenim parametrima, a najvećim dijelom o vrsti pufera u kojem se nalazi. Izveden je zaključak da je NADH najstabilniji u uvjetima niske temperature, bazičnom mediju te u zwitterionskom puferu. Zhang i sur. (2018) ispitali su stabilnost NADH u različitim ionskim kapljevinama te uočili uspješnu stabilizaciju koenzima u onima čije su pH vrijednosti u neutralnim i bazičnim područjima, dok je značajna degradacija uočena u ionskim kapljevinama niskih pH vrijednosti. Nadalje, Fukazawa i Ishihara (2016), također su ispitali stabilnost sustava NADH i enzima laktat dehidrogenaze (LDH), uz dodatak vodotopljivih fosfolipidnih polimera. Kao rezultat, otkriveni su polimeri koji bez utjecaja na LDH mogu zarobiti inhibitore enzimске reakcije koji nastaju spontanom oksidacijom NADH tijekom skladištenja istog u sustavu s enzimom. Nastajanje inhibitora, tj. smanjenje stabilnosti NADH, praćeno je spektrofotometrijski.

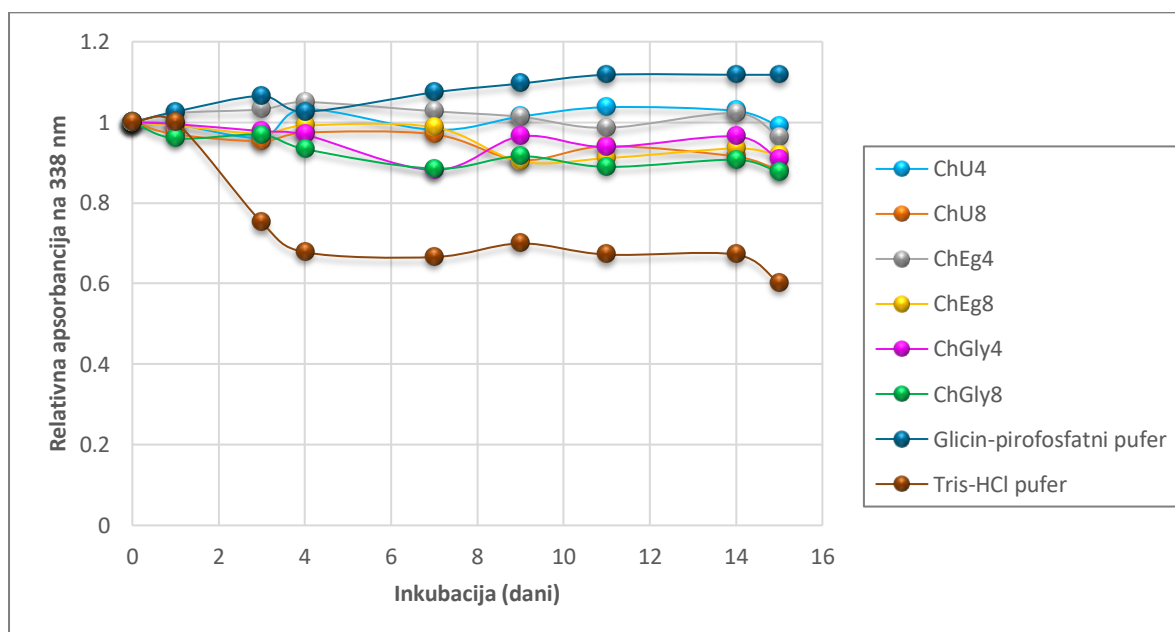
U ovom je radu ispitana stabilnost oksidiranog oblika, NAD<sup>+</sup>, te reduciranog oblika ovog koenzima, NADH, u DES-ovima navedenima u tablici 6. Stabilnost ovih koenzima praćena je spektrofotometrijski na valnim duljinama na kojima se postiže apsorpcijski maksimum karakterističnih grupa u molekuli koje apsorbiraju zračenje. Adeninski dio molekula NAD<sup>+</sup> i NADH najviše zračenja apsorbira na 260 nm, dok piridinski prsten molekule NADH apsorbira na 340 nm (Rover Jr. i sur., 1998), stoga su i spektrofotometrijska mjerenja za ove molekule provedena na bliskim valnim duljinama: na 262 nm i 338 nm za NADH, odnosno na 338 nm za NAD<sup>+</sup>.



Slike 9 – 12 prikazuju su rezultate praćenja stabilnosti NADH na 262 nm i 338 nm.



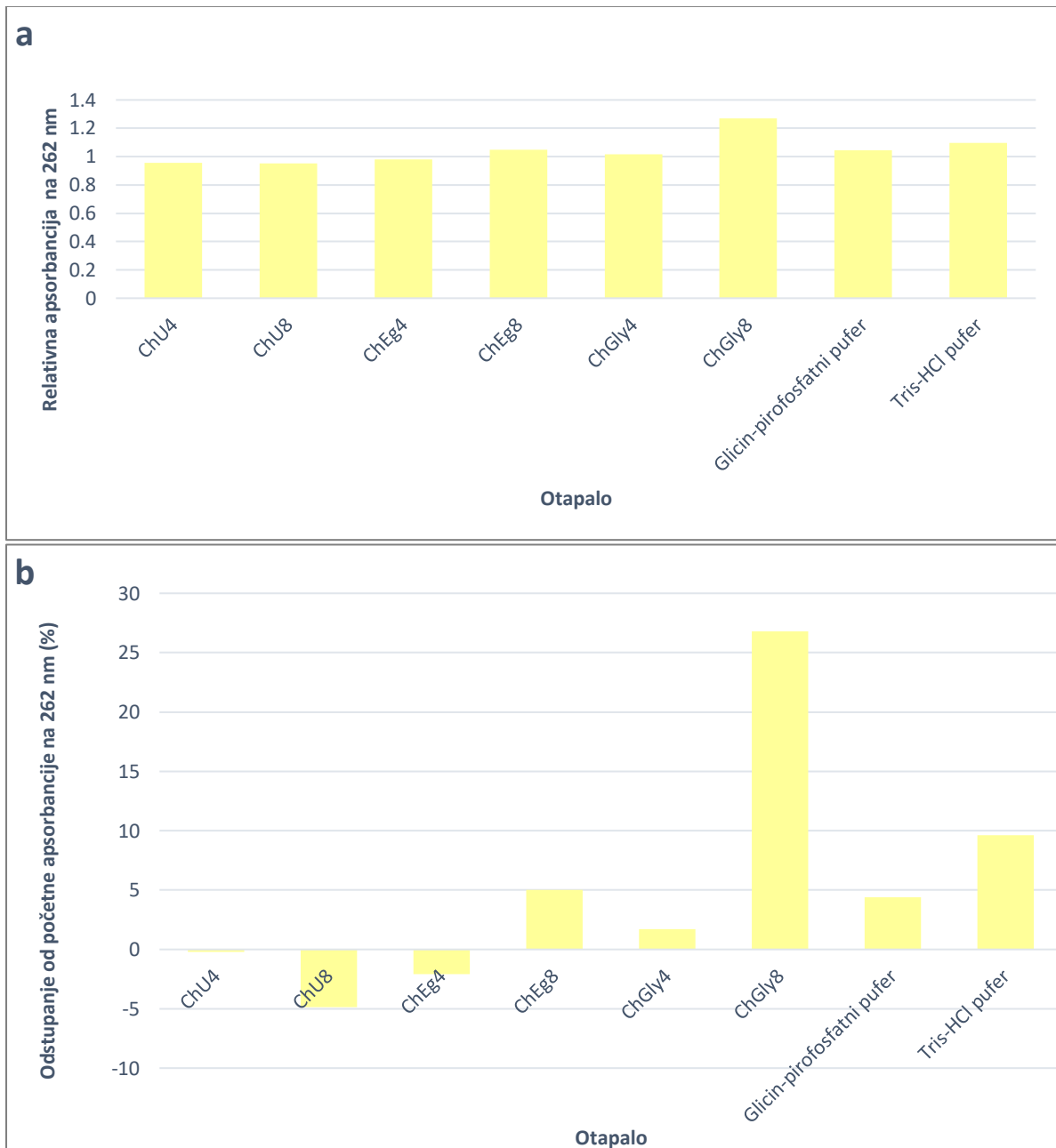
**Slika 9.** Relativna apsorbanca na 262 nm tijekom 15 dana inkubacije NADH u različitim otapalima pri 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=2).



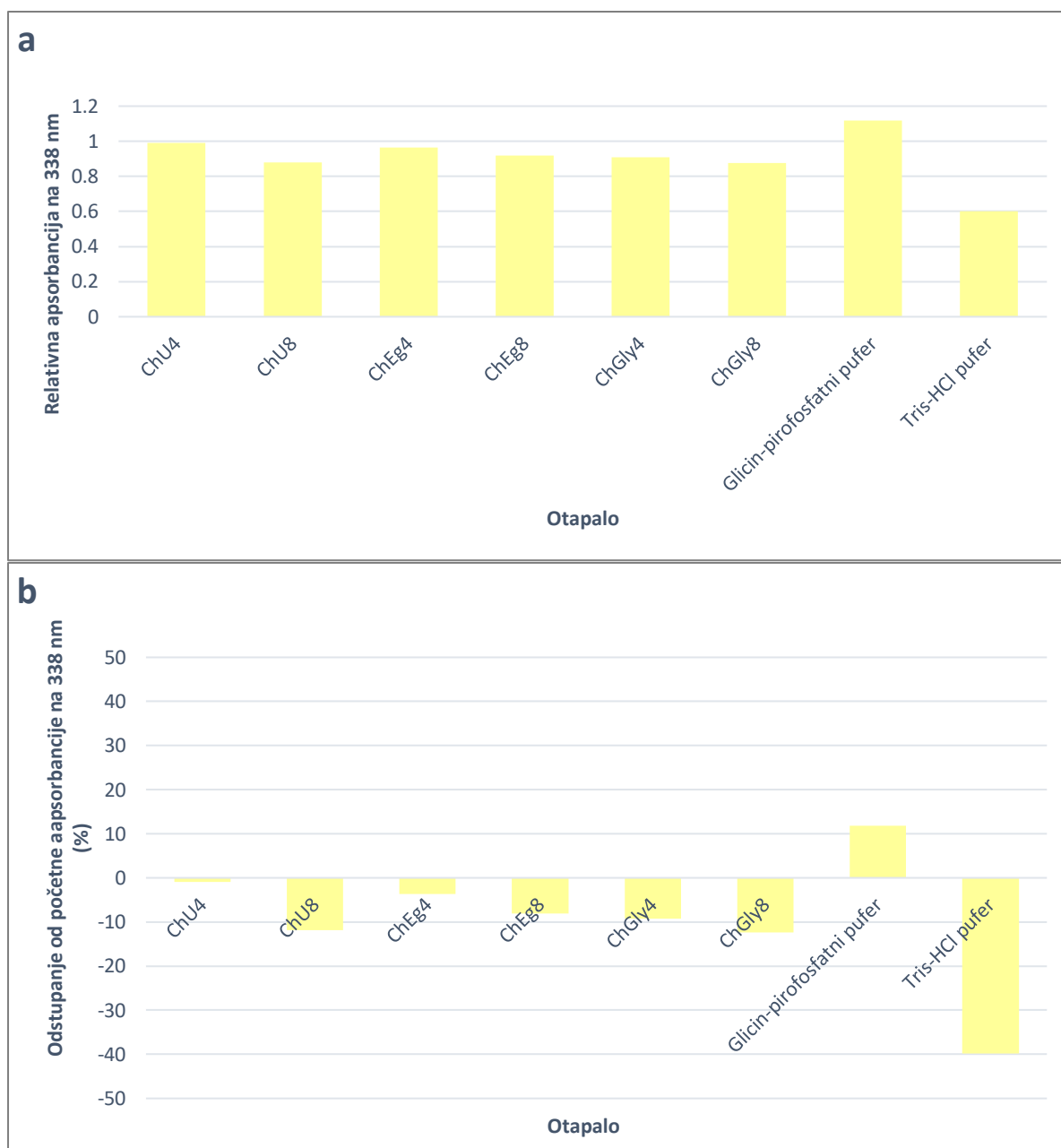
**Slika 10.** Relativna apsorbanca na 338 nm tijekom 15 dana inkubacije NADH u različitim otapalima pri 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=2).

Iz rezultata promjene relativne apsorbancije po danima inkubacije, koji su prikazani na slikama 9 i 10, može se primijetiti da već nakon 3 dana inkubacije NADH u Tris-HCl puferu dolazi do značajnije promjene apsorbancije na 338 nm, što se može povezati sa degradacijom koenzima. Također, do veće promjene apsorbancije na 262 nm dolazi i u uzorku koenzima

otopljenog u otapalu ChGly<sub>8</sub>. Apsorbancije uzoraka u kojima se kao otapala koriste ostali DES-ovi mijenjaju se sporije što ukazuje na to da su povoljnija za skladištenje NADH.



**Slika 11. a)** Relativna apsorbancija na 262 nm nakon 15 dana inkubacije NADH u različitim otapalima pri 4 °C, **b)** Odstupanje (%) od početne apsorbancije na 262 nm nakon 15 dana inkubacije NADH u različitim otapalima pri 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=2).

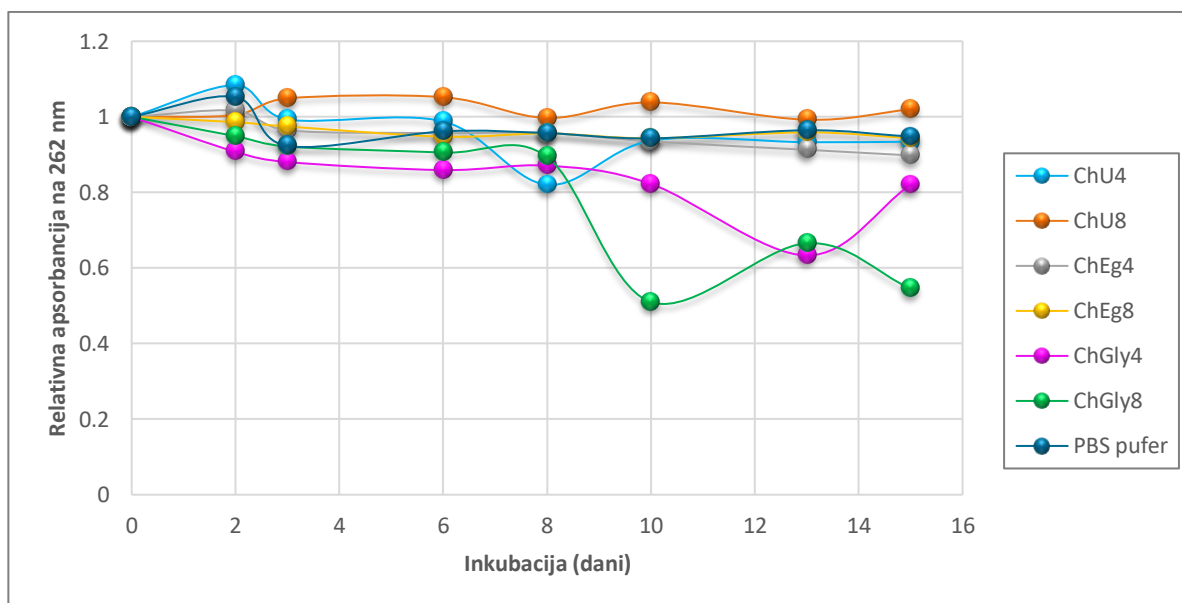


**Slika 12. a)** Relativna apsorbanca na 338 nm nakon 15 dana inkubacije NADH u različitim otapalima pri 4 °C, **b)** Odstupanje (%) od početne apsorbanje na 338 nm nakon 15 dana inkubacije NADH u različitim otapalima pri 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=2).

Na slici 11 vidljivo je da relativnu apsorbanciju najbližu vrijednosti 1, odnosno najveće odstupanje od početne vrijednosti apsorbanje, na 262 nm nakon 15 dana inkubacije, pokazuju uzorci u otapalima ChGly<sub>8</sub> i Tris-HCl. Najveću vrijednost odstupanja od početne apsorbanje na 338 nm pokazuje uzorak NADH u Tris-HCl puferu što je vidljivo na slici 12. Primjećuje se da su odstupanja od početne vrijednosti apsorbanje na 262 nm uglavnom pozitivna (slika 11b), dok su na 338 nm negativna (slika 12b). Povećanje apsorbanje na

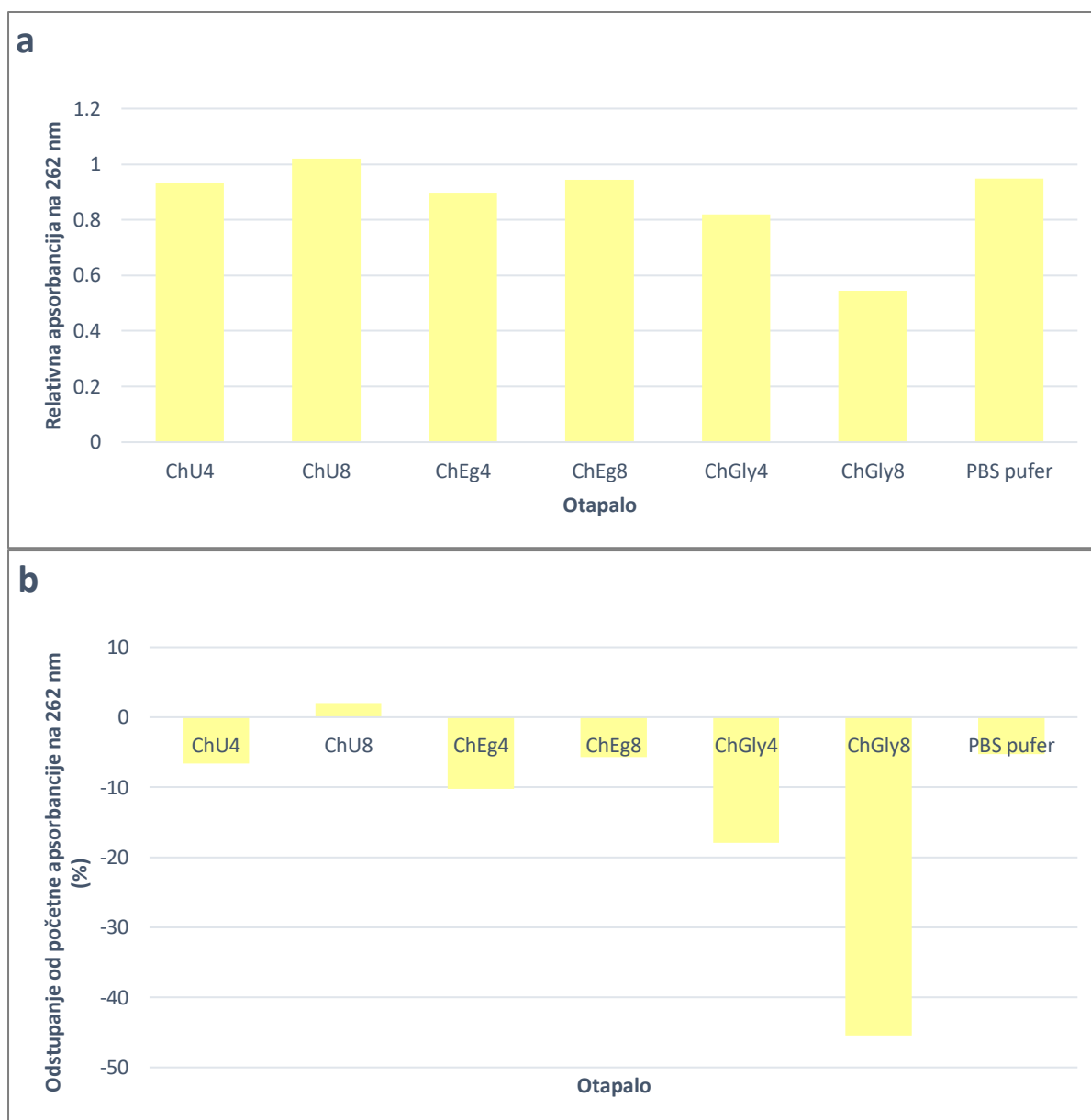
262 nm te smanjenje na 338 nm tijekom degradacije reduciranog oblika koenzima u skladu su s podacima preuzetim iz literature (Fukazawa i Ishihara, 2016; Rover Jr. i sur., 1998). Najmanje odstupanje na obje valne duljine, 0,2 % na 262 nm i 0,9 % na 338 nm, ima uzorak NADH u otapalu ChU<sub>4</sub>, što ukazuje da je degradacija koenzima u navedenom otapalu najmanja. Prema tome, ChU<sub>4</sub> je najpovoljniji DES za skladištenje NADH među ispitivanima, a drugi najpovoljniji je ChEG<sub>4</sub> (slike 11 i 12). Opažena bolja stabilizacija NADH u glicin-pirofosfatnom puferu pH=9, u odnosu na pufer Tris-HCl pH=7,5, te bolja stabilizacija koenzima u blago lužnatim DES-ovima koji sadrže ureu i etilen-glikol, nego u blago kiselim DES-ovima koji sadrže glicerol, također se podudara s literaturnim podacima, prema kojima lužnato okruženje stabilizira molekulu NADH (Rover Jr. i sur., 1998).

Rezultati spektrofotometrijskog praćenja stabilnosti oksidiranog oblika koenzima, NAD<sup>+</sup>, u DES-ovima i PBS puferu prikazani su na slikama 13 i 14.



**Slika 13.** Relativna apsorbancija na 262 nm tijekom 15 dana inkubacije NAD<sup>+</sup> u različitim otapalima pri 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=2).

Na temelju rezultata prikazanih na slici 10 opaža se da se kroz 15 dana inkubacije vrijednosti apsorbancija uzoraka NAD<sup>+</sup> u različitim DES-ovima i puferu pretežno postupno i polako mijenjaju, osim u DES-ovima koji sadrže glicerol, gdje su vidljive veće promjene u vrijednostima istih.

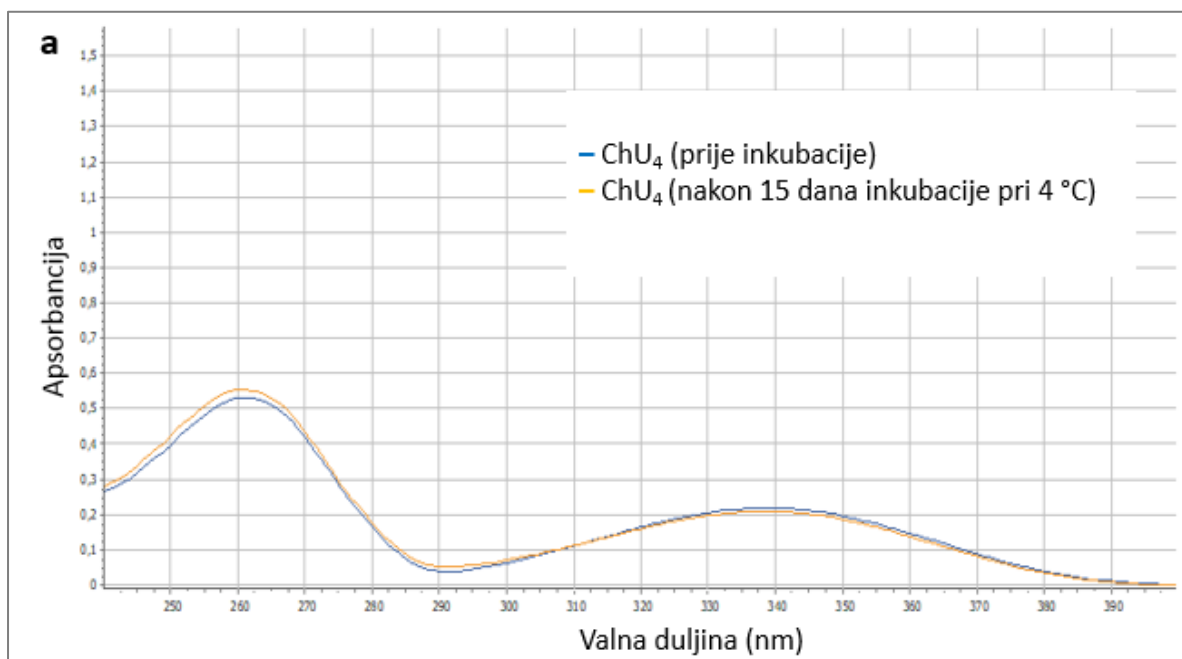


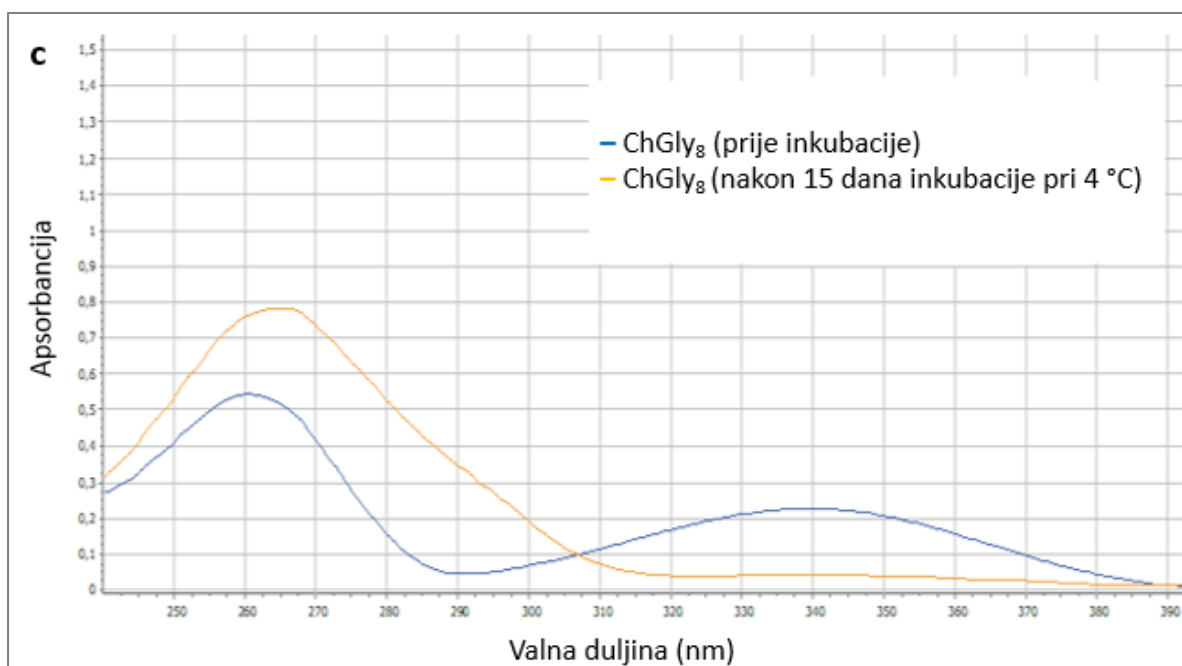
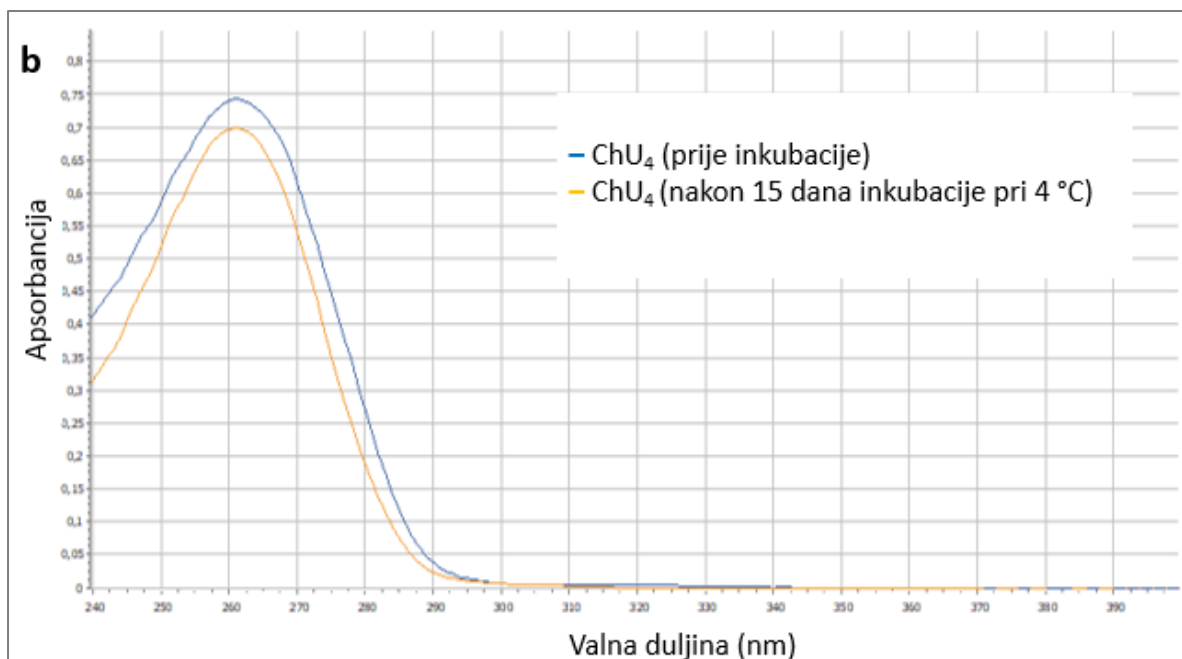
**Slika 14. a)** Relativna apsorbanija na 262 nm nakon 15 dana inkubacije NAD<sup>+</sup> u različitim otapalima pri 4 °C, **b)** Odstupanje (%) od početne apsorbanije na 262 nm nakon 15 dana inkubacije NAD<sup>+</sup> u različitim otapalima pri 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (n=2).

Da je NAD<sup>+</sup> najmanje stabilan u DES-ovima koji sadrže glicerol, vidljivo je i na slici 14a i 14b, iz koje se može očitati da je u 15 dana došlo do degradacije čak 45 % koenzima prema odstupanju od apsorbanije izmjerene neposredno prije početka inkubacije. Prema uputama proizvođača koenzima (Sigma-Aldrich), NAD<sup>+</sup> bi trebao biti stabilan u blago kiselim ili neutralnim uvjetima, a najmanja stabilnost opažena upravo pri DES-ovima s glicerolom koji su blago kiseli, ukazuje da pH nije glavni čimbenik koji utječe na stabilnost ovog enzima u ispitanim DES-ovima. PBS pufer pokazao se kao pogodno otapalo za NAD<sup>+</sup> s ukupnom

promjenom apsorbancije od 5,2 %, a i odstupanja u ostalim ispitivanim DES-ovima iznose manje od 20 %, pri čemu su najmanja u uzorcima s otapalima u kojima su donori vodikove veze urea i etilen-glikol. Među navedenim najpogodnijim DES-ovima za održavanje stabilnosti  $\text{NAD}^+$ , oni koji sadrže veći udio vode pokazali su manje odstupanje od početne apsorbancije, tj. relativnu apsorbanciju bližu vrijednosti 1. Kao najpovoljnije otapalo za stabilizaciju  $\text{NAD}^+$  pokazalo se eutektičko otapalo  $\text{ChU}_8$  koje nakon 15 dana inkubacije pokazuje samo 2 % odstupanja apsorbancije u odnosu na početnu vrijednost.

Dobra stabilizacija nikotinamidnih koenzima popraćena je minimalnim promjenama u apsorpcijskom spektru (slika 15a i 15b), dok se loša stabilizacija koenzima očituje u značajnim promjenama u apsorpcijskom spektru koenzima nakon 15 dana inkubacije pri temperaturi od 4 °C (slika 15c). Budući da je za provođenje oksidoredukcijskih reakcija poželjna stabilnost i oksidiranog i reduciranog oblika nikotinamidnog koenzima, kao najbolji su se pokazali DES-ovi na bazi kolin-klorida koji sadrže ureu kao donora vodikove veze, jer dobro stabiliziraju oba oblika koenzima. Eutektička otapala na bazi kolin-klorida s glicerolom u sastavu najlošije stabiliziraju i  $\text{NADH}$  i  $\text{NAD}^+$ .





**Slika 15.** Promjene u apsorpcijskim spektrima koenzima **a)** NADH nakon 15 dana inkubacije u ChU<sub>4</sub> pri 4°C, **b)** NAD<sup>+</sup> nakon 15 dana inkubacije u ChU<sub>4</sub> pri 4°C, **c)** NADH nakon 15 dana inkubacije u ChGly<sub>8</sub> pri 4°C.

## 5. ZAKLJUČCI

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

- 1) Priprava eutektičkih otapala jednostavan je postupak tijekom kojeg ne nastaje otpad.
- 2) Volumetrijska aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze viša je u eutektičkim otapalima s 80 % vode u odnosu na ista s 40 % vode, no u svim je pripremljenim eutektičkim otapalima značajno niža nego u referentnom puferu, stoga niti jedno od istih nije povoljan medij za provođenje reakcije ovog enzima.
- 3) Razlike u spektrima fluorescencije alkohol dehidrogenaze u eutektičkim otapalima i puferima ukazuju na promjenu konformacije enzima u eutektičkim otapalima koja se očituje u smanjenoj enzimskoj aktivnosti.
- 4) Eutektička otapala na bazi kolin-klorida s ureom u sastavu najbolje stabiliziraju i oksidirani i reducirani oblik nikotinamidnog koenzima.
- 5) Eutektička otapala na bazi kolin-klorida s glicerolom u sastavu rezultirala su najlošijom stabilizacijom NADH/NAD<sup>+</sup>.



## 6. LITERATURA

Anastas P., Eghbali N. (2010) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**: 301 – 312.

Anonymous 1 Creative enzymes – Translocase Introduction, <[https://www.creative-enzymes.com/resource/Translocase-Introduction\\_42.html](https://www.creative-enzymes.com/resource/Translocase-Introduction_42.html)> Pristupljeno 5. kolovoza 2020.

Anonymous 2 (2017) School of Biomedical Sciences Wiki – Alcohol dehydrogenase, <[https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/index.php/Alcohol\\_dehydrogenase](https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/index.php/Alcohol_dehydrogenase)> Pristupljeno 24. srpnja 2020.

Anonymous 3 (2014) Chemistry LibreTexts – Ultraviolet and Visible Spectroscopy <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Bruice\)/13%3A\\_Mass\\_Spectrometry%2C\\_Infrared\\_Spectroscopy%2C\\_and\\_Ultraviolet/13.01%3A\\_Mass\\_Spectrometry%2C\\_Infrared\\_Spectroscopy%2C\\_and\\_Ultraviolet/Visible\\_Spectroscopy/13.1.17%3A\\_Ultraviolet\\_and\\_Visible\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Bruice)/13%3A_Mass_Spectrometry%2C_Infrared_Spectroscopy%2C_and_Ultraviolet/13.01%3A_Mass_Spectrometry%2C_Infrared_Spectroscopy%2C_and_Ultraviolet/Visible_Spectroscopy/13.1.17%3A_Ultraviolet_and_Visible_Spectroscopy)> Pristupljeno 16. kolovoza 2020.

Bommarius A. S., Riebel B. R. (2004) Biocatalysis, 1. izd., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. str. 1 – 15; 30 – 32.

Brunner G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* **67**: 21 – 33.

Cvjetko Bubalo M., Panić M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. (2016) Metode pripreve eutektičkih otapala. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 164 – 168.

Cvjetko Bubalo M., Radošević K., Radojčić Redovniković I., Halambek J., Gaurina Srček V. (2014) Ionske kapljevine – razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem. Ind.* **63**: 163 – 171.

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

Dabirmanesh B., Khajeh K., Akbari J., Falahati H., Daneshjoo S., Heydari A. (2011) Mesophilic alcohol dehydrogenase behavior in imidazolium based ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids* **161**: 139 – 143.

De Carvalho, C. C. C. R. (2011) Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnology Advances* **29**: 75 – 83.

- Faber K. (2004) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 7. izd., Springer. str. 1 – 26.
- Fukazawa K., Ishihara K. (2016) Enhanced stability of NADH/dehydrogenase mixture system by water-soluble phospholipid polymers. *Biomaterials and Biomechanics in Bioengineering* **3**: 37 – 46.
- Ghisalba O., Meyer H.P., Wohlgemuth R. (2010) Industrial biotransformation. U: *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*, 1. izd., Flickinger M.C., ur., John Wiley & Sons, Ltd. str. 1 – 18.
- Goldberg K., Schroer K., Lütz S., Liese A. (2007) Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Applied microbiology and biotechnology* **76**: 237 – 248.
- Grogan G. (2009) *Practical Biotransformations: A Beginner's Guide*, 1. izd., A John Wiley and Sons, Ltd. str. 3 – 25; 38 – 40.
- Gröger H., Asano Y. (2012) Introduction – Principles and Historical Landmarks of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. U: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Volume 1*, 3. izd., Drauz K., Gröger H., May O., ur., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. str. 3 – 41.
- Gröger H., Hummel W., Borchert S., Krauß M. (2012) Reduction of Ketones and Aldehydes to Alcohols. U: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Volume 1*, 3. izd., Drauz K., Gröger H., May O., ur., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. str. 1037 – 1039; 1049 – 1050.
- Gu Y., Jérôme F. (2010) Glycerol as a sustainable solvent for green chemistry. *Green Chemistry* **12**: 1127 – 1138.
- Holland H. L. (2002) Biocatalysis. U: *Handbook of Green Chemistry and Technology*, 1. izd., Clark J., Macquarrie D., ur., Blackwell Science Ltd. str. 188.
- Hou Y. C., Yao C. F., Wu W. Z. (2018) Deep eutectic solvents: Green solvents for separation applications. *Acta Phys. Chim. Sin.* **34**: 873 – 885.
- Jia R., Hu Y., Huang, H. (2014) Improving the catalytic performance of porcine pancreatic lipase in the presence of [MMIm][MeSO<sub>4</sub>] with the modification of functional ionic liquids. *Process Biochemistry* **49**: 668 – 672.
- Johannes T., Simurdiak M. R., Zhao H. (2006) Biocatalysis. U: *Encyclopedia of Chemical Processing*, 2. izd., Lee S., ur., Taylor & Francis. str. 101 – 110.

Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Vorkapić-Furač J. (2004) "Zelena" kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima. *Kem. Ind.* **53**: 217 – 224.

Kataoka M., Kita K., Wada M., Yasohara Y., Hasegawa J., Shimizu S. (2003) Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 437 – 445.

Lakowicz J. R. (2013) Principles of Fluorescence Spectroscopy, 4.izd., Springer. str. 1 – 3; 530 – 534.

Lancaster M. (2002) Principles of Sustainable and Green Chemistry. U: Handbook of Green Chemistry and Technology, 1. izd., Clark J., Macquarrie D., ur., Blackwell Science Ltd. str. 10 – 25.

Luisi P. L., Favilla R. (1970) Tryptophan fluorescence quenching in horse liver alcohol dehydrogenase. *European journal of biochemistry* **17**: 91 – 94.

Milner S. E., Maguire A. R. (2012) Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. *Arkivoc* **2012**: 321 – 382.

Misra G. (2019) Fluorescence spectroscopy. U: Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources, 1. izd., Misra G., ur., Academic Press. str. 31 – 37.

Muñoz Solano D., Hoyos P., Hernáiz M. J., Alcántara A. R., Sánchez-Montero J. M. (2012) Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology* **115**: 196 – 207.

Nestl B. M., Nebel B. A., Hauer, B. (2011) Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **15**: 187 – 193.

Nian B., Cao C., Liu Y. (2019) How *Candida antarctica* lipase B can be activated in natural deep eutectic solvents: experimental and molecular dynamics studies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **95**: 86 – 93.

Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**: 1063 – 1071.

Rover Jr L., Fernandes J. C., de Oliveira Neto G., Kubota L. T., Katekawa E., Serrano S. H. (1998) Study of NADH stability using ultraviolet–visible spectrophotometric analysis and factorial design. *Analytical biochemistry* **260**: 50 – 55.

Sigma-Aldrich  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide – Product information <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/n8285pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n8285pis.pdf)> Pristupljeno 20. kolovoza 2020.

Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews* **114**: 11060 – 11082.

Sorci L., Kurnasov O., Rodionov D. A., Osterman A. L. (2010) Genomics and Enzymology of NAD Biosynthesis. U: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Volume 7, 1. izd., Mander L., Liu. H.-W., ur., Elsevier Science. str. 213.

Straathof A. J., Panke S., Schmid A. (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Current opinion in biotechnology* **13**: 548 – 556.

Šinko G. (2005) Enzimske i proteinske metode u pripravi enantiomerno čistih kiralnih spojeva i svojstva nekih biološki aktivnih enantiomera. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **56**: 351 – 361.

Van Osch D. J. G. P., Kollau L. J. B. M., van den Bruinhorst A., Asikainen S., Rocha M. A. A., Kroon M. C. (2017) Ionic liquids and deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass fractionation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **19**: 2636 – 2665.

Vasić-Rački, Đ. (2006) History of industrial biotransformations—dreams and realities. U: *Industrial biotransformations*, 2. izd., Liese A., Seelbach K., Wandrey K., ur., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. str. 1 – 36.

Xu P., Zheng G. W., Zong M. H., Li N., Lou W. Y. (2017) Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresources and bioprocessing* **4**: 34.

Zhang Q., De Oliveira Vigier K., Royer S., Jérôme F. (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**: 7108 – 7146.

Zhang Z., Xu B., Luo J., Solms N., He H., Zhang Y., Pinelo M., Zhang S. (2018) Ionic Liquids as Bifunctional Cosolvents Enhanced CO<sub>2</sub> Conversion Catalysed by NADH-Dependent Formate Dehydrogenase. *Catalysts* **8**: 304.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Marija Biskup

---

ime i prezime studenta