

Utjecaj eutektičkih otapala na reakcije katalizirane alkohol dehidrogenazom

Martinuš, Tihana

Master's thesis / Diplomski 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:159:772717>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2020.

Tihana Martinuš

1317/MB

**UTJECAJ EUTEKTIČKIH
OTAPALA NA REAKCIJE
KATALIZIRANE ALKOHOL
DEHIDROGENAZOM**

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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost (br. 7712) pod nazivom „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Marini Cvjetko Bubalo na prenesenom znanju i pomoći te uloženom trudu i vremenu prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala i dr.sc. Manueli Panić na nesebičnoj pomoći i brojnim korisnim savjetima tijekom vremena provedenog u Laboratoriju.

Iznimnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji i prijateljicama koji su mi bili najveća podrška tijekom mog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ EUTEKTIČKIH OTAPALA NA REAKCIJE KATALIZIRANE ALKOHOL DEHIDROGENAZOM

Tihana Martinuš, 1317/MB

Sažetak: Porastom ekološke svijesti i interesa za vođenjem biokatalitičkih procesa koji rezultiraju većom produktivnošću i smanjenom količinom štetnog otpada, znanstvenici se okreću razvoju eutektičkih otapala kao nove generacije ekološki prihvatljivih otapala. U ovome radu ispitana je aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze u eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida i betaina te promjene u konformaciji istog. Otapala s betainom kao akceptorom vodika pokazala su najmanje konformacijske promjene enzima u odnosu na pufer kao referentno otapalo, a ista otapala pokazala su se povoljnima i za njegovu aktivnost. Zbog potrebe enzima za koenzimom, u istim otapalima ispitana je i stabilnost koenzima NADH i NAD^+ nakon čega je potvrđen stabilizirajući utjecaj eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida sa ureom i etilen glikolom kao donorima vodika. Kako bi se provjerila mogućnost odvijanja reakcije redukcije katalizirane cijelim stanicama, provedena je asimetrična redukcija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirana stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Reakcija je provedena u eutektičkom otapalu betain:etilen-glikol (u molarnom omjeru 1:2) koji se pokazao kao povoljno eutektičko otapalo u kojemu nastaje (S)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol, vrijedan farmaceutski proizvod važan u sintezi antitrombotika Brilique koji se koristi za potrebe liječenja koronarnog sindroma.

Ključne riječi: eutektička otapala, biotransformacije, alkohol dehidrogenaza, koenzimi, redukcija, 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanon

Rad sadrži: 65 stranica, 27 slika, 4 tablice, 39 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo

Pomoć pri izradi: Dr.sc. Manuela Panić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Red.prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo
3. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
4. Doc.dr.sc. Davor Valinger (zamjena)

Datum obrane: 06. studenoga 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Culture Technology and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

INFLUENCE OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS ON REACTIONS CATALYZED BY ALCOHOL DEHYDROGENASE

Tihana Martinuš, 1317/MB

Abstract: *Because of increased environmental awareness and interest in biocatalytic processes with higher productivity and reduced amounts of hazardous waste, scientists work hard to develop deep eutectic solvents (DES) as a new generation of ecology acceptable solvents. In this study, the activity of ADH and changes in its conformation in DES based on betaine and choline chloride were investigated. DES with betaine as a hydrogen acceptor showed the least conformational changes of the enzyme compared to the buffer and the same solvents proved to be favorable for its activity. Due to the need of the enzyme for coenzyme, the stability of coenzymes NADH and NAD⁺ was examined in DES with betaine and choline chloride and the stabilizing effect of DES based on choline chloride with urea and ethylene glycol as hydrogen donors was confirmed. An asymmetric reduction of 2-chloro-1-(3,4-difluoro-phenyl)ethanone catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* was also performed to see if whole cells could catalyse this reaction. The reaction was carried out in DES betaine ethylene glycol (molar ratio of 1:2) which have been shown to be preferred choice for this reduction. As a product, (S)-2-chloro-1-(3,4-difluorophenyl)ethanol, a valuable pharmaceutical product was formed.*

Keywords: deep eutectic solvents, biotransformations, alcohol dehydrogenase, coenzymes, reduction, 2-chloro-1-(3,4-difluoro-phenyl)ethanon

Thesis contains: 65 pages, 27 figures, 4 tables, 39 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. Manuela Panić*

Reviewers:

1. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
2. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
3. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
4. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: November 6th, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BIOTRANSFORMACIJE.....	2
2.1.1. Biotransformacije pomoću cijelih stanica	2
2.1.2. Biotransformacije pomoću izoliranih enzima	3
2.1.3. Enzimi u biotransformacijama	4
2.1.3.1. Struktura enzima	5
2.1.3.2. Aktivnost, selektivnost i stabilnost enzima	7
2.1.3.3. Tipovi enzimskih reakcija	9
2.1.4. Industrijske biotransformacije.....	10
2.2. ZELENA OTAPALA ZA ZELENE TEHNOLOGIJE	13
2.2.1. Ionske kapljevine	13
2.2.2. Superkritične i subkritične tekućine	14
2.2.3. Eutektička otapala	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Kemikalije.....	18
3.1.2. Pufferi.....	18
3.1.3. Biokatalizatori.....	19
3.1.4. Oprema i uređaji.....	19
3.2. METODE RADA.....	20
3.2.1. Priprava eutektičkih otapala	20
3.2.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze	22
3.2.3. Praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenaze primjenom spektrofotometrije	23
3.2.4. Praćenje stabilnosti koenzima NAD ⁺ i NADH u eutektičkim otapalima	23
3.2.5. Redukcija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona s pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3.2.5.1. Određivanje koncentracije produkata (R,S)-2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola.....	26
3.2.5.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona i (R,S)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanola	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Priprava eutektičkih otapala	30
4.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze	31
4.3. Konformacijske promjene alkohol dehidrogenaze (ADH) u eutektičkim otapalima	33
4.4. Stabilnost koenzima NADH i NAD ⁺ u eutektičkim otapalima.....	36
4.4.1. Stabilnost NADH	38
4.4.2. Stabilnost NAD ⁺	49
4.5. Redukcija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona s pekarskim kvascem <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
5. ZAKLJUČAK	60
6. LITERATURA	62

1. UVOD

Posljednjih nekoliko desetljeća povećan je interes za industrijskom proizvodnjom koja isključuje upotrebu štetnih kemikalija koje ugrožavaju zdravlje ljudi i okoliš. Buđenjem ekološke svijesti raste želja za primjenom netoksičnih i nehlapljivih otapala koja zahvaljujući svojim kemijskim i fizikalnim svojstvima vjerodostojno zamjenjuju klasična organska štetna otapala. Mogućnost dizajniranja takvih *zelenih* otapala navela je znanstvenike na stalni razvoj i istraživanje mogućnosti koje pruža *zelena* kemija u svrhu dobivanja brojnih farmaceutskih i kemijskih proizvoda. Eutektička otapala kao otapala bazirana na prirodnim spojevima, odlikuju se biorazgradivošću i netoksičnošću te samim time pružaju održivost u ekološkom i ekonomskom smislu. Kao biokompatilna otapala koriste se u biokatalitičkim procesima kataliziranim biološkim sustavima, odnosno izoliranim enzimima ili pomoću cijelih stanica mikroorganizama. Takve reakcije nazivaju se biotransformacijama, a primjenjuju se u brojnim područjima, od proizvodnje i transformacije spojeva u farmaceutskoj industriji do raznih analiza i dijagnostike u medicini.

Veliki značaj u farmaceutskoj industriji imaju oksidoredukcijske reakcije katalizirane dehidrogenazama. Asimetrična redukcija prokiralnih ketona jedna je od takvih reakcija kojom nastaju kiralni alkoholi važni u sintezi vrijednih farmaceutika i finih kemikalija. Enzim koji katalizira asimetričnu redukciju jest alkohol dehidrogenaza, koja za svoju aktivnost zahtijeva prisutnost i regeneraciju koenzima NADH i NAD⁺. Kako bi se potvrdila mogućnost provođenja reakcija redukcije u ekološki prihvatljivim eutektičkim otapalima, u ovom je radu ispitana aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze u eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida i betaina. Također su u istim otapalima praćene promjene u konformaciji enzima primjenom spektrofluorimetrije. Obzirom na važnost koenzima za odvijanje reakcija koje katalizira alkohol dehidrogenaza, ispitana je i stabilnost koenzima NADH i NAD⁺ u pripremljenim eutektičkim otapalima. Osim navedenog, cilj ovog rada bio je ispitati i mogućnost provođenja reakcija redukcije pomoću cijelih stanica u pripremljenim eutektičkim otapalima. U tu svrhu provedena je enantioselektivna redukcija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u kiralni alkohol (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol primjenom pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u eutektičkom otapalu betain:etilen-glikol.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOTRANSFORMACIJE

Veliku pažnju u današnjem svijetu kemičara i biokemičara privlače procesi u kojima pretvorbu organskih spojeva u drugi industrijski važan spoj provode biološki sustavi, odnosno mikroorganizmi ili enzimi izolirani iz mikroorganizama. Takve reakcije pretvorbe spojeva nazivaju se biotransformacijama. Iako je primjena živih mikroorganizama i njihovih enzima zabilježena još u davnim vremenima ljudske povijesti prilikom proizvodnje hrane i pića (kruh, vino, ocat), velik potencijal ove vrste katalizatora prepoznat je tek tijekom dvadesetog stoljeća. Zahvaljujući ubrzanom razvoju biotransformacijskih procesa, mikroorganizmi više nisu upotrebljavani samo za fermentacijske procese, već za dobivanje kemijskih spojeva poput aminokiselina, šećera i različitih farmaceutika. Ono što predstavlja izazov kod biokatalitičkih reakcija je interdisciplinarnost ovog područja s obzirom da zahtijeva znanja iz različitih područja kao što su genetika, mikrobiologija, molekularna biologija i organska sinteza (Drauz i sur., 2012). Primjena biokatalitičkih reakcija prisutna je u brojnim područjima, a obuhvaća proizvodnju i transformaciju spojeva u farmaceutskoj industriji, razne analize i dijagnostiku u medicini, a neizostavne su i u zaštiti okoliša prilikom uklanjanja kontaminanata iz zagađenog područja uporabom mikroorganizama, procesom zvanim bioremedijacija. Djelatnosti koje ih često koriste su poljoprivreda, prehrambena industrija, proizvodnja finih kemikalija i lijekova, papirna i rudarska industrija te proizvodnja energije. Kako bi provođenje biotransformacija u industrijskom mjerilu bilo učinkovito, važno je zadovoljiti faktore poput dostupnosti potrebnih enzima i mikroorganizama, njihove cijene, optimiziranje procesa, priprema hranjive podloge ili reakcijske smjese te izolacija i pročišćavanje željenog produkta. Također je potrebno prethodno potvrditi prednosti odvijanja biokatalitičke reakcije u odnosu na kemijske metode, pronaći rješenje za otpad nastao nakon provedene biokatalize, utvrditi potrebno vrijeme za razvoj novog procesa te se osvrnuti na javno mišljenje o dobivenom krajnjem proizvodu (Faber, 2011).

2.1.1. Biotransformacije pomoću cijelih stanica

Reakcije u kojima ulogu biokatalizatora imaju cijele stanice odnosno mikroorganizmi provode se u uvjetima optimalnim za rast korištenog mikroorganizma. Najučinkovitiji oblik staničnog biokatalizatora su čiste kulture mikroorganizama. Mješane kulture koje sadrže dva ili više različitih tipova mikroorganizama nisu stabilne zbog promjena u dinamici populacije što može

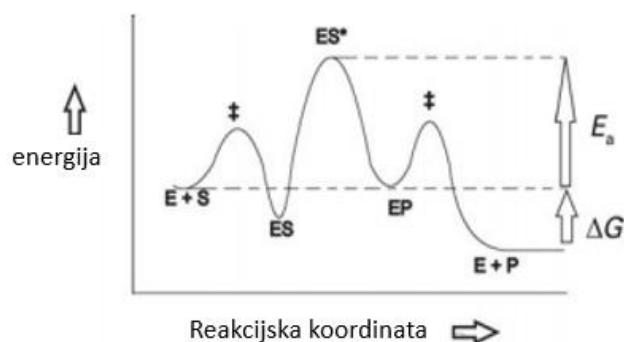
rezultirati nepredvidivim produktima metabolizma koji narušavaju uspješnost biokatalize. Nakon porasta zadovoljavajućeg broja stanica, supstrat koji se dodaje u hranjivu podlogu provodi se u željeni produkt enzimskom aktivnošću unutar stanice. Kako bi se taj proces uspješno odvio, supstrat mora proći kroz staničnu membranu do aktivnog mjesta enzima. U ovakvim vrstama reakcije enzimi se nalaze u svom prirodnom okruženju, što je jedna od prednosti korištenja cijelih stanica u biokatalitičkim reakcijama. U takvom prirodnom okruženju enzimi su vrlo stabilni i ne zahtijevaju dodatak kofaktora kako bi proveli željenu reakciju. Ostale prednosti ovakvih *in vivo* biokataliza su jednostavnost provođenja reakcija, ekonomičnost, mogućnost provođenja reakcije u vodenom mediju, kao i ponovna upotreba imobiliziranih staničnih kultura. Nedostaci uporabe cijelih stanica uključuju istovremeno odvijanje različitih reakcija unutar stanica što rezultira različitim nusproduktima. Za uzgoj mikroorganizama također je potrebno osigurati određene uvjete rasta i održavati stanice vijabilnima, a nakon završenog procesa potrebno je stanice centrifugirati ili filtrirati kako bi se željeni proizvod izolirao i pročistio. S obzirom na brojnost i sveprisutnost različitih vrsta mikroorganizama, širok je raspon tvari koje mogu koristiti kao supstrat i koji im omogućuju preživljavanje u različitim uvjetima rasta. Najčešće korišteni mikroorganizmi u biotransformacijama su bakterija *Escherichia coli*, bakterijske vrste iz rodova *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Mucor*, kao i pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Grogan, 2009).

2.1.2. Biotransformacije pomoću izoliranih enzima

Enzimi kao biokatalizatori u biotransformacijama češće se koriste nego cijele stanice mikroorganizama. Razlog tome je mogućnost katalize različitih vrsta reakcija, njihova visoka učinkovitost, aktivnost u blagim uvjetima te biorazgradivost. Upotreba izoliranih enzima također osigurava odvijanje željene reakcije i nastanak određenog produkta bez odvijanja ostalih staničnih reakcija koje rezultiraju raznim nusproduktima. Nedostaci biokatalitičkih reakcija kataliziranih s izoliranim enzimima uključuju prethodnu izolaciju potrebnog enzima čime se povećava cijena i kompleksnost samog procesa. Njihova stabilnost manja je u odnosu na enzime unutar stanica s obzirom da se ne nalaze u svom prirodnom staničnom okruženju, stoga je potrebno osigurati povoljne radne parametre za učinkovitu biokatalizu. Katalitička aktivnost enzima najveća je u vodenom mediju koji nije pogodan za odvijanje organskih reakcija zbog visoke točke vrelišta vode i visoke topline isparavanja (Grogan, 2009).

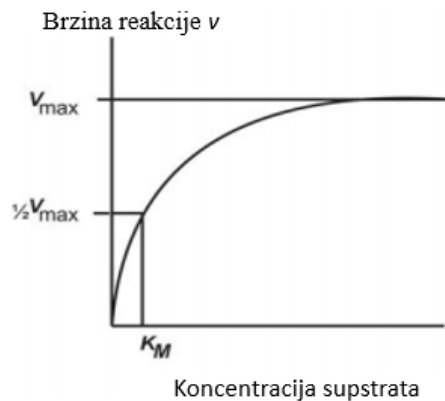
2.1.3. Enzimi u biotransformacijama

Izrazito važnu ulogu u biokemijskim reakcijama svih živih stanica imaju enzimi. Ove makromolekule imaju sposobnost vezanja malih molekula, supstrata, nakon čega provode enzimsku reakciju. Kako bi se enzimska reakcija mogla odvijati, enzim E i supstrat S reverzibilno se vežu čime nastaje enzim-supstrat kompleks (ES kompleks) koji prolazi kroz prijelazno stanje do enzim-produkt kompleksa (EP kompleks) pa konačno i do stanja slobodnog produkta P i slobodnog enzima E (Bommarius i Riebel, 2004). Kako je prikazano na slici 1, enzimi smanjuju energiju aktivacije zbog čega se reakcija odvija brže nego nekatalizirana reakcija (Grogan, 2009).



Slika 1. Reakcija katalizirana enzimom; E_a – energija aktivacije, ΔG – promjena u slobodnoj Gibbsovoj entalpiji (Grogan, 2009)

Kinetika enzimskih reakcija opisana je Michaelis-Menten zakonom 1913. godine koji govori o zasićenju reakcije s obzirom na supstrat i s obzirom na enzim. Slika 2 prikazuje ponašanje enzima u slučaju povećanja koncentracije dodanog supstrata. Pri nižim koncentracijama supstrata primijećen je porast brzine enzimске reakcije koji je proporcionalan povećanju koncentracije supstrata. Taj linearni dio krivulje podudara se s činjenicom da u aktivnom mjestu enzima postoje dostupna mjesta za vezanje supstrata. Kada dođe do zasićenja aktivnog mjesta enzima, supstrat se neće vezati i brzina enzimске reakcije opada (Grogan, 2009).



Slika 2. Enzimska reakcija pri dodatku veće koncentracije supstrata; S - koncentracija supstrata (mol L^{-1}), v - brzina reakcije (mol s^{-1}) (Grogan, 2009)

Pri određenoj koncentraciji supstrata, brzina enzimske reakcije doseže svoju maksimalnu vrijednost, v_{\max} , koja označava najveću moguću brzinu reakcije koja bi se teorijski mogla postići, a izražava se u jedinicama supstrata koji je preveden u produkt po jedinici vremena (mol s^{-1}). Drugi važan kinetički parametar koji se može odrediti pomoću Michaelis-Menten dijagrama je K_M , odnosno koncentracija supstrata pri kojoj je brzina enzimske reakcije jednaka polovici maksimalne brzine, $v_{\max}/2$, a izražava se u jedinici mol L^{-1} . K_M vrijednost također govori o afinitetu enzima za supstrat, a što je ona niža enzim ima veći afinitet prema supstratu, dok veća K_M vrijednost ukazuje na manji afinitet enzima prema supstratu. Kinetičke konstante K_M i v_{\max} povezane su Michaelis-Menten jednadžbom (jednadžba 1):

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad [1]$$

gdje je:

v – brzina enzimske reakcije, v_{\max} - maksimalna brzina enzimske reakcije, K_M - koncentracija supstrata pri kojoj se postiže polovica maksimalne brzine i $[S]$ - koncentracija supstrata.

2.1.3.1. Struktura enzima

Enzimi su proteini načinjeni od različitih kombinacija 20 aminokiselina, a njihova molekulska masa kreće se od 10 000 do 100 000 Da. Svaka aminokiselina sadrži drugačiji pobočni lanac koji im daje specifična svojstva, a u interakciji s aktivnim mjestom enzima, kofaktorom ili

metalnim ionom omogućuju kataliziranje širokog spektra različitih katalitičkih procesa. Kombinacije različitih aminokiselina tijekom formiranja strukture proteina dovode do različitih razina strukture proteina koja može biti primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna kako je prikazano u tablici 1.

Jedinstvenost enzima kao katalitički aktivnih proteina rezultat je njihovih složenih trodimenzionalnih struktura i postojanja aktivnog mjesta unutar strukture enzima. Aktivno mjesto zaslužno je za visoku selektivnost enzima zbog specifičnog prepoznavanja supstrata. Enzimi kao izvanredni katalizatori povećavaju brzinu reakcije do 10^{18} puta u odnosu na nekataliziranu reakciju, a u slučaju katalitičke reakcije u kojoj djeluju kao „savršeni“ katalizatori ograničeni su samo brzinom molekularne difuzije.

Tablica 1. Prikaz hijerarhijske strukture proteina (Grogan, 2009)

Stupanj hijerarhijske strukture	
Primarna struktura	Redoslijed aminokiselina povezanih peptidnom vezom u polipeptidni lanac
Sekundarna struktura	Namatanje i nabiranje polipeptidnog lanca u trodimenzionalnu strukturu – α -uzvojnice i β -nabrane ploče
Tercijarna struktura	Trodimezionalni raspored (konformacija) svih atoma jednog polipeptidnog lanca
Kvaterna struktura	Prostorni raspored svih podjedinica jednog proteina

Osim dodatka supstrata, za katalitičku aktivnost enzima izuzetno su bitni uvjeti u kojima se reakcija provodi i važno je napomenuti da ne postoje optimalni uvjeti u kojima generalno svi enzimi imaju zadovoljavajuću enzimsku aktivnost. Enzimska kataliza zahtjeva specifične reakcijske uvjete poput optimalne temperature i pH vrijednost okoline koji su vrlo važni za aktivnost i stabilnost proteina. Otapalo u kojem se provodi biokataliza također je vrlo važan faktor, no iako je vodeni medij prirodno okruženje enzima, kod većine industrijskih enzimskih transformacija voda nije pogodno otapalo (Drauz i sur., 2012).

2.1.3.2. Aktivnost, selektivnost i stabilnost enzima

Karakteristike svih katalizatora pa tako i biokatalizatora su njihova aktivnost, selektivnost i stabilnost.

Aktivnost enzima

Ukupna aktivnost enzima izražava se međunarodnom jedinicom U (eng. Units):

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

koja označava količinu enzima koja katalizira pretvorbu 1 mikromola supstrata u produkt u 1 minuti. Pomoću izračuna jednostavnih kinetičkih parametara kao što je v_{\max} , moguće je odrediti količinu enzimske aktivnosti prisutne u uzorku. Ipak, kada se govori o enzimskoj aktivnosti, specifična aktivnost i volumetrijska aktivnost imaju značajniju ulogu u karakterizaciji enzima u odnosu na ukupnu enzimsku aktivnost. Specifična aktivnost enzima određuje se s obzirom na njegovu masu:

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

dok se volumetrijska aktivnost temelji na jedinici volumena:

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

Uvjeti okoline u kojima se određuje enzimsku aktivnost izuzetno su bitni, a većina enzima aktivna je pri temperaturi od 5 °C do 15 °C i pH od 5 do 10, dok se određivanje aktivnosti najčešće vrši pri uvjetima temperature od $T = 30$ °C i pH 7,5, ukoliko nije drugačije naznačeno. Specifična aktivnost enzimskog pripravka povećava se s povećanjem čistoće enzima, optimiranjem uvjeta u kojima se provodi reakcija, promjenom strukture enzima ili nosača enzima. Volumetrijska aktivnost biokatalizatora može se poboljšati dodatkom veće količine biokatalizatora u sustav. Uspješnost enzimskih reakcija kataliziranih različitim biokatalizatorima uspoređuje se s frekvencijom preokreta (eng. *turnover number*, TOF), koji se određuje ukoliko je poznat broj aktivnih mjesta u enzimu, prema jednadžbi 2 (Bommarius i Riebel, 2004):

$$\text{frekvencija preokreta (TOF)} = \frac{\text{broj katalitičkih događaja}}{\text{vrijeme} \cdot \text{broj aktivnih mjesta}} \quad [2]$$

Selektivnost enzima

Enzime karakteriziraju tri tipa selektivnosti; kemoselektivnost, regioselektivnost i enantioselektivnost. Kemoselektivnost se odnosi na djelovanje enzima na jedinstveni tip funkcionalne skupine. Zahvaljujući svojoj trodimenzionalnoj strukturi, enzimi razlikuju funkcionalne skupine koje su smještene u različitim područjima iste molekule supstrata što im daje svojstvo regioselektivnosti. Stereoselektivnost ili enantioselektivnost najvažnija je vrsta selektivnosti u kontekstu biokatalize s obzirom da se biokatalizatori koriste s ciljem postizanja enantiomerne čistoće produkta. Budući da je većina enzima vrlo selektivna po pitanju kiralnosti supstrata, enantiomeri određenog bioaktivnog spoja uzrokuju različite biološke učinke (Faber, 2011). Enantioselektivnost se kontrolira enantiomernim odnosom ili E vrijednošću i enantiomernim viškom (ee). Enantiomerni odnos ili E vrijednost služi kao mjera enantioselektivnosti u određenom stupnju konverzije (Chen i sur, 1982), a određuje se prema jednadžbi 3:

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_A}{(k_{cat}/K_M)_B} = \ln \frac{([A]/[A]_0)}{([B]/[B]_0)} \quad [3]$$

gdje je E - enantiomerni odnos, k_{cat} - konstanta brzine reakcije, K_M - konstanta saturacije (zasićenja), $[A]$ - koncentracija *faster-reacting* enantiomera i $[B]$ - koncentracija *slower-reacting* enantiomera.

Jednadžba 4 koristi se za određivanje enantiomernog viška, a obuhvaća ukupnu selektivnost do točke izolacije proizvoda:

$$ee = \frac{[A]-[B]}{[A]+[B]} \cdot 100 \% \quad [4]$$

pri čemu je ee - enantiomerni višak, $[A]$ - koncentracija *faster-reacting* enantiomera i $[B]$ - koncentracija *slower-reacting* enantiomera (Bommarius i Riebel, 2004).

Stabilnost enzima

Temperatura, pH vrijednost, kisik, razni inhibitori i mehanički stres neki su od čimbenika koji utječu na stabilnost enzima. Termalna stabilnost enzima opisuje se temperaturom taljenja (eng. *melting temperature*, T_m), a odnosi se na temperaturu pri kojoj je polovica proteina u namotanoj konformaciji. Na temperaturu taljenja pojedinog enzima utječe aminokiselinski sastav, broj disulfidnih mostova, vrsta otapala i ionska jakost otopine (Grogan, 2009).

2.1.3.3. Tipovi enzimskih reakcija

Prema vrsti reakcije koju kataliziraju, enzimi su podijeljeni u sedam razreda, a svakom enzimu dodijeljen je četveroznamenasti broj, E.C. broj (eng. *Enzyme Commission number*, E.C.). Prvi broj u nizu E.C. oznake predstavlja razred u koji je enzim svrstan, odnosno vrstu reakcije koju enzim katalizira. Druga i treća znamenka odnose se na podrazrede enzima, dok četvrta znamenka predstavlja serijski broj enzima u podrazredu.

U razred broj 1 svrstani su enzimi oksidoreduktaze koji provode reakcije oksidacije i redukcije kao što su pretvorbe ketona u alkohole, reakcije hidroksilacije, oksidacije amina i redukcija ugljik-ugljik dvostrukih veza. Ova vrsta enzima od velike je važnosti jer uključuje reakcije oksidacije molekula koje su bitne za aktivaciju molekula kao što su ugljikovodici. Također oksidacijom amina nastaju imini koji uz prisutnost enzima u vodenom mediju formiraju karbonilne skupine uz otpuštanje amonijevih iona. Oksidoreduktaze imaju veliku ulogu u biotransformacijama, iako često zahtjevaju prisutnost kofaktora kao što su NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid), NADP⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat), hem, FAD (flavin adenin dinukleotid) ili FMN (flavin mononukleotid). Kao takvi, predstavljaju izazov zbog potrebne regeneracije kofaktora nakon jednog ciklusa biokatalize, što može utjecati na stabilnost kofaktora, ali i troškove procesa (Grogan, 2009).

Transferaze, koje pripadaju u razred broj 2, enzimi su koji kataliziraju reakcije prijenosa grupa između molekula. Primjeri enzima transferaza su glikozil-transferaze i kinaze. Glikozil-transferaze prenose šećerne jedinice iz aktiviranih ugljikohidratnih molekula do molekule akceptora pri čemu nastaju glikozidi, a kinaze prenose fosfatne grupe i sudjeluju u staničnim signalnim procesima te u biotransformacijama imaju važnu ulogu kod formiranja fosfatnih estera.

Hidrolaze sudjeluju u cijepanju kemijskih veza uz dodatak molekula vode. U organskoj sintezi najčešće se primjenjuju proteaze, lipaze, esteraze i glikozidaze. Kimotripsin je proteaza koja cijepa peptidne veze i esterske veze u enantioselektivnim reakcijama hidrolize s ciljem dobivanja optički čistih alkohola i karboksilnih kiselina, za što se također koriste i esteraze te lipaze. Glikozidaze cijepaju glikozidne veze između ugljikohidratnih jedinica i odlikuju se karakteristikama visoke regio- i stereoselektivnosti (Grogan, 2009).

Liaze su četvrti razred enzima, a kataliziraju reakcije adicije vode ili amonijevih iona uz eliminaciju dvostruke veze. Takve reakcije često su popraćene visokom selektivnošću pri čemu nastaju enantiomeri čistih alkohola ili amina.

Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije, odnosno prijenos grupa unutar iste molekule. Ligaze su enzimi koji kataliziraju nastajanje kemijskih veza, a da bi se nove veze formirale potrebna je energija koja se oslobađa hidolizom molekule adenozin-trifosfata (ATP) u adenozin-difosfat (ADP). Ovakvi enzimi pokazuju velik potencijal, no u reakcijama biotransformacija imaju ograničenu primjenu. Posljednja klasa enzima su translokaze koje kataliziraju prijenos grupa s jednog mjesta u stanici na drugo, poput prijenosa iona ili molekula kroz staničnu membranu (Grogan, 2009).

2.1.4. Industrijske biotransformacije

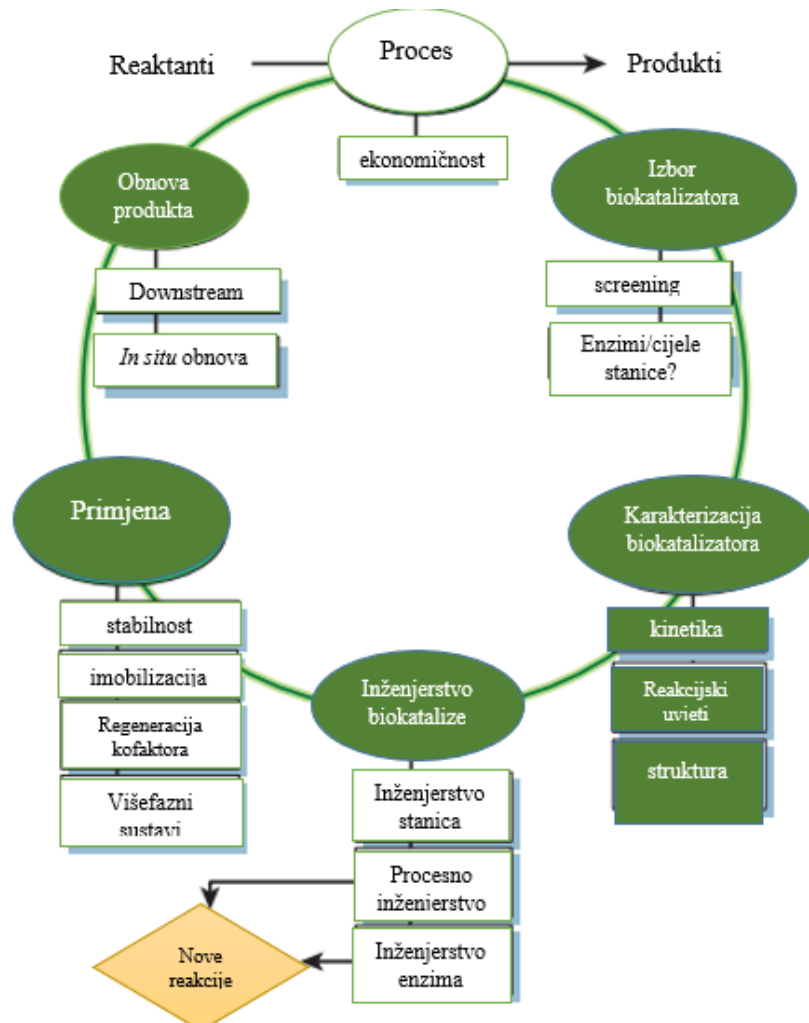
Sve je veći porast industrijskih procesa koji za sintezu farmaceutskih proizvoda, finih kemikalija, agrokemijskih intermedijera i lijekova koriste biološke katalizatore. Kako bi se unaprijedio razvoj biotransformacija u farmaceutskoj i kemijskoj industriji, kombiniraju se nove razvijene metode molekularne biologije, procesno inženjerstvo, visoko učinkovite *screening* metode, a metaboličko inženjerstvo i usmjerena evolucija omogućile su proizvodnju stabilnih biokatalizatora s određenom aktivnošću i selektivnošću. Broj spojeva sintetiziranih pomoću enzima konstantno se povećava, a uključuje spojeve s protutumorskim, antivirusnim i protuupalnim djelovanjem, zatim antiaritmike, antipsihotike, sredstva za snižavanje kolesterola u krvi i slično. Enzimi su sposobni katalizirati velik broj reakcija, no njihova praktična primjena često je smanjena zbog ograničene komercijalne dostupnosti (Zaks, 2001). Uporaba biokatalizatora posljednjih desetljeća ukazala je na neznatan broj nedostataka njihove primjene u organskoj sintezi. Izolirani enzimi obično se koriste u hidrolitičkim reakcijama te u reakcijama izomerizacije, dok se cijele stanice koriste u organskim sintezama. Razlog uporabe cijelih stanica u takvim reakcijama je potreba za prisutnošću kofaktora i njegovom regeneracijom, što se postiže u *in vivo* uvjetima, zbog čega je biokataliza jednostavnija i jeftinija uz prisutnost metabolički aktivnih stanica. S obzirom na mogućnost prihvaćanja širokog spektra složenih molekula kao supstrata i svojim regio- i enantioselektivnim karakteristikama, enzimi su izvanredni katalizatori koji sudjeluju u jednostavnim i složenim reakcijama. Zahvaljujući visokoj selektivnosti, reakcije biotransformacije rezultiraju malim brojem nusproizvoda, a time

čine enzime ekološkom alternativom konvencionalnim kemijskim katalizatorima. Biotransformacije se provode pri blažim reakcijskim uvjetima u usporedbi s kemijskim reakcijama, a većina današnjih enzimskih procesa dijele ista svojstva, uključujući visoku produktivnost procesa i koncentraciju nastalog produkta, bez nastanka nepoželjnih nusproizvoda i bez potrebe za kofaktorima. Smatra se da biotransformacije u budućnosti neće biti ograničene s dostupnošću tehnologije niti karakteristikama supstrata i produkta, već će izvođenje biokatalize biti ograničeno s dostupnošću biokatalizatora (Schmid i sur., 2001).

Ciklus biokatalitičkog procesa

Ono što čini glavnu razliku između procesa biotransformacije i konvencionalnih kemijskih reakcija je kinetika korištenog enzima, stabilnost proteina u radnim uvjetima i svojstva biokatalizatora koji imaju određenu ulogu u stanicama. S novim reakcijama biokatalize često dolaze i nove enzimске aktivnosti, a razvoj novog biokatalitičkog procesa shematski je prikazan na slici 3. Kako bi se proizveo željeni produkt potrebno je odabrati jednu od nekoliko mogućih biokatalitičkih reakcija kojima će se učinkovito prevesti supstrat u željeni proizvod. Nakon razvoja novog biokatalizatora ili nakon odabira postojećeg biokatalizatora, potrebno je postaviti radne uvjete koji će pridonijeti ekonomičnom odvijanju procesa. Za optimalnu izvedbu takvog bioprocesa potrebno je znanje različitih stručnjaka koji postepeno razvijaju bioproces do učinkovitog industrijskog procesa koji je ekonomski izvediv. Ekonomska izvedivost bioprocesa ovisi o nekoliko čimbenika koji se odnose na vrstu biokatalizatora te karakteristike reaktora u kojemu se bioproces provodi. Većina biokatalizatora se koristi u imobiliziranom obliku kao heterogeni biokatalizatori, što je slučaj i kod kemijskih procesa jer se takvi katalizatori mogu obnoviti i ponovno koristiti. Međutim, provode se i bioprocesi koji koriste homogene suspendirane cijele stanice ili izolirane enzime čija cijena je dovoljno niska pa dozvoljava jednokratnu upotrebu, bez obnavljanja katalizatora i njihovog ponovnog korištenja u drugim procesima. Identifikacija željenog proizvoda ili dostupnost novog enzima glavni su temelj za pokretanje novog bioprocesa. Odabrani katalizator koji prevodi dostupni reaktant u željeni proizvod može biti dostupan na tržištu ili razvijen proteinskim inženjersvom ili usmjerenom evolucijom. Karakteristike biokatalizatora određuju reakcijske uvjete potrebne za optimalnu enzimsku aktivnost, visoku reaktivnost enzima i dugotrajno odvijanje katalize. Kako bi se bioproces odvio na najbolji mogući način, biokatalizator i proces optimiziraju se na više razina: proteinskim inženjersvom na enzimskoj razini za bolju enzimsku aktivnost i stabilnost te mogućnost korištenja širokog spektra supstrata, kao i na razini čitavog procesa. Bioproces se također optimizira na staničnoj razini koja se odnosi na odabir otapala pogodnog za stanice,

unos molekule supstrata u stanicu domaćina i izlaz nastalog produkta iz stanice u okolinu te sprečavanje nastanka neželjenih nusproizvoda. Izolirani enzimi i cijele stanice mogu se imobilizirati vezanjem na nosače, a ukoliko enzimi za svoju aktivnost zahtijevaju kofaktore, potrebno je osigurati njihovu regeneraciju (Schmid i sur., 2001).



Slika 3. Razvoj biokatalitičkog procesa (Schmid i sur., 2001)

Medij u kojemu se provodi bioproces može se sastojati od dvije faze (voda-organsko otapalo), samo vodene faze ili samo organske faze, a optimiziranje medija važno je zbog otapanja supstrata i nastalog produkta uz zadržavanje enzimske aktivnosti. Zahvaljujući brojnim istraživanjima i razvoju u području enzimskog inženjerstva, poznato je da enzimi djeluju i u organskim otapalima, čistim otapalima i superkritičnim tekućinama bez dodatka vode. Takva okruženja donose određene prednosti, uključujući veću topljivost supstrata, modifikacije u specifičnosti enzima i povratne hidrolitičke reakcije što dovodi do novih aktivnosti enzima koje

su nekad bile moguće samo uz genetičko modificiranje ili odvijanje višestupanjskih procesa unutar cijelih stanica. Ove prednosti omogućuju primjenu enzimske aktivnosti u organskim otapalima od kiralne rezolucije kemikalija, lijekova i njihovih intermedijera do enantioselektivne i regioselektivne polimerizacije (Schmid i sur., 2001).

2.2. ZELENA OTAPALA ZA ZELENE TEHNOLOGIJE

S ciljem smanjivanja emisije štetnih hlapljivih organskih spojeva koje potječe od industrijskih procesa, osmišljen je program *zelene kemije* kojim se promiče smanjena uporaba štetnih otapala. Otapala imaju veliku ulogu u industrijskim procesima i neophodna su za njihovo odvijanje jer omogućuju otapanje brojnih krutina, prijenos mase i topline, utječu na viskoznost tvari te na postupke pročišćavanja i izdvajanja nastalih produkata. Zbog neophodnosti otapala u industrijskim procesima, sve se više koriste obnovljiva zelena otapala koja su sigurnija za upotrebu i nisu štetna za zdravlje i okoliš kao otapala nastala iz nafte.

Voda se kao otapalo u industrijskim procesima koristi pri polimerizaciji emulzija i postupcima hidrodestilacije. Ipak, njezina primjena je ograničena zbog slabe topljivosti organskih i organo-metalnih spojeva u vodi te zbog energetsko zahtjevnih postupaka uklanjanja vode nakon provedenih procesa. Osim vode, ekološki prihvatljiva otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora koja su primjenjiva u industrijskoj proizvodnji su ionske tekućine pri sobnoj temperaturi te superkritične i subkritične tekućine i otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.2.1. Ionske kapljevine

Zahvaljujući svojim karakteristikama, ionske tekućine privukle su veliku pažnju u znanstvenom i industrijskom svijetu. Zbog povoljnih ekoloških i tehnoloških svojstava, ove organske soli čiji sastav čine veliki organski kationi i organski ili anorganski anioni, bilježe eksponencijalni rast u primjeni na raznim područjima. Njihove prednosti uključuju zanemarivu hlapljivost, nezapaljivost te termičku, kemijsku i elektrokemijsku stabilnost. Ionske tekućine čini veliki broj različitih struktura što utječe i na složenost fizikalno-kemijskih svojstava. Imaju nisku točku tališta, veću viskoznost od organskih otapala, veću gustoću u odnosu na vodu te manju površinsku napetost od vode, a veću od *n*-alkana. Navedena svojstva gustoće, površinske napetosti i viskoznosti utječu na procese poput prijenosa mase, razdvajanje faza tekuće-tekuće te na pumpanje i potrebnu snagu miješanja otopine. Ionske tekućine kao polarna otapala mogu

se koristiti kao otapala za anorganske, organske i polimerne spojeve, a ionske veze unutar njihovih struktura polarnim tvarima omogućuju lako otapanje. S obzirom na elektrokemijsku inertnost i dobru električnu provodljivost, ova otapala pronašla su veliku primjenu u elektrokemiji. Ipak, sve veću primjenu nalaze i u farmaceutskoj industriji, biotehnologiji, kemijskoj tehnologiji i raznim analizama jer zbog jednostavnog obnavljanja nakon procesa, pozitivno utječu na njegovu ekonomičnost. U širokoj komercijalnoj primjeni ionske tekućine za sada nisu zastupljene zbog složene strukture koja povećava njihovu cijenu od 5 do 20 puta u odnosu na konvencionalna organska otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Niža cijena proizvodnje ionskih tekućina ipak bi se mogla postići korištenjem jeftinijih kationa i aniona, poput kolin-klorida (Renner, 2001). Strategije zelene kemije nisu ostvarene kod konvencionalnih metoda pripreme ionskih tekućina zbog korištenja neobnovljivih sirovina i hlapljivih organskih otapala štetnih za zdravlje i okoliš. Međutim, stupanj utjecaja ovih otapala na okoliš ovisi o njihovoj strukturi pa je za dizajniranje ionskih tekućina potrebno znanje iz različitih disciplina kako bi se smanjio njihov štetni utjecaj na okolinu. Od kada su Carter i sur. (2004.) za pripremu bezopasnih ionskih tekućina koristili netoksične zaslađivače saharin i acesulfam, za pripremu ionskih tekućina sve se više koriste prirodni materijali poput organskih kiselina, aminokiselina, kolin i šećeri (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.2.2. Superkritične i subkritične tekućine

Superkritični fluid (*eng.* supercritical fluid, SCF) je tekućina zagrijana na temperaturi višoj od kritične temperature i komprimirana pri tlaku većem od kritičnog tlaka. Karakteristika superkritičnih tekućina je da je njihova gustoća slična gustoći tekućina, viskoznost poput viskoznosti plinova, a difuzivnost superkritičnih fluida je za dva reda veličine veća u odnosu na difuzivnost tekućina. Gustoća superkritičnih fluida vrlo je osjetljiva na promjene u temperaturi i tlaku pri vrijednostima blizu kritične točke pa se prema svojim karakteristikama mogu smjestiti u stanje između plinova i tekućina (Brunner, 2005). Hoće li se određeno otapalo koristiti kao superkritično otapalo, ovisi o njegovim kritičnim svojstvima, toksičnosti, cijeni i mogućnosti otapanja supstrata. Ugljični dioksid (CO₂) i voda privukli su najviše pažnje kao superkritična otapala. CO₂ ima primjenu u superkritičnom ekstrahiranju što je omogućeno njegovim niskim kritičnim konstantama koje uključuju kritičnu temperaturu od 31,1 °C i kritični tlak od $7,38 \times 10^6$ Pa, zatim ne eksplozivnost, lako je dostupan, nije otrovan i jednostavno se uklanja iz nastalog produkta. Koristi se kod ekstrakcije nepolarnih spojeva, odnosno kod otapanja nepolarnih i slabo polarnih spojeva te kod odvajanja spojeva koji su slabo hlapljivi,

veće molekulske mase i polarnosti pri većem tlaku. Produkti dobiveni ekstrakcijom pomoću superkritičnog CO₂ sigurni su za ljudsku upotrebu zbog čega takav CO₂ nosi GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*, GRAS). Primjena superkritičnog CO₂ prisutna je u farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji, kozmetici, proizvodnji materijala, u nekim kemijskim reakcijama te procesima separacije pomoću membrana, sterilizacije i tankoslojne ekstrakcije (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Voda kao superkritično otapalo ima značajno drugačija svojstva u odnosu na vodu u standardnim uvjetima. Zbog velike polarnosti može se koristiti samo za ekstrakciju polarnih spojeva, no zahvaljujući svojim povoljnim svojstvima nezapaljivosti, netoksičnosti, lakoj dostupnosti i niskoj cijeni, proizvodnja ekstrakata pomoću superkritične vode sigurna je za okoliš i zdravlje, a također je i ekonomski isplativa. Visoka polarnost i niska selektivnost prema nepolarnim spojevima navode se kao nedostaci superkritične vode, no oni se mogu prevladati povećanjem tlaka i temperature vode. Kritične vrijednosti za temperaturu i tlak vode su $T=374,2$ °C i $p=22,1 \times 10^6$ Pa, a iznad navedenih vrijednosti voda prelazi u superkritično stanje. Temperaturne vrijednosti iznad 100 °C, a ispod kritične temperature od 374,2 °C i tlaku dovoljno niskom da se voda nalazi u tekućem stanju, dovode vodu u subkritično stanje. Voda se može koristiti kao otapalo za ionske, ali i za neionske vrste što ovisi o temperaturi vode. Subkritična voda koristi se za ekstrakciju antioksidacijskih spojeva, bioaktivnih sastojaka, esencijalnih ulja, β -glukana, fenola, pesticida i herbicida iz uzoraka iz okoliša (Ong i sur., 2006). Obzirom na to da se ovim načinom ekstrakcije dobivaju proizvodi koji imaju povoljan utjecaj na zdravlje, ekstrakcija subkritičnom vodom svrstava se u *zelene tehnologije*. Moguće je postići visoku selektivnost ekstrakcije bez dodataka drugih otapala, za razliku od klasičnih metoda ekstrakcije pri kojima se visoka selektivnost postiže dodatkom niza toksičnih organskih otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

2.2.3. Eutektička otapala

Iako su ionske tekućine, zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava, prikupile veliku pažnju znanstvenika te stekle primjenu u raznim procesima biokatalize i ekstrakcije, sve je veća potreba za njihovom „zelenijom“ alternativom. S ciljem izbjegavanja nedostataka ionskih tekućina, odnosno njihove slabe biorazgradivosti, održivosti i biokompatibilnosti, kao otapala u brojnim procesima koriste se eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) (Paiva i sur., 2014). Biorazgradiva i ekološki sigurna eutektička otapala zamjenjuju otapala bazirana na

nafti. Često se nazivaju četvrtom generacijom ionskih tekućina zbog svojeg ionskog karaktera, iako nisu potpuno načinjena od ionskih vrsta. DES-ovi su smjesa organskih spojeva čija je točka taljenja niža od točke taljenja pojedinih sastojaka eutektičkog otapala (Clouthier i Pelletier, 2012). Kao i kod ionskih tekućina, moguće je dizajnirati eutektička otapala kombiniranjem različitih svojstava koja će novostvoreni DES učiniti optimalnim za primjenu u određene svrhe (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Strukturu DES-a čini akceptor vodika poput netoksičnih kvaternih amonijevih soli te nenabijeni donor vodikove veze (šećeri, karboksilne kiseline, alkoholi, amini) u određenim molarnim udjelima. Najčešće se za njihovu pripremu koriste kolin-klorid (Ch-Cl), karboksilne kiseline, urea, limunska kiselina i glicerol (Choi i sur., 2011). Unatoč sličnostima s ionskim tekućinama koja se odnose na nehlapljivost, nezapaljivost i veliku viskoznost, preferira se upotreba DES-ova zbog jeftinije i jednostavne pripreme samog otapala (jeftinije sirovine), svojstva biorazgradivosti, manje toksičnosti i bolje održivosti u ekološkom i ekonomskom smislu (Paiva i sur., 2014). DES-ovi bazirani na prirodnim spojevima, primarnim metabolitima kao što su aminokiseline, organske kiseline i šećeri nazivaju se prirodnim eutektičnim otapalima (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Istraživanjima je dokazano da bioaktivne komponente poput betaina, kolin-klorida, aminokiselina i šećera u DES-ovima imaju 10-100 puta veću topljivost nego u vodi zbog čega se koriste za proizvodnju biljnih ekstrakata u farmaceutske, prehrambene, kozmetičke i agrokemijske svrhe (Bi i sur., 2013). Iako se DES-ovi smatraju netoksičnima, pojedina istraživanja pokazala su određenu razinu citotoksičnosti na bakterijskim kulturama. DES-ovi koji su u istraživanju bili bazirani na fosfonijevom anionu ukazali su na slabu antibakterijsku aktivnost do koje je došlo zbog oštećenja stanične stijenke bakterija zbog delokaliziranih naboja u eutektičkim otapalima. U istom istraživanju, Hayyan i sur. (2013a, 2013b) zabilježili su veću citotoksičnost DES-ova nego svakog pojedinog spoja iz čega se zaključuje da komponente DES-a imaju sinergistički učinak. Takav učinak može nastati zbog kemijske prirode DES-a i lošeg prijenosa kisika u kulturi stanica zbog povećane viskoznosti eutektičkog otapala (Hayyan i sur., 2013a, 2013b). Osim toga, istraživanje koje su proveli Hou i sur. (2013) ukazalo je na inhibitorni učinak DES-a na acetilkolinesterazu (AChE) koja je esencijalni enzim u živčanom sustavu većine viših organizama.

Jedan od najčešćih sastojaka eutektičkih otapala je glicerol zbog povoljnih kemijskih svojstava koja uključuju visoku polarnost, mogućnost otapanja organskih i anorganskih tvari i mogućnosti stvaranja vodikovih veza. Glicerol je netoksično otapalo, nije zapaljiv, stabilan je pri skladišnim uvjetima i biorazgradiv što je pridonijelo njegovom statusu *zelenog otapala* (Gu

i Jérôme, 2010). U organskoj kemiji glicerol je poželjno otapalo jer omogućuje otapanje hidrofobnih spojeva koji se slabo miješaju s vodom, organskih soli, enzima, kiselina i baza te kompleksa prijelaznih metala (Quispe i sur., 2013). Visoka točka vrelišta pri temperaturi od 290 °C i toplinska stabilnost dozvoljavaju odvijanje procesa na visokoj temperaturi uz istovremeno odvijanje destilacije. S obzirom da se takvim procesom otapalo razdvaja od produkata nastalih u reakciji, otapalo je moguće ponovno upotrijebiti. Upotreba glicerola kao otapala povoljno utječe na učinkovitost reakcije te na njezinu selektivnost, laku izolaciju proizvoda i recikliranje katalizatora (Gu i Jérôme, 2010). Visokom temperaturom rješava se i problem velike viskoznosti glicerola. Osim toga, nedostaci glicerola su i slabo otapanje hidrofobnih spojeva te plinova u glicerolu i nastanak nusproizvoda u ekstremno kiselim ili baznim uvjetima zahvaljujući reaktivnim hidroksilnim skupinama glicerola. Brojne katalizirane i nekatalizirane organske sinteze, procesi separacije i izolacije te biotransformacije koriste glicerol i njegove derivate kao otapala (García i sur., 2014). Budući da eutektična otapala imaju svojstvo odličnog otapanja raznih spojeva kao što su proteini, lijekovi, aminokiseline, soli, šećeri i metalni oksidi, zastupljena su u elektrokemijskim procesima elektrodepozicije, odvajanja metala i elektropoliranja. Zahvaljujući svojstvu otapanja CO₂ koriste se za kemijsku fiksaciju CO₂ i pročišćavanju plinova. S obzirom na ekološku prihvatljivost, njihova primjena nalazi se i u nukleofilnim reakcijama, elektrofilnim supstitucijama, kopolimerizacijama, dehidraciji ugljikohidrata, reakcijama redukcije i mnogim drugim procesima (Durand i sur., 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Betain, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Etilen-glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- 2-kloro-1-(3,4-difluoro-fenil)etanon, Acros Organics, New Jersey, USA
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirani), p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Nikotinamid adenin dinukleotid (reducirani), p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Propilen-glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Urea, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.2. Pufferi

- PBS puffer, pH = 7,4

0,2 g KCl i 8 g NaCl otopi se u 800 mL destilirane vode te se u otopinu doda 1,44 g Na_2HPO_4 i 0,24 g KH_2PO_4 . pH otopine podesi se na 7,4 dodatkom 1 mol L^{-3} otopine HCl te nadopuni destiliranom vodom do 1000 mL.

- Glicin-pirofosfatni puffer, pH = 9

8,34 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ i 0,42 g glicina otopli se u 250 mL redestilirane vode te pH otopine podesiti na 9,0 dodatkom 1 mol L^{-3} otopine HCl.

- Tris-HCl, pH = 7,5

15,14 g Tris baze otopi se u 150 mL destilirane vode uz miješanje. pH otopine podesi se na 7,5 dodatkom 12 mol L^{-3} otopine HCl te nadopuni destiliranom vodom do 250 mL.

3.1.3. Biokatalizatori

- Liofilizirana alkohol dehidrogenaza, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Instant suhi pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, Kvasac d.o.o., Hrvatska

3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Hladnjak (Gorenje, Slovenija)
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Homogenizator s regulacijom temperature, EppendorfThermoMixer C, Njemačka
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, odmjerne tikvice, menzure)
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikropipete (10 µL, 100 µL, 1000 µL)
- Multimetra pH/ion metar (S220, Mettler Toledo)
- Plinski kromatograf s masenim spektrofotometrom (GC-MS), Shimadzu QP2010PLUS, Japan
- Spektrofluorimetar, Cary Eclipse, Varian, SAD
- Tikvice s okruglim dnom, Deotto Lab, Hrvatska
- UV – VIS spektrofotometar, GENESYS 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprava eutektičkih otapala

U ovom radu sintetizirano je šest eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida i betaina. Za praćenje stabilnosti koenzima NADH i NAD⁺ u tikvicu s okruglim dnom dodane su preračunate količine komponenata prema određenim molarnim omjerima kako je prikazano u tablici 2. Zatim je u tikvicu dodan određeni volumen vode kako bi se dobila eutektička otapala s različitim molarnim udjelima vode. Za praćenje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) i promjena u njegovoj konformaciji te za enantioselektivnu redukciju kataliziranu stanicama kvasca, eutektička otapala pripremljena su na način da je ishodno bezvodno eutektičko otapalo razrijeđeno vodom do određenog volumnog omjera od 20 i 60 % (v/v) (tablica 3). Reakcijske smjese zagrijane su do 50 °C na magnetskoj miješalici te je nakon 2 sata miješanja dobivena homogena, prozirna i bezbojna tekućina. pH vrijednosti pripremljenih eutektičkih otapala izmjerene su pomoću multimetra pH/ion metra pri temperaturi od 25 °C. Dobivena eutektička otapala zatvorena su parafilmom i skladištena na tamnom mjestu prije daljnje primjene.

Tablica 2. Pripravljena eutektička otapala za ispitivanje stabilnosti koenzima

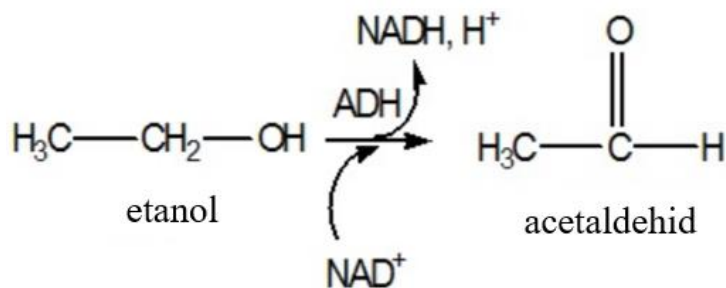
Prirodno eutektičko otapalo	Kratica	Molarni omjer komponenata
Kolin-klorid : etilen glikol : voda	ChEG ₄	1:2:4
Kolin-klorid : glicerol : voda	ChGly ₄	1:2:4
Kolin-klorid : urea : voda	ChU ₄	1:2:4
Betain : etilen glikol : voda	BEG ₄	1:2:4
Betain : glicerol : voda	BGly ₄	1:2:4
Betain : propilen glikol : voda	BPG ₄	1:2:4

Tablica 3. Pripremljena eutektička otapala za praćenje aktivnosti alkohol-dehidrogenaze i promjena u konformaciji iste

Eutektičko otapalo	Molarni udio komponenata	Kratica	Udio vode [%] (v/v)
Kolin-klorid : urea	1 : 2	ChU20%	20 %
		ChU60%	60 %
Kolin-klorid : glicerol	1 : 2	ChGly20%	20 %
		ChGly60%	60 %
Kolin-klorid : etilen-glikol	1 : 2	ChEG20%	20 %
		ChEG60%	60 %
Betain : urea	1 : 3	BU20%	20 %
		BU60%	60 %
Betain : glicerol	1 : 2	BGly20%	20 %
		BGly60%	60 %
Betain : etilen-glikol	1 : 3	BEG20%	20 %
		BEG60%	60 %
Betain : propilen-glikol	1 : 3	BPG20%	20 %
		BPG60%	60 %

3.2.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze

Određivanje aktivnosti alkohol-dehidrogenaze (ADH) provodi se spektrofotometrijskim testom koji se temelji na reakciji oksidacije etanola u acetaldehid. Reakcija se odvija u glicin-pirofosfatnom puferu čija je pH vrijednost 9, a njezin tijek shematski je prikazan na slici 4.



Slika 4. Oksidacija etanola u acetaldehid djelovanjem enzima ADH

Za ispitivanje aktivnosti alkohol-dehidrogenaze u kivetu od 1 mL potrebno je otpipetirati 19,8 μL EtOH (96 %, v/v), 10 μL otopine NAD^+ ($\gamma_{\text{NAD}^+} = 0,5 \text{ g mL}^{-1}$), 950,2 μL otapala (75 mmol L^{-1} glicin-pirofosfatni pufer pH = 9 ili odabrani DES) i 20 μL suspenzije enzima ADH ($\gamma_{\text{ADH}} = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$).

Nastali NADH mjeri se spektrofotometrijski pri $\lambda = 340 \text{ nm}$ jer reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetlosti navedene valne duljine, a njegov oksidirani oblik NAD^+ ne apsorbira svjetlo u području valne duljine 300 – 400 nm. Iz promjene apsorbancije u vremenu $\Delta\text{ABS}/\Delta t$ računa se volumetrijska aktivnost (A_v) enzima prema jednadžbi 5:

$$A_v = \frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t} \cdot \frac{V_u}{V_r \cdot \varepsilon_{340} \cdot d} \cdot f \quad [5]$$

gdje je f – faktor razrjeđenja; V_r – volumen uzorka (cm^3); V_u – ukupni volumen (cm^3); ε_{340} – ekstincijski koeficijent ($\text{cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$) koji za $\lambda = 340 \text{ nm}$ iznosi $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$; d – promjer kivete (1 cm). Volumna aktivnost izražena je u međunarodnoj jedinici enzimske aktivnosti U po jedinici volumena pri čemu je $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1}$.

3.2.3. Praćenje promjena u konformaciji alkohol dehidrogenaze primjenom spektrofluorimetrije

Kako bi se pratile promjene u konformaciji enzima ADH koje se odvijaju u reakcijskoj smjesi pri temperaturi od 25 °C, potrebno je prethodno pripremiti matičnu otopinu enzima ADH. Matična otopina enzima čija masena koncentracija iznosi 30 mg mL⁻¹ ($\gamma_{ADH} = 30 \text{ mg mL}^{-1}$) pripravljena je otapanjem 3 mg enzima ADH u 100 μL glicin-pirofosfatnog pufera. Uzorci ukupnog volumena od 3 mL pripremljeni su dodatkom 10 μL matične otopine enzima u 2990 μL DES-a odnosno pufera, nakon čega su temperirani na 25 °C tijekom 5 minuta prije spektrofluorimetrijskog snimanja. Mjerenje je provedeno na valnim duljinama $\lambda_{\text{eks.}} = 293 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em.}} = 300 - 400 \text{ nm}$ i temperaturi od 25 °C koristeći spektrofluorimetrijski uređaj.

3.2.4. Praćenje stabilnosti koenzima NAD⁺ i NADH u eutektskim otapalima

Kako bi se pratila stabilnost koenzima NAD⁺ i NADH u različitim eutektskim otapalima i pri različitim temperaturama, pripravljene su matične otopine navedenih koenzima čija je masena koncentracija iznosila $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$. Izračunata masa koenzima NAD⁺ otopljena je u PBS puferu pH 7,4, a koenzim NADH otopljen je u glicin pirofosfatnom puferu čija pH vrijednost iznosi 9. U volumene od 5 mL prethodno pripremljenih eutektskih otapala i u PBS pufer dodano je 10 μL matične otopine koenzima NAD⁺. Otopine u kojima je praćena stabilnost koenzima NADH pripravljene su na način da je 10 μL matične otopine NADH dodano u pripravljene DES-ove te u referentne otopine Tris-HCl i glicin-pirofosfatni pufer. Dobivene otopine su inkubirane 15 dana na sobnoj temperaturi od 25 °C i na temperaturi od 4 °C. Promjene u stabilnosti koenzima nakon inkubacije praćene su u apsorpcijskom spektru u rasponu od 250 do 400 nm. Apсорpcijski maksimumi za koenzim NADH očitani su na valnim duljinama od 262 nm i 338 nm, a za NAD⁺ na 262 nm.

U različitim eutektskim otapalima te referentnim otapalima, izračunate su relativne vrijednosti apsorpcije pri 262 nm ($A_{262\text{Rel}}$) za NAD⁺, odnosno 262 ($A_{262\text{Rel}}$) i 338 nm ($A_{340\text{Rel}}$) za NADH prema izrazima [6] i [7]:

$$A_{262\text{Rel}} = \frac{A_{262\text{n}}}{A_{262\text{p}}} \quad [6]$$

$$A_{338\text{Rel}} = \frac{A_{338\text{n}}}{A_{338\text{p}}} \quad [7]$$

gdje je:

$A_{262\text{n}}$ - izmjerena apsorbancija na 262 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 odnosno 4 °C,

$A_{262\text{p}}$ - vrijednost apsorbancije izmjerena u otopini koenzima koja nije bila prethodno inkubirana (svježe pripravljena otopina),

$A_{338\text{n}}$ - izmjerena apsorbancija na 338 nm nakon inkubacije koenzima u različitim otapalima pri 25 odnosno 4 °C,

$A_{338\text{p}}$ - vrijednost apsorbancije izmjerena u otopini koenzima koja nije bila prethodno inkubirana (svježe pripravljena otopina).

Zatim su izračunata odstupanja od početne relativne apsorbancije (%) na 262 nm (Δ_{262}) za NAD^+ , odnosno 262 nm (Δ_{262}) i 338 nm (Δ_{338}) za NADH nakon inkubacije u različitim eutektičkim otapalima prema formulama [8] odnosno [9]:

$$\Delta_{262} = (1 - A_{262,15}) \cdot (-100) \quad [8],$$

$$\Delta_{338} = (1 - A_{338,15}) \cdot (-100) \quad [9]$$

gdje $A_{262,15}$ predstavlja relativnu apsorbanciju očitano pri 262 nm nakon 15 dana inkubacije u različitim eutektičkim otapalima, a $A_{338,15}$ relativnu apsorbanciju očitano pri 338 nm nakon 15 dana inkubacije u različitim eutektičkim otapalima.

3.2.5. Redukcija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona s pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

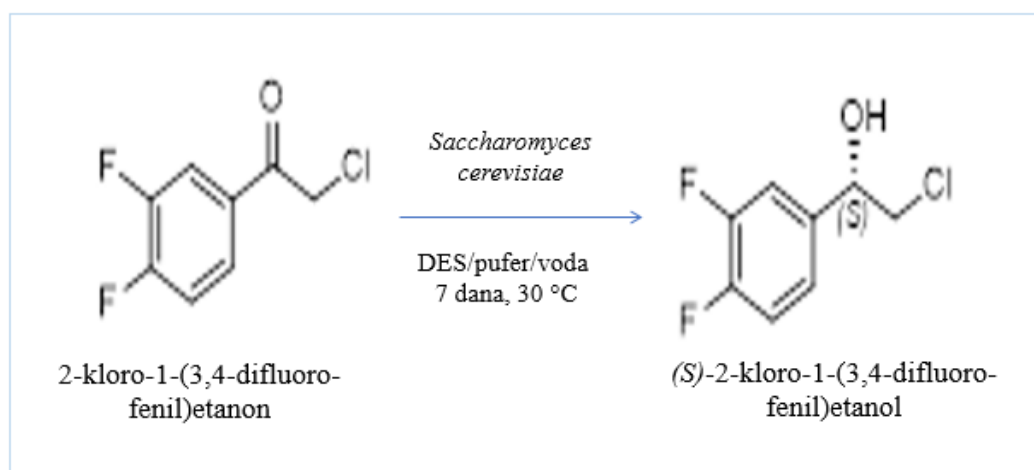
Liofilizirane stanice pekarskog kvasca isperu se u destiliranoj vodi (pH = 7). Zatim se kvasac pomiješa s destiliranom vodom. Dobivena otopina ($\gamma = 5 \text{ g mL}^{-1}$) miješa se na homogenizatoru dok se ne dobije homogena smjesa, a nastala suspenzija centrifugira se na 6000 o min^{-1} tijekom 20 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant se odlije, a kvašćeva biomasa (talog) koristi se za

daljnju asimetričnu redukciju 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona. Na slici 5 prikazana je modelna reakcija redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirana dehidrogenazom.

Reakcija je provedena u vodi, puferu i eutektičkom otapalu (betain:etilen-glikol, BEG) s različitim udjelom vode – 0, 20 i 60 % (v/v) prema dolje opisanom protokolu, a svaka reakcijska smjesa postavljena je u 2 paralele te je za svaku točku uzorkovanja postavljen poseban eksperiment.

U epruvetu se dodaje 0,5 g pripremljenog kvasca, 1,5 mL otapala (voda, BEG s različitim udjelima vode ili pufer) te 10 μL prethodno pripremljene matične otopine supstrata 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona ($\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$), čime započinje reakcija redukcije supstrata. Određeni uzorci stavljaju se u tresilicu na 4, 22 ili 40 °C kroz 1, 11 i 21 dan.

Matična otopina supstrata pripremljena je tako da je 3 mg 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona otopljeno u 1,5 mL BEG-a.



Slika 5. Redukcija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirana kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

Nakon 2, 5 i 7 dana određeni uzorci se centrifugiraju na 6000 rpm^{-1} tijekom 20 minuta, a produkt i zaostali supstrat ekstrahiraju se iz supernatanta etil-acetatom (3x3 mL). Ekstrakcija se provodi uz intenzivno miješanje na vrtložnoj miješalici tijekom 10 minuta. Nakon što se slojevi razdvoje, organska faza se analizira na plinskom kromatografu. Izuzima se cjelokupna organska faza koja se uparava do suha na rotacionom vakuum uparivaču. Analiza svih uzoraka provedena je u triplicatu.

Radi usporedbe uspješnosti redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u različitim otapalima, za svaku pojedinu reakciju računa se iskorištenje reakcije te enantiomerni višak.

Iskorištenje procesa redukcije η (%) računa se prema jednadžbi 10:

$$\eta = \frac{c_P}{c_T} \times 100 \quad [10]$$

gdje C_P predstavlja izmjerenu koncentraciju produkta (mol L^{-1}), a C_T teoretski moguću koncentraciju produkta (mol L^{-1}).

Enantiomerni višak ee (%) računa se prema jednadžbi 11:

$$ee = \frac{(S_{OH}-R_{OH})}{(S_{OH}+R_{OH})} \cdot 100 \quad [11]$$

gdje R_{OH} predstavlja površinu ispod pika (*R*)-2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola, a S_{OH} površinu ispod pika (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola.

*3.2.5.1. Određivanje koncentracije produkata (*R,S*)-2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola*

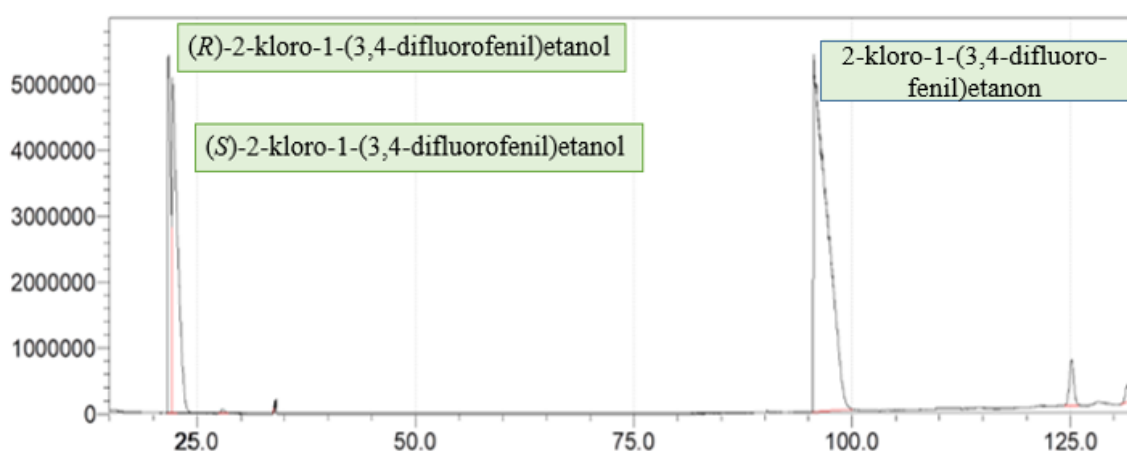
Kvalitativna i kvantitativna analiza redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

Kromatografski uvjeti za određivanje (*R,S*)-2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola:

- Kromatografska kolona: Beta DEX 225 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
- Pokretna faza: Helij
- Ukupni protok: 6,7 mL min⁻¹
- Protok u koloni: 0,71 mL min⁻¹
- Linearna brzina: 31,2 cm sec⁻¹
- Detektor: maseni spektrometar (MS)
- Tlak: p = 42,3 kPa
- Temperatura kolone: T₁ = 90 °C, T₂ = 155 °C, T₃ = 220 °C
- Temperatura injektora: T = 220 °C

- Vrijeme trajanja analize: 133,30 min

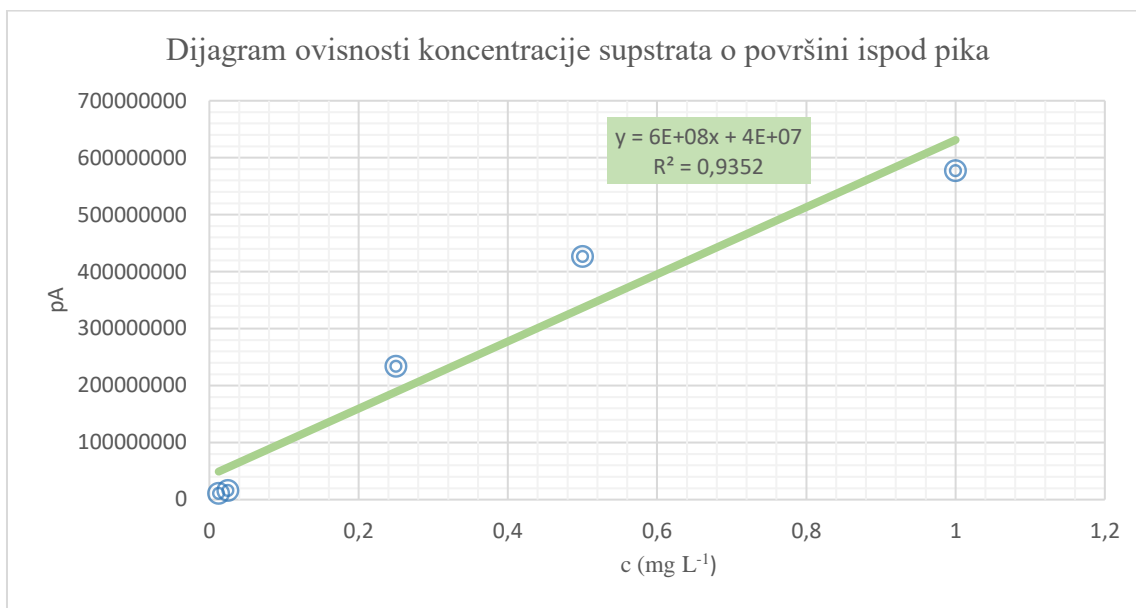
Identifikacija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona i (*R,S*)-2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanola provedena je na temelju njihovih retencijskih vremena, odnosno na temelju vremena izlaženja razdvojenih pikova u reakcijskoj smjesi s kiralne kromatografske kolone te je potvrđena usporedbom masenih spektara u bazi podataka. Retencijsko vrijeme (R_t) za 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanon iznosi 98,625 min, R_t za (*R*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol 21,5 min i R_t za (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol 24,0 min kako je prikazano na slici 6.



Slika 6. Prikaz plinskog kromatograma enantioselektivne redukcije 2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanona katalizirane pekarskim kvascem

3.2.5.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije 2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanona i (*R,S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanola

Za izradu baždarnog dijagrama pripreme se otopine 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u etil-acetatu tako da koncentracije redom iznose 0,0125; 0,025; 0,25; 0,5 i 1 mg mL⁻¹. Zatim se 100 μ L pripremljenih otopina analizira plinskom kromatografijom. Baždarni dijagram konstruira se pomoću računala, tako što se na ordinatu nanese izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija otopina. Konstruirani dijagram na slici 7 prikazuje ovisnost množinske koncentracije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona o površini ispod pika te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna nepoznata koncentracija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u uzorcima.



Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zahvaljujući podizanju ekološke svijesti i želji za vođenjem visokoproduktivnih, ekonomičnih i održivih procesa, sve se veći broj industrija okreće „zelenoj“ proizvodnji. Principi zelene kemije obuhvaćaju primjenu ekološki prihvatljivih, obnovljivih i netoksičnih otapala. S druge strane, biotransformacije, kao jedno od najvažnijih područja zelene kemije izvrsna su alternativa klasičnim kemijskim postupcima sinteze brojnih spojeva koji koriste hlapljiva, zapaljiva i štetna otapala. Prednosti biotransformacijskih procesa poput blagih uvjeta rada, visoke čistoće proizvoda te biorazgradivosti katalizatora doveli su do razvoja mnogih novih visokovrijednih proizvoda u farmaceutskoj, kemijskoj i agrokemijskoj industriji bez štetnog utjecaja na okoliš i zdravlje ljudi. Osim toga, glavna značajka biotransformacija je primjena enzimskih pripravaka koji se odlikuju karakteristikama visoke enantio- i regioselektivnosti pa omogućuju sintezu enantiomerno čistih spojeva. Razlog iznimne važnosti enantiomerno čistih kemikalija je spoznaja da se dva enantiomera razlikuju u svojoj aktivnosti pa imaju različit utjecaj na ljudsko zdravlje (Liang i sur., 2015).

Velik interes u industriji primijećen je kod enantioselektivne katalitičke redukcije prokiralnih ketona čime nastaju kiralni alkoholi koji se koriste u pripremi raznih lijekova i finih kemikalija. Oksidoreducirajući enzimi poput dehidrogenaza i reduktaza pokazali su se učinkovitim alatom za provedbu ovakvih reakcija redukcije. Kako bi oksidoreducirajući enzimi mogli katalizirati reakciju, potreban im je kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid (NADH/NAD⁺) s kojim stupaju u interakciju. Nakon njegovog prelaska u oksidirani (NAD⁺) ili reducirani oblik (NADH), neophodna je regeneracija koenzima kako bi se reakcije redukcije odnosno oksidacije mogle dalje odvijati. Dehidrogenaze su enzimi koji se najčešće koriste u reakcijama oksidacije, a podrazumijevaju prijenos protona H⁺ i dva elektrona sa nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) na molekulu akceptora. Najveću industrijsku primjenu ima enzim alkohol-dehidrogenaza koja se koristi za sintezu kiralnih alkohola ključnih za sintezu kemijskih i farmaceutskih proizvoda (Grogan, 2009).

Kako bi hlapljiva i toksična organska otapala našla manju primjenu u industriji, a proizvodnja optički čistih spojeva bila ekološki prihvatljiva, sve se veći broj znanstvenika okreće istraživanju i razvoju idealnog otapala za biokatalitičke sustave. Takva otapala čija se fizikalno-kemijska svojstva mogu dizajnirati jesu eutektička otapala. Obzirom na navedeno, u ovom je radu ispitana mogućnost primjene eutektičkih otapala u reakcijama redukcije koje

podrazumijevaju primjenu oksidoreduktivnih enzima (alkohol dehidrogenaze). Budući da je stabilnost enzima izuzetno važan parametar u biokatalitičkim reakcijama, također je ispitana aktivnost enzima alkohol-dehidrogenaze (ADH) u pripremljenim eutektičkim otapalima i puferu te promjene u konformaciji ADH primjenom spektrofluorimetrije. U radu je ispitana i stabilnost koenzima NAD^+ i NADH. Kako bi se ispitala mogućnost primjene eutektičkih otapala u reakcijama redukcije primjenom cijelih stanica, provedena je reakcija redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona pomoću pekarskog kvasca u eutektičkom otapalu betain:etilen-glikol. Redukcijom 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona nastaju kiralni produkti (*R*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol i (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol. *S*-enantiomer važan je kiralni intermedijer u pripravi tikagrelora koji je biološki aktivna tvar u antitrombotiku *Brilique* koji se koristi kao učinkoviti lijek za akutni koronarni sindrom (Guo, 2017). Pekarski kvasac, korišten u ovom radu kao biokatalizator, često je korišten za redukciju prokiralnih spojeva zbog svoje netoksičnosti, biorazgradljivosti, niske cijene i velike dostupnosti. Zahvaljujući većem broju oksidoredukcijskih enzima koje sadrži, koristi se za sintezu brojnih spojeva i visokovrijednih proizvoda, a omogućuje i regeneraciju koenzima (Sheldon, 2016).

4.1. Priprava eutektičkih otapala

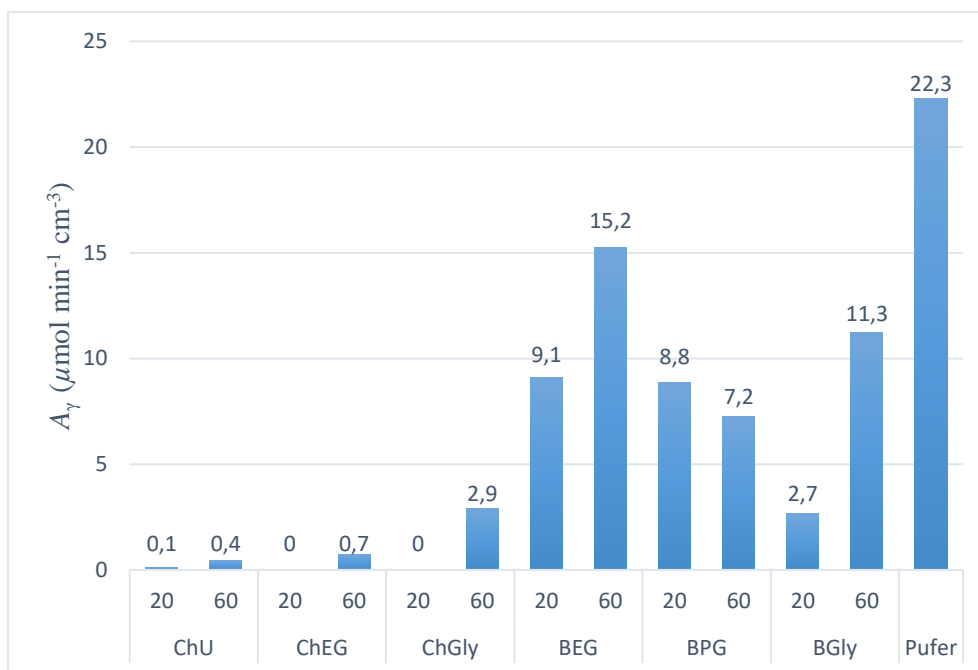
Priprava eutektičkih otapala koja su korištena za praćenje stabilnosti koenzima NADH i NAD^+ provedena je jednostavnim postupkom u kojem je kolin-klorid pomiješan s ureom, glicerolom i etilen-glikolom kao donorima vodikove veze, uz dodatak vode, u omjerima 1:2:4 kako je prikazano u tablici 2. Priprava eutektičkih otapala s betainom provedena je na isti način pri čemu su kao donori vodikove veze dodani etilen-glikol, glicerol i propilen-glikol. Također su pripremljena eutektička otapala s određenim volumnim udjelima vode (tablica 3) koja su korištena za praćenje aktivnosti ADH, promjena u konformaciji istog enzima te u asimetričnoj redukciji kataliziranoj kvascem. Zatim su smjese kontinuirano zagrijavane uz miješanje sve dok nije dobivena homogena i bezbojna viskozna kapljevina. Iskorištenje priprave ovih otapala je 100 %, što predstavlja prednost kod priprave prirodnih eutektičkih otapala. pH vrijednosti izmjerene su pomoću multimetra pH/ion metra i prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Pripravljena prirodna eutektička otapala s izmjerenim pH vrijednostima

Prirodno eutektičko otapalo	Kratica	pH
Kolin-klorid : etilen glikol : voda	ChEG ₄	6,8
Kolin-klorid : glicerol : voda	ChGly ₄	6,7
Kolin-klorid : urea : voda	ChU ₄	8,2
Betain : etilen glikol : voda	BEG ₄	7,85
Betain : glicerol : voda	BGly ₄	7,86
Betain : propilen glikol : voda	BPG ₄	8,2
Kolin-klorid : urea : voda	ChU20%	8,7
Kolin-klorid : urea : voda	ChU60%	8,0
Kolin-klorid : glicerol : voda	ChGly20%	6,0
Kolin-klorid : glicerol : voda	ChGly60%	6,5
Kolin-klorid : etilen glikol : voda	ChEG20%	8,7
Kolin-klorid : etilen glikol : voda	ChEG60%	8,1

4.2. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze

Kako bi se odredila aktivnost enzima (ADH), provedena je reakcija oksidacije etanola u acetaldehid. Otapala u kojima je reakcija provedena su prethodno pripremljena prirodna eutektička otapala i glicin-pirofosfatni pufer (pH = 9). Eutektička otapala na bazi kolin-klorida i betaina pripremljena su s udjelom vode od 20 % i 60 % (v/v). ADH za katalizu reakcije zahtijeva kofaktor NAD⁺ koji se reducira u NADH, a nastali NADH mjeri se spektrofotometrijski pri 340 nm. Dijagram koji pokazuje volumetrijsku aktivnost ADH u eutektičkim otapalima i glicin-pirofosfatnom puferu prikazan je na slici 8.



Slika 8. Volumetrijska aktivnost alkohol dehidrogenaze (A_v) u eutektičkim otapalima ChU₄, ChEG₄, ChGly₄, BEG₄, BPG₄ i BGly₄ te glicin-pirofosfatnom puferu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

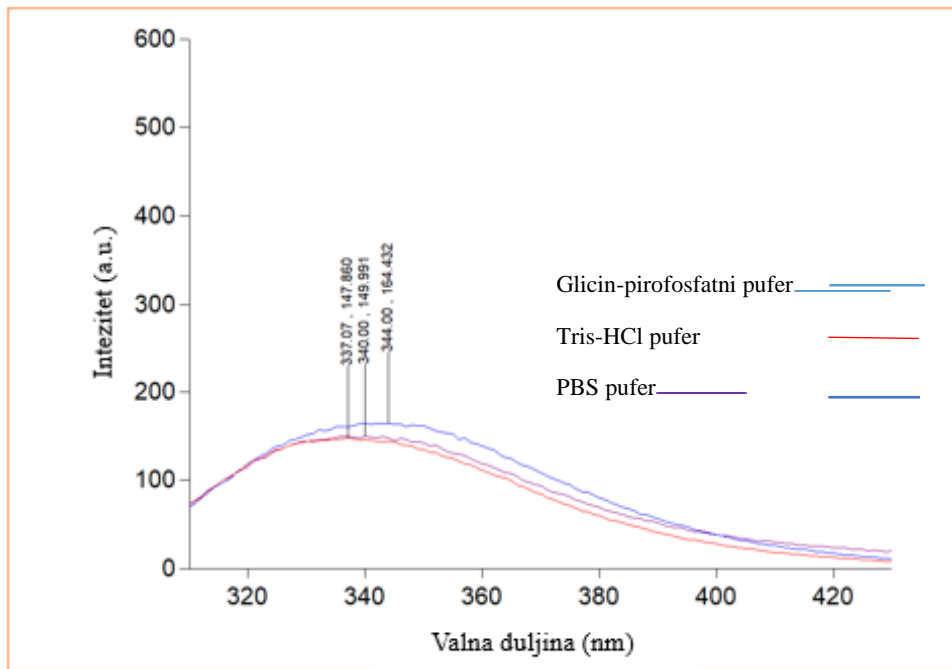
Aktivnosti u ispitanim DES-ovima kretale su se u rasponu od 0,0 do 15,3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$, dok je aktivnost u puferu iznosila 22,9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$. DES-ovi na bazi betaina pokazali su se boljim s vrijednostima u rasponu od 2,7 do 15,3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$, u odnosu na eutektička otapala na bazi kolin-klorida kod kojih je najviša izmjerena aktivnost enzima iznosila tek 2,9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$. U uzorcima koji su sadržavali eutektička otapala s većim udjelom vode (60 %) uglavnom je izmjerena veća enzimaska aktivnost alkohol dehidrogenaze pa je iz ovih rezultata vidljivo da povećanje udjela vode u DES-u povoljno utječe na aktivnost alkohol dehidrogenaze. Kao najbolje otapalo za aktivnost ADH pokazalo se BEG60 % kod kojeg je aktivnost iznosila 15,3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$.

4.3. Konformacijske promjene alkohol dehidrogenaze (ADH) u eutektičkim otapalima

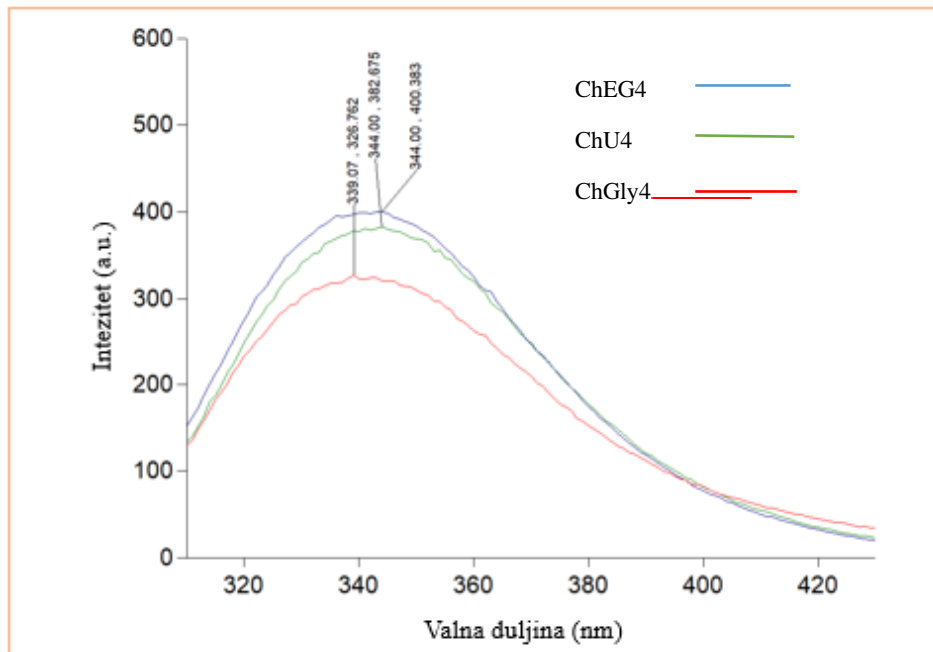
Kako bi se promatrale promjene u konformaciji ADH u različitim eutektičkim otapalima, praćene su promjene u fluorescentnim spektrima otopina enzima. Uzorci ukupnog volumena od 3 mL koji su pripremljeni dodatkom 10 μ L matične otopine enzima ADH u eutektičko otapalo odnosno pufer, temperirani su na 25 °C tijekom 5 minuta. Zatim su uzorci snimani na spektrofotometru pri valnim duljinama $\lambda_{\text{eks.}} = 293$ nm i $\lambda_{\text{em.}} = 300 - 400$ kako bi se pratila konformacija ADH.

Mjerenje konformacije ADH primjenom spektrofotometra moguće je zahvaljujući nativnoj fluorescenciji ovog proteina koja potječe od aminokiselina tirozina i triptofana. Triptofan daje najveći doprinos ukupnoj fluorescenciji, a raspon valnih duljina emisijskog maksimuma (λ_{max}) triptofana je u rasponu od 308 do 355 nm koji ovisi o stupnju izloženosti pobočnog ogranka. Konformacijske promjene posljedica su promjena u intenzitetu maksimalne fluorescencije (I_{max}) i valnoj duljini emisijskog maksimuma (λ_{max}). Niže vrijednosti za λ_{max} (eng. *blue shift*) triptofan pokazuje u nepolarnoj, hidrofobnoj mikrookolini (Jia i sur., 2014). U doticaju s okolnim otapalom, imidazolni prsten triptofana postaje izloženiji i stvara vodikove veze zbog čega dolazi do pomaka valne duljine maksimuma intenziteta fluorescencije prema crvenom dijelu spektra (eng. *red shift*) (Lakowitz, 2006). Osim toga, fluorescenciju triptofana moguće je utišati ili ugasiti molekulama „prigušivačima“ (eng. *quencher*). Prilikom gašenja ili utišavanja fluorescencije dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije zbog stvaranja veza između molekule „prigušivača“ i molekule fluorofora unutar triptofana odnosno proteina (Luisi i Favilla, 1970). U ovom radu praćen je utjecaj 6 eutektičkih otapala ChU₄, ChEG₄, ChGly₄, BEG₄, BPG₄ i BGly₄ na konformaciju enzima ADH što također utječe i na samu aktivnost enzima. Na slici 9 prikazani su spektri dobiveni nakon spektrofotometrijskog praćenja konformacije enzima ADH u puferima (a), eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida (b) i na bazi betaina (c).

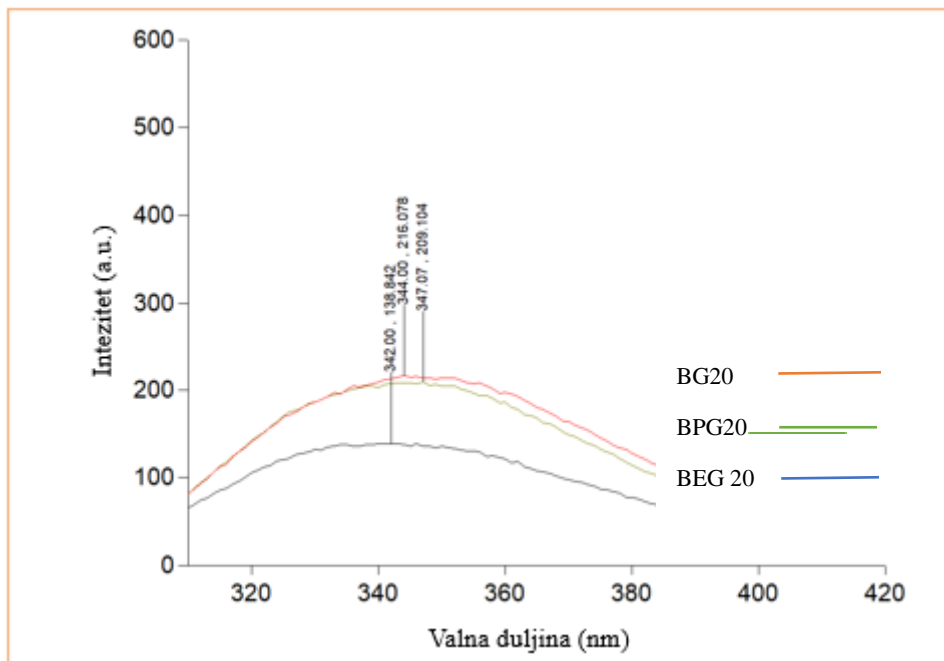
(a)



(b)



(c)



Slika 9. Spektri dobiveni mjerenjem na spektrofluorimetru pri valnim duljinama $\lambda_{\text{eks.}} = 293 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em.}} = 300 - 400$ kako bi se pratila konformacija ADH u puferima (a), eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida (b) i eutektičkim otapalima na bazi betaina (c).

Tijekom praćenja stabilnosti koenzima NAD^+ , najniži intenziteti fluorescencije izmjereni su u uzorcima s referentnim otapalima, glicin pirofosfatnim, PBS donosno Tris-HCl puferom, a koji su pogodni za odvijanje reakcije koju provodi alkohol dehidrogenaza. Tijekom stvaranja veza između aktivnog mjesta enzima i supstrata odnosno otapala dolazi do zaklanjanja triptofana u strukturi enzima što se očituje smanjenjem apsorbancije. Ispitivanjem utjecaja zadanih eutektičkih otapala, iz dobivenih spektara može se vidjeti tek blagi porast intenziteta fluorescencije u uzorcima s eutektičkim otapalima na bazi betaina (slika 9c) u odnosu na intenzitet fluorescencije u uzorcima s puferima. U uzorcima s kolinijevim DES-ovima zabilježen je veći porast fluorescencije zbog izazvanih promjena u konformaciji ADH. Dobiveni rezultati pokazuju da betainijevi DES-ovi tvore veze s enzimom i pogodniji su za odvijanje reakcije u odnosu na DES-ove na bazi kolin-klorida. Zabilježena fluorescencija kod betainijevih DES-ova sličnog je intenziteta kao u uzorcima s puferima. Mjerenjem fluorescencije u kolinijevim DES-ovima, intenzitet se nije značajno mijenjao u uzorcima s različitim donorima vodikovih veza, dok se kod betainijevih DES-ova intenzitet fluorescencije razlikuje ovisno o donoru vodikove veze. Na slici 9c vidljiva je razlika u intenzitetima

fluorescencije kod betainijevih DES-ova pri čemu je najslabiji intenzitet zabilježen u uzorku s etilen-glikolom kao donorom vodika zbog čega je ovaj DES najpogodniji za odvijanje reakcije jer najmanje utječe na konformaciju enzima ADH. Isto otapalo pokazalo se najpogodnijim i tijekom ispitivanja aktivnosti enzima u pripremljenim DES-ovima. Dobiveni rezultati potvrđuju utjecaj promjene konformacije enzima na njegovu aktivnost. Luisi i Favilla (1970) u svom radu navode da smanjenje fluorescencije može biti posljedica vezanja koenzima ili inhibitora enzima za njegova aktivna mjesta zbog čega triptofan u aktivnom mjestu slabije fluorescira. Ukoliko dolazi do vezanja koenzima NAD^+ ili NADH za aktivna mjesta u enzimu, enzimska aktivnost se povećava. Međutim, kompeticija između inhibitora i supstrata/koenzima za aktivna mjesta u enzimu može rezultirati inhibiranjem ili inaktivacijom enzima ukoliko inhibitora u otopini ima u većoj koncentraciji u odnosu na supstrat. Osim navedenog, gubitak fluorescencije može biti i posljedica odmatanja proteina što izravno utječe na enzimsku aktivnost i konformaciju (Luisi i Favilla, 1970).

4.4. Stabilnost koenzima NADH i NAD^+ u eutektskim otapalima

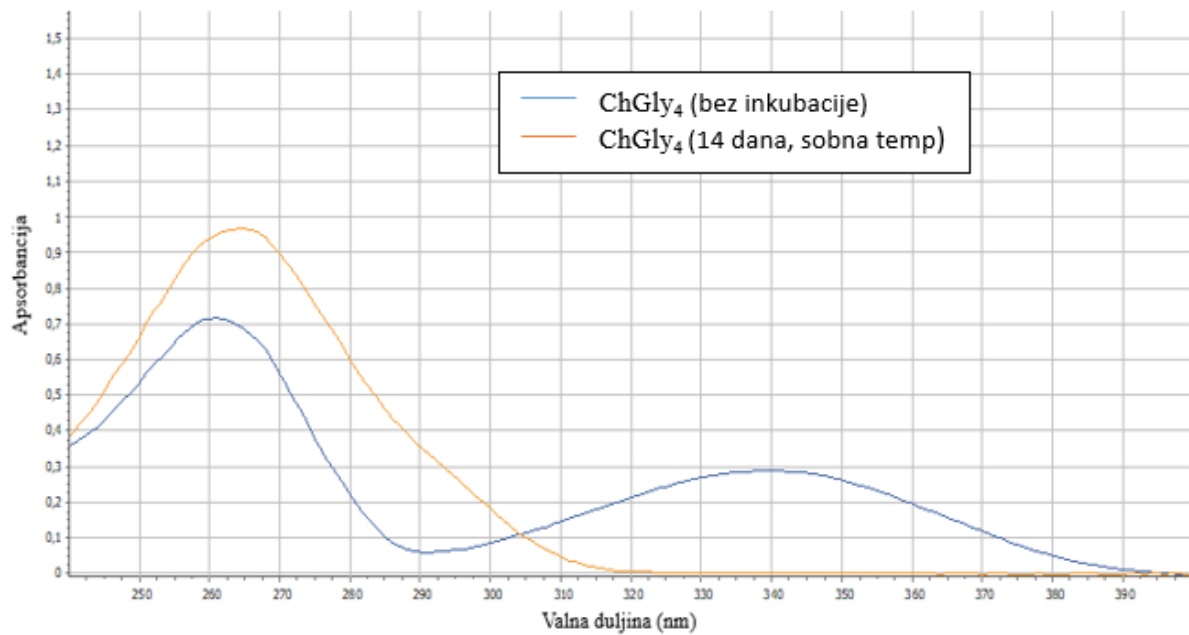
U ovom radu stabilnost koenzima NADH i NAD^+ tijekom inkubacije u eutektskim otapalima praćena je spektrofotometrijski, tj. praćenjem promjena apsorpcijskog spektra u rasponu od 250 do 400 nm. Ova metoda pogodna je za praćenje stabilnosti koenzima zahvaljujući adeninu i piridinskom prstenu u strukturi NADH koji apsorbiraju svjetlost na 260 nm i 340 nm, dok apsorpcijski spektar koenzima NAD^+ ima jedan pik na 260 nm koji odgovara adeninu (Rover Jr. i sur., 1998).

Za tu svrhu pripremljene su otopine koenzima koncentracije 500 g L^{-1} u prethodno pripremljenim DES-ovima na bazi kolin-klorida i betaina odnosno referentnim puferima. Iste su inkubirane pri sobnoj temperaturi ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). Obzirom da su se DES-ovi na bazi kolin-klorida pokazali boljima za stabilnost koenzima, u istim otapalima pratila se stabilnost koenzima NADH i NAD^+ nakon inkubaciju u hladnjaku pri temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 15 dana.

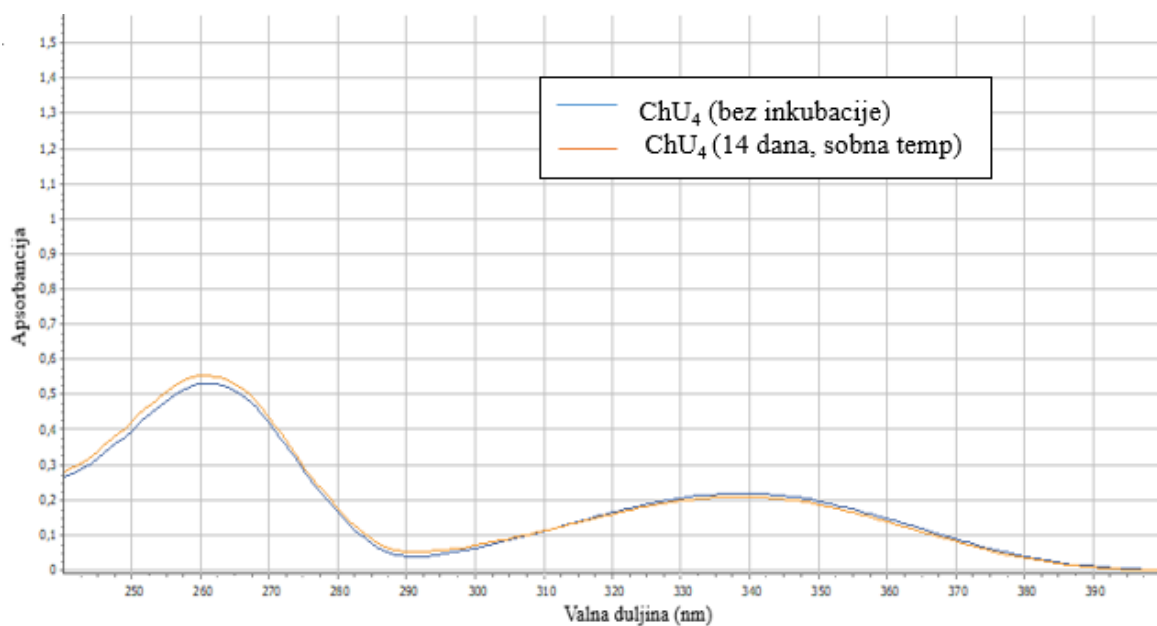
Nakon inkubacije svih uzoraka tijekom 15 dana primijećen je porast apsorbanije pri 262 nm i smanjenje apsorbanije pri 338 nm, a pri 300 nm pojavio se širi pik. Ove promjene u apsorbaniji ukazuju na oksidaciju NADH u NAD^+ i formiranje inhibitora. Obzirom da NAD^+ tj. adenin u njegovoj strukturi apsorbira samo na 260 nm, oksidacijom NADH u NAD^+ raste pik na 260 nm, a zbog degradacije NADH s vremenom inkubacije, degradira se i piridinski prsten zbog čega se pik na 340 nm smanjuje (Fukazawa i Ishihara, 2016). Primjer destabilizacije

koenzima tijekom inkubacije u određenom otapalu (ChGly₄) prikazan je na slici 10a, pri čemu je vidljiv porast apsorbancije na 262 nm, a pad apsorbancije pri 338 nm jer dolazi do oksidacije NADH u NAD⁺. S druge strane, eutektičko otapalo ChU₄ pokazalo je stabilizirajući utjecaj na koenzime NADH i NAD⁺, što se očituje u malim promjenama u apsorpcijskom spektru (slika 10 b,c).

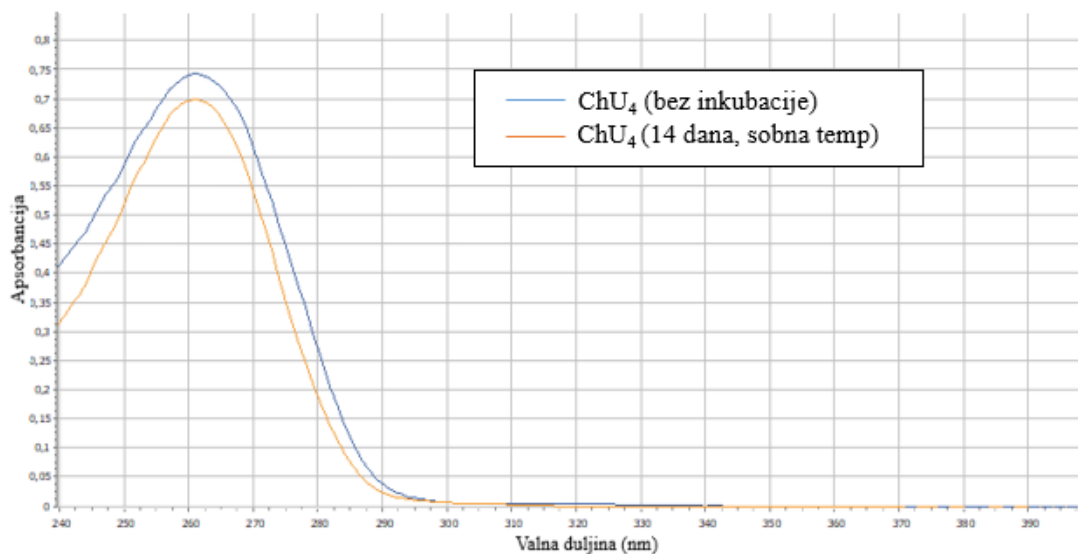
(a)



(b)



(c)

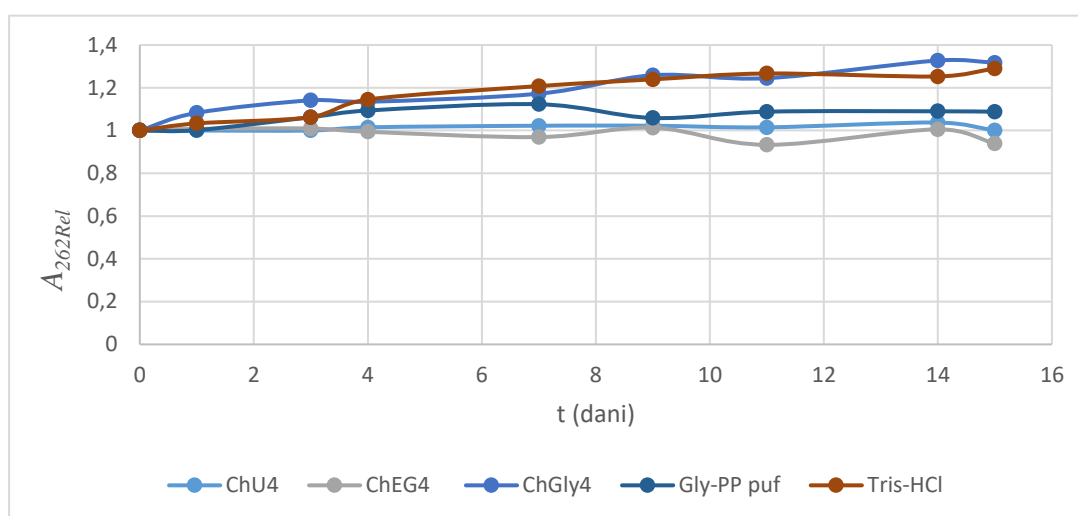


Slika 10. Promjene u apsorbanciji (Δ ABS) nakon 14 dana inkubacije koenzima na sobnoj temperaturi a) NADH u ChGly₄ koji negativno utječe na stabilnost koenzima NADH što se vidi po povećanju apsorbancije pri 262 nm i smanjenju apsorbancije pri 338 nm zbog oksidacije NADH u NAD⁺; b) koenzim NADH stabilan je u DES-u ChU₄ jer na spektru nisu vidljive promjene u apsorbanciji pri 262 i 338 nm; c) koenzim NAD⁺ također pokazuje stabilnost u eutektičkom otapalu ChU₄ stabilnom apsorbancijom na spektru pri 262 nm.

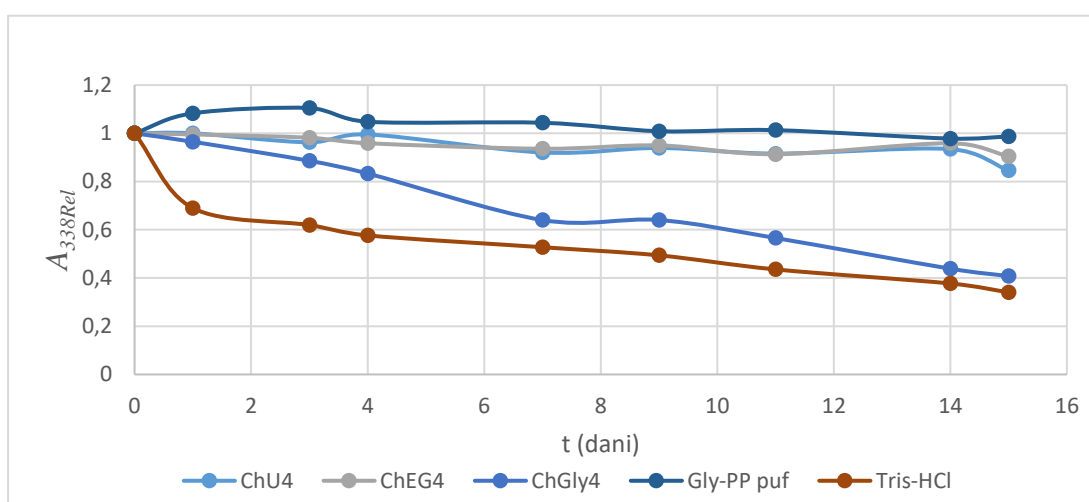
4.4.1. Stabilnost NADH

Na slici 11 prikazane su promjene u relativnoj apsorbanciji izmjerenoj na sobnoj temperaturi pri valnoj duljini od 262 nm (a) i 338 nm (b) o vremenu inkubacije NADH u različitim eutektičkim otapalima s kolin-kloridom te referentnim otapalima glicin-pirofosfatnom puferu i Tris-HCl puferu.

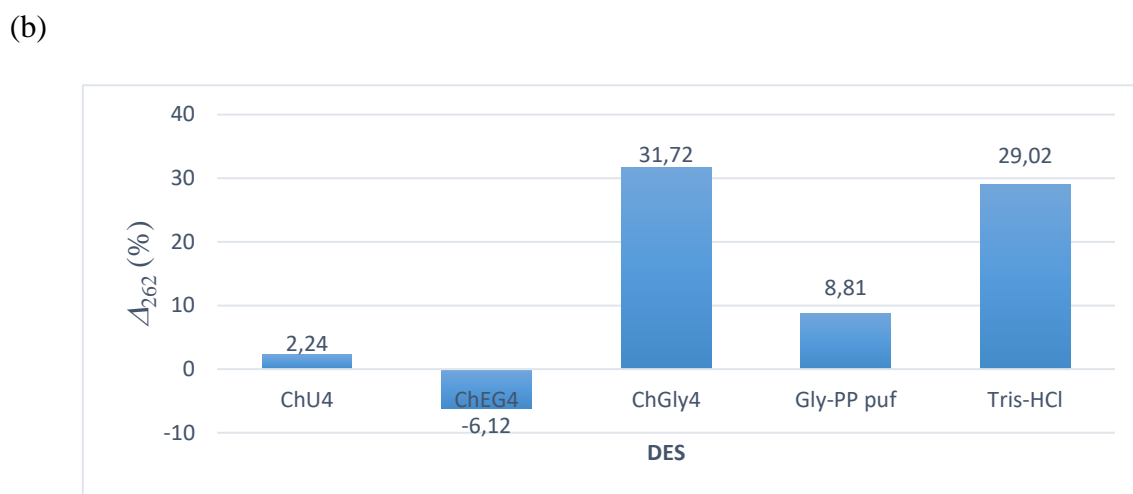
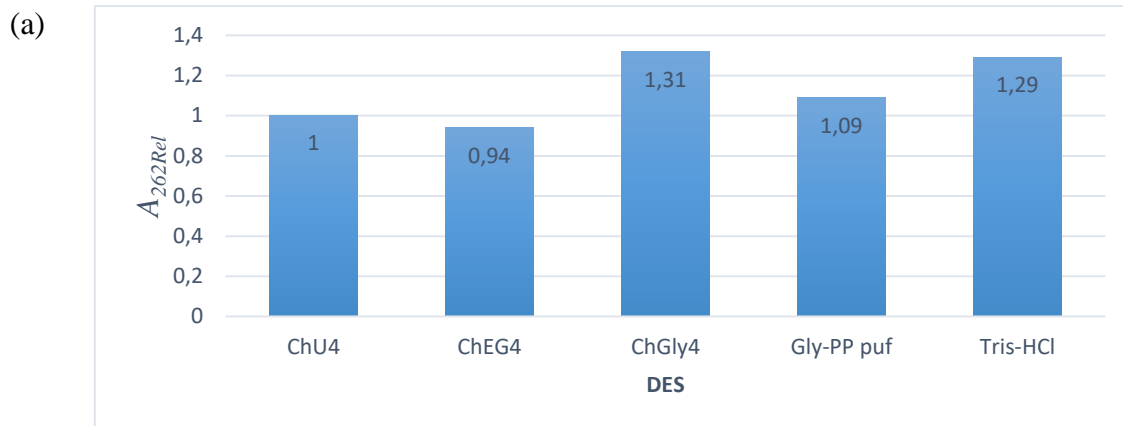
(a)



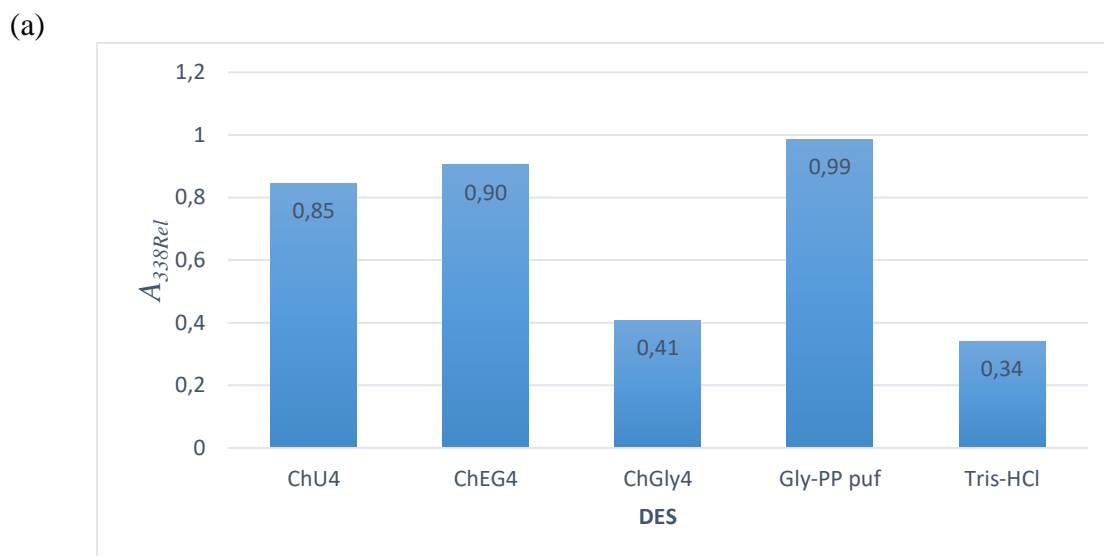
(b)



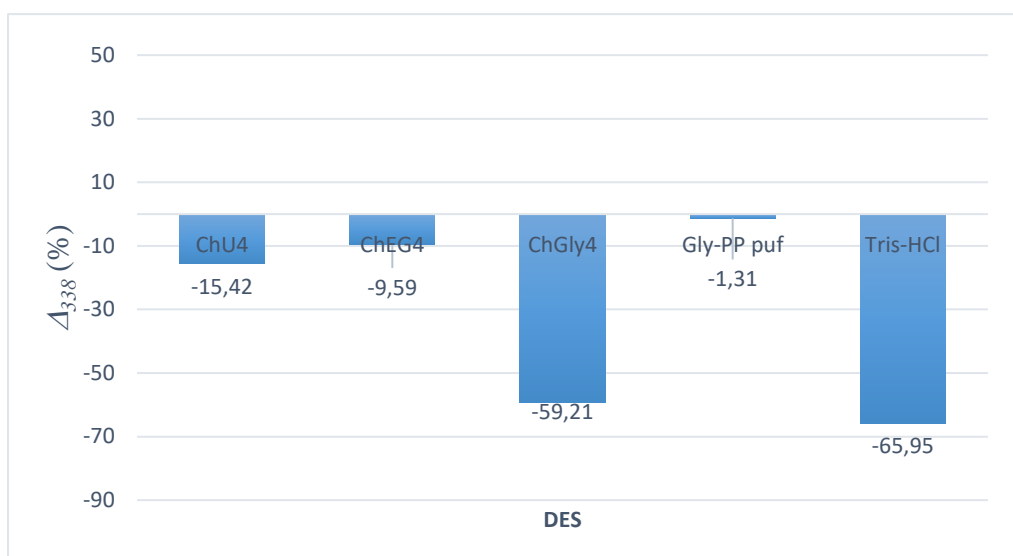
Slika 11. Promjena stabilnosti koenzima NADH u različitim prirodnim eutektičkim otapalima na bazi kolin-klorida i puferima, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 262 nm (A_{262Rel}) (a) i 338 nm (A_{338Rel}) (b) nakon inkubacije otopina na sobnoj temperaturi (25 °C) tijekom 15 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).



Slika 12. Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NADH tijekom 15 dana u različitim otapalima (a) te odstupanje od početne apsorbancije pri 262 nm (Δ_{262}) u različitim otapalima pri sobnoj temperaturi (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).



(b)



Slika 13. Relativne apsorbancije izmjerene na 338 nm (A_{338Rel}) (a) te odstupanje od početne apsorbancije na 338 nm (ΔA_{338}) (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

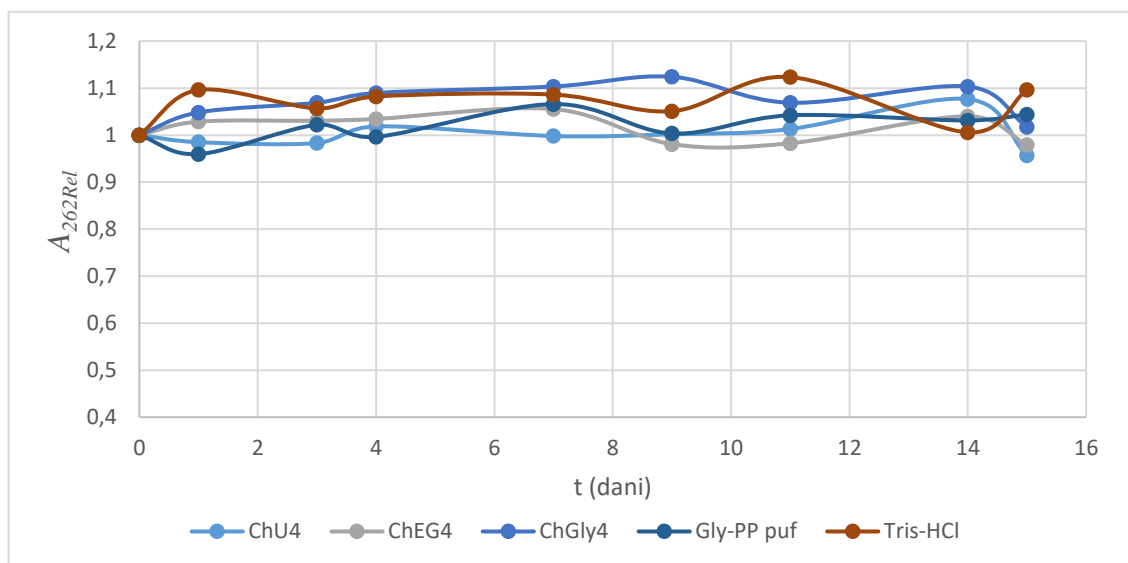
Izmjerene apsorbancije koenzima NADH na valnoj duljini od 262 nm i 338 nm svedene su na relativne vrijednosti pri čemu se sa slike 12 može vidjeti da je najveća vrijednost apsorbancije koenzima NADH zabilježena u uzorku s ChGly₄. Uzorak s istim otapalom pokazao je i najveće odstupanje (%) od početne apsorbancije pri 262 nm. Odstupanje se kreće u rasponu od -6,118 % do 31,724 % pri čemu je najmanje odstupanje zabilježeno je u uzorku s ChU₄ otapalom (2,2 %) (Slika 12b). Mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 338 nm, najveća relativna vrijednost apsorbancije zabilježena je u uzorku s ChEG₄ (slika 13a), u kojemu je odstupanje od početne apsorbancije (-9,6 %) pri 338 nm najmanje, zbog čega se ovo eutektičko otapalo pokazalo prihvatljivim za stabilnost koenzima NADH (slika 13b). U puferima je relativna apsorbancija pri 262 nm iznosila 1,1 za glicin-pirofosfatni pufer, a 1,3 za Tris-HCl, dok je u uzorku s glicin-pirofosfatnim puferom odstupanje iznosilo samo 8,8 % (slika 12b). Pri 338 nm najveća relativna vrijednost izmjerena je u glicin-pirofosfatnom puferu ($A_{338Rel} = 0,9$), a u istom uzorku zabilježeno je i najmanje odstupanje (-1,3 %) od početne vrijednosti apsorbancije (slika 13b). Blagi porast u apsorbanciji pri 262 nm zabilježen je kod otopine koja je sadržavala pufer Tris-HCl i DES ChU₄. Karakteristika koja ih izdvaja od ostala tri otapala je i viši pH (8,2 za ChU₄ i 7,5 za TrisHCl) pa blago lužnati uvjeti pozitivno utječu na stabilnost reduciranog koenzima (Zhang i sur., 2018). Kod ostala tri otapala apsorbancija je konstantna tijekom vremena inkubacije. Ipak, na valnoj duljini od 338 nm zabilježen je blagi pad u apsorbanciji

kod uzoraka koji su sadržavali Tris-HCl pufer i glicin-pirofosfatni pufer što se može objasniti kao posljedica oksidacije NADH jer tijekom inkubacije reducirani NADH prelazi u oksidirani oblik (NAD^+) (Zhang i sur., 2018).

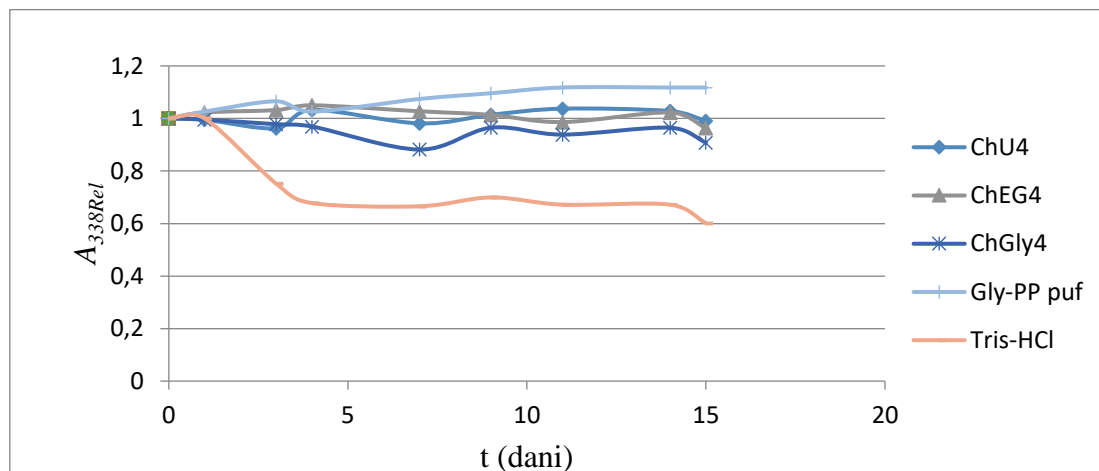
Uspoređujući dobivene rezultate tijekom praćenja stabilnosti koenzima NADH u različitim eutektičkim otapalima s obzirom na odstupanja od početne apsorpcije, najveća stabilnost koenzima pri valnim duljinama od 262 nm i 338 nm zabilježena je kod ChU_4 i ChEG_4 .

Na slici 14, koja prikazuje vrijednosti apsorpcija na 262 nm (a) i 338 nm (b) izmjerenih nakon inkubacije NADH u kolinijevim DES-ovima i u puferima na 4 °C tijekom 15 dana, vidi se sličnost u dobivenim rezultatima u odnosu na izmjerene apsorpcije kod uzoraka inkubiranih na sobnoj temperaturi. Prilikom mjerenja na obje temperature primjetan je sličan trend u vrijednostima relativnih apsorpcija iz kojeg je vidljivo da ChU_4 ima povoljan utjecaj na stabilnost koenzima, dok su u DES-u ChGly_4 izmjerena najveća odstupanja od početne apsorpcije. Razlika se može primijetiti u vrijednostima izmjerene relativne apsorpcije pri 338 nm (slika 14b) koje su nešto više u odnosu na dobivene rezultate pri istoj valnoj duljini kod uzoraka inkubiranih na sobnoj temperaturi. Veće vrijednosti relativne apsorpcije ukazuju na veću stabilnost koenzima pri nižim temperaturama što je razlog njihovog skladištenja u hladnjacima na temperaturi nižoj od sobne (Rover Jr i sur, 1998).

(a)

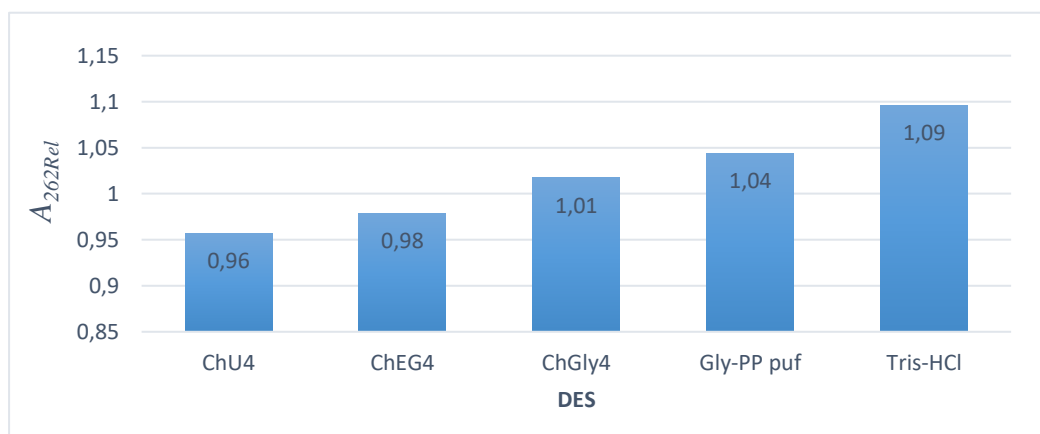


(b)

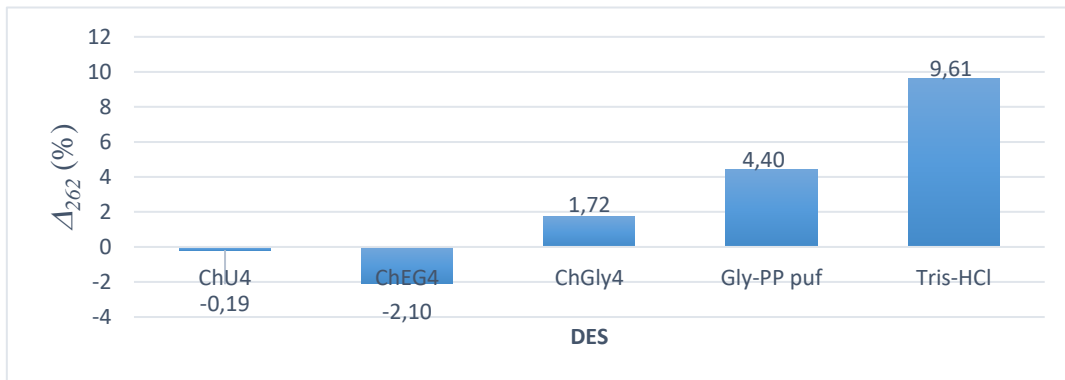


Slika 14. Grafovi s izmjerenim apsorbancijama pri 262 nm (A_{262Rel})(a) i 338 nm (A_{338Rel}) (b) koji prikazuju promjene u relativnoj apsorbanciji koenzima NADH u DES-ovima na bazi kolin-klorida tijekom inkubacije uzoraka 15 dana na 4 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

(a)

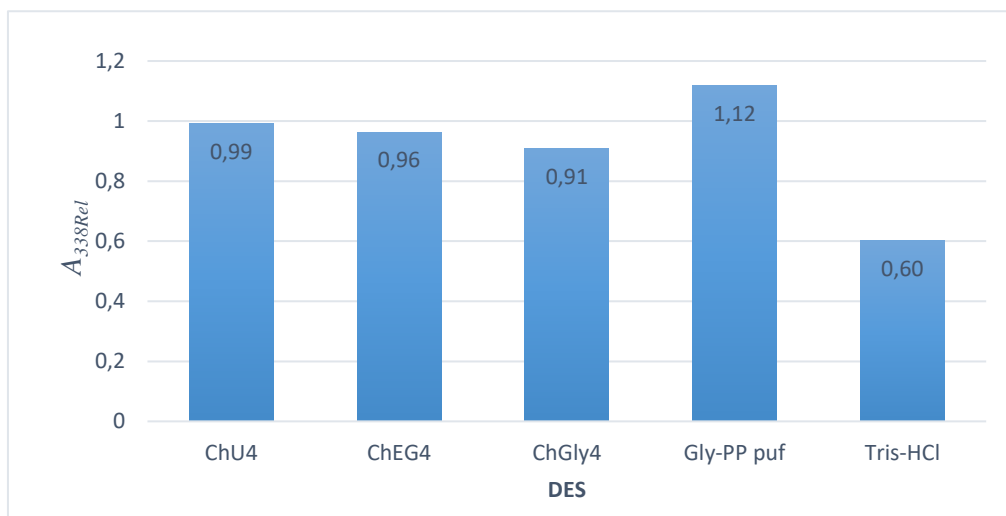


(b)

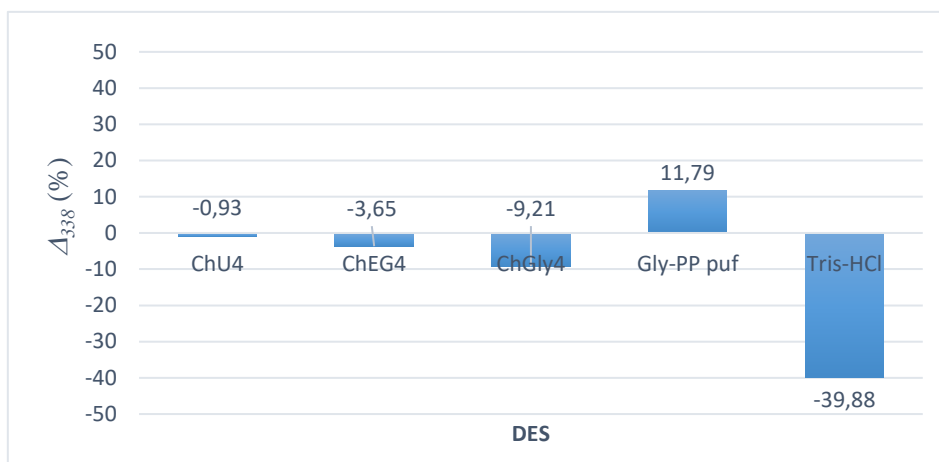


Slika 15. Relativna apsorbancija na 226 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NADH na 4 °C tijekom 15 dana u različitim otapalima (a) i odstupanja (ΔA_{262}) od početne apsorbancije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

(a)



(b)

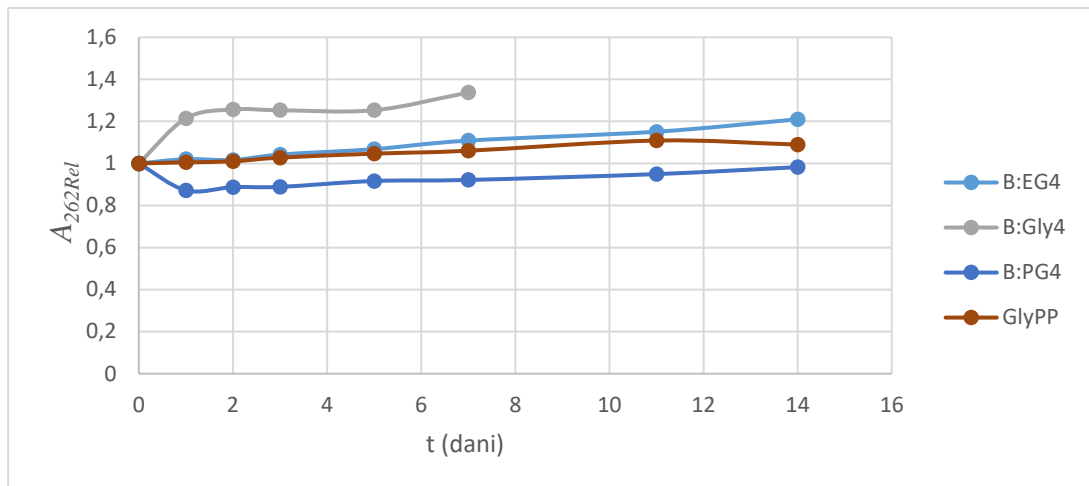


Slika 16. Relativna apsorbancija na 338 nm (A_{338Rel}) nakon inkubacije NADH na 4 °C tijekom 15 dana u različitim otapalima (a) i odstupanja (Δ_{338}) od početne apsorbancije (b) pri 338 nm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

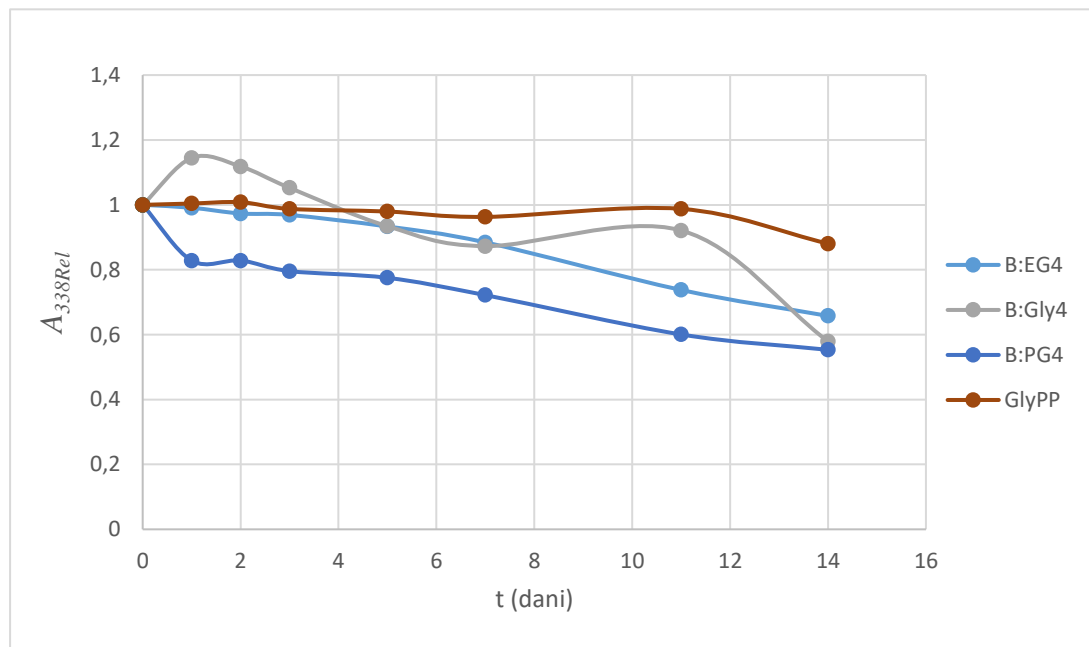
Izmjerene vrijednosti apsorbancija koenzima NADH nakon inkubacije na 4 °C svedene su na relativne apsorbancije. Mjerenjem apsorbancije na 262 nm u uzorku s ChGly₄ očitana je najveća vrijednost apsorbancije ($A_{262Rel} = 1,01$), no najniži postotak odstupanja od početne apsorbancije pri 262 nm pokazuje uzorak s ChU₄ (-0,19 %) (slika 15b) što je također slučaj i kod uzoraka inkubiranih na sobnoj temperaturi (slika 12b). Mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 338 nm uzorak s ChU₄ najviše je apsorbirao UV-VIS svjetlost ($A_{338Rel} = 0,9$), a pokazao je i najmanji postotak odstupanja (-0,9 %) od početne apsorbancije pri 338 nm što ga čini najpogodnijim eutektičkim otapalom za stabilnost koenzima NADH (slika 16b). Pufferi su kod mjerenja na 262 i 338 nm pokazali slične vrijednosti u relativnoj apsorbanciji, no uzorak s glicin-pirofosfatnim puferom imao je manja odstupanja u odnosu na uzorak s Tris-HCl puferom.

Grafovi na slici 17 prikazuju apsorbancije izmjerene u uzorcima s eutektičkim otapalima na bazi betaina i u glicin-pirofosfatnom puferu.

(a)



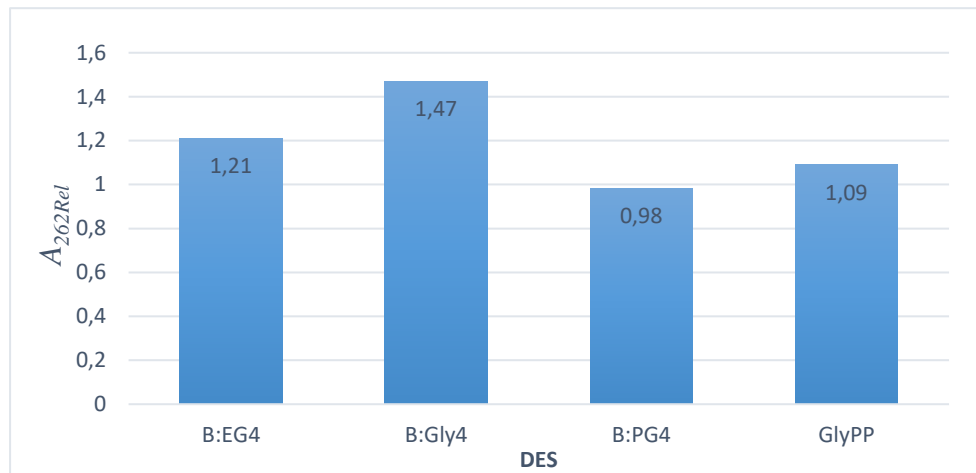
(b)



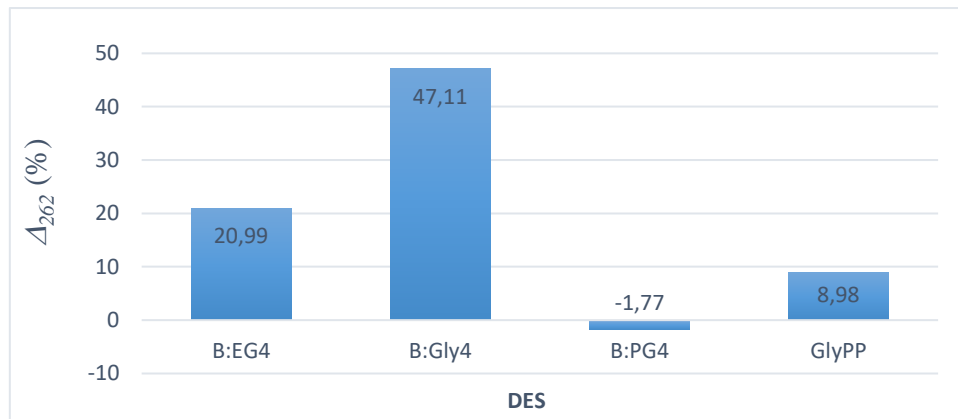
Slika 17. Grafovi s izmjerenim apsorbancijama pri 262 nm (A_{262Rel}) (a) i 338 nm (A_{338Rel}) (b) koji prikazuju stabilnost koenzima NADH u DES-ovima pripremljenim s betainom, tijekom inkubacije uzoraka 14 dana na sobnoj temperaturi (25 °C). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Nakon što su apsorbancije pri valnoj duljini od 262 nm izmjerene, svedene su na relativne vrijednosti te je izračunato odstupanje od početne apsorbancije prikazano na slici 18.

(a)



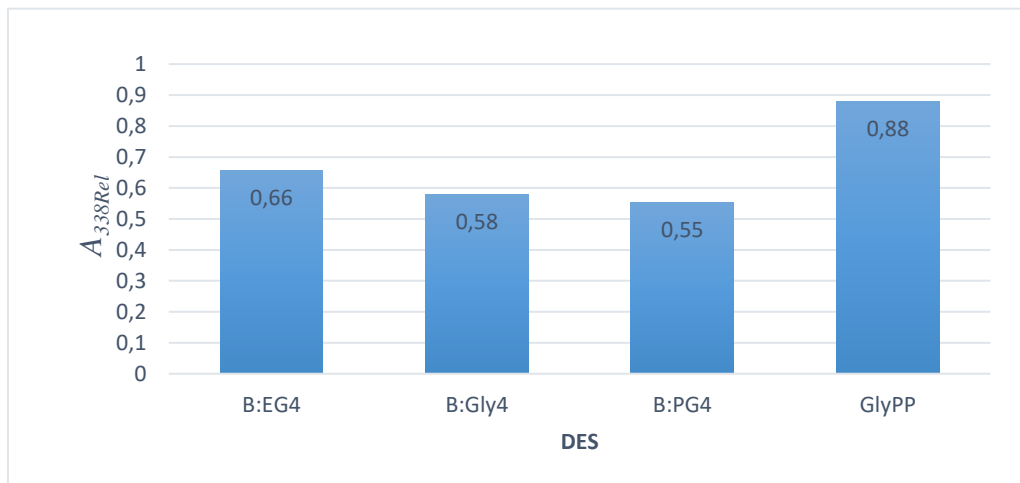
(b)



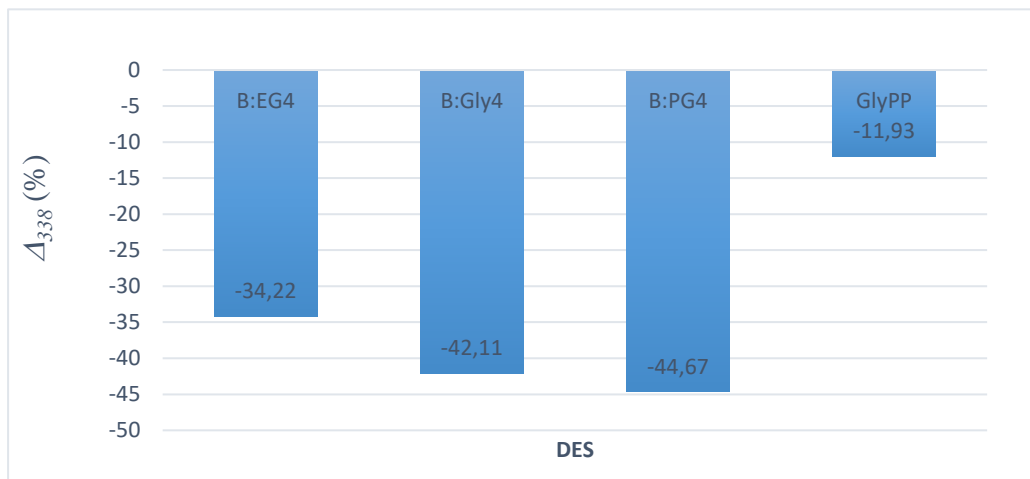
Slika 18. Relativne apsorbancije izmjerene na 262 nm (A_{262Rel}) kod uzoraka na bazi betaina koji su inkubirani 14 dana na 25 °C (a) i izračunata odstupanja (Δ_{262}) od početne apsorbancije (b) za iste uzorke. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Relativne apsorbancija kreću se u rasponu od 0,9 do 1,4, a najveća apsorbancija na 262 nm izmjerena je u uzorku B:Gly₄ ($A_{262Rel} = 1,4$), za koji je izračunato i najveće odstupanje od početne apsorbancije pri 262 nm (47,1 %). DES-ovi na bazi betaina pokazuju manja odstupanja u odnosu na kolin-klorid DES-ove, a najmanje odstupanje zabilježeno je u uzorku s BPG₄ (-1,77 %) (slika 18).

(a)



(b)



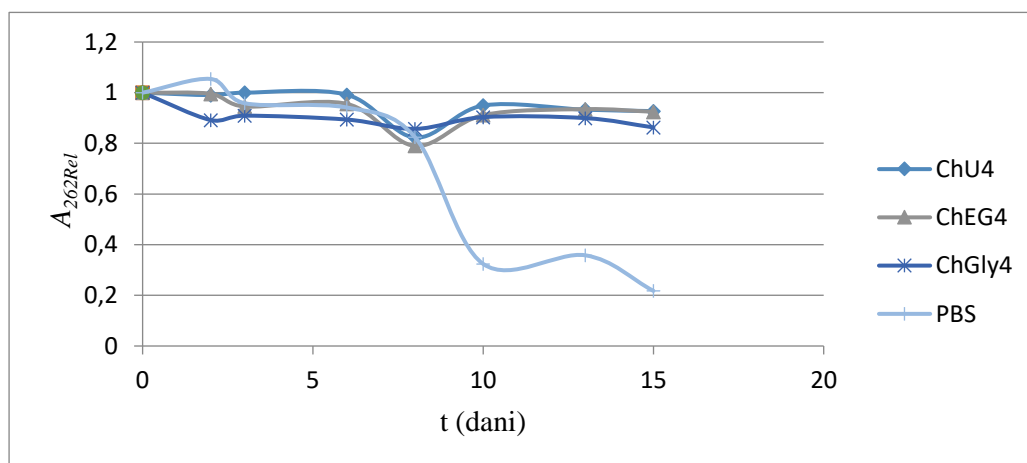
Slika 19. Grafovi s relativnim apsorbancijama (A_{338Rel}) (a) i odstupanjima (Δ_{338}) od početne apsorbancije (b) uzoraka s betainom izmjenjenih pri 338 nm nakon inkubacije na 25 °C tijekom 14 dana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

U ovim uzorcima s DES-ovima pripremljenim s betainom zabilježena su velika odstupanja od početne apsorbancije koja se kreću od -34,22 % (BEG₄) do -44,67 % (BPG₄). Uzorak s BEG₄ pokazuje najmanje odstupanje od početne apsorbancije i najveću relativnu apsorbanciju ($A_{338Rel} = 0,66$) pa se pokazalo najpogodnijim za stabilnost koenzima nakon inkubacije 14 dana na sobnoj temperaturi (slika 19).

4.4.2. Stabilnost NAD⁺

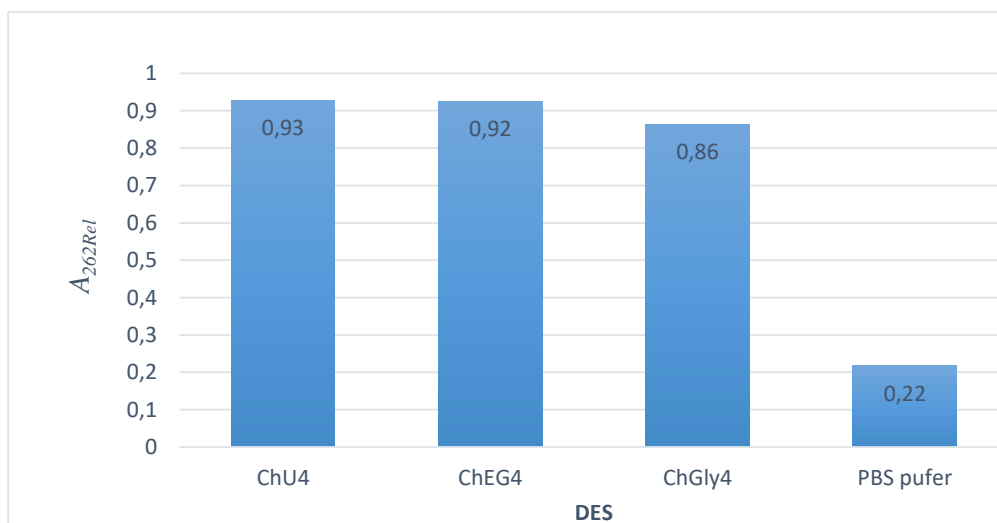
Osim stabilnosti koenzima NADH, praćena je stabilnost i koenzima NAD⁺ pri jednakim uvjetima. Uzorci su, osim koenzima, sadržavali prethodno pripremljena prirodna eutektićka otapala i PBS pufer pH 7,4. Obzirom da NAD⁺ apsorbira UV-VIS svjetlost samo na 262 nm, apsorbancija je mjerena pri navedenoj valnoj duljini.

Nakon što su apsorbancije uzoraka s koenzimom NAD⁺ izmjerene na valnoj duljini od 262 nm nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, svedene su na relativne apsorbancije, a na slici 20 vidljivo je da je najviša relativna apsorbancija zabilježena u uzorku s ChU₄ ($A_{262Rel} = 0,93$) (slika 21a) za koji je dobiven i najmanji postotak odstupanja od početne apsorbancije (-7,27 %) mjerene na 262 nm (slika 21b).

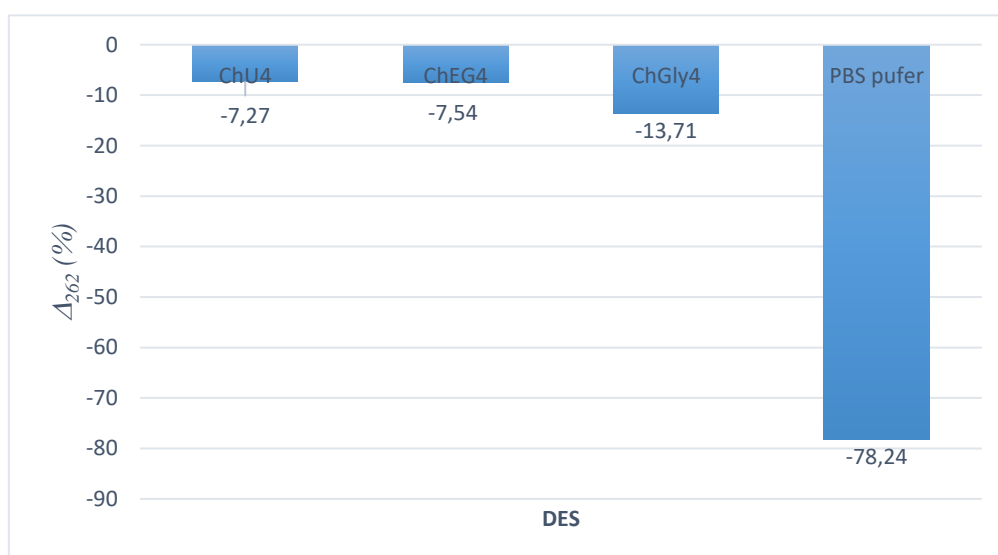


Slika 20. Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NAD⁺ na sobnoj temperaturi tijekom 15 dana u različitim otapalima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

(a)

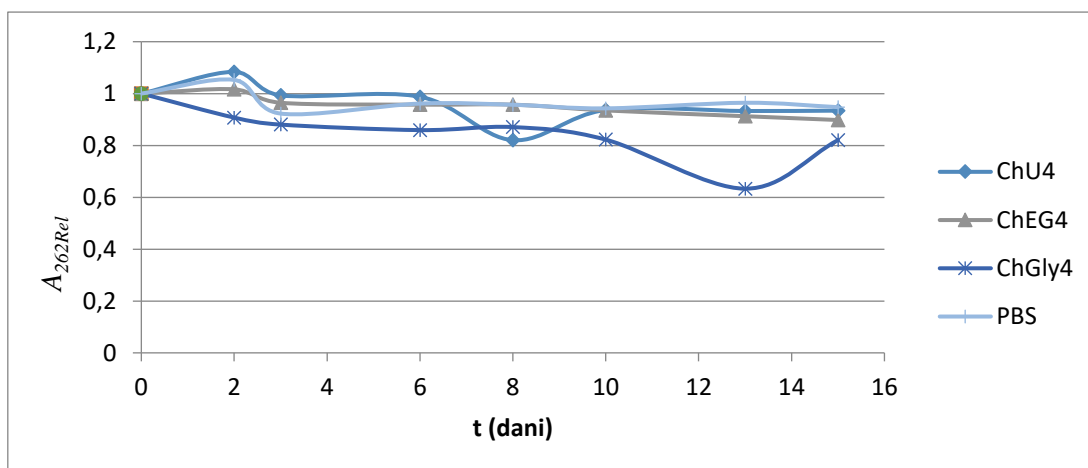


(b)



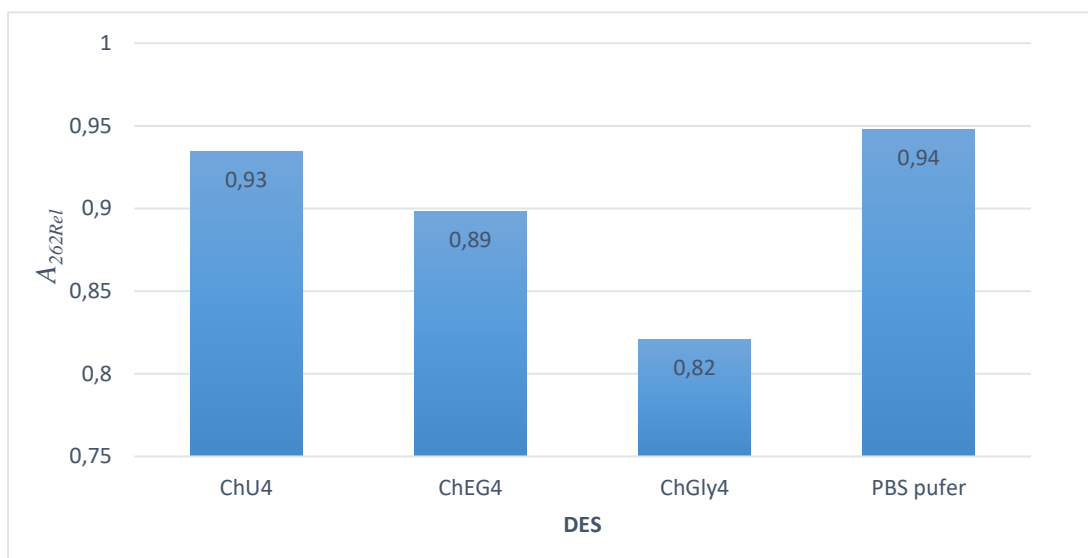
Slika 21. Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NAD^+ na sobnoj temperaturi tijekom 15 dana u različitim otapalima (a) i odstupanje (Δ_{262}) od početne apsorbancije mjerene na 262 nm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Stabilnost koenzima NAD^+ u eutektičkim otapalima sa kolin-kloridom praćena je i kod uzoraka koji su inkubirani tijekom 15 dana na 4 °C pošto su se eutektička otapala na bazi kolin-klorida pokazala boljim za stabilnost koenzima u odnosu na DES-ove s betainom. Rezultati ovih mjerenja prikazani su na slici 22 i slici 23.

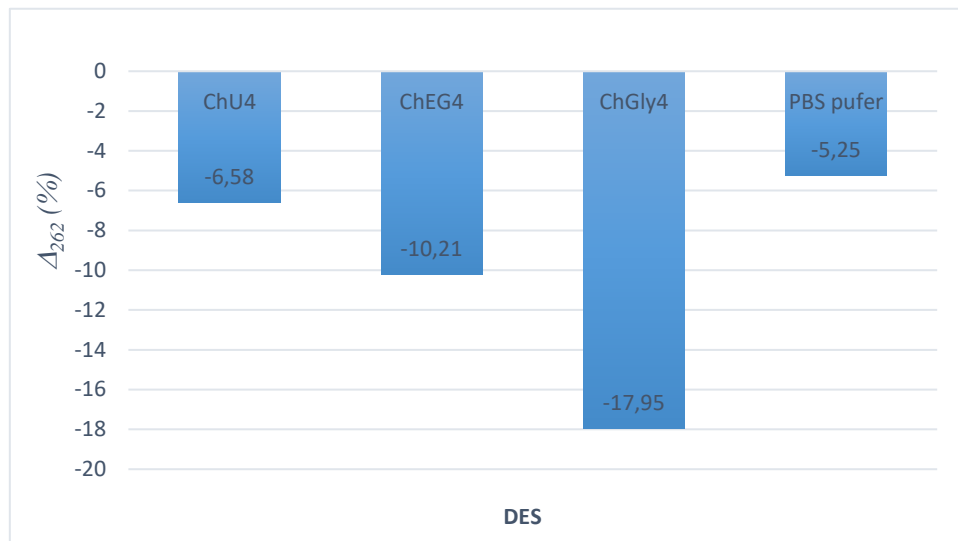


Slika 22. Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NAD^+ pri temperaturi od 4 °C tijekom 15 dana u različitim otapalima.

(a)



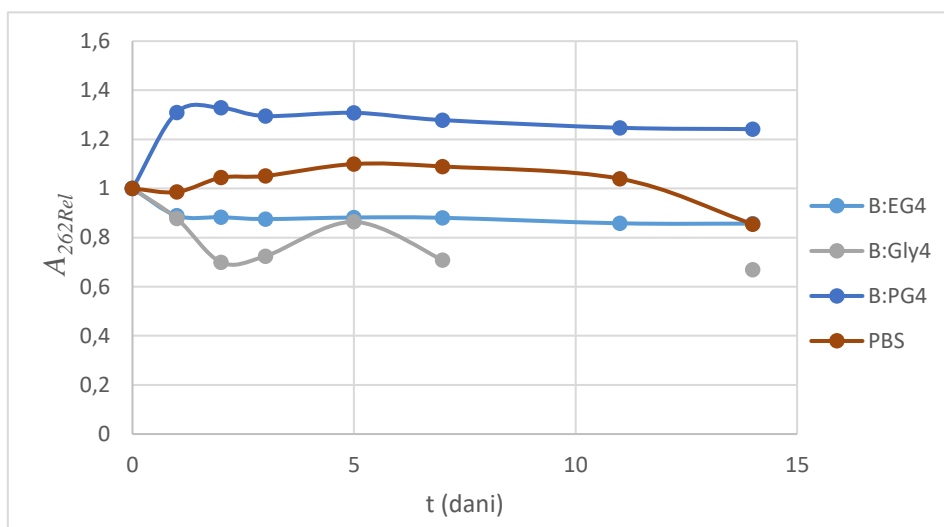
(b)



Slika 23. Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije NAD^+ pri temperaturi od 4 °C tijekom 15 dana u različitim otapalima (a) i odstupanje (Δ_{262}) od početne apsorbancije mjerene na 262 nm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

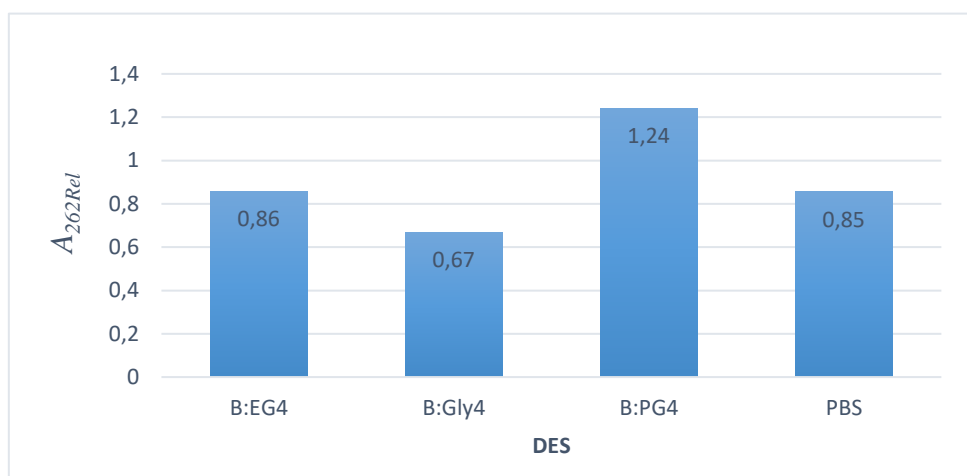
Na temelju grafova sa slike 23 i izmjerenih apsorbancija, uzorak ChU₄ ponovno se pokazao najboljim eutektičkim otapalom za stabilnost koenzima NAD^+ s apsorbancijom od 0,93 i najnižim postotkom odstupanja od početne apsorbancije od -6,58 %. Vrijednosti apsorbancija uglavnom su veće od vrijednosti izmjerenih kod uzoraka inkubiranih na sobnoj temperaturi jer su niže temperature pogodnije za stabilnost koenzima. Ovi rezultati preklapaju se s prijašnjim istraživanjima koja govore o utjecaju pH, temperature i vrste otapala na stabilnost koenzima $NADH/NAD^+$ (Fukazawa i Ishihara, 2016).

Stabilnost koenzima NAD^+ praćena je i u eutektičkim otapalima s betainom koji su inkubirani tijekom 14 dana na 25 °C. Vrijednosti relativnih apsorbancija prikazane su na slici 24 i slici 25.

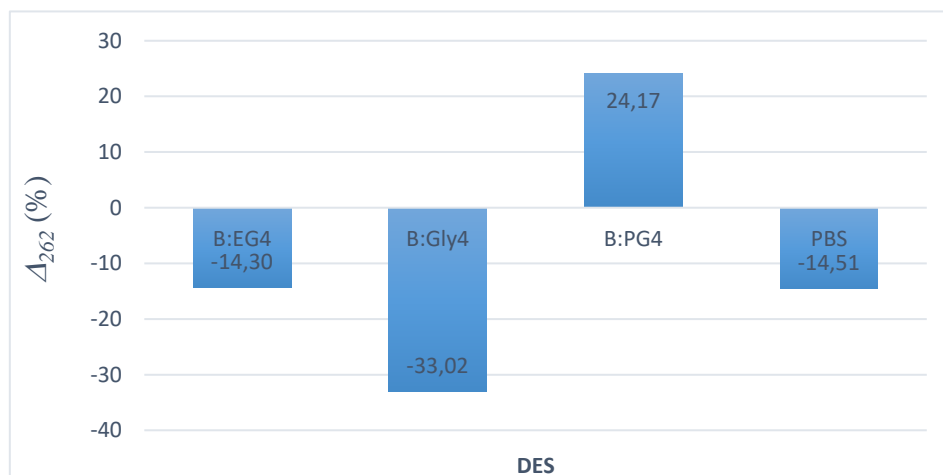


Slika 24. Relativna apsorbanacija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije uzoraka s NAD^+ u eutektičkim otapalima s betainom i PBS puferu pri temperaturi od 25 °C tijekom 14 dana u različitim otapalima.

(a)



(b)



Slika 25. Relativna apsorbancija na 262 nm (A_{262Rel}) nakon inkubacije uzoraka s NAD^+ u eutektičkim otapalima s betainom i PBS puferu pri temperaturi od +25 °C tijekom 14 dana u različitim otapalima (a) te odstupanje (Δ_{262}) od početne apsorbancije mjerene na 260 nm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ($n=2$).

Sa slike 25b vidi se da DES BEG₄ pokazuje najmanje odstupanje (-14,30 %) od početne apsorbancije pri 262 nm, dok je najveće odstupanje zabilježeno u uzorku s BGly₄ (-33,02 %) zbog čega BGly₄ ne utječe dobro na stabilnost koenzima NAD^+ .

Prema rezultatima mjerenja apsorbancije koenzima NAD^+ i $NADH$ u pripremljenim eutektičkim otapalima i puferima, nakon inkubacije uzoraka na sobnoj temperaturi i 4 °C, DES koji je pokazao najpovoljniji utjecaj na stabilizaciju koenzima $NADH$ i NAD^+ je ChU₄. DES koji je pokazao destabilizirajući utjecaj na koenzime je ChGly₄. Za koenzim $NADH$ povoljniji su lužnati uvjeti pa i rezultati pokazuju veću stabilnost koenzima $NADH$ u uzorcima s glicin-pirofosfatnim puferom (pH 9), nego u uzorcima s Tris-HCl puferom (pH 7,5). Kod DES-ova pripremljenih s betainom, najpovoljniji utjecaj na stabilnost koenzima pokazao je DES BEG₄, dok se BGly₄ pokazao kao DES s najgorim utjecajem na stabilnost koenzima.

4.5. Redukcija 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona s pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

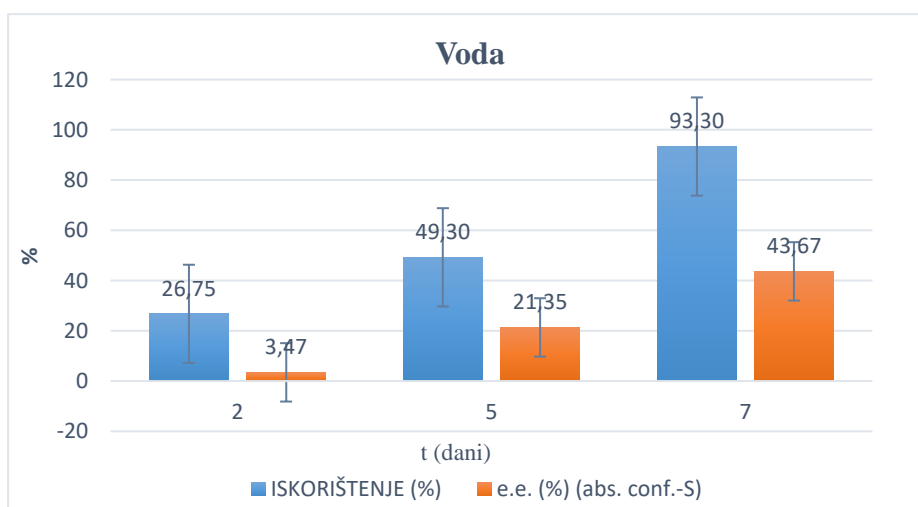
Saccharomyces cerevisiae jedan je od najpoznatijih modelnih organizama i najčešće korišteni mikroorganizam u biokatalizi obzirom na njegov jednostavan i jeftin uzgoj, dobro proučenu

fiziologiju, kratko generacijsko vrijeme i nepatogenost. Prednost primjene pekarskog kvasca također je i sadržaj različitih oksido-redukcijskih enzima te blagi uvjeti rada, a biokataliza ne zahtijeva složene postupke obrade. Često se koristi u biokatalizi spojeva s karbonilnim skupinama i dvostrukim ugljik-ugljik vezama, budući da ima visok katalitički kapacitet, naročito u enantioselektivnim redukcijama karbonilnih grupa (Cvjetko Bubalo i sur., 2015b). Osim u reakcijama redukcije primjenu nalazi u hidrolitičkim i oksidacijskim reakcijama kao i u dehidrogeniranju. Za odvijanje reakcija kataliziranih stanicama pekarskog kvasca nema potrebe za dodavanjem kofaktora u reakcijsku smjesu niti regeneracije koenzima. Asimetričnim redukcijama karbonilnih skupina nastaju optički aktivni (*R*)- ili (*S*)- alkoholi, a reakcije se provode u vodenom mediju uz dodatak etanola ili ugljikohidrata. Međutim, istraživanjima se pokazalo da reakcije koje se provode u vodenom mediju imaju niske prinose, sporo se odvijaju, a rezultiraju i niskim enantiomernim viškom zbog aktivnosti ostalih oksidoreduktaza prisutnih u stanicama kvasca (Mahmood, 2015).

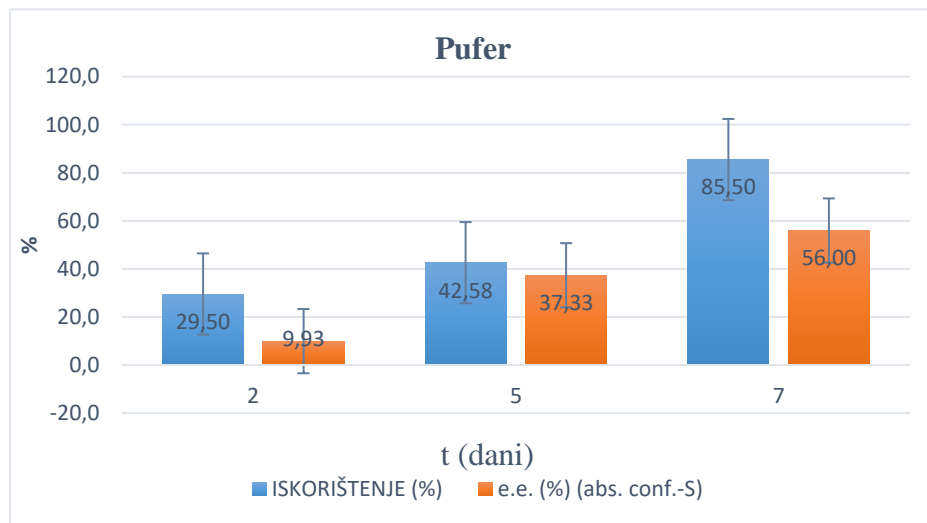
U ovom radu ispitana je mogućnost redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirane s cijelim stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Reakcija je provedena u vodi, puferu i eutektičkom otapalu BEG₄, koje se pokazalo kao najpogodnije za aktivnost alkohol-dehidrogenaze uz dodatak vode od 20 i 60 % (v/v) te supstrata. Uzorci su inkubirani na tresilici pri temperaturi od 4, 22 i 40 °C tijekom 1, 11 i 21 dan, nakon čega su analizirani plinskom kromatografijom.

Za procjenu uspješnosti reakcije redukcije u različitim eutektičkim otapalima, vodi i puferu te pri različitim temperaturama i vremenu inkubacije, izračunata su iskorištenja reakcija i enantiomerni višak (slika 26 a-e).

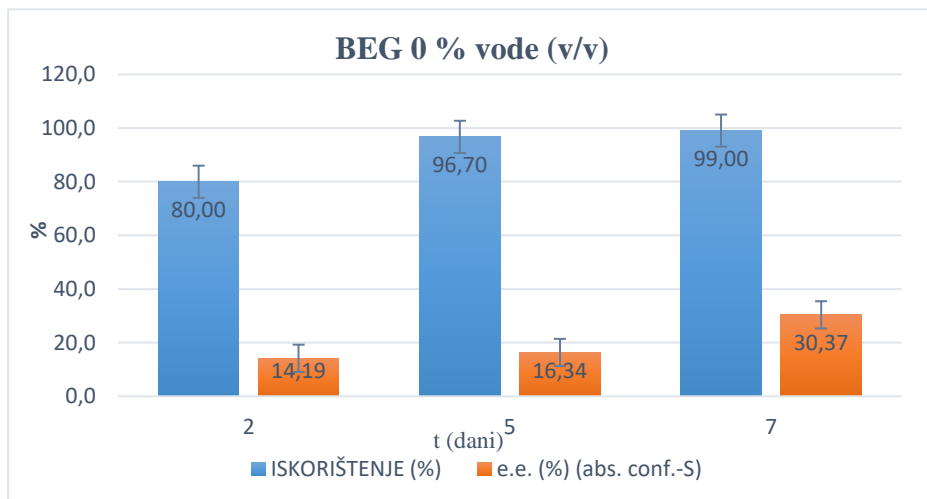
(a)



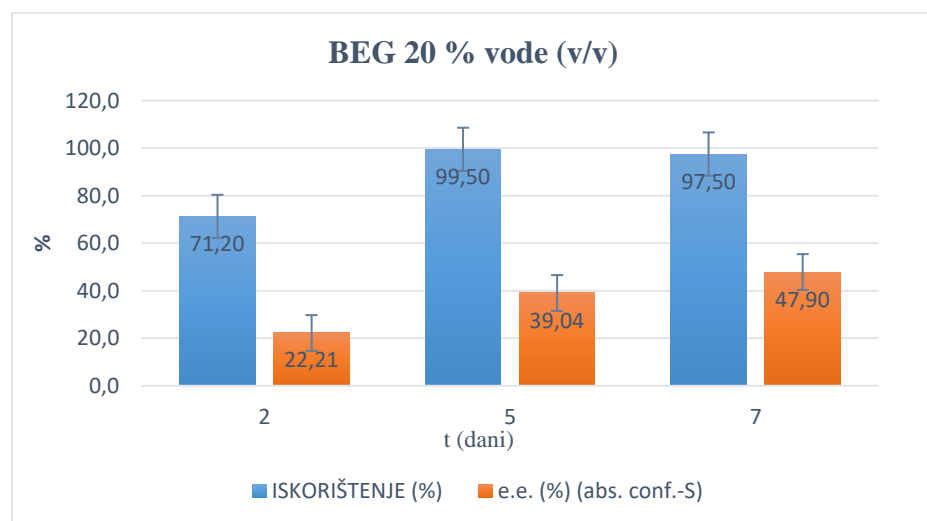
(b)



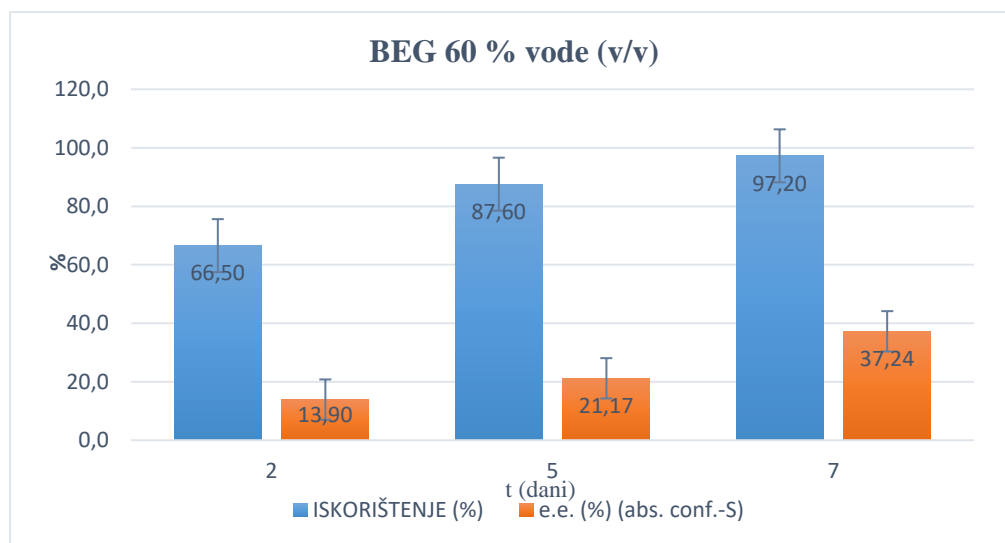
(c)



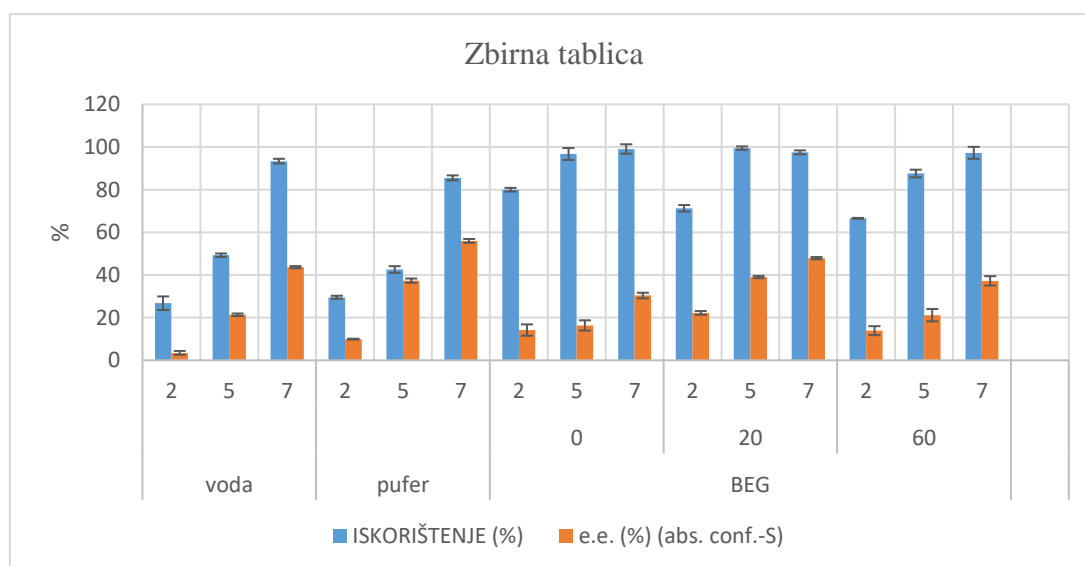
(d)



(e)



Slika 26. Enantiomerni višak (*ee*) te iskorištenje (η) redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirane cijelim stanicama pekarskog kvasca nakon 2, 5 i 7 dana u a) vodi, b) puferu, c) eutektičkom otapalu BEG s 0 % vode, d) eutektičkom otapalu BEG s 20 % vode, e) eutektičkom otapalu BEG sa 60 % vode. Reakcijski uvjeti: 10 μ L matične otopine 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona ($\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$), 0,5 mg kvasca otopljenog u otapalu te 1,5 mL otapala.



Slika 27. Enantiomerni višak i iskorištenje redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirane enzimima pekarskog kvasca u vodi, puferu i eutektičkom otapalu BEG s 0, 20 i 60 % vode. Reakcijski uvjeti: 10 μ L matične otopine 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona ($\gamma = 2$

mg mL⁻¹), 0,5 mg kvasca otopljenog u otapalu te 1,5 mL otapala; 7 dana; 30 °C. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti ± S.D. ($n = 3$).

Reakcijom redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona nastaju produkti (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol i (*R*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol. (*S*)-enantiomer poželjan je produkt i ovom reakcijom redukcije praćeno je iskorištenje reakcije i enantiomerni višak u korist (*S*)-enantiomera. (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanol koristi se u sintezi *Ticagrelora* kao kiralni intermedijer. *Ticagrelor* se primjenjuje u terapiji akutnog koronarnog sindroma zbog čega je njegov način sinteze važan za farmaceutsku industriju. Primjenom pekarskog kvasca kao biokatalizatora te eutektičkih otapala umjesto toksičnih, hlapljivih i nerazgradivih organskih otapala, po principima *zelene* tehnologije smanjio bi se štetan utjecaj na okoliš i zdravlje čovjeka.

Rezultati dobiveni u reakciji redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona pokazuju da različit udio vode u otapalu BEG utječe na stereoselektivnost biokatalizatora. Najveće iskorištenje reakcije postignuto je u čistom eutektičkom otapalu BEG s 0 % vode od 99,0 % pri čemu je izračunata *ee* vrijednost 30,37 %. Voda se također pokazala kao dobro otapalo za provođenje reakcije redukcije katalizirane kvascem pri čemu je iskorištenje reakcije iznosilo visokih 93,3 %. Iskorištenja reakcija u svakom uzorku s eutektičkim otapalom kreću se od 97 – 99 %, neovisno o udjelu vode. Ovakav rezultat potvrđuje prethodna istraživanja u kojima uzorci s eutektičkim otapalima rezultiraju većim iskorištenjima u odnosu na uzorke koji sadrže čistu vodu. Razlog tome su različiti donori vodikove veze (alkoholi i šećeri) koji čine sastav eutektičkog otapala, a povoljno djeluju na stanice kvasca kao izvor nutritivnih tvari ili kao ko-supstrati koji služe za regeneraciju kofaktora (Panić i sur., 2018). Najniže iskorištenje reakcije postignuto je u puferu (85,50 %), dok je *ee* 56,0 %. Obzirom da je vrijednost *ee* viša od 50 %, biokatalizator je u glicin-pirofosfatnom puferu stereoselektivan. U uzorku BEG s 20 % vode (v/v) izračunat je najviši enantiomerni višak (47,90 %). Obzirom na najveće iskorištenje od 99,00 % i najniži enantiomerni višak od 30,37 % u čistom DES-u, primjetno je da biokatalizator ima najnižu stereoselektivnost. Kod dobivenih rezultata nije uočen trend u postocima iskorištenja i enantiomernog viška s obzirom na postotak vode u eutektičkom otapalu. Do toga je moglo doći zbog aktivnosti različitih enzima u stanicama pekarskog kvasca koji su u određenim uvjetima aktivni odnosno inhibirani, na što mogu utjecati i karakteristike pojedinog eutektičkog otapala (Panić i sur., 2018).

U zaključku, rezultati potvrđuju i opravdavaju primjenu eutektičkog otapala betain:etilen-glikola za proizvodnju (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanola redukcijom 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona koja je katalizirana pekarskim kvascem *Saccharomyces cerevisiae*, obzirom da su konverzije supstrata u *S*-produkt rezultirale većim postotkom nego u čistoj vodi. Biokatalitičke redukcije koje se provode u eutektičkim otapalima rezultiraju većim iskorištenjem u odnosu na bioredukcije provedene u čistoj vodi zbog povećane topljivosti polarnih i nepolarnih spojeva. Dizajniranjem otapala postižu se takve željene karakteristike eutektičkih otapala koje doprinose većim konverzijama i rezultiraju željenim enantiomerima (Gröger i sur., 2003). BEG pokazao se kao pogodno eutektičko otapalo koje se može primjenjivati u konceptu *zelene* tehnologije za pripremu lijekova značajnih u farmaceutskoj industriji. Ispitano eutektičko otapalo također se pokazalo pogodno za stabilnost koenzima NADH i NAD⁺ te za aktivnost enzima alkohol-dehidrogenaze zbog čega se kao *zeleno* otapalo može primjenjivati i u enzimski kataliziranim reakcijama za sintezu farmaceutskih vrijednih spojeva.

Na temelju dobivenih rezultata, DES-ovi na bazi kolin-klorida i betaina pokazali su se dobrim otapalima za provođenje reakcija koju katalizira alkohol dehidrogenaza. Obzirom na dobru stabilnost enzima ADH u DES-ovima na bazi betaina, oni se mogu koristiti u oksidoredukcijskim reakcijama. DES-ovi na bazi kolin-klorida također su povoljna otapala za provođenje reakcija koje zahtijevaju prisutnost koenzima budući da su pokazala stabilizirajuće djelovanje na koenzime NADH i NAD⁺. S ciljem sinteze farmaceutski vrijednog spoja (*S*)-2-klor-1-(3,4-difluorofenil)etanola dobivenog asimetričnom redukcijom 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u eutektičkom otapalu betain:etilen-glikol, zaključuje se da su stanice kvasca dobar biokatalizator koji u kombinaciji s primjenom *zelenog* otapala zadovoljava principe zelene tehnologije u svrhu dobivanja visokovrijednih proizvoda.

5. ZAKLJUČAK

Ovim radom ispitan je utjecaj zelenih eutektičkih otapala (DES-ova) na odvijanje redukcijskih reakcija koje provodi enzim alkohol dehidrogenaza (ADH) u svrhu dobivanja visokovrijednih farmaceutskih i kemijskih spojeva. Ispitana je aktivnost enzima ADH u pripremljenim eutektičkim otapalima, promjene u njegovoj konformaciji te stabilnost koenzima potrebnog za odvijanje oksidoredukcijskih reakcija. Također je ispitana mogućnost odvijanja enantioselektivne asimetrične redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona u pripremljenim DES-ovima koja je katalizirana pekarskim kvascem. Na temelju provedenih eksperimenata i njihovih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Eutektička otapala kolin-klorid:urea, kolin-klorid:etilen-glikol, kolin-klorid:glicerol, betain:etilen-glikol, betain:glicerol, betain:urea i betain:propilen-glikol pripremljena su zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida kao akceptora vodika s donorima vodika ureom, etilen-glikolom i glicerolom u odgovarajućim omjerima uz 100 %-tno iskorištenje. Razrjeđivanjem su pripremljena otapala s određenim volumnim udjelom vode. Isti postupci provedeni su za pripremu eutektičkih otapala s betainom pri čemu su kao donori vodika korišteni urea, etilen-glikol, propilen-glikol i glicerol.
2. Ispitivana je aktivnost alkohol dehidrogenaze u pripremljenim eutektičkim otapalima na bazi betaina i kolin-klorida s udjelom vode od 20 i 60 % te u glicin-pirofosfatnom puferu. Najveća aktivnost ADH zabilježena je u glicin-pirofosfatnom puferu, dok su se DES-ovi na bazi betaina pokazali boljima za enzimsku aktivnost u odnosu na kolin-klorid DES-ove. Najpogodniji je DES BEG sa 60 % vode.
3. Praćenjem utjecaja pripremljenih eutektičkih otapala na konformaciju enzima ADH pomoću spektrofluorimetrije, niže vrijednosti apsorbancija izmjerene su u uzorcima s DES-ovima na bazi betaina. Do smanjenja apsorbancije dolazi zbog nastanka veza između aktivnog mjesta enzima i otapala. Prema tome, DES-ovi na bazi betaina slabije utječu na konformaciju ADH i pogodniji su za odvijanje reakcije.
4. Stabilnost koenzima NADH i NAD⁺ praćena je pomoću spektrofotometra pri čemu su mjerene relativne apsorbancije pri 262 nm za koenzim NAD⁺ odnosno pri 262 nm i 338 nm za koenzim NADH. Uzorci su inkubirani u DES-ovima na bazi kolin-klorida i betaina na 25 °C i 4°C. DES-ovi koji su imali povoljniji utjecaj na stabilizaciju koenzima su na bazi kolin-klorida pri čemu se najpovoljnijim pokazao ChU₄.

5. Provođenjem asimetrične redukcije 2-klor-1-(3,4-difluoro-fenil)etanona katalizirane stanicama pekarskog kvasca u betain:etilen-glikolu s 0, 20 i 60 % vode, potvrđena je mogućnost provođenja enantioselektivne redukcije pri čemu nastaje S-enantiomer. Reakcija je provedena i u puferu te čistoj vodi. Iskorištenja reakcije u DES-ovima s betanom (97 – 99 %) veća su u odnosu na uzorak s čistom vodom (93,3 %) što potvrđuje da različiti donori vodikove veze povoljno utječu na biokatalizator. Najviši enantiomerni višak (47,90 %) izmjeren je u uzorku BEG s 20 % vode.

6. LITERATURA

- Bi, W., Tian, M, Row, K.H. (2013) Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A* .**1285**, 22–30.
- Bommarius, A. S., Riebel, B. R. (2004) Biocatalysis, WILEY-WCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, str. 19-40.
- Brunner, G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J. Food Eng.* **67**, 21–33.
- Carter, E.B., Culver, S.L., Fox, P.A., Goode, R.D., Ntai, I., Tickell, M.D., Traylor, R.K., Hoffman, N.W., Davis Jr., J.H. (2004) Sweet success: ionic liquids derived from non-nutritive sweeteners. *Chem. Comm.* **21**, 630–631.
- 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.
- Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y. T., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* **156**, 1701– 1705.
- Clouthier, C. M., Pelletier, J. N. (2012) Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1585–1605.
- Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotox. Environ. Safe* **99**, 1–12.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green Solvents for Green Technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 1631–1639.
- Cvjetko Bubalo, M., Mazur, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. (2015) Baker's yeast-mediated asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutanoate in deep eutectic solvents. *Process Biochem.* **50**, 1788-1972.

- Dabirmanesh, B., Khajeh, K., Akbari, J., Falahati, H., Daneshjoo, S., Heydari, A. (2011) Mesophilic alcohol dehydrogenase behavior in imidazolium based ionic liquids. *J. Mol. Liq.* **161**, 139-143.
- Drauz, K., Gröger, H., May, O. (2012) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3. izd, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- 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.
- Fukazawa, K., Ishihara, K. (2016) Enhanced stability of NADH/dehydrogenase mixture system by water-soluble phospholipid polymers. *Biomater. Biomech. Bioeng.* **3**, 37-46.
- García, J.I., García-Marín, H., Pires, E. (2014) Glycerol based solvents: synthesis, properties and applications. *Green Chem.* **16**, 1007–1033.
- Grogan, G. (2009) *Practical Biotransformations*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Gröger H., Hummel W., Buchholz S., Drauz K., Nguyen T., Rollmann C., Hüsken H., Abokitse K. (2003) Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a hydrogenase-compatible biphasic reaction media. *Organic Letters* **5**, 173-176.
- Gu, Y., Jérôme, F. (2010) Glycerol as a sustainable solvent for green chemistry. *Green Chem.* **12**, 1127–1138.
- Guo, X., Tang, J.-W., Yang, J.-T., Ni, G.-W., Zhang, F.-L., Chen, S.-X. (2017) Development of a Practical Enzymatic Process for Preparation of (S)-2-Chloro-1-(3,4-difluorophenyl)ethanol. *Org. Process Res. Dev.* **21**(10), 1595–1601.
- 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.

- Jia, R., Hu, Y., Huang, H. (2014) Improving the catalytic performance of porcine pancreatic lipase in the presence of [MMIm][MeSO₄] with the modification of functional ionic liquids. *Process Biochem.* **49**, 668-672.
- Lakowitz, J.R. (2016) Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer*, New York.
- Liang, J., Zhang, Y., Sun, A., Deng, D., Hu, Y. (2015) Enantioselective resolution of (±)-1-phenylethanol and (±)-1-phenylethyl acetate by a novel esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121. *Appl. Biochem. Biotech.* **178**, 559 - 575.
- Luisi, P. L., Favilla, R. (1970) Tryptophan Fluorescence Wuenching in Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **17**, 91-94.
- Mahmood S., Khalid A., Arsad M., Crowley D.E. (2015) Detoxification of azo dyes by bacterial oxidoreductase enzymes. *Crit. Rev. in Biotechnol.* **4**, 639-651.
- Ong, E.S., Cheong, J.S.H., Goh, D. (2006) Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *J. Chromatogr. A.* **1112**, 92–102.
- 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.
- Panić, M., Delač, D., Roje, M., Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M. (2018) Green asymmetric reduction of acetophenone derivatives: *Saccharomyces cerevisiae* and aqueous natural deep eutectic solvent. *Biotechnol. Lett.* **41**, 253-262.
- Renner, R. (2001) Ionic liquids: an industrial cleanup solution. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 410–413.
- Rover Jr, L., Fernandes, J.C.B., de Oliveira Neto, G., Kubota, L.T., Katekawa, E., Serrano, S.H.P. (1998) Study od NADH Stability Using Ultraviolet-Visible Spectrophotometric Analysis and Factorial Design. *Anal. Biochem.* **260**, 50-55.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tommorow. *Nature*, **409**, 258-268.
- Sheldon, R.A. (2016) Biocatalysis and biomass conversion in alternative reaction media. *Chemistry* **22**, 12984–12999.

Quispe, C.A.G., Coronado, C.J.R., Carvalho, J.A. (2013) Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renew. Sust. Energy Rev.* **27**, 475–493.

Vandenberghe, A., Markó, I.E., Lucaccioni, F., Lutts, S. (2013) Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. *Ind. Crops Prod.* **42**, 380 – 385.

Zaks, A. (2001) Industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 130-136.

Zhang, Z., Xu, B., Luo, J., Von Solms, N., He, H., Zhang, Y., Pinelo, M, Zhang, S. (2018) Ionic Liquids as Bifunctional Consolvents Enhanced CO₂ Conversion by NADH-Dependent Formate Dehydrogenase. *Catalysts* **8**, 304.

Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Zagreb, 13.10.2020.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem pod moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću da su svi moji radovi na koje se pozivam u postupku izbora/reizbora u znanstveno zvanje, umjetničko-nastavno i znanstveno-nastavno zvanje izvorni rezultat vlastitog rada te da se u izradi istih radova nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njima navedeni.

Ime i prezime pristupnika

Tihana Martinuš