

Aktivnost odabranih oksidoreduktaza u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Mah'D, Jasmin

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:136335>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-28**



Repository / Repozitorij:

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



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

Jasmin Mah'D
0067537809

**Aktivnost odabranih oksidoreduktaza u
niskotemperaturnim eutektičkim otapalima**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

Istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost „Intenzifikacija biokatalitičkih procesa za održivu valorizaciju otpada primjenom eutektičkih otapala i mikroreaktora“ (IPS-2022-02-3938)

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

ZAHVALA

Zahvaljujem svojem mentoru, izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo ugodnoj suradnji i stručnoj pomoći. Veliko hvala i kolegici Miji Radović na pomoći oko snalaženja u laboratoriju i savjetima pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Zagreb, 2023 godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Jasmin Mah'D, 0067537809

Aktivnost odabranih oksidoreduktaza u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Sažetak: Ovim radom ispitana je aktivnost enzima alkohola dehidrogenaze (ADH) i litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*). Odabrane su lako dostupne, netoksične i relativno jeftine komponente za izradu niskotemperaturnih eutektičkih otapala prema načelima zelene kemije i održivog razvoja. Nakon sinteze otapala, spektrofotometrijski je ispitana aktivnost ADH u glicin pirofosfatnom puferu pH 9 (GPP) i LPMO u natrijev acetatnom puferu (NaAc) puferu pH 6 u svrhu usporedbe aktivnosti. Potom je aktivnost enzima ispitana u priređenim otapalima istom spektrofotometrijskom metodom uz pufer kao slijepu probu. Svrha rada je bila ispitati primjenu DES-ova te usporediti i eksperimentalno potkrijepiti aktivnost ADH i LPMO u pripremljenim DES-ovima.

Ključne riječi: *aktivnost enzima, alkohol dehidrogenaza, betain, biokataliza, litička polisaharidna monooksigenaza, niskotemperaturna eutektička otapala*

Rad sadrži: 33 stranica, 7 slika, 6 tablica, 62 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: Mia Radović mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 14.rujan.2023

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of biochemical engineering
Laboratory for cell technology, application and biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Jasmin Mah'D, 0067537809

Activity of selected oxidoreductased in low-temperature deep eutectic solvents

Abstract: This work investigated the activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and lytic polysaccharide monooxygenase enzyme (LPMO) in low-temperature deep eutectic solvents (DES). Easily accessible, non-toxic, and relatively inexpensive components were selected to create the deep eutectic solvents according to the principles of green chemistry and sustainable development. LPMO activity was initially spectrophotometrically tested in NaAc buffer pH 6, while ADH activity was spectrophotometrically tested in glycine pyrophosphate buffer pH 9 for comparison. Then, enzyme activity was tested in prepared solvents using the same method with buffer as a blank. Purpose of the work was to investigate the usage of DES and experimentally substantiate the activity of ADH and LPMO in prepared DES.

Keywords: *alcohol dehydrogenase, betaine, enzyme activity, low-temperature deep eutectic solvents, lytic polysaccharide monooxygenases*

Thesis contains: 33 pages, 7 figures, 6 tables, 62 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate Professor

Technical support and assistance: Mia Radović mag. ing. biotechn

Thesis defended: September 14, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	17
2. TEORIJSKI DIO	17
2.1. ZELENA KEMIJA	17
2.1.1. NAČELA I SMJEROVI ZELENE KEMIJE	17
2.1.2. ZELENA OTAPALA KAO SMJER ZELENE KEMIJE	17
2.1.3. BOKATALIZA KAO SMJER ZELENE KEMIJE	17
2.2. OKSIDOREDUKTIVNI ENZIMI	17
2.2.1. OPĆENITO O OKSIDOREDUKTIVNIM ENZIMIMA	17
2.2.2. KLASIFIKACIJA OKSIDOREDUKTIVNIH ENZIMA	17
2.2.3. ZNAČAJ I PRIMJENA OKSIDOREDUKTIVNIH ENZIMA	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1 MATERIJALI.....	17
3.1.1 ENZIMSKI PRIPRAVAK	17
3.1.2 KEMIKALIJE	17
3.1.3 PRIPREMA MATIČNE OTOPINE I PUFERA.....	17
3.1.4 OPREMA I UREĐAJI	18
3.2 METODE	18
3.2.1 PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČJIH OTAPALA	18
3.2.2 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ALOKOHOL DEHIDROGENAZE	20
3.2.3 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LITIČKE POLISAHARIDNE MONOOKSIGENAZE	21

4. REZULTAT I RASPRAVA	23
4.1 PRIPRAVA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA	23
4.2 AKTIVNOST ALKOHOL DEHIDROGENAZE U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA 25	
4.3 AKTIVNOST LITIČKE POLISAHARIDNE MONOOKSIGENAZE U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	27
5. ZAKLJUČAK	2828
6. POPIS LITERATURE	2929

1. UVOD

Koncept „Zelena kemija“ razvijena je krajem prošlog stoljeća od strane Američke agencija za zaštitu okoliša (*engl.* Environmental Protection Agency, EPA) zbog štetnog utjecaja industrije na zdravlje ljudi i okoliša. Predstavlja novi pristup kemiji koji teži proizvodnji i primjeni kemikalija koja bi bila ekološki i ekonomski prihvatljivija. U skladu s načelima zelenije kemije, značajnu primjenu zauzeli su biotransformacijski postupci, odnosno postupci enzimski kataliziranih pretvorbi organskih spojeva u definirane konačne produkte. Biotransformacije objedinjuju znanja iz biokemije, mikrobiologije, molekularne biologije i inženjerstva, a njihova primjena je karakteristična za prehrambenu, kemijsku i farmaceutsku industriju. Kao biokatalizatori u biokatalitičkim reakcijama mogu se koristiti enzimi (sirovi ili pročišćeni), čiste kulture mikroorganizama, biljne i životinjske stanice i tkiva, sintetski i polusintetski enzimi. Omogućuju provođenje reakcije pri blagim uvjetima, kemo-, regio- i stereospecifičnost enzima, visoka čistoća produkta i ekonomsku efikasnost. Pronalazak novih, ekološki prihvatljivih otapala također je jedan od pravaca zelene kemije. U sklopu toga, u novije vrijeme sve se više izučavaju niskotemperaturna eutektička otapala (DES) kao zamjena za štetna otapala u organskoj sintezi i biokatalizi. DES-ove karakteriziraju neznatna hlapljivost, niska toksičnost, nezapaljivost, biorazgradivost te velika kemijska, elektrokemijska i toplinska stabilnost otapalima. Cilj rada je bio ispitati aktivnost dva enzima iz klase oksidoreduktaza, alkohol dehidrogenaza (ADH) i litička polisaharidna monooksigenaza (LPMO) u DES-ovima. LPMO enzimi igraju ključnu ulogu u depolimerizaciji biopolimera na bazi šećera koji uključuje celulozu, hemicelulozu, hitin i škrob, a imaju pozitivan značaj za pretvorbu biomase. ADH ima značajan doprinos u sintezi enantiomerno čistih stereizomera kiralnih alkohola, čime se može postići često visoka kemoselektivnost i enantioselektivnost. U tu svrhu, otapala su pripravljena i fizikalno-kemijski karakterizirana te je u njima izmjerena aktivnost enzima primjenom ultraljubičaste-vidljive spektrofotometrije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA KEMIJA

U ovom suvremenom dobu, brojni industrijski procesi zahtijevaju velike količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala koji se koriste u različitim reakcijskim sustavima. Sukladno tome, rastuće je područje istraživanja u razvoju zelenih tehnologija koje je usmjereno na ekološke zahtjeve i očuvanje okoliša. S ciljem sprječavanja daljnjeg razvoja globalnog zatopljenja, nastoji se smanjiti upotreba fosilnih goriva te osmisliti novi i ekonomski učinkoviti procesi koji osiguravaju zaštitu okoliša. Upravo se iz tog razloga javlja se smjer kemije, nazvan zelena kemija, koji predstavlja jedinstven forum za objavljivanje inovativnih istraživanja o razvoju alternativnih zelenih i održivih tehnologija. Zelena kemija nastoji smanjiti, odnosno eliminirati korištenje ili stvaranje opasnih tvari u dizajnu, proizvodnji ili primjeni kemijskih proizvoda. Na taj način smanjuje i utjecaj kemijskog poduzeća na okoliš (Američka agencija za zaštitu okoliša, 2022).

2.1.1. Načela i smjerovi zelene kemije

Kemijska industrija igra ključnu ulogu u održavanju svjetskog gospodarstva i podržavanju budućih tehnologija, ali je pod pritiskom bez presedana zbog učinaka globalizacije i promjena na mnogim svojim tradicionalnim tržištima.

Agencija za zaštitu okoliša (*engl.* Environmental Protection Agency, EPA), američka agencija za zaštitu okoliša, definira zelenu kemiju kao dizajn kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili eliminiraju stvaranje opasnih tvari. Napori EPA-e da ubrza usvajanje ove revolucionarne i raznolike discipline doveli su do značajnih prednosti za okoliš, inovacija i jačanja gospodarstva. EPA je odgovorna za zaštitu i poboljšanje okoliša kao vrijednog dobra za ljude te ima glavnu ulogu u regulaciji okoliša, pružanju znanja i zagovaranju zaštite okoliša (Američka agencija za zaštitu okoliša, 2022).

Glavni ciljevi zelene kemije su (Američka agencija za zaštitu okoliša, 2022):

- Sprječavanje onečišćenje na molekularnoj razini,
- Primjena na sva područja kemije, a ne na jednu kemijsku disciplinu,
- Primjena inovativnih znanstvena rješenja za probleme onečišćenja okoliša,
- Smanjenje negativnih utjecaja kemijskih proizvoda i procesa na zdravlje ljudi i okoliš,
- Smanjenje i ponekad eliminiranje opasnosti od postojećih proizvoda i procesa,
- Dizajn kemijskih proizvoda i procesa.

Dvanaest načela, odnosno principa zelene kemije razvijeno je od strane Paula Anastasa i Johna koji su u svojoj knjizi *Green Chemistry Theory and Practice*, 1998 godine, objasnili značenje principa zelene kemije u praksi. Principi zelene kemije govore o smanjenju ili uklanjanju opasnih ili štetnih tvari od sinteze, proizvodnje i primjene kemijskih proizvoda, a također zahtijevaju smanjenje uporabe opasnih stvari za zdravlje ljudi i okoliša, a dvanaest principa zelene kemije su (Anastas, Warner, & C. Green Chemistry, 1998):

1. **Prevenција** – bolje je spriječiti nastanak otpada nego ga sanirati nakon što je nastao
2. **Ekonomija atoma** – proces sinteze treba osmisliti tako da je u konačni proizvod uključena maksimalna količina ulazne sirovine
3. **Sigurniji proces sinteze** - postupak sinteze treba dizajnirati s ciljem smanjene upotrebe spojeva štetnih za ljudsko zdravlje i okoliš
4. **Sigurniji kemijski proizvodi** – kemijske proizvode treba osmisliti da budu manje toksični, ali jednako učinkoviti
5. **Sigurnija pomoćna sredstva** – upotrebu pomoćnih sredstva treba svesti na minimum i kad god je moguće koristiti ona neškodljiva
6. **Energetska učinkovitost** – energetske zahtjeve treba svesti na minimum te ako je moguće sintetske procese voditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku
7. **Obnovljive sirovine** – obnovljive sirovine treba upotrebljavati gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo
8. **Minimizacija proširenja procesa** – nepotrebna proširenja procesa treba izbjegavati kako bi se smanjila dodatna upotreba reagensa i stvaranje otpada

9. **Kataliza** – katalitički reagensi, selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama
10. **Biorazgradivost proizvoda** – kemijski proizvodi moraju imati mogućnost pretvorbe u spojeve neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja
11. **Analitičke metode** – potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog proizvodnog procesa s ciljem sprečavanja nastanka opasnih tvari
12. **Sigurniji uvjeti rada** – potrebno je smanjiti upotrebu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (toksičnost, eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

Ciljevi zelene kemije u zaštiti okoliša i ekonomskoj dobiti ostvaruju se kroz nekoliko dominantnih pravaca kao što su: kataliza, biokataliza, uporaba alternativnih obnovljivih sirovina (biomasa), alternativnih reakcijskih medija (voda, ionske kapljevine, superkritične tekućine), alternativnih reakcijskih uvjeta (aktivacija mikrovalnim zračenjem) kao i novim fotokatalitičkim reakcijama (Jukić i sur., 2005).

Kataliza kao temelj zelene kemije novim katalitičkim reakcijama i tipovima katalizatora (glina, zeoliti itd.) nudi niz pogodnosti u pogledu iskoristivosti procesa, selektivnosti, redukcije energije te uporabe alternativnih reakcijskih medija. Ogroman potencijal mikroorganizama i enzima u transformiranju sintetskih supstancija s visokom kemo-, regio- i enantiomernom selektivnosti daje biokatalizi dominantno mjesto u zelenom programu. Fotokatalitičke reakcije koje predstavljaju nove metode za čišćenje kontaminiranog zraka i vode također pridonose zelenoj kemiji – stvarajući uvjete za postizanje održivosti (Jukić i sur., 2005).

Roger i sur. (2022) definiraju enzim kao molekulu koja djeluje kao katalizator u živim organizmima, regulirajući brzinu kojom se odvijaju kemijske reakcije, a da se pritom ne mijenja. Biološki procesi koji se događaju u svim živim organizmima su kemijske reakcije, a većinu njih reguliraju enzimi. Bez enzima, mnoge od ovih reakcija ne bi se odvijale primjetnom brzinom. Enzimi kataliziraju sve aspekte staničnog metabolizma. To uključuje probavu hrane, u kojoj se velike molekule hranjivih tvari, kao što su proteini, ugljikohidrati i masti, a razgrađuju ih na manje molekule i zaslužni su za očuvanje i transformacija kemijske energije.

2.1.2. Zelena otapala kao smjer zelene kemije

Otapala se svakodnevno upotrebljavaju u brojnim industrijskim procesima zbog važne uloge u otapanju krutih komponenti, prijenosu mase i topline te u koracima izdvajanja i pročišćavanja produkta. Procjenjuje se da hlapljiva organska otapala čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija uzrokujući brojne negativne učinke na okoliš. Samo neki od negativnih učinaka organskih otapala su promjena klime na globalnoj razini, onečišćenje zraka, narušavanje ozonskog omotača, bolesti kod ljudi i slično (Bolf, 2020).

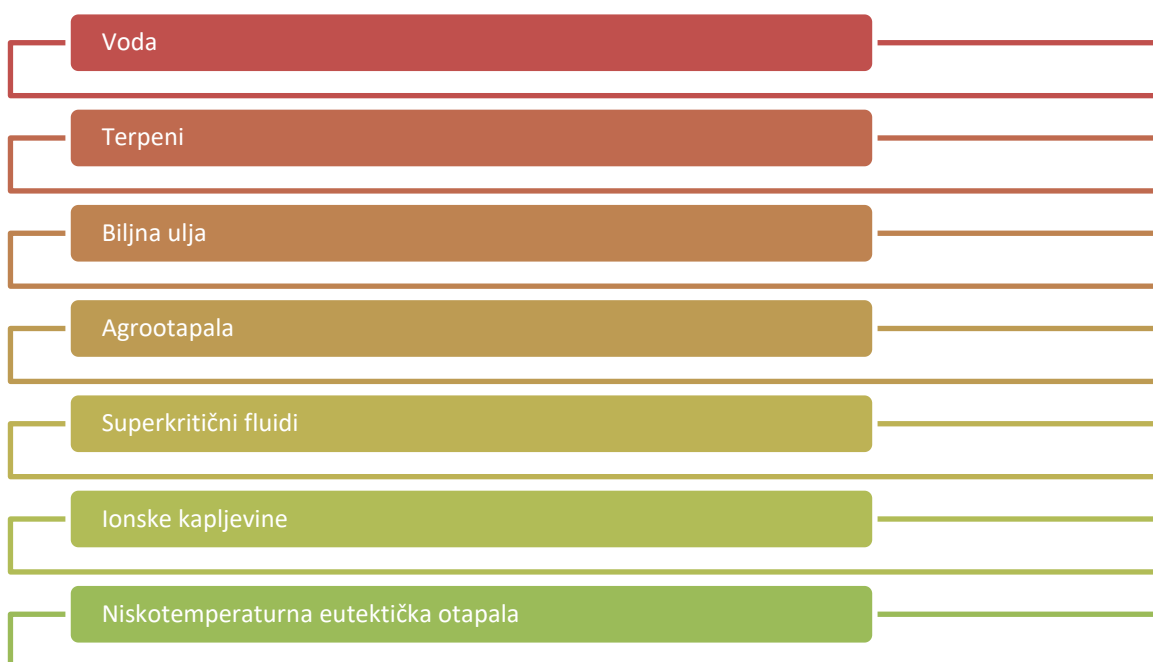
U okviru zelene kemije sva štetna organska otapala moraju se zamijeniti s odgovarajućim otapalom, a odabir prikladne zamjene za organska otapala obuhvaća:

- **sigurnost radnika** - toksičnost, kancerogenost, mutagenost, apsorpcija putem kože i respiratornog sustava
- **sigurnost procesa** - zapaljivost, eksplozivnost, hlapljivost, potencijal stvaranja peroksida
- **sigurnost okoliša** - ekotoksičnost, postojanost, kontaminacija podzemnih voda, uništavanje ozonskog omotača
- **održivost procesa** - sposobnost recikliranja i mogućnost višekratne uporabe.

Bolf (2020) navodi da prema smjernicama zelene kemije idealno otapalo treba biti kemijski i fizički stabilno, nezapaljivo, male hlapljivosti, s povoljnim ekološkim otiskom, jednostavno za uporabu te jednostavno za recikliranje s mogućnošću ponovne uporabe.

Karakteristike idealnog zelenog otapala mogu se podijeliti u tri skupine koje uključuju sigurnost i zakonodavstvo, ekološka ograničenja i učinkovitost. Sigurnost i zakonodavstvo usmjereni su prema smanjivanju rizika od eksplozije, dozvoljivosti u proizvodnji i analiziraju hlapljivost. S druge strane, ekološka ograničenja razmatraju biorazgradivost zelenih otapala, učinak staklenika, ozonski omotač i emisiju organskih spojeva. Učinkovitost zelenih otapala utvrđuje se na osnovu cijene, njihovoj dostupnosti, moći otapanja i selektivnosti.

Najznačajnija zelena otapala su voda, terpeni, biljna ulja, agrootapala, superkritični fluidi, ionske kapljevine i DES-ovima (Slika 1).



Slika 1. Najznačajnija zelena otapala (Bolf, 2020)

Ionske kapljevine (eng. Ionic Liquids, ILs) su organske soli koje se tale pri temperaturi nižoj od 100 °C, a obilježavaju ih jedinstvena svojstva poput neznatne hlapljivosti, nezapaljivost te velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost. Neznatna hlapljivost pomažu u smanjenju onečišćenju zraka, nezapaljivost u sigurnosti procesa, a velika stabilnost omogućuje recikliranje i višestruke uporabe (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

Ionske tekućine razlikuju se od klasičnih otapala po tome što su građene od iona, aniona i kationa, a ne od molekula. Prva zabilježena ionska kapljevina je etilamonijev nitrat s talištem 12 °C. Sintetizirao ju je P. Walden 1914. godine za vojne potrebe kao tekući eksploziv i to neutralizacijom etilamina koncentriranom dušičnom kiselinom (Ghosh, 2021). Najvažnije karakteristike ionskih kapljevina su nisko talište, stabilnost, nehlapljivost, nezapaljivost, sposobnost otapanja različitih komponenata te mogućnost dizajniranja svojstava za određene svrhe. To im otvara mogućnost u stvaranju i novih rješenja u ekološkom smislu. Ono što ih čini zelenim otapalom je jednostavna regeneracija nakon procesa zbog niskog tlaka pare i toplinske

stabilnosti, a upravo je to važno za ekonomski i ekološki pristup. U usporedbi s organskim otapalima, ionske su kapljevine multifunkcionalne, relativno skupe, imaju ekonomski imperativ, katalična sposobnost im je uobičajena, kiralnost se može podešavati, obično su nezapaljive, imaju izvrsnu sposobnost otapanja i beznačajan tlak para (Tablica 1) (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).

Tablica 1. Usporedba organskih otapala i ionskih kapljevine (Cvjetko Bubalo i sur., 2014)

Svojstvo	Organska otapala	Ionske kapljevine
Broj otapala	≈ 600	> 1000
Primjenjivost	jedna funkcija	multifunkcionalnost
Cijena	relativno jeftina	relativno skupa
Mogućnost recikliranja	ekološki imperativ	ekonomski imperativ
Katalitička sposobnost	rijetko	uobičajeno (mogućnost podešavanja)
Kiralnost	rijetko	mogućnost podešavanja
Zapaljivost	obično zapaljiva	obično nezapaljiva
Sposobnost otapanja	ograničena	izvrsna (mogućnost podešavanja)
Tlak para	značajan	beznačajan

Superkritični fluidi su bilo koje tvar iznad svoje kritične temperature i kritičnog tlaka. On ima jedinstvena svojstva koja se razlikuju i od plinova i od tekućina. Superkritični fluid ima svojstvo plina da penetrira u svaku poru kao i svojstvo tekućine da otapa materijale. Topljivost tvari raste s porastom gustoće (tj. s porastom tlaka). Primjerice, naftalen je praktički netopiv u niskotlačnom tekućem ugljičnom dioksidu. Na 100 bar topljivost je 10 g/L a na 200 bar je 50 g/L. Brzom ekspanzijom superkritične otopine dolazi do taloženja otopljene krutine (Generalić, 2018).

Otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora postaju sve važnija zelena otapala. Primjer otapala iz obnovljivih izvora su glicerol, etanol, metanol, esteri mliječne kiseline i laktata, d-limonen, metilni esteri masnih kiselina. Karakteristike tih otapala su visoka moć otapanja, biorazgradljivost i netoksičnost. Nedostatci tih otapala su cijena, visoka viskoznost i visoko vrelište. Od otapala iz prirodnih izvora ističu se DES-ovi koji postoje kao dvije ili više komponente u krutom ili tekućem stanju. Zbog formiranja jakih vodikovih veza između prisutnih komponenata, ova otapala mogu tvoriti kapljevinu. Otapala dobivena iz prirodnih izvora su nehlapljiva, nezapaljiva, stabilna te niskog ekološkog otiska, a to ih u potpunosti čini zelenim otapalima (Bolf, 2020).

2.1.3. Biokataliza kao smjer zelene kemije

U današnje vrijeme razvoj umjetnih inteligencija, automatizacija i tehnologija ultra visoke propusnosti pružaju beskonačne mogućnosti za otkriće novih enzima, enzimskih mehanizama i enzimskih kaskada, te postupno nadopunjuje nedostatak preostalih ključnih koraka u dizajnu puta ukupne enzimske sinteze. Stoga, istraživanje biokatalize postupno se kreće prema novim tehnologijama. Zagovaranje biokatalize u zelenoj kemiji stavlja fokus na korištenju obnovljivih izvora te stvara važnu ulogu enzimskog procesa za podršku održivoj zelenoj kemijskoj industriji. Biokataliza se vrlo dobro uklapa s načelima zelene kemije (Tablica 2).

Tablica 2. Biokataliza i načela zelene kemije (Sheldon, 2016)

Načela zelene kemije	Biokataliza
Prevenција otpada	Omogućuje održivije rute sa značajno smanjenim otpadom
Atomska ekonomičnost	Omogućuje više atomskih ekonomskih ruta
Manje opasne sinteze	Općenito niska toksičnost
Dizajn za sigurnije proizvode	Nije relevantno
Sigurnija otapala i pomoćna sredstva	Obično se izvode u vodi ili otapalima
Energetska učinkovitost	Blagi uvjeti pogoduju energetske učinkovitosti
Obnovljive sirovine	Enzimi su obnovljivi
Smanjiti derivatizaciju	Biokataliza uklanja potrebu za zaštitom/

	skidanjem zaštite
Kataliza	Enzimi su katalizatori
Dizajn za razgradnju	Nije baš relevantan, ali sami enzimi jesu biorazgradivi
Analiza onečišćenja	Može se primijeniti u biokatalitičkim procesima
Inherentno sigurniji procesi	Izvedeni u blagim i sigurnim uvjetima

Sheldon (2016) navodi značajke biokatalize u kontekstu zelene kemije i održivog razvoja:

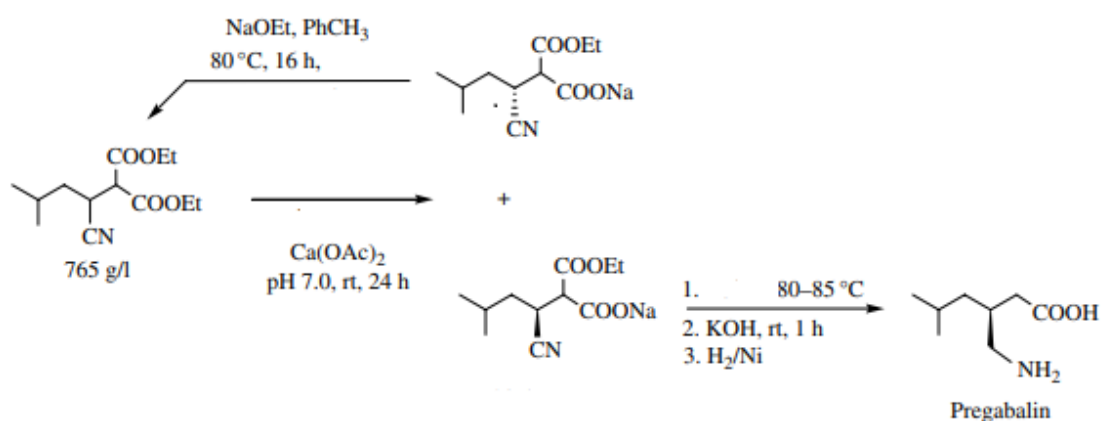
1. Katalizator (enzim) potječe iz obnovljivih izvora i biokompatibilan je (ponekad čak i jestiv), biorazgradiv i u biti neopasan, odnosno ispunjava kriterije održivosti izvanredno dobro.
2. Biokataliza izbjegava korištenje i kontaminaciju proizvoda oskudnim plemenitim metalima kao što su paladij, platina i rodij. Troškovi uklanjanja tragova plemenitih metala, na prihvatljivu razinu mogu biti veliki.
3. Reakcije se provode u ekološki prihvatljivom otapalu (voda) u blagim uvjetima (fiziološki pH i temperatura okoline i pritisak).
4. Reakcije molekula odvijaju se s visokim aktivnostima i kemo-, regio- i stereoselektivnosti i općenito bez potrebe za zaštitu. To omogućuje izvršavanje procesa koji su ekonomičniji i učinkovitiji u potrošnji energije i sirovina s manje otpada, pa su stoga i ekološki i ekonomski više atraktivnije od konvencionalnih ruta.
5. Kao izravna posljedica veće selektivnosti i blažih uvjeta reakcije, biokatalitički procesi često daju proizvode veći stupanj čistoće od tradicionalnih kemijskih ili kemokatalitičkih procesa.
6. Enzimski procesi (ali ne i fermentacije) mogu se provoditi u standardu višenamjenskih reaktora i stoga ne zahtijevaju dodatna ulaganja, na primjer, za visokotlačnu opremu.
7. Biokatalitičke reakcije se provode pod otprilike istim uvjetima temperature i tlaka, te je stoga relativno lako integrirati višestruke reakcije u ekološki učinkovite katalitičke kaskadne procese.

Biokataliza je u skladu s 10 od 12 principa zelene kemije, a nije relevantna za načela 4 i 10 koja se tiču dizajna sigurnijih, biorazgradivih proizvoda. Posljedično, od sredine 1990-ih pojavila se biokataliza kao važna tehnologija za zadovoljavanje rastuće potražnje za zelenom i

održivom kemijskom proizvodnjom, posebno u farmaceutskoj industriji (Švarc i sur., 2019).

Kakaei i sur. (2019) definiraju biokatalizu kao korištenje prirodnih tvari, poput enzima ili stanica, za katalizaciju kemijskih reakcija. Enzimi su proizvodi žive stanice, a po kemijskoj su naravi bjelančevine. Aktivnost pojedinih enzima može se pojačati specifičnim aktivatorima te usporiti inhibitorima. U usporedbi s nekataliziranim reakcijama, enzimske su reakcije brže 106 do 1012 puta. Prema glavnoj podjeli, enzimi se svrstavaju u šest skupina prema reakcijama koje kataliziraju: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze (Kos i Šušković, 2021).

Primjer biokatalize u zelenoj kemiji je kemoenzimski proces za pregabalin. Pfizerovi znanstvenici opisali su kemoenzimski proces druge generacije za proizvodnju pregabalina (Slika 2). Pregabalin je aktivni sastojak lijeka za središnji živčani sustav. Ključni enzimski korak proveden je s jeftinom, lako dostupnom lipazom deterdženta za pranje rublja sa koncentracijom supstrata od 765 g/l. Korištenje organskih otapala dramatično je smanjeno uglavnom u vodenom procesu. U usporedbi s proizvodnim procesom prve generacije, novi proces omogućio je veći prinos i peterostruko smanjenje E faktora¹ sa 86 na 17 (Sheldon, 2016).



Slika 2. Kemoenzimski proces za pregabalin (Sheldon, 2016)

¹ E faktor (ekološki čimbenik) je još jedna jednostavna metrika za označavanje koliko je neka reakcija "zelena". Definira se kao omjer mase otpada i mase proizvoda.

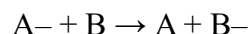
2.2. OKSIDOREDUKTIVNI ENZIMI

Oksidoreduktivni enzimi su skupina enzima koje kataliziraju biokemijske reakcije koje uključuju oksidacijsko-redukcijske procese. Ova skupina enzima ima važnu ulogu u brojnim biološkim procesima poput metabolizma i proizvodnje energije.

2.2.1. Općenito o oksidoreduktivnim enzimima

U biokemiji, oksidoreduktaze uključuju redoks reakcije u kojima se vodikovi ili kisikovi atomi ili elektroni prenose s jedne na drugu molekulu. Oksidoreduktaze uključuju kategorije enzima hidrosilaze, oksigenaze, peroksidaze i dehidrogenaze (Mansour, 2020).

Na primjer, enzim koji je katalizirao ovu reakciju bila bi oksidoreduktaza:



U ovom primjeru, A je reduktor (donator elektrona), a B je oksidans (akceptor elektrona).

U bliskoj budućnosti, oksidoreduktaza bi se mogla koristiti kao najbolji biokatalizator u farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim industrijama. Oksidoreduktaza igra značajnu ulogu u području dijagnostike, prognoze i liječenja bolesti. Analizom aktivnosti enzima i promjenama određenih tvari u tjelesnim tekućinama može se dijagnosticirati broj bolesti. Poremećaji koji nastaju zbog manjka (kvantitativnog i kvalitativnog) i viška oksidoreduktaze, koji mogu pridonijeti metaboličkim abnormalnostima i smanjenom normalnom životu, postaju dosta učestali.

2.2.2. Klasifikacija oksidoreduktivnih enzima

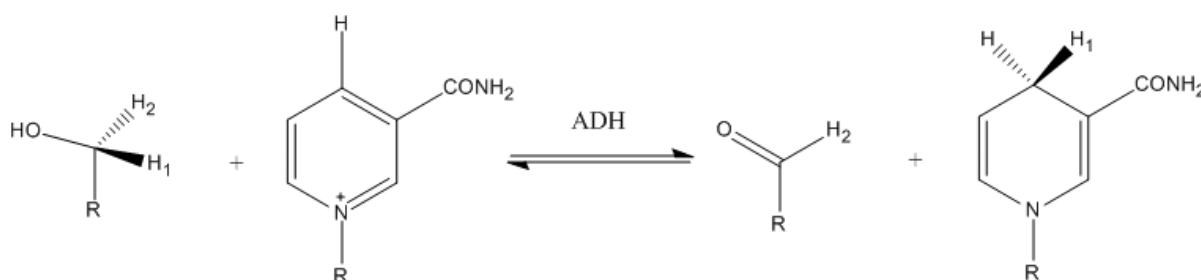
Kategorizacija oksidoreduktivnih enzima dijeli se na (Kareem, 2020):

1. Dehidrogenaze – prijenos vodika
2. Oksidaze – prijenos elektrona na molekulu kisika
3. Oksigenaze – prijenos kisika s molekularnog kisika
4. Peroksidaze – prijenos elektrona na peroksid

Dehidrogenaze su enzimi koji kataliziraju reakcije redukcije prijenosom vodikovih iona sa supstrata na akceptor ili koenzim. Koenzimi su male organske molekule uključene u enzimsku katalizu, kao što su nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺ ili NADH), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP⁺ ili NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD) i flavin mononukleotid (FMNo) (Nwazue, 2011).

Nwazue (2011) definira dehidrogenaze kao skupinu bioloških katalizatora, odnosno enzima, koji posreduju u biokemijskim reakcijama uklanjanja atoma vodika [H] umjesto kisika [O] u svojim oksido-redukcijskim reakcijama. To je svestran enzim u putu respiratornog lanca ili lancu prijenosa elektrona. T. Turnberg je otkrio ovu skupinu enzima između 1900.-1922. Nekoliko dehidrogenaza je prisutno u tkivima ljudi, biljaka i mikroorganizama koji imaju ogromne biokemijske interese. Kao rezultat polimorfne prirode ovog enzima, važno je ograničiti naš interes na različite funkcije laktat dehidrogenaze u dijagnozi i liječenju malarije (Nwazue, 2011).

Reakcije dehidrogenaze dolaze najčešće u dva oblika: prijenos hidrida i oslobađanje protona, često s vodom kao drugim reaktantom (Slika 4) i prijenos dvaju vodika.



Slika 4. Općenita shema reakcije dehidrogenacije (oksidacije) alkohola (Stamp, 2014)

Oksidaza je enzim koji sudjeluje u oksidacijsko-redukcionoj reakciji. Oksidaza ima katalitičku ulogu i osobito je važna u reakcijama koje imaju diokisik (O₂) kao akceptor elektrona. Enzimi oksidoreduktaze kataliziraju prijenos elektrona od molekule, poznate kao reduktor ili donor elektrona, do oksidansa ili akceptora elektrona. Kada oksidaza igra ulogu u reakciji, koja uključuje doniranje atoma vodika, kisik postaje voda (H₂O) ili vodikov peroksid (H₂O₂). Jedan od najvažnijih enzima oksidaze je citokrom C oksidaza. Ovaj enzim igra ključnu ulogu u omogućavanju tijelu da koristi kisik u proizvodnji energije, a ujedno je i posljednji enzim u

završnoj fazi respiratornog lanca prijenosa elektrona (Prospec, 2016).

Test oksidaze koristi kako bi se mogli identificirati različiti mikroorganizmi koji sadrže enzim po nazivu citokrom C oksidazu. Taj enzim je jako važan u lancu prijenosa elektrona. Citokrom oksidaza prenosi elektrone iz lanca prijenosa elektrona na kisik i reducira ga u vodi (Thpanorama, 2022). Rezultat testa prikazuje se ljubičastom bojom. Ako bakterija proizvodi citokrom C oksidazu, enzim će oksidirati reagens korišten u testu kako bi dobio ljubičastu boju. Ako bakterija ne proizvodi citokrom C oksidazu, neće doći do promjene boje. Pozitivan rezultat testa pokazuje da je bakterija aerobna i stoga može koristiti kisik za disanje (Thpanorama, 2022).

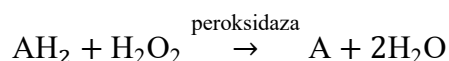
Oksigenaze su skupina jedinstvenih enzima koji kataliziraju reakcije fiksacije kisika. Oksigenaze su široko rasprostranjene u prirodi i igraju ključnu ulogu u metaboličkoj pretvorbi, sintetskim i degradacijskim reakcijama različitih prirodnih spojeva kao što su aminokiseline, lipidi, hormoni, vitamini i tako dalje, kao i sintetičkih lijekova. S druge strane, oksidaze i dehidrogenaze uglavnom su uključene u energetske metabolizam (Hayaishi, 2013).

Hayaishi (2013) klasificira oksigenaze u dvije kategorije:

1. Diooksidaze koje kataliziraju ugradnju dvaju atoma molekularnog kisika po supstratu
2. Monooksidaze koje uključuju jedan atom molekularnog kisika po supstratu, a drugi atom se reducira u vodu, H₂O.

Peroksidaze su skupina enzima koji kataliziraju oksidaciju supstrata vodikovim peroksidom ili organskim peroksidom. Aktivnost peroksidaze otkrio je Schonbein 1855. tretirajući gvajakol (C₆H₄) vodikovim peroksidom i biljnim ekstraktima. Peroksidaze su jako bitne za sve žive sustave jer se nalaze u svim biljkama i životinjama. Peroksidaze također kataliziraju apstrakciju jednog ili dva elektrona prijenosom jednog elektrona s organskog supstrata, u tom se slučaju vodikov peroksid korisni kao akceptor elektrona (Meunier, 2003).

Jednadžba reakcije koju kataliziraju peroksidaze je:



Dakle, vidljivo je da je vodikov peroksid (H_2O_2) akceptor elektron u brojnim oksidacijskim reakcijama. H_2O_2 je jedan od supstrata i sudjeluju u oksidacijskoj detoksikaciji lijekova i ksenobiotika, urođenom imunitetu, biosintezi hormona i patogenezi upalnih bolesti (Lubos i sur., 2011). Peroksidaze imaju veliku ulogu u zaštitnim mehanizmima, ali ipak postoje i neke peroksidaze koje mogu dovesti do nekih štetnih reakcija poput kooksidacije endogenih supstrata, lijekova i ksenobiotika što dovodi do oksidacije lipoproteina, karcinogeneze i nekroze jetre. Tako se danas čak i različiti inhibitori koriste protiv različitih tipova tkivno specifičnih peroksidaza za liječenje raznih vrsta bolesti (Schulz i sur., 2012.).

2.2.3. Značaj i primjena oksidoreduktivnih enzima

Enzimi oksidoreduktaze kao što je već navedeno povezani su s reakcijama oksidacije i redukcije, reakcijama hidroksilacije, oksidacije amina i također su povezane s redukcijama ugljik-ugljik dvostrukih veza.

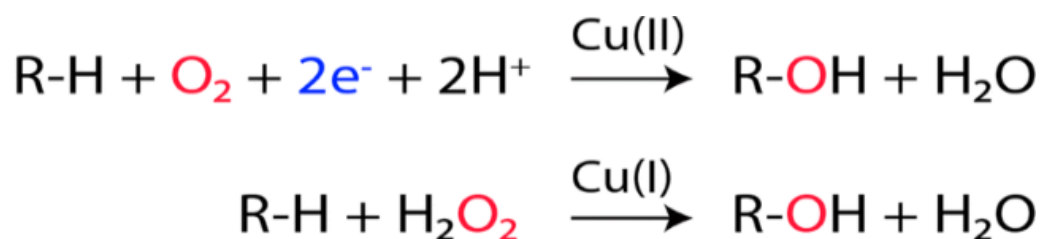
Značaj enzima oksidoreduktaze pronalazi se u reakcijama oksidacije molekula koje su važne za molekule poput ugljikovodika. Kod oksidacije amina stvaraju se imini, a oni uz pomoć enzima u vodenom mediju tvore karbonilne skupine ujedno otpuštajući amonijeve ione. Enzimi oksidoreduktaze imaju veliki značaj i u biotransformacijama. U biotransformacijama dosta često zahtjevaju postojanost kofaktora koji mogu biti NAD^+ , $NADP^+$, hem, FAD ili FMN. Poslije biokatalize je potrebna regeneracija kofaktora, a to ima izravan utjecaj na njihovu stabilnost, ali i same troškove koji se stvaraju u procesu (Grogan, 2009).

Od najvažnijih enzima oksidoreduktaze izdvajaju se **litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) i alkohol dehidrogenaze** (Grogan, 2009).

Litička polisaharidna monooksigenaza (LPMO) je novootkriven i široko proučavan enzim posljednjih godina. Ovi enzimi igraju ključnu ulogu u depolimerizaciji biopolimera na bazi šećera koji uključuje celulozu, hemicelulozu, hitin i škrob, a imaju pozitivan značaj za pretvorbu biomase. Litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) su u prirodi u izobilju i najpoznatije su po svojoj ulozi kao što su hitin i celuloza. Aktivnost LPMO zahtijeva supstrat kisika, za koji se izvorno mislilo da je O_2 , ali koji također može biti H_2O_2 . U LPMO reakcijama

Cu(II)/Cu(I) naznačen iznad strelica odnosi se na ion bakra u aktivnom mjestu i njegovo oksidacijsko stanje prije pokretanja katalitičkog ciklusa (Slika 5) (Wang i sur., 2021).

Litička polisaharidna monoksigenaza pronalazi svoju primjenu u industrijskom biotehnološkom sektoru. U proizvodnji biogoriva LPMO povećava učinkovitost razgradnje celuloze za proizvodnju biogoriva. U procesu razgradnje celuloze LPMO radi u suradnji s celulazama čime se poboljšava konverzija celuloze u šećere i fermentacije u biogoriva. Svoju primjenu LPMO pronalazi u prehrambenim industrijama. LPMO cijepa komplekse ugljikohidrata kako bi se poboljšala osjetne karakteristike hrane i pića. Bioremedijacija je također grana koja primjenjuje LPMO. LPMO pomaže u bioremedijaciji okoliša kontaminirano kompleksnim polisaharidima kao što je na primjer hitin. Zahvaljujući LPMO razgradnja hitina je olakšana čime se omogućava degradacija otpada hitina.

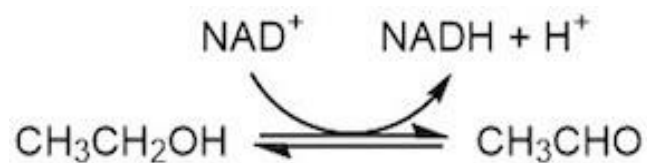


Slika 5. Reakcija katalizirana enzimo LPMO (Wang i sur., 2021)

Alkohol dehidrogenaza je enzim koji se uglavnom nalazi u jetri i želucu. Ona je važna kao dio stanice kvasca u proizvodnji etanola, ali i u biokatalizi za redukciju aldehida. Kao što mu ime govori, njegov je posao pokrenuti put metabolizma alkohola. Kod odraslih osoba alkoholno piće je sastavni dio mnogih proslava, dio je ljudske kulture i često se konzumira. Uz to, alkohol je mnogima ukusan, ali to je zapravo toksin, a upravo zbog alkohol dehidrogenaza ljudi ne umiru od alkohola. Ime dehidrogenaza također implicira mehanizam djelovanja u ovom procesu. Prefiks 'de' znači ne, a 'hidro' se odnosi na atom vodika. Dakle, alkohol dehidrogenaza djeluje uklanjanjem atoma vodika iz alkohola. (Patterson, 2021).

Kada ljudi piju etanol, alkohol dehidrogenaza ga može razgraditi u želucu. Etanol koji nastavlja kroz želudac apsorbira se u krv u tankom crijevu. Krv u kapilarama koje okružuju tanko crijevo ide izravno u jetru. Glavni posao jetre je detoksikacija krvi, pa krv ovdje ide izravno iz

probavnog trakta. U jetri ima više alkohol dehidrogenaze za razgradnju etanola u krvi, ali alkohol dehidrogenaza razgrađuje alkohol na drugi otrovni spoj, acetaldehid. Acetaldehid je dobro poznati toksin i kancerogen tako da tijelo ne može to zadržati. Višak acetaldehida dovodi do simptoma mamurluka kao što su mučnina, glavobolja, malaksalost, znojenje i drugih simptoma (Patterson, 2021). Dakle, tijelo može podnijeti ovaj otrovni spoj. Drugi enzim acetaldehid dehidrogenaza se pretvara iz acetaldehida u acetat, bezopasnu molekulu koja se dalje razgrađuje na vodu i ugljični dioksid (Slika 6). Ovi spojevi se mogu lako osloboditi iz tijela.



Slika 6. Alkohol dehidrogenazom katalizirana pretvorba etanola u formaldehid (Mootha i sur., 2009)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Enzimski pripravak

Liofilizirana alkohol dehidrogenaza (ADH) izolirana iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*
Litička polisaharidna monooksigenaza (LPMO).

3.1.2 Kemikalije

- Betain, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Etanol (96% v/v), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etilen glikol, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Glicerol, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NAD⁺ Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- NADH, Alfa Aesar, Ward Hill, SAD
- Urea, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Vodikov peroksid w(H₂O₂ = 30%)
- 2,6-dimetoksifenol (DMP)

Sve kemikalije upotrebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće. Za pripremu eutektičkih otopala i otopina koristila se destilirana voda PBF-a.

3.1.3 Priprema matične otopine i pufera

- Natrijev acetatni pufer (NaAc) (100 mM, pH = 6)
 - Octena kselina, w(C₂H₄O₂) = 99,5 % (do pH 6)
 - Natrijev acetat (1,6496 g)
 - Ultračista voda (200 mL)

- Glicin pirofosfatni pufer (GPP) (pH=9)

Na₂P₂O₇ x 10 H₂O (pH 8,22)

Glicin (0,415 g)

Destilirana voda (247,29 mL)

3.1.4 Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator-IKA vortex, Genius 3, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Laboratorijska tresilica, Fisher Bioblock Scientific, tip KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, epruvete, eppendorf epruvete, odmjerne tikvice, menzure, kivete, špatule, stalak za epruvete)
- Magnetska mješalica s grijanjem, Technica, Železnik, Slovenija
- Mikropipete (10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L)
- Multimetar pH/ion metar, S220, Mettler Toledo, Columbus, SAD
- Spektrofluorimetar, Cary Eclipse, Varian, SAD
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYS™ 105, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

3.2 METODE

3.2.1 Priprava i karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Postupak pripreve eutektičkih otapala se provodi prema zadanim molarnim omjerima miješanjem prethodno preračunatih sastojaka prikazanih u tablici 3. Pripremljene reakcijske smjese su se zagrijavale na 60 °C pri 170 okretaja u minuti na magnetskoj mješalici određeno vrijeme dok se nije postigla bistra, bezbojna i homogena tekućina. Prirodnim eutektičkim otapalima izmjerena je pH vrijednost pri sobnoj temperaturi te polarnost.

Polarnost odabranih DES-ova određena je pomoću Nile crvene solvatokromne probe prema protokolu opisanom u Jeong i sur., 2017 i Ogihara i sur., 2004. Prethodno je pripremljena crvena stock otopina masene koncentracije 1 g L^{-1} u etanolu i pohranjena na temperaturi $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Prvo je pripremljena stock otopina koja je bila 100 puta u etanolu. Uzorci za spektrofotometar pripremljeni su u Eppendorf tubicama volumena 2 mL tako da je dodano 1,5 mL ispitivanog eutektičkog otapala i 0,5 mL razrijeđene crvene stock otopine. Destilirana voda se koristila kao slijepa proba, dok je u plastične kivete volumena 1 mL dodano $800 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka. Apsorpcijski spektri odabranih otapala snimljeni su pomoću GENESYS 10S UV-Vis spektrofotometra, pri valnim duljinama u intervalu od 340 do 800 nm. Iz dobivenih apsorpcijskih spektara očitavaju se maksimalne valne duljine apsorpcije (λ_{max}). Nakon što su očitane vrijednosti λ_{max} , iste su korištene za izračunavanje molarne prijelazne energije (E_{NR}), koja je određena prema izrazu [1]:

$$E_{\text{NR}} (\text{kcal mol}^{-1}) = \frac{hcNA}{\lambda_{\text{max}}} = \frac{28591}{\lambda_{\text{max}}} \quad [1]$$

pri čemu su h – Planck-ova konstanta ($6,62607004 \times 10^{-34} \text{ J/s}$), c – brzina svjetlosti ($300\,000 \text{ km/s}$), NA – Avogadro-ova konstanta ($6,02214076 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), λ_{max} - maksimalna valna duljina apsorpcije (nm). *BU10 se kristalizirala pri sobnoj temperaturi pa se iz tog razloga nije koristila dalje u istraživanju.

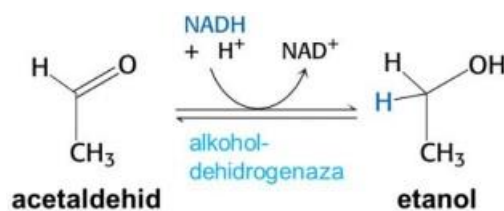
Tablica 3. Pripravljena niskotemperaturna eutektička otapala

DES	Kratica	Molarni omjer	W(H ₂ O) %
Beatin:etilen glikol	BEG ₁₀	1:2	10
	BEG ₃₀		30
	BEG ₅₀		50
Betain:glicerol	BGly ₁₀	1:2	10
	BGly ₃₀		30
	BGly ₅₀		50
Betain:urea	*BU ₁₀	1:3	10
	BU ₃₀		30
	BU ₅₀		50

3.2.2 Određivanje aktivnosti alokohol dehidrogenaze

Aktivnosti alkohol dehidrogenaze iz *Saccharomyces cerevisiae* (ADH) u NADES-ima prati se jednostavnim spektrofotometrijskim testom koji se temelji na reakciji oksidacije etanola u acetaldehid (slika 7) (Vrsalović Presečki, 2012). U sklopu testa se mjeri početna brzina reakcije katalizirane s 0,4 mg mL⁻¹ ispranih stanica *S. cerevisiae* odnosno ADH u određenom otapalu (NADES ili pufer kao referentno otapalo) koji sadrži 96 %-tni etanol i 530,7 mg mL⁻¹ NAD⁺ u prisutnosti različitih NADES-ova.

Shematski se reakcija može prikazati jednadžbom:



Slika 7. Shema oksidacijsko redukcijske reakcije koju katalizira alkohol dehidrogenaza (Teparić, 2019)

Spektrofotometrijski se mjeri promjena apsorbancije nastalog NADH pri $\lambda = 340$ nm jer reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetla te valne duljine, dok njegova oksidirana forma (NAD^+) u valnom području 300 – 400 nm ne apsorbira svjetlo.

Iz promjene apsorbancije u vremenu $\Delta\text{ABS}/\Delta t$ izračuna se volumna aktivnost enzima ADH (A_v) prema izrazu [1]:

$$A_v = \frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t} \cdot \frac{V_u}{V_r \cdot \varepsilon_{340} \cdot d} \cdot f \quad [3]$$

Gdje je:

f – faktor razrjeđenja;

V_r – volumen uzorka (cm^3);

V_u – ukupni volumen (cm^3);

ε_{340} – ekstincijski koeficijent ($\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$), iznosi $6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ za $\lambda = 340$ nm;

d – promjer kivete ($d = 1$ cm)

$\Delta\text{ABS}/\Delta t$ – predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu (min^{-1})

Volumna aktivnost se izražava u međunarodnoj jedinici enzimske aktivnosti U po jedinici volumena pri čemu je $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ cm}^{-3}$.

Za test je potrebno u kvarcnu kivetu od 1 mL 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 dm^{-3} glicin pirofosfatni pufer pH 9, odnosno prethodno pripremljeni NADES-i),
- 20 μL suspenzije enzima *S. cerevisiae* odnosno ADH ($\gamma = 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$).

3.2.3 Određivanje aktivnosti litičke polisaharidne monooksigenaze

Za mjerenje apsorbancije korišten je spektrofotometrijski test koji se temelji na oksidacijskoj reakciji 2,6-dimetoksifenola (2,6-DMP-a) u pripadajuće fenoksi radikale. Prije

početka mjerenja apsorbancije, testna otopina koja je sadržavala uzorak, zagrijavala se u vodenoj kupelji pri 30 °C između 5 i 10 minuta, i potom je prebačena u kivetu volumena 1 mL. Korišteno je više šarži istog LPMO enzima te su zbog toga izmjerene i vrijednosti apsorbancije u puferu svakog dana mjerenja. Provedeno je i mjerenje u reakcijskoj smjesi bez enzima kao slijepa proba.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za mjerenje aktivnosti LPMO

Komponenta	Koncentracija u testu	Temeljna otopina	V [μ L] za nulti uzorak	V [μ L]
NaAc pufer pH 6/DES		100 mM	500	430
DMP	500 μ M		0	30
H ₂ O ₂	100 μ M	5 mM u H ₂ O	0	20
uzorak			0	20

Dodatkom H₂O₂ kao zadnje komponente u reakcijskoj smjesi započinje mjerenje promjene apsorbancije u vremenu ($\Delta ABS/\Delta t$) spektrofotometrijski pri 469 nm tijekom 120 sekundi.

Iz sakupljenih podataka o vrijednostima apsorbancije izračunata je brzina reakcije preko nagiba pravca ovisnosti apsorbancije o vremenu. U obzir su uzeti podaci skupljeni u prvih 60 sekundi kako bi se obuhvatilo linearno područje tijeka reakcije. Brzine reakcije izračunate su iz srednje vrijednosti nagiba pravca triju paralelnih mjerenja. Vrijednost brzine u DES-u izražena je relativno u odnosu na izmjerenu brzinu u puferu toga dana. Drugim riječima, relativna brzina reakcija pokazuje koliko je puta reakcija bila brža ili sporija od one u puferu toga dana. Iz vrijednosti relativne brzine reakcije preko jednadžbe (1) izračunata je relativna volumetrijska aktivnost enzima. EF vrijednost izračunata je preko jednadžbe (2)

$$volumetrijska\ aktivnost_{rel} (U L^{-1}) = brzina_{rel} (min^{-1}) \cdot EF \quad [1]$$

$$EF = \frac{ukupni\ volumen(ml) \cdot stupanj\ razrjeđenja}{volumen\ uzorka\ (ml) \cdot dužina\ (cm) \cdot molarni\ apsorpcijski\ koeficijent\ (mM^{-1}cm^{-1})} \quad [2]$$

4. REZULTAT I RASPRAVA

Koncept održivog razvoja u veoma je važnom fokusu modernih kemijskih industrija s ciljem smanjenja onečišćenja i prekomjerne upotrebe prirodnih resursa, nastojeći implementirati koncepte zelene kemije u kemijskim procesima. Veliku pozornost su privukli DES-ovi kao zamjena organskim otapalima i reagensima koji imaju štetan učinak na okoliš. Zahvaljujući svojim povoljnim svojstvima kao što su niska hlapljivost, netoksičnost, niska cijena, biorazgradivost, visokoj selektivnošću, nezapaljivost i njegovom primjenom poput biokatalizatora u organskoj sintezi može zamijeniti nepovoljne ekološke korake i povećati produktivnost procesa koji se provodi pri blagim uvjetima. Zelena otapala, bilo da su izolirani iz cijelih stanica ili enzima moguće je sintetizirati optički čiste spojeve visoke vrijednosti, čija potražnja raste u farmaceutskim industrijama. Za sintezu kiralnih alkohola u industrijama kao biokatalizatori najčešće se koriste oksidoreducirajući enzimi, odnosno dehidrogenaze i reduktaze za čiju aktivnost zahtjeva prisutnost odgovarajućih koenzima.

Priprema prirodnih DES-ova je jednostavna i podrazumijeva miješanje i zagrijavanje krutina ili tekućina (poput glicerola i etilen-glikola) u određenom molarnom omjeru, a koje hlađenjem ostaju tekućine na sobnoj temperaturi. Ovakva priprema otapala je efikasna na razini atoma (engl. *Atom economy*) i predstavlja značajnu prednost kod sinteze zelenih otapala. U konačni produkt uključena je maksimalna količina ulazne sirovine, a veća razina atoma znači manju primjenu neobnovljivih izvora sirovina, broja stupnjeva sintetskog procesa i količinu ukupnog otpada. Sirovine koje se upotrebljavaju za sintezu prirodnih eutektičkih otapala su lako dostupna, jeftina, sigurna i biorazgradiva. DES-ovi su se pokazali izvrsnima za različite primjene, a posebno kao otapala za enzimski katalizirane reakcije ili kao mediji za pohranu enzima u tekućem obliku. Stoga je u ovom radu ispitano 8 betainijevih prirodnih eutektičkih otapala sa etilen-glikolom, glicerolom i ureom kao donatorom vodikove veze te je ispitan njihov utjecaj na i aktivnost dva enzima iz klase oksidoreduktaza, alkohol dehidrogenaza iz , (ADH) i litička polisaharidna monooksigenaza LPMO u DES-ovima .

4.1 Priprema i karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala

U odnosu na ionske kapljevine, priprema DES-ova je ekonomičnija i jednostavnija. Kod pripreme DES-ova nije došlo do kemijske reakcije, nego su sintetizirana povezivanjem komponenti vodikovim vezama rezultirajući eutektičkom smjesom. Iz perspektive zelene kemije, bitno je napomenuti kako se radi o održivom procesu koji posjeduje 100%-tnu atomsku

učinkovitost (svi atomi supstrata se ugrađuju u produkt) te kao takav ne stvara otpad. Sintetizirani su DES-ovi načinjeni od kvarternih amonijevih soli i organskih molekula. Betain predstavlja pogodnu komponentu za pripremu DES-ova s obzirom da je biorazgradiv, obnovljiv, jeftin, prirodno prisutan u biološkim sustavima, nije toksičan i ima široku primjenu u industriji. Pripremljena su 3 različita betain DES-a, betain-etilen glikol, betain-glicerol i betain-urea. Navedeni DES-ovi su prikazani u tablici 4 te su pripremljeni s različitim volumnim udjelima udjelima vode u sastavu.

Tablica 4. Pripremljena prirodna niskotemperaturna eutektička otapala DES-ova

Prirodno eutektičko otapalo	Kratica	Udio vode (w/w)	Polarnost E_{NR} (kcal mol⁻¹)	pH vrijednost
Betain-etilen glikol:voda	BEG10	10	48873.50	8.35
Betain-etilen glikol:voda	BEG30	30	84588.75	7.5
Betain-etilen glikol:voda	BEG50	50	73310.25	7.22
Betain-glicerol:voda	BGly10	10	49465.39	7.86
Betain-glicerol:voda	BGly30	30	101028.26	7.06
Betain-glicerol:voda	BGly50	50	101386.52	6.75
Betain-urea:voda	BU30	30	107890.56	8.92
Betain-urea:voda	BU50	50	79640.55	8.60

Također, u tablici 4 su prikazane vrijednosti polarnosi određenih DES-ova. Vrijednost polar-
nosti su u rasponu od $48873.50 \text{ kcal mol}^{-1}$ do $107890.56 \text{ kcal mol}^{-1}$. DES-ovi BEG₃₀ i BEG₅₀
koji sadrže veći udio vode pokazuju veću polarnost u odnosu na isti DES s manjim udjelom
vode, odnosno BEG₁₀ čija polarnost iznosi najmanjih $48873.50 \text{ kcal mol}^{-1}$. To je uskladu s
očekivanjima s obzirom da je etilen glikol nepolarna molekula. Isto to vrijedi i za DES be-
tain.glicerol. S porastom udjelom vode pH vrijednost betain-glicerol DES-ova se smanjuje.
Manji udio vode i veći pH kod betain-urea pokazuje veću polarnost. BU₃₀ pokazuje najveću
pH vrijednost, 8.92 i najveću polarnost čija vrijednost iznosi $107890.56 \text{ kcal mol}^{-1}$, što je bilo
u skladu s očekivanjima budući da je urea izrazito polarna molekula. Međutim, BU₅₀ pokazuje
manju polarnost u usporedbi s BGly₅₀ s najmanjom pH vrijednošću, 6.75.

4.2 Aktivnost alkohol dehidrogenaze u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) određena je mjerenjem početne brzine
reakcije oksidacije etanola u acetaldehid. Otapala u kojima je reakcija provedena su prethodno
pripremljeni DES-ovi i glicin-pirofosfatni pufer (pH = 9). DES-ovi na bazi betaina
pripremljena su s odgovarajućim udjelima vode prikazanih na slici 7. ADH za katalizu reakcije
zahtjeva koenzim NAD^+ koji se reducira u NADH, aktivnost enzima je izmjerena
spektrofotometrijskom metodom praćenjem koncentracije nastalog NADH pri valnoj duljini od
340 nm. Iz prikupljenih podataka o vrijednostima apsorbancije izračunata je brzina reakcije
preko nagiba pravca ovisnosti apsorbancije o vremenu. U obzir su uzeti podaci skupljeni u
prvih 60 sekundi kako bi se obuhvatilo linearno područje tijekom reakcije. Brzine reakcije
izračunate su iz srednje vrijednosti nagiba pravca triju paralelnih mjerenja. Vrijednost brzine u
DES-u izražena je relativno u odnosu na izmjerenu brzinu u puferu toga dana.

Tablica 5. Aktivnost ADH izmjerena u referentnom puferu i DES-ovima. (Reakcijski uvjeti: koncentracija ADH=0.008 mg mL⁻¹, 25 °C)

DES i pufer*	Kratica	Udio vode (w/w)	Aktivnost ADH	pH vrijednost
Betain-etilen glikol:voda	BEG10	10	0.001	8.35
Betain-etilen glikol:voda	BEG30	30	0.007	7.5
Betain- glicerol:voda	BGly30	30	0.002	7.06
Betain- glicerol:voda	BGly50	50	0.003	6.75
Betain- urea:voda	BU30	30	0.002	8.92
Glicin pirofosfatni pufer*	GPP	-	0.457	9

U tablici 5. su prikazane vrijednosti različitih relativnih aktivnosti izračunatih iz spektrofotometrijski određenih brzina reakcija. Brzine reakcije su izračunate iz nagiba tangente na linearni dio grafa ovisnosti apsorbancije o vremenu sadržanog u izlaznim podacima uređaja. Iz stupčastog grafa vidljivo je da ADH ne pokazuje aktivnost u DES-ovima. Konformacija aktivnog mjesta ADH ne odgovara vezanju supstrata zbog čega nema aktivnosti. pH GPP pufera iznosi 9 te je pH vrijednost pufera veća u usporedbi s pH vrijednostima DES-ova koji pokazuju beznačajnu razinu aktivnosti.

4.3 Aktivnost litičke polisaharidne monooksigenaze u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Za određivanje izračuna i iskazivanje brzine enzimske reakcije u DES-ovima u obzir je uzeta brzina u NaAc puferu pH vrijednosti 6. Razlog tome je upotreba različitih sarži LPMO enzima i provođenje mjerenja aktivnosti kroz duži vremenski interval u kojem postoji potencijalni utjecaj skladištenja na enzimsku aktivnost. Stoga je brzina enzimske reakcije izražena u relativnom odnosu s brzinom reakcije u puferu izmjerene istog dana. Izračunata relativna brzina prevedena je preko jednadžbe 1 u aktivnost.

Tablica 6. Volumetrijska aktivnost LPMO u betain DES-ovima (Reakcijski uvjeti: koncentracija LPMO=0.008 mg mL⁻¹, 25 °C)

DES/pufer i pripadajući udio vode u otapalu	Volumetrijska aktivnost u DES-u (U L⁻¹)	pH vrijednost
BU₃₀	3,34	8.92
BU₅₀	0,74	8.60
BEG₁₀	19,61	8.35
BEG₃₀	1,96	7.5
BEG₅₀	1,00	7.22
BGly₅₀	0,64	6.75
NaAc	6,40	6

U tablici 6 prikazane su aktivnosti LPMO-a u NaAc i DES-ovima. Eksperimentalno dobivene vrijednosti predstavljaju odnos aktivnosti u NaAc puferu i određenom DES-u. Budući da vrijednosti aktivnost proizlaze iz ranije izračunatih vrijednosti apsorbancija i brzina, primjenjuje se ista povezanost između sastava DES-ova i masenog udjela vode. Iz priložene tablice je uočljivo kako veći udio vode u konačnici rezultira smanjenom koncentracijom produkta. Moguće je da je to rezultat narušavanja supramolekularne strukture DES-a prilikom povećanja masenog udjela vode. . Unatoč tome što je u literaturi navedeno kako je struktura stabilna do 40-50% masenog udjela vode (Radović i sur. 2021), moguće je da i niži udjeli

dovode do oslobađanja molekula. Može se uočiti kako je u DES-ovima kojima je donor vodikove veze šećerna molekula poput glukoze ili saharoze prisutna vrlo mala ili čak nepostojeća aktivnost. Mogući razlog tome je što su šećerni DES-ovi otežavaju prijenos mase. Od DES-ova prikazanih u tablici 6, najveću relativnu vrijednost apsorbancije prikazuje dvokomponentni sustav BEG₁₀. Također navedeni DES ima značajno veću volumetrijsku aktivnost nego NaAc pufer. BEG₁₀ ima jedinstvenu kombinaciju svojstava koja mu omogućuje generaciju visoke razine volumetrijske aktivnosti. DES-ovi na bazi betain-etilen glikol i betain-urea sa smanjenjem pH vrijednosti volumetrijska aktivnost opada. BEG₁₀ je povoljan medij za provođenje reakcije koju katalizira LPMO.

5. ZAKLJUČAK

Svrha rada je bila ispitati primjenu DES-ova te usporediti i eksperimentalno potkrijepiti aktivnost ADH i LPMO u pripremljenim DES-ovima. Razrjeđivanjem su pripremljeni DES-ovi s određenim volumnim udjelom vode. DES-ovi na bazi betaina su povoljniji medij za provođenje reakcije koju katalizira LPMO nego ADH. Stabilnost u provedenim DES-ovima, pokazali su da blago lužnati DES-ovi koji sadrže ureu ili etilen-glikol imaju bolji učinak na stabilnost koenzima nego DES-ovi koji sadrže glicerol.

Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Na razini atoma, sinteza DES-ova je jednostavna, jeftina i učinkovita metoda
2. LPMO enzim je aktivan u DES-ovima, na njegovu aktivnost utječu fizikalna i kemijska svojstva DES-ova poput pH. U blago lužnatim (pH 6,75 -8,92) moguće je postići veću aktivnost enzima.
3. U ovom istraživanju najveća aktivnost LPMO-a zabilježena je u DES-u B:EG₁₀ pH 8,35.
4. ADH enzim nije aktivan u DES-ovima.

6. POPIS LITERATURE

Abranches DO, Silva LP, Martins MAR, Pinho SP, Coutinho JAP (2020) Understanding the Formation of Deep Eutectic Solvents: Betaine as a Universal Hydrogen Bond Acceptor. *Chem Sus Chem* **13**, 4916-4921.

Aparecida de Marco B, Rechelo BS, Gandolpho Tòtoli E, Kogawa AC, Nunes Saldago H R (2019) Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharm J* **27**, 1-8.

Baydaş Y, Dertli E, Şahin E (2020) Green synthesis of chiral aromatic alcohols with *Lactobacillus kefir* P2 as a novel biocatalyst. *Synth Commun* **50**, 1035-1045.

Benworth BH, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, i sur. (2021) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **121**, 1232–1285.

Cano-Flores A, Gómez J, Escalona-Torres IS, Velasco-Bejarano B (2020) Microorganisms as Biocatalysts and Enzyme Sources. U: Blumenberg M, Shaaban M, Elgaml A (ured.) *Microorganisms*, 1. izd., IntechOpen, London, str. 1-32.

Choi YH, Spronsen Y, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends WCEI, i sur. (2011) Are 7. Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?. *Plant Physiol* **156**, 1701–1705.

Croom E (2012) Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci* **112**, 31-88.

Cvjetko Bubalo M, Panić M, Radošević K, Radojčić Redovniković I (2016) Methods for deep eutectics solvents preparation. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 164-168.

Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Radojčić Redovniković I, Halambek J, Gaurina Srček V (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol Environ Saf* **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.

Czech L, Hermann L, Stöveken N, Richter AA, Höppner A, Smits SHJ, i sur. (2018) Role of the Extremolytes Ectoine and Hydroxyectoine as Stress Protectants and Nutrients: Genetics, Phylogenomics, Biochemistry, and Structural Analysis. *Genes* **9**, 177.

Fontanille P, Gros JB, Larroche C (2006) Biotransformations with Crude Enzymes and Whole Cells. U: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C (ured.) *Enzyme Technology*, 1. izd., Springer, New York, str. 123-155.

Fryszkowska A, Devine PN (2020) Biocatalysis in drug discovery and development. *Curr Opin Chem Biol* **55**, 151-160.

Galvão WS, Pinheiro BB, Golçalves LRB, de Mattos MC, Fonseca TS, Regis T, i sur. (2018) Novel nanohybrid biocatalyst: application in the kinetic rezolutan of secondary alcohols. *J Mater Sci* **53**, 14121–14137.

Garzón-Posse F, Becerra-Figueroa L, Hernández-Arias J, Gamba-Sánchez D (2018) Whole Cells as Biocatalysts in Organic Transformations. *Molecules* **23**, 1265.

Giordano RC, Ribeiro MP, Giordano RL (2006) Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnol Adv* **24**, 27-41.

Grogan G (2009) Practical Biotransformations: A Beginner's Guide, 1. izd., A John Wiley and Sons, Ltd., str. 1-39.

Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A (2018) Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review). *J Emerg Technol Innov Res* **5**, 411-424.

Hansen BB, Spittle S, Chen B, Poe D, Zhang Y, Klein JM, i sur. (2021) Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **121**, 1232–1285.

Hatti-Kaul R, Chen L, Dishisha T, Enshasy HE (2018) Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiol Lett* **365**, 213-233.

Hegazy ME, Mohamed TA, ElShamy AI, Mohamed AE, Mahalel UA, Reda EH, i sur. (2015) Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review. *J Adv Res* **6**, 17-33.

Huang LH, Li J, Xu G, Zhang XH, Wang YG, Yin YL, i sur. (2010) Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with *Penicillium griseopurpureum* Smith and *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. *Steroids* **75**, 1039-1046.

Ivanković A, Dronjić A, Martinović Bevanda A, Talić S (2017) Review of 12 Principles of Green Chemistry in Practice. *Int J Sustain Energy* **6**, 39-48.

Kaushik N, Biswas S, Singh J (2014) Biocatalysis and Biotransformation Processes – An Insight. *The Scitech Journal* **01**, 15-22.

Khan S, Bano Z, Singh LR, Hassan MI, Islam A, Ahmad F (2013) Testing the ability of non-methylamine osmolytes present in kidney cells to counteract the deleterious effects of urea on structure, stability and function of proteins. *PLoS One* **8**, 72533.

Klamt A, Jonas V, Burger T, Lohrenz JCW (1998) Refinement and parametrization of COSMO-RS. *J Phys Chem A* **102**, 5074-5085.

Kushwah N, Jain V, Yadav D (2020) Osmolytes: A Possible Therapeutic Molecule for Ameliorating the Neurodegeneration Caused by Protein Misfolding and Aggregation. *Biomolecules* **10**, 132.

Li C J, Trost BM (2008) Green chemistry for chemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 13197-13202.

- Lin B, Tao Y (2017) Whole-cell biocatalysts by design. *Microb Cell Fact* **16**, 106.
- Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M, i sur. (2020) Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* **6**, 23-44.
- Musa MM (2022) Alcohol Dehydrogenases with anti-Prelog Stereopreference in Synthesis of Enantiopure Alcohols. *ChemistryOpen* **11**, 1.
- Nemer G, Louka N, Vorobiev E, Salameh D, Nicaud JM, Maroun RG i sur. (2021) Mechanical Cell Disruption Technologies for the Extraction of Dyes and Pigments from Microorganisms: A Review. *Ferment* **7**, 36.
- NIST Chemistry WebBook, <<https://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Pristupljeno 01.09.2022.
- O'Donnell NH, Møller BL, Neale AD, Hamill JD, Blomstedt CK, Gleadow RM (2013) Effects of PEG-induced osmotic stress on growth and dhurrin levels of forage sorghum. *Plant Physiol Biochem* **73**, 83-92.
- Ogihara W, Aoyama T, Ohno H (2004) Polarity Measurement for Ionic Liquids Containing Dissociable Protons. *Chem Lett* **33**, 1414-1415.
- Paiva P, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural Deep Eutectic Solvents-Solvents for the 21st Century. *ACS Sus Chem Eng* **2**, 1063-1071
- Pan SY, Fan C, Lin YP (2019) Development and Deployment of Green Technologies for Sustainable Environment. *Environmets* **6**, 114.
- Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2020) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. *J Chem Technol Biotechnol* **96**, 14-30.
- Pappenberger G, Hohmann HP (2014) Industrial Production of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) and D-Isoascorbic Acid. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **143**, 143-188.
- Parmar A, Kumar H, Marwaha SS, Kennedy JF (2000) Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnol Adv* **18**, 289-301.
- Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syldatk C, Holtmann D (2019) Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends Biotechnol* **37**, 943-959.
- Peternel Š (2013) Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production. *N Biotechnol* **30**, 250-254.
- Pinto A, Contente ML, Tamborini L (2020) Advances on whole-cell biocatalysis in flow. *Curr Opin Green Sustain Chem* **25**, 100343.
- PubChem – Urea, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=urea>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=urea>>. Pristupljeno 21.08.2022.

Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Slivac I, Gaurina Srček V, Radojčić Redovniković I (2016) Green technology meets ecotoxicology. *Croat J Food Sci Technol* **8**, 120-128.

Sheldon RA, Brady D (2013) The Limits to Biocatalysis: Pushing the Envelope. *Chem Commun* **00**, 1-3.

Singh LR, Ali Dar T, Haque I, Anjum F, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F (2007) Testing the paradigm that the denaturing effect of urea on protein stability is offset by methylamines at the physiological concentration ratio of 2:1 (urea:methylamines). *Biochim Biophys Acta* **1774**, 1555-1562.

Smitha MS, Singh S, Singh R (2017) Microbial Biotransformation: A Process for Chemical Alterations. *J Bacteriol Mycol Open Access* **4**, 00085.

Song Z, Wang J, Sundmacher K (2021) Evaluation of COSMO-RS for solid–liquid equilibria prediction of binary eutectic solvent systems. *Green Energy Environ* **6**, 371-379.
Straathof AJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 548 – 556.

Teng X, Ichiye T (2020) Dynamical Model for the Counteracting Effects of Trimethylamine *N*-Oxide on Urea in Aqueous Solutions under Pressure. *J Phys Chem B* **124**, 1978-1986.

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

Vrsalović Presečki, A, Makovšek, K., Vasić- Rački, Đ. (2012) Coenzyme regeneration in hexanol oxidation catalyzed by alcohol dehydrogenase. *Appl. Biochem. biotechnol.* **167**, 595-611.

Zeng CX, Qi SJ, Xin RP, Yang B, Wang YH (2016) Synergistic behavior of betaine–urea mixture: Formation of deep eutectic solvent. *J Mol Liq* **219**, 74-78.

Wei P, Liang J, Cheng J, Zong MH, Lou WY (2016) Markedly improving asymmetric oxidation of 1-(4-methoxyphenyl) ethanol with *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 cells by adding deep eutectic solvent in a two-phase system. *Microb Cell Fact* **15**, 5.

Winkler CK, Schrittwieser JH, Kroutil W (2021) Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. *ACS Cent Sci* **7**, 55-71.

Wojeicchowski JP, Ferreira AM, Abranches DO, Mafra MR, Coutinho JAP (2020) Using COSMO-RS in the Design of Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Antioxidants from Rosemary. *ACS Sustainable Chem Eng* **8**, 12132-12141.

Xu P, Du PX, Zong MH, Li N, Lou WY (2016) Combination of deep eutectic solvent and ionic liquid to improve biocatalytic reduction of 2-octanone with *acetobacter pasteurianus*

GIM1.158 cell. *Sci Rep* **6**, 26158.

Yancey PH (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**, 2819-2830.

Yancey PH, Burg MB (1989) Distribution of major organic osmolytes in rabbit kidneys in diuresis and antidiuresis. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol* **257**, 602-607.

Yılmaz D, Şahin E, Dertli E (2017) Highly Enantioselective Production of Chiral Secondary Alcohols Using *Lactobacillus paracasei* BD101 as a New Whole Cell Biocatalyst and Evaluation of Their Antimicrobial Effects. *Chem Biodivers* **14**, 1.

Ovu napomenu izbrisati prije predaje - Zadnja (ne numerirana) stranica završnog rada (uključiti u elektronsku verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu, a u printanu verziju original potpisanu)

Izjava o izvornosti

Ja Jasmin Mah'D izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis
