

# Utjecaj hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na aktivnost i skladišnu stabilnost lipaza

---

Mihaljević, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*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:159:738867>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Iva Mihaljević**  
8383/BT

**UTJECAJ HIDROFOBNIH NISKOTEMPERATURNIH  
EUTEKTIČKIH OTAPALA NA AKTIVNOST I SKLADIŠNU  
STABILNOST LIPAZA**  
ZAVRŠNI RAD

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** HRZZ-IP-04-2019 Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova

**Mentor:** dr. sc. Manuela Panić

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Utjecaj hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na aktivnost i skladišnu stabilnost lipaza

Iva Mihaljević, 8383/BT

**Sažetak:** Implementacijom načela zelene kemije, koja nudi konkretne smjernice za adaptaciju konvencionalnih i dizajn novih kemijskih produkata i procesa, nastoji se smanjiti ili potpuno ukloniti primjena štetnih i opasnih tvari. Najveći potencijal za zamjenu organskih otapala imaju zelena otapala među kojima se ističu niskotemperaturna eutektička otapala nalazeći svoju primjenu u različitim područjima između kojih je i biokataliza. U ovom radu ispitivan je njihov utjecaj na aktivnost i skladišnu stabilnost različitih lipaza te su u tu svrhu korištena dva hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala (hDES) Ty:C<sub>8</sub> i C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>. Analizom rezultata, najaktivnijom se pokazala lipaza CALB u hDES-u Ty:C<sub>8</sub>, dok su najvišu skladišnu stabilnost pokazale lipaza G u hDES-u Ty:C<sub>8</sub> te lipaza AYS u hDES-u C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>. Zaključno, nudeći bolji ekološki otisak hDES-ovi su potencijalna zamjena za primjenu u industriji i eliminaciji organskih otapala kao skladišni medij za lipaze.

**Ključne riječi:** zelena kemija, eutektička otapala, lipaza, aktivnost, skladišna stabilnost

**Rad sadrži:** 29 stranica, 9 slika, 2 tablice, 29 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Manuela Panić

**Pomoć pri izradi:** Anja Damjanović, mag. ing.

**Datum obrane:** 7. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Bioengineering  
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### Hydrophobic deep eutectic solvents impact on lipase activity and storage stability

Iva Mihaljević, 8383/BT

**Abstract:** The implementation of green chemistry principles, which offers specific guidelines for the adaptation of conventional and the design on new chemical products and processes, aims to reduce or eliminate the use of harmful and hazardous substances. Green solvents have the greatest potential to replace organic solvents, among which deep eutectic solvents are highlighted by their application in different areas, including biocatalysis. Their impact on the activity and storage stability of various lipases was studied in this work and two hydrophobic deep eutectic solvents (hDES) Ty:C<sub>8</sub> and C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> were used for that purpose. Analyzing the results, lipase CALB in hDES Ty:C<sub>8</sub> showed to be the most active, while the highest storage stability showed lipase G in hDES Ty:C<sub>8</sub> and lipase AYS in hDES C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>. In conclusion, offering a better environmental footprint, hDESs are a potential substitute for industrial applications and elimination of organic solvents as a storage medium for lipases.

**Keywords:** green chemistry, deep eutectic solvents, lipase, activity, storage stability

**Thesis contains:** 29 pages, 9 figures, 2 tables, 29 references, 0 supplement

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Manuela Panić

**Technical support and assistance:** Anja Damjanović, mag. ing.

**Defence date:** 7th September 2022

*Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Manueli Panić na ukazanoj prilici, uloženom vremenu i prenesenom znanju te strpljenju i razumijevanju. Veliko hvala i mag. ing. Anji Damjanović na nesebičnoj pomoći i brojnim korisnim savjetima prilikom izrade rada.*

*Od srca hvala mojoj obitelji i prijateljima na konstantnoj podršci. Bili ste moja motivacija i vjerovali u mene kad ja nisam.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ZELENA KEMIJA.....	2
2.2. ZELENA OTAPALA.....	3
2.3. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA .....	4
2.3.1. HIDROFOBNA EUTEKTIČKA OTAPALA.....	8
2.4. PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA U BIOTRANSFORMACIJAMA .....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. Materijali i metode .....	11
3.1.1. Kemikalije .....	11
3.1.2. Enzimski preparati.....	11
3.1.3. Oprema i uređaji .....	12
3.2. Metode rada.....	12
3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala .....	12
3.2.2. Aktivnost lipaza.....	13
3.2.3. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na aktivnost lipaza .....	14
3.2.4. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na stabilnost lipaza.....	17
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala.....	18
4.2. Aktivnost lipaza.....	18
4.3. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na aktivnost lipaza.....	20
4.4. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na stabilnost lipaza .....	22
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. LITERATURA .....	27

## 1. UVOD

U posljednja dva desetljeća sve više pozornosti je usmjereno razvoju različitih ekološki prihvatljivih, prilagodljivih i održivih otapala koja mogu zamijeniti konvencionalna štetna organska otapala. Zbog zaštite okoliša, zdravlja te sigurnosnih implikacija određenih organskih otapala, poticaj u zamjeni otapala raste na globalnoj razini. Stoga, zelena kemija postaje prepoznatljiva disciplina koja obuhvaća primjenu zelenih i održivih tehnologija. Prema načelima zelene kemije, da bi se otapalo kvalificiralo kao zeleni medij, ono mora zadovoljavati niz kriterija vezanih uz njihovu toksičnost, zapaljivost, stabilnost, biorazgradivost, recikliranje, dostupnost te nisku cijenu. Najveći potencijal u području zelene kemije za zamjenu organskih otapala su superkritične tekućine, ionske kapljevine te eutektička otapala.

Niskotemperaturna eutektička otapala (DES-ovi) definiraju se kao smjese dvaju ili više komponenti pripremljenih miješanjem kvaternih amonijevih soli i donora vodika u određenom molarnom omjeru, što rezultira nastankom homogene kapljevine (Radović, 2020). Izborom komponenti i njihovog omjera moguće je dizajnirati fizikalno-kemijske karakteristike i utjecati na uspješnost istih zbog čega su niskotemperaturna eutektička otapala našla široku primjenu u organskoj sintezi, (bio)katalizi, proizvodnji nanomaterijala, u procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenti te elektrokemiji. Najveća pažnja usmjerena je na reakcije katalizirane lipazama, posebice reakcije sinteze estera i transesterifikacije pri čemu DES može imati ulogu otapala, kootapala ili supstrata u slučaju kad je jedna od ishodnih komponenti DES-a supstrat spomenute reakcije.

Cilj ovog rada je ispitati aktivnost i stabilnost lipaza u hidrofobnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (hDES). U tu svrhu korištene su sljedeće lipaze: lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* (CALB), lipaza AH "Amano" izolirana iz *Pseudomonas cepacia* (AH), lipaza AS "Amano" izolirana iz *Aspergillus niger* (AS), lipaza AYS "Amano" izolirana iz *Candida cylindracea* (AYS) te lipaza G "Amano" izolirana iz *Penicillium camembertii* (G).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ZELENA KEMIJA

Zelena kemija je propulzivno područje istraživanja koje pokušava pronaći i održati ravnotežu između primjene prirodnih resursa, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša, stvarajući novu generaciju znanstvenika i tehnologa koji će na ekonomskoj osnovi analizirati procese i materijale upotrijebljene u proizvodnji i razvoju da bi sačuvali prirodne resurse i okoliš (Jukić i sur., 2004). Pokret zelene kemije razvio se ranih 1990-ih od strane Američke agencije za zaštitu okoliša (engl. *United States Environmental Protection Agency*, US EPA) s ciljem promoviranja inovativnih kemijskih tehnologija da bi se smanjila ili potpuno uklonila primjena štetnih i opasnih tvari (Lancaster, 2002). U sklopu pokreta, formulirano je dvanaest načela koja su prihvaćena kao univerzalni pravilnik za postizanje ciljeva i održivosti. Prilikom provođenja procesa prema načelima zelene kemije, nemoguće je udovoljiti zahtjevima svih 12 načela, ali se u svim stupnjevima sinteze nastoji primijeniti čim veći broj istih (Jukić i sur., 2004).

Dvanaest načela zelene kemije jesu:

1. Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao.
2. Tijek kemijske sinteze treba osmisliti tako da se maksimalno uključe ulazne sirovine u konačni proizvod.
3. Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se u njima ne rabe i ne proizvode tvari toksične za ljude i okoliš.
4. Kemijske produkte treba osmisliti tako da im se smanji toksičnost, a zadrži djelotvornost.
5. Uporabu pomoćnih kemijskih tvari (npr. otapala, sredstava za razdjeljivanje i sl.) treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće.
6. Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
7. Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to s tehničke i ekonomske strane prihvatljivo.
8. Treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa (npr. zaštićivanje funkcionalnih skupina, privremene modifikacije fizikalno-kemijskih procesa itd.).



9. Katalitički reagensi selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od reagenasa u stehiometrijskim količinama.
10. Kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u produkte neškodljive za okoliš nakon prestanka njihovog djelovanja.
11. Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.
12. U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice poput eksplozije, vatre i štetnog isparavanja (Jukić i sur., 2004).

Primjena hlapivih organskih otapala u industriji je široko zastupljena uključujući postupke poput ekstrakcije, biotransformacije, razdvajanja, pročišćavanja i sušenja proizvoda te sintetskih reakcija i analitičkih metoda. Usprkos tomu, organska otapala odgovorna su za značajne količine onečišćenja zraka i vode uzrokujući brojne negativne učinke na okoliš (promjena klime na globalnoj razini, narušavanje ozonskog omotača, narušavanje ljudskog zdravlja i sl.). K tomu, mnoga organska otapala su također otrovna što zahtijeva korištenje dodatne zaštitne opreme, a proces njihove regeneracije i ponovne uporabe je tehnološki zahtjevan te rezultira energetskim gubitkom uz unakrsno onečišćenje (Radović i sur., 2021).

Spomenuto je dovelo do potrebe za razvojem različitim ekološki prihvatljivih, prilagodljivih i održivijih zelenijih otapala, među kojima se ističu ionske kapljevine, superkritični i subkritični fluidi, fluorirana otapala te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora (Radović i sur., 2021). Uz navedeno, trenutno raste interes za korištenjem netoksičnih materijala te alternativnih izvora energije specifično selektivnih za određene molekule ili veze, dajući time uštedu energije i povećanu selektivnost. Takvi izvori uključuju mikrovalove, fotokemijske, ultrazvučne i elektrokemijske izvore (Lancaster, 2002).

## **2.2. ZELENA OTAPALA**

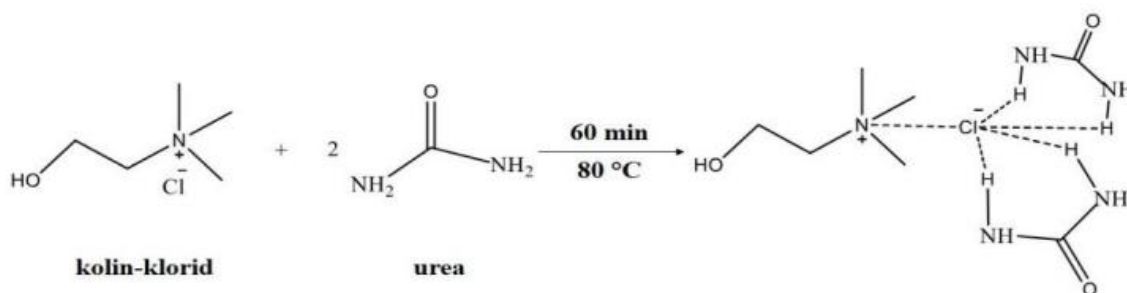
Da bi se neko otapalo kvalificiralo kao zeleni medij, ono mora zadovoljavati stroge zahtjeve vezane uz njihovu toksičnost, biorazgradivost, recikliranje, održivost, dostupnost te nisku cijenu (Vanda i sur., 2018; Abbott i sur., 2004). Također, otapalo ne smije biti zapaljivo i eksplozivno.

Osnovna dva pristupa u razvoju zelenih otapala uključuju primjenu otapala koja pokazuju bolja svojstva prema okolišu, zdravlju, sigurnosti i otapala iz obnovljivih izvora te zamjenu štetnih otapala i otapala koja se dobivaju iz nafte. (Cvjetko Bubalo i sur., 2015a).

U većini slučajeva, kao prvo otapalo od izbora se nameće voda upravo zbog svoje dostupnosti, niske cijene, netoksičnosti i nezapaljivosti te sigurnosti za okoliš i ljude. Međutim, slaba topivost mnogih organskih i organometalnih spojeva u vodi, visoka temperatura taljenja ( $T_t = 0\text{ }^\circ\text{C}$ ) te visoka molarna entalpija isparavanja ( $\Delta H_v = 40,65\text{ kJ/mol}$ ) su glavni ograničavajući faktori njene primjene kao otapala (Radović i sur., 2021; Cvjetko Bubalo i sur., 2015a). Kao što je već spomenuto, nedostaci uporabe vode i organskih otapala doveli su do razvoja novih vrsta otapalionskih kapljevin, superkritičnih tekućina te eutektičkih otapala. Njihova zadaća je nadići prethodno navedene nedostatke u skladu s zahtjevima zelene kemije te osigurati sigurnost radnika, okoliša i procesa.

### 2.3. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) definiraju se kao smjese dviju ili više komponenti, u čvrstom ili tekućem agregatnom stanju, koje pri određenim uvjetima mogu tvoriti kapljevinu. Usljed formiranja intramolekulskih interakcija dolazi do delokalizacije naboja te posljedično smanjenja tališta smjese u odnosu na točke tališta pojedinačnih komponenti smjese (Radović i sur., 2021). Pod pojmom niskotemperaturna eutektička otapala se podrazumijevaju eutektičke smjese kod kojih dolazi do značajnog sniženja temperature tališta. Klasičan primjer prikazan na slici 1 je smjesa kvartarne amonijeve soli kolin-klorida ( $T_t = 302\text{ }^\circ\text{C}$ ) i uree ( $T_t = 132\text{ }^\circ\text{C}$ ) u omjeru 1:2, pri povišenoj temperaturi i uz neprestano miješanje dobiva se niskotemperaturno eutektičko otapalo s talištem od  $12\text{ }^\circ\text{C}$  (Radović i sur., 2021).



**Slika 1.** Sinteza eutektičkog otapala kolin-klorid:urea (1:2) (Shekaari i sur., 2017).

Opća formula niskotemperaturnih eutektičkih otopala je  $Cat^+X^-zY$  gdje je  $Cat^+$  amonijev, sulfatni ili fosfatni kation, dok je X Lewis-ova baza, obično halogenid. Iz toga proizlazi da  $Cat^+X^-$  zajedno predstavljaju akceptor vodikove veze. Y predstavlja Lewis-ovu ili Brønsted-ovu kiselinu, dok je z broj Y molekula koje stupaju u interakcije s odgovarajućim anionom (Radović i sur., 2021; Smith i sur., 2014). Prema radu Smith i sur. (2014), niskotemperaturna eutektička otopala podijeljena su u četiri skupine:

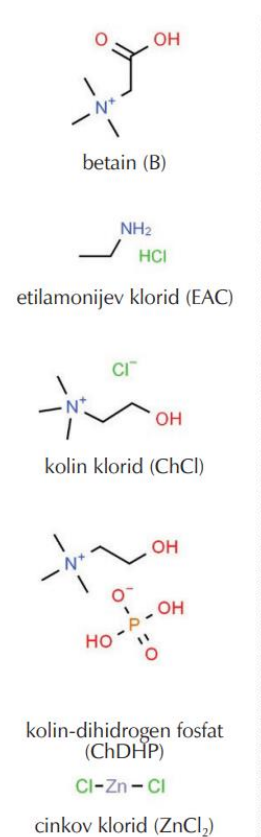
Tip I (kvartarna sol  $Cat^+X^-$  i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe)

Tip II (kvartarna sol  $Cat^+X^-$  i halogenid metala poput Cr, Co, Fe)

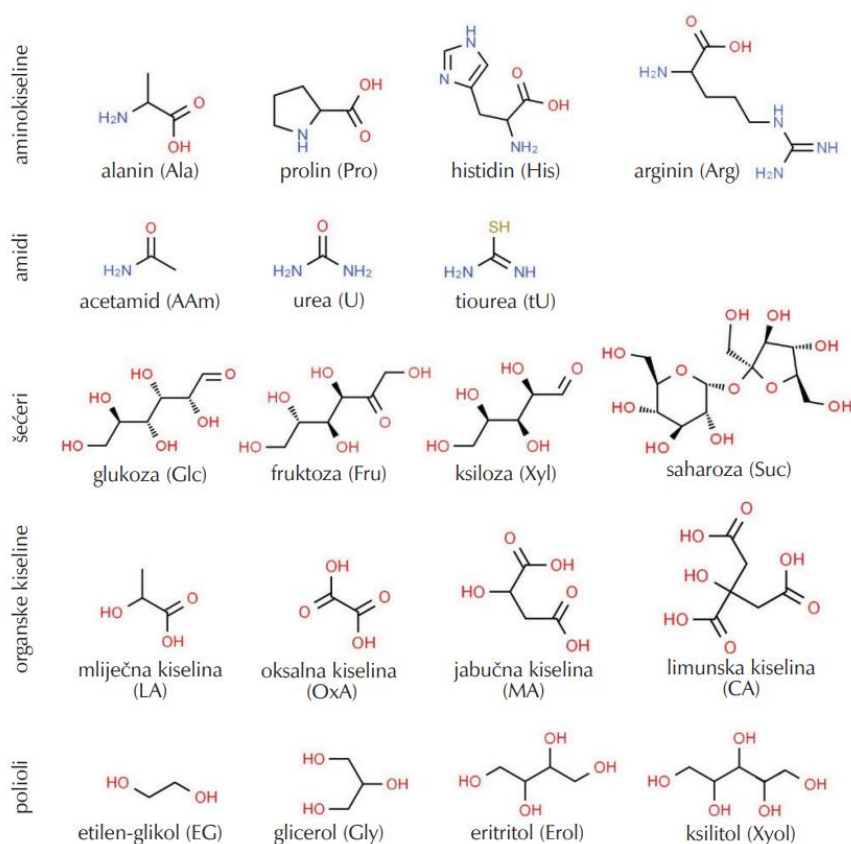
Tip III (kvartarna sol  $Cat^+X^-$  i donor vodikove veze poput amida, kiseline, alkohola)

Tip IV (halogenid metala poput Al, Zn i donor vodikove veze poput amida, alkohola)

Akceptori vodikove veze



Donori vodikove veze

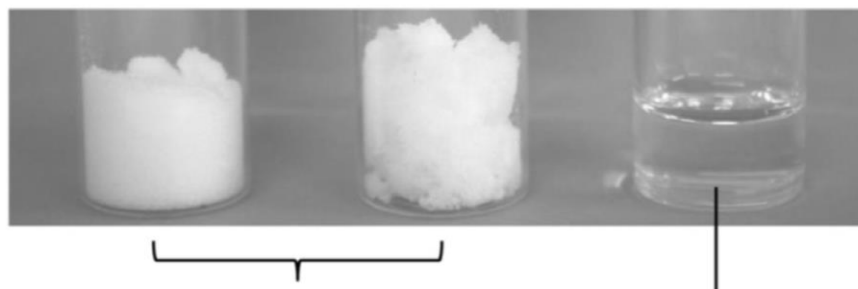


**Slika 2.** Primjeri spojeva za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otopala (Radović i sur., 2021).

Podvrste niskotemperaturnih eutektičkih otapala nastale su na osnovu njihove strukture, odnosno funkcije. Kada su ishodne komponente koje sačinjavaju DES primarni metaboliti poput aminokiselina, šećera, poliola, organskih i masnih kiselina, takva otapala se nazivaju prirodna eutektička otapala ili kraće NADES (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*), a odlikuje ih niska toksičnost (Paiva i sur., 2014) (slika 2). Novu klasu eutektičkih otapala čine terapijska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*) s mogućom primjenom u dizajniranju i formulaciji lijekova budući da se temelje na činjenici kako djelatna tvar lijeka može biti jedna od komponenata niskotemperaturnog eutektičkog otapala (Radović i sur., 2021).

Kao što je ranije navedeno, eutektička otapala se pripremaju miješanjem dvaju ili više, u pravilu krutih komponenti, s ili bez dodatkom vode, u određenom molarnom omjeru i pri povišenoj temperaturi do nastanka homogene eutektičke smjese (slika 3). Pri tome je važno naglasiti da kod pripreme otapala ne dolazi do reakcije već se komponente povezuju vodikovim vezama tvoreći eutektičko otapalo (Panić i sur., 2021; Cvjetko Bubalo i sur., 2016). Postoji nekoliko metoda pripreme DES-ova: (1) metoda usitnjavanja uz homogenizaciju, (2) metoda pripreme vodene otopine komponenata, (3) metoda primjenom alternativnih izvora energije, (4) metoda zagrijavanja i miješanja. Svim ovim metodama je zajednički korak miješanje donora i akceptora vodikove veze u određenom omjeru, no daljnji tijek provedbe se razlikuje (Radović i sur., 2021).

donor vodikove veze + akceptor vodikove veze = eutektičko otapalo



- Potreban definirani molarni omjer

Viskozna tekućina

- Zagrijavanje i miješanje

**Slika 3.** Nastanak eutektičkog otapala zagrijavanjem i miješanjem definiranog molarnog omjera donora i akceptora vodikove veze (Pätzold i sur., 2019).

Fizikalno-kemijska svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala ovise o strukturi samog otapala, odnosno o strukturi ishodnih komponenti te o njihovom molarnom omjeru. Najvažnije karakteristike za njihovu industrijsku primjenu čine viskoznost, pH vrijednost, talište, polarnost i gustoća. Niskotemperaturna eutektička otapala koja su najviše u upotrebi imaju talište ispod 50 °C, a potvrđeno je kako se povećanjem broja hidroksilnih grupa u molekuli koja ima ulogu donora vodikove veze povećava talište (Radović i sur., 2021). Većina niskotemperaturnih eutektičkih otapala ima gustoću veću od vode i kreće se u rasponu od 1.0 do 1.3 g/cm<sup>3</sup> pri sobnoj temperaturi (Tang i Row, 2013). Također, većina poznatih otapala je vrlo viskozna i niske ionske vodljivosti što se pripisuje prisutnosti guste mreže vodikovih veza između svake komponente rezultirajući manjom pokretljivošću slobodnih molekula unutar DES-a (Galović, 2021). Viskoznost se značajno mijenja kao funkcija temperature prateći Arrhenius-ovu ovisnost. Povećanjem temperature dolazi do smanjenja viskoznosti, ali i gustoće, zbog povećanja molekularne aktivnosti i pokretljivosti atoma u molekulama (Smith i sur., 2014; Zhang i sur., 2012). Nadalje, dodatak vode također utječe na smanjenje gustoće i viskoznosti, međutim previsok udio vode u otapalu može poremetiti supramolekularnu mrežu eutektičkog otapala (Radović i sur., 2021).

Većina DES-ova opisanih u literaturi su hidrofilnog karaktera, no posljednjih se godina pažanja posvećuje hidrofobnim otapalima što omogućuje dizajniranje eutektičkih otapala različitog raspona polarnosti. Kiselost i bazičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala određuje izbor donora i akceptora vodikove veze. Otapala s organskom kiselinom kao donorom vodikove veze su kisela i imaju pH vrijednosti < 3. Suprotno tomu, otapala koja sadrže amid kao donor vodikove veze su bazična s pH vrijednostima > 8. Trend povećanja pH vrijednosti s povećanjem udjela vode utvrđen je kod izrazito kiselih otapala, dok dodatak vode kod otapala s pH vrijednostima u gornjem području kiselosti rezultira smanjenjem pH vrijednosti (Radović i sur., 2021; Radojčić Redovniković i sur., 2019).

Fizikalno-kemijska svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala se mogu značajno razlikovati zbog postojanja velikog broja različitih kombinacija donora i akceptora vodika te se mogu dizajnirati otapala određenih fizikalno-kemijskih karakteristika i biološke aktivnosti za specifičnu primjenu. Stoga je u literaturi čest naziv i dizajnirana otapala (Radović i sur., 2021).

Uz navedene pozitivne karakteristike poput nehlapljivosti, nezapaljivosti i stabilnosti, posebna pažnja se posvećuje pitanju njihove toksičnosti i biorazgradivosti. Pretpostavka njihove netoksičnosti proizlazi iz činjenice da su ishodne komponente koje sačinjavaju DES netoksične i niskog utjecaja na okoliš. Međutim, to ne znači da će i mješavine tih komponenti biti netoksične što je potkrijepljeno činjenicom da DES-ovi imaju posebna svojstva koja niti jedna od pojedinačnih komponenti nema (Smith i sur., 2014). Također pretpostavka ne uzima u obzir mogućnost sinergističkog učinka komponenti (Radović i sur., 2021). Primjer je naveden u istraživanju kojeg su proveli Hayyan i sur. (2013a, 2013b) gdje je ispitivana toksičnost i citotoksičnost kolin-klorida s HBD-ima glicerinom, etilen glikolom, trietilen glikolom i ureom. Ispitivanjem su otkrili da je citotoksičnost DES-a bila znatno veća u usporedbi s njegovim pojedinačnim komponentama. Općenito, pokazano je kako otapala koja sadrže organsku kiselinu kao donor vodikove veze pokazuju veću citotoksičnost u usporedbi s otapalima koja sadrže šećere kao donore vodikovih veza (Radović i sur., 2021). Zbog moguće široke primjene eutektičkih otapala u raznim granama industrije, potrebno je provesti još istraživanja o njihovoj potencijalnoj toksičnosti i utjecaju na okoliš.

### **2.3.1. HIDROFOBNA EUTEKTIČKA OTAPALA**

Hidrofobni DES-ovi (engl. *Hydrophobic Deep Eutectic Solvents*, hDES) su u literaturi predstavljeni 2015. godine kao nova kategorija DES-ova smatrajući se obećavajućom podklasom tradicionalnih hidrofiličnih DES-ova (Zainal-Abidin i sur., 2019). Hidrofobnost im je povezana s hidrofobnošću njihovih ishodišnih komponenti. Hidrofobni DES-ovi se općenito ne miješaju s vodom te imaju visoku učinkovitost ekstrakcije za nepolarne molekule, stoga su predloženi kao potencijalni medij za ekstrakciju za zamjenu toksičnih organskih otapala ili skupih hidrofobnih ionskih kapljevina. Proučavanje navedenih otapala dovelo je do proširenja raspona njihove primjene u pogledu ekstrakcije, međutim mali broj sintetiziranih hidrofobnih DES-ova posljedica je ograničenog broja dostupnih i jeftinih hidrofobnih soli i drugih komponenti. (Lee i sur., 2019).

Hidrofobni DES-ovi se mogu podijeliti u dvije skupine. Prva skupina, najviše proučavanih hDES-ova, se uglavnom sastoji od kvartarnih amonijevih soli s dugim alkilnim lancima. Primjerice, dekanska kiselina s dugim alkilnim lancima amonijeve soli (npr. tetraoktilamonijev bromid, tetrabutilamonijev klorid). Druga skupina obuhvaća mješavinu dvaju neutralnih spojeva, odnosno hidrofobnih prirodnih spojeva koji djeluju kao HBA s nekim hidrofobnim HBD poput

karboksilnih kiselina ili alkohola s kiselinama dugih alkilnih lanaca (npr. terpenoidi:karboksilna kiselina, L-mentol:karboksilna kiselina, timol:karboksilna kiselina). Postoje i druge vrste hidrofobnih DES-ova na neutralnoj bazi pripremljenih od kombinacije dvaju masnih kiselina, u kojima obje kiseline mogu imati ulogu donora i akceptora vodikove veze. Primjeri takvih hDES-ova su laurinska kiselina:dekanska kiselina, laurinska kiselina:nonanska kiselina, laurinska kiselina:oktanska kiselina (Zainal-Abidin i sur., 2019).

Za razliku od hidrofilnih eutektičkih otapala, hidrofobna posjeduju duge alkilne lance smanjujući time težinu polarnih područja unutar kemijske strukture. Navedeno odstupanje u kemijskoj strukturi može uzrokovati značajne promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima DES-ova kao što su točka taljenja, gustoća, viskoznost, stabilnost u vodi te toplinska stabilnost (Zainal-Abidin i sur., 2019). Hidrofobni DES-ovi pokazuju gustoću u rasponu od 0,88 do 1,1 g/cm<sup>3</sup> što je nešto niže u odnosu na hidrofilne, upravo zbog prisutnosti manje gustih dugih alkilnih lanaca. Iz toga proizlazi da se za isti HBD i molarni omjer gustoća hidrofobnog DES-a smanjuje povećanjem duljine alkilnog lanca HBA (Warrag i Kroon, 2020). Viskoznost hDES-ova u najvećoj mjeri ovisi o kemijskoj prirodi ishodnih komponenti (HBD, HBA, molarni omjer) te o temperaturi budući da je potvrđeno da se viskoznost značajno mijenja kao funkcija temperature. Jednako kao i hidrofilni, hidrofobni DES-ovi imaju točku taljenja znatno nižu u odnosu na točke taljenja početnih komponenti, a ona ovisi o snazi molekularnih interakcija, kemijskoj strukturi te samim ishodnim komponentama. hDES-ovi posjeduju visoku toplinsku stabilnost kako bi se osiguralo da ostanu u tekućem agregatnom stanju, no zabilježeno je nekoliko slučajeva njihovog isparavanja pod određenim uvjetima primjene. Do isparavanja hDES-a može doći pri visokoj temperaturi zbog degradacije pojedinih komponenti koje sačinjavaju otapalo prilikom slabljenja vodikovih veza (Zainal-Abidin i sur., 2019).

Najveća pažnja posvećena je pitanju topivosti, odnosno stabilnosti hidrofobnih DES-ova u vodi. Važno je osigurati da hDES-ovi ostaju stabilni i netaknuti nakon kontakta s vodom osiguravajući da nema sadržaja vode u njima uz minimalne gubitke komponenti u vodenu fazu (Zainal-Abidin i sur., 2019). Ovo svojstvo je potvrđeno u istraživanju kojeg su proveli van Osch i sur. (2015). Također je pokazano da se udio vode u DES-u smanjuje s povećanjem duljine ugljikovodičnog lanca.

## 2.4. PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA U BIOTRANSFORMACIJAMA

Eutektička otapala pokazuju veliki potencijal primjene u različitim biotransformacijskim procesima, obzirom da mogu poboljšati opskrbu supstratom, pretvorbu i stabilnost. Najbolji rezultati postignuti su kada su komponente DES-a supstrati pojedine enzimске reakcije. Iako se uspješno koristi širok raspon enzima za biotransformacije u DES-u, najveća pažnja usmjerena je reakcijama kataliziranim lipazom sa slobodnim i imobiliziranim enzimima. To se posebice odnosi na sintezu estera i reakcije transesterifikacije pri čemu DES može imati ulogu otapala, kootapala ili supstrata u slučaju kad je jedna od ishodnih komponenti DES-a supstrat spomenute reakcije. Druge vrste reakcija uključuju oksidaciju, dehalogenaciju, sintezu peptida, peroksidaciju, stvaranje C-C veza te hidrolizu epoksida gdje je dokazan pozitivan učinak DES-a kao kootapala. (Pätzold i sur., 2019). Naime, u enzimski kataliziranoj reakciji hidrolize epoksida u odgovarajuće diole, koji su važni kiralni sintetski intermedijeri, postignuta je veća brzina reakcije u odnosu na vodu (Xu i sur., 2017).

Međutim, postoje određene prepreke korištenja eutektičkih otapala kao medija. U istraživanju kojeg su proveli Gorke i sur. (2008) pokazano je da prilikom provedbe reakcije (trans-) esterifikacije u DES-ovima na bazi kiselina ili alkohola dolazi do konkuriranja otapala s ciljnim supstratima u željenoj reakciji. Nastanak nusprodukata se u ovakvim tipovima reakcijskih sustava ne može u potpunosti eliminirati, no isto se minimizira obzirom da je reaktivnost komponenti DES-a smanjena zbog jakih vodikovih veza unutar otapala (Pätzold i sur., 2019).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali i metode

##### 3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril, Honeywell, Seelze, Njemačka
- Arapska guma
- Destilirana voda
- Izopropanol, Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka
- Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH=7), pripremljen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zagreb, Hrvatska
- Laurinska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- n-heptan (99%), CARLO ERBA Reagents S.A.S., Val de Reuil Cedex, Francuska
- Oktanska kiselina, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
- *p*-nitrofenilpalmitat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*R*, *S*)-1-feniletil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- (*S*)-1-feniletanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Timol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Triton X, AppliChem, Darmstadt, Njemačka
- Vinil acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sva upotrijebljena otapala i kemikalije bili su analitičke čistoće.

##### 3.1.2. Enzimski preparati

- Novozym 435 (lipaza B izolirana iz kvasca *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama s udjelom vode 1-2 (w/w %), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD; u nastavku rada kratica CALB
- Lipaza AH "Amano" (lipaza izolirana iz bakterije *Pseudomonas cepacia*), Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan; u nastavku kratica AH
- Lipaza AS "Amano" (lipaza izolirana iz gljivice *Aspergillus niger*), Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan; u nastavku kratica AS

- Lipaza AYS "Amano" (lipaza izolirana iz kvasca *Candida cylindracea*), Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan; u nastavku kratica AYS
- Lipaza G "Amano" (lipaza izolirana iz gljive *Penicillium camemberti*), Amano Pharmaceutical Co., Ltd., Nagoya, Japan; u nastavku kratica G

### 3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator-IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka
- Laboratorijski pribor (eppendorf epruvete, falkon epruvete, laboratorijske čaše, menzura, mikropipete, nastavci za mikropipete, stalci za uzorke, špatula)
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s UV-Diode Array detektorom, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYSTM10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

Dva prirodna eutektička otapala sintetizirana su dodatkom izračunate količine ishodnih komponenti prema molarnim omjerima prikazanim u Tablici 1. U epruveti se pomiješaju prethodno izračunate mase, odnosno volumeni donora i akceptora vodikove veze te se epruveta stavlja na miješalicu pri temperaturi od 50 °C tijekom pola sata do nastanka homogene, prozirne i viskozne kapljevine. Pripremljena otapala se čuvaju na sobnoj temperaturi i danjem svjetlu do daljnje upotrebe.

**Tablica 1.** Niskotemperaturna eutektička otapala korištena u radu

Prirodno eutektičko otapalo (DES)	Molarni omjer	Kratica
laurinska kiselina:oktanska kiselina	1:1	C <sub>12</sub> :C <sub>8</sub>
timol:oktanska kiselina	1:3	Ty:C <sub>8</sub>

Hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala pripremljena prema Tablici 1 korištena su za ispitivanje utjecaja hidrofobnih DES-ova na aktivnost i stabilnost različitih lipaza.

### 3.2.2. Aktivnost lipaza

Ispitivanje aktivnosti lipaza provedeno je reakcijom hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u *p*-nitrofeniletanol prema radu Čanak i sur. (2016). Za provedbu reakcija korištene su sljedeće lipaze: lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* (CALB), lipaza AH "Amano" izolirana iz *Pseudomonas cepacia* (AH), lipaza AS "Amano" izolirana iz *Aspergillus niger* (AS), lipaza AYS "Amano" izolirana iz *Candida cylindracea* (AYS) te lipaza G "Amano" izolirana iz *Penicillium camembertii* (G). Otopina supstrata priređena je miješanjem 9 mL kalij-fosfatnog pufera, 1 mL otopine *p*-nitrofenilpalmitata u izopropanolu (10 mg/mL), 11 mg arapske gume i 44 mg Triton X. U Eppendorf epruvete se doda 0,4 mL otopine pojedine lipaze u acetonitrilu i 0,1 mL kalij-fosfatnog pufera. Reakcija započinje dodatkom 0,5 mL supstrata te se provodi na Eppendorf mješaču 30 minuta pri 30 °C i 1000 rpm. Slijepa proba se priredi miješanjem 0,4 mL otopine pojedinog enzima i 0,6 mL kalij-fosfatnog pufera. Uzorkovanje se provodi svakih 10 minuta pri čemu se 800 µL reakcijske smjese prebacuje u plastične kivete. Aktivnost pojedine lipaze se određuje mjerenjem apsorbancije na UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 410 nm svakih 10 minuta tijekom vremenskog intervala od 30 minuta.

#### *Izrada baždarnog dijagrama*

Za izradu baždarnog dijagrama pripreme se otopine *p*-nitrofenola u acetonitrilu tako da koncentracije redom iznose 1, 0,8, 0,5 i 0,25 mg/mL. Potom se na ordinatu nanese izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 410 nm, dok se na apscisu nanese pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrtaju dijagram ovisnosti apsorbancije o masenoj koncentraciji *p*-nitrofenola te se prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunaju nepoznate masene koncentracije *p*-nitrofeniletanola u uzorcima.

Radi međusobne usporedbe aktivnosti različitih lipaza, računa se inicijalna brzina reakcije hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata.

**Početa brzina reakcije A** (mmol/L min) računa se prema jednadžbi 1:

$$A = \frac{ap}{t} \quad [1]$$

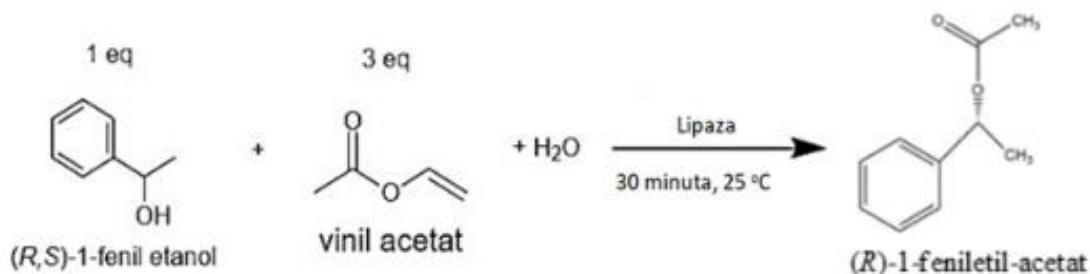
pri čemu je:

ap – nagib (mmol/L)

t - vrijeme trajanja procesa (min).

### 3.2.3. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na aktivnost lipaza

Reakcija lipazom katalizirane enantioselektivne kinetičke rezolucije (*R,S*)-1-feniletanola s vinil acetatom (slika 4) provodi se u prethodno sintetiziranim DES-ovima timol:oktanska kiselina (Ty:C<sub>8</sub>) i laurinska kiselina:oktanska kiselina (C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>), dok se kao referentno otapalo koristi heptan. Enantioselektivna, lipazom katalizirana esterifikacija provedena je prema radu Stradomska i sur. (2021). U reakcijsku smjesu se doda 1000 μL otapala, bilo heptana ili Ty:C<sub>8</sub> ili C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>, 6 μL supstrata (*R,S*)-1-feniletanola, 13,91 μL supstrata vinil acetata, 1 mg pojedine lipaze (CALB, AH, AS, AYS ili G) te 10 μL destilirane vode. Reakcija se provodi na Eppendorf mješaču tijekom 30 minuta pri 25 °C i 1000 rpm.



**Slika 4.** Enantioselektivna kinetička rezolucija (*R,S*)-1-feniletanola

Kvalitativna i kvantitativna analiza (*R,S*)-1-feniletil-acetata provodi se pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s UV-Diode Array detektorom.

#### *Priprema otopine standarda*

Priređena su razrjeđenja (*R,S*)-1-feniletil-acetata u mobilnoj fazi A tako da molarne koncentracije redom iznose 6,090, 3,045, 1,523, 0,761 i 0,076 mM. Na temelju ovisnosti površine kromatografskih pikova o molarnoj koncentraciji standarda izrađen je baždarni dijagram te je izračunata pripadajuća jednadžba pravca.

### Kromatografski uvjeti

Kolona: Phenomenex Lux Cellulose-3, LC Column, 250 × 4,6 mm, 5 μm

Pokretna faza: A - 80% (v/v) heksan

B - 20% (v/v) izopropanol

Eluiranje: gradijentno

Injektirani volumen: 5 μL

Temperatura injektiranja: 4 °C

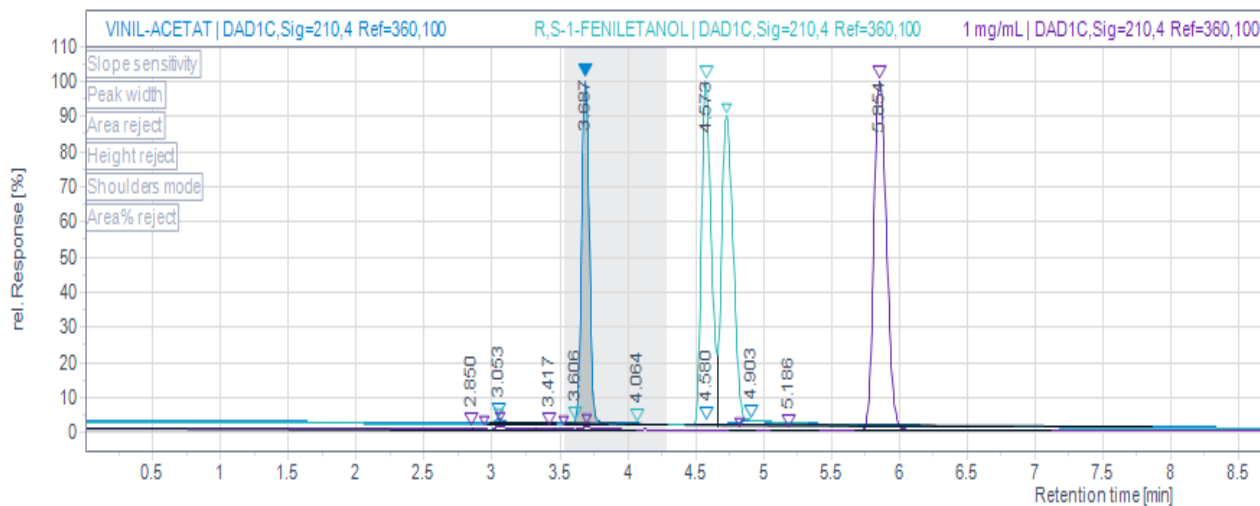
Protok: 1 mL/min

Temperatura kolone: 25 °C

Vrijeme analize: 15 min

Detektor: UV-Diode Array ( $\lambda = 210 \text{ nm}$ )

Retencijsko vrijeme ( $R_t$ ) za vinil-acetat iznosi 3,687 min, za (*R*)-1-feniletanol iznosi 4,573 min, za (*S*)-1-feniletanol iznosi 4,75 min, a za (*R,S*)-1-feniletil-acetat iznosi 5,854 min (Slika 5).



**Slika 5.** Prikaz tipičnog tekućinskog kromatograma enzimski katalizirane enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola

### Identifikacija i kvantifikacija

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom retencijskih vremena razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s retencijskim vremenima standarda te usporedbom UV-spektara. Kvantifikacija spojeva provedena je metodom baždarnog dijagrama, pri čemu su vrijednosti (*R,S*)-1-feniletil-acetata izračunate iz pripadajuće jednadžbe pravca (Tablica 2).

**Tablica 2:** Jednadžba baždarnog pravca

Standard	Jednadžba pravca	Koeficijent determinacije ( $R^2$ )
( <i>R,S</i> )-1-feniletil-acetat	$y = 2443,8x + 226,78$	$R^2 = 0,9991$

Kako bi se usporedila aktivnost pojedinih lipaza u ispitivanim hDES-ovima računa se konverzija procesa esterifikacije, enantiomerni višak, volumetrijska produktivnost esterifikacije i specifična produktivnost enzima.

**Konverzija procesa** esterifikacije  $X$  (%) računa se prema jednadžbi 2:

$$X = \frac{c_A}{c_{AT}} \times 100 \quad [2]$$

pri čemu je:

$c_A$  - izmjerena molarna koncentracija estera (mM)

$c_{AT}$  – teoretski moguća molarna koncentracija estera (mM)

**Volumetrijska produktivnost esterifikacije**  $V_P$  (mol/L min) računa se prema jednadžbi 3:

$$V_P = \frac{c_A - c_B}{t} \quad [3]$$

pri čemu je:

$c_A$  - molarna koncentracija estera (mol/L)

$c_B$  - početna molarna koncentracija estera (mol/L)

$t$  - vrijeme trajanja procesa (min)

**Specifična produktivnost enzima**  $V_E$  ( $\mu\text{mol}/\text{mg min}$ ) računa se prema jednadžbi 4:

$$V_E = \frac{n_{p2} - n_{p1}}{m_E * t} \quad [4]$$

pri čemu je:

$n_{p1}$  - početna množina estera ( $\mu\text{mol}$ )

$n_{p2}$  - konačna množina estera ( $\mu\text{mol}$ )

$m_E$  - masa pripravka enzima (mg)

$t$  - vrijeme trajanja procesa (min)

### 3.2.4. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na stabilnost lipaza

Eksperimentalna reakcija opisana u poglavlju 3.2.3. korištena je za mjerenje reakcije esterifikacije u ukupno 6 točaka tijekom 30 dana s ciljem ispitivanja stabilnosti lipaza u hidrofobnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima Ty:C<sub>8</sub> i C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>. Kao referentno otapalo korišten je heptan. Lipaze su u ispitivanim otapalima inkubirane 0, 1, 6, 9, 15 i 30 dana pri sobnoj temperaturi. Reakcija esterifikacije je u navedenim točkama započeta dodatkom dvaju supstrata, vinil acetata i (*R,S*)-1-feniletanola te vode, a praćena je 30 minuta. Produkt reakcije, (*R*)-1-feniletil-acetat kvalitativno je i kvantitativno određen pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-Diode Array detektorom.

Skladišna stabilnost lipaza u ispitivanim otapalima izražena je kao rezidualna aktivnost enzima nakon inkubacije na 25 °C u određenom vremenskom intervalu te se računa u svrhu usporedbe međusobne aktivnosti lipaza.

**Rezidualna aktivnost lipaza (%)** računa se kao postotak aktivnosti enzima nakon inkubacije u odnosu na inicijalnu aktivnost enzima bez inkubacije (nulti dan pri 25 °C), odnosno prema jednadžbi 5.

$$\text{Rezidualna aktivnost} = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad [5]$$

$A$  - površina ispod pika nakon inkubacije

$A_0$  - površina ispod pika bez inkubacije

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Pravilan odabir reakcijskog i skladišnog medija predstavlja jedan od najvažnijih koraka u reakcijama biokatalize, očuvanju aktivnosti i stabilnosti biokatalizatora te uspostavi učinkovitog, održivog i sigurnog industrijskog procesa (Radović, 2020). Razvojem programa zelene kemije, pojavljuju se razna nekonvencionalna, zelena otapala kao potencijalna zamjena za štetna organska otapala. Među njima se ističu prirodna niskotemperaturna eutektička otapala upravo zbog svoje jednostavne, jeftine i sigurne pripreme te mogućnosti specifičnog dizajniranja kako bi zadovoljila potrebe pojedinog procesa.

U ovom radu ispitivan je utjecaj hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na aktivnost i skladišnu stabilnost različitih lipaza (CALB, AH, AS, AYS, G). U tu svrhu izabrana su dva hidrofobna eutektička otapala Ty:C<sub>8</sub> i C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>, dok je kao referentno otapalo korišten heptan. Obzirom da je stabilnost enzima u otapalu važan parametar prilikom određivanja prihvatljivosti nekog otapala za primjenu u industrijskom mjerilu, stabilnost svih enzima praćena je pri sobnoj temperaturi tijekom 30 dana. Kao dodatni parametri usporedbe međusobne aktivnosti lipaza, izračunata je konverzija procesa, volumetrijska produktivnost reakcije, rezidualna aktivnost te specifična produktivnost enzima.

### 4.1. Sinteza prirodnih eutektičkih otapala

Priprema prirodnih eutektičkih otapala provodila se jednostavnim postupkom kemijske sinteze, pri čemu se odgovarajuće ishodne komponente pomiješaju u određenim molarnim omjerima (tablica 1) te se kontinuirano zagrijavaju uz miješanje do pojave homogene viskozne tekućine. Iskorištenje reakcije je 100%, što je značajna prednost prilikom sinteze prirodnih eutektičkih otapala.

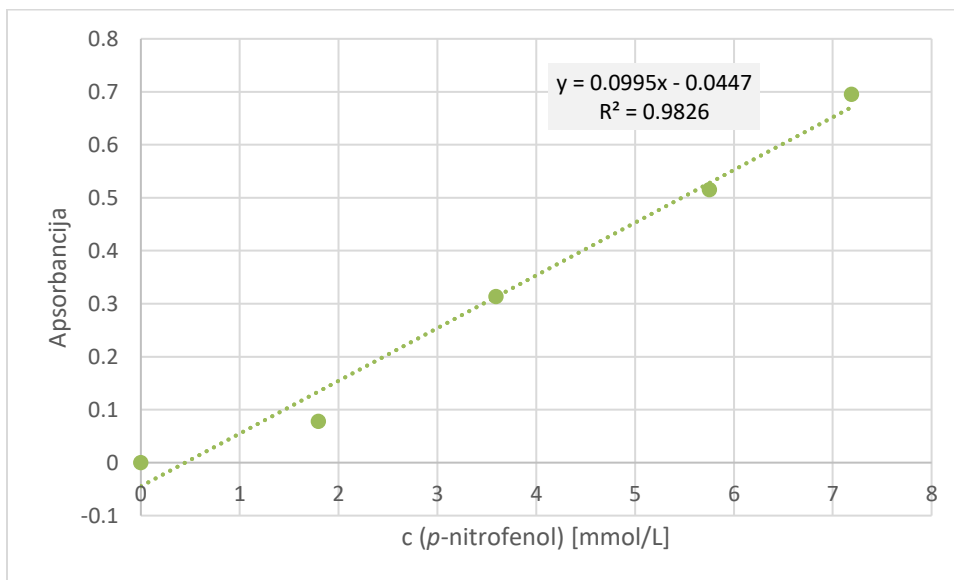
### 4.2. Aktivnost lipaza

Lipaze pripadaju hidrolazama, skupini enzima koji stimuliraju hidrolizu lipidnih supstrata (masti i ulja) u njihove monomere (glicerol i masne kiseline). Iako mogu biti izolirane iz različitih izvora, mikrobne lipaze su najčešće korištene zbog svoje raznolike primjene u industriji, budući da se relativno lako uzgajaju na različitim hranjivim podlogama pri blagim uvjetima temperature i pH. Karakterizira ih širok spektar aktivnosti, visoka selektivnost, stabilnost, niska cijena, a budući da za njihovu aktivnost nisu potrebni koenzimi predstavljaju idealne biokatalizatore

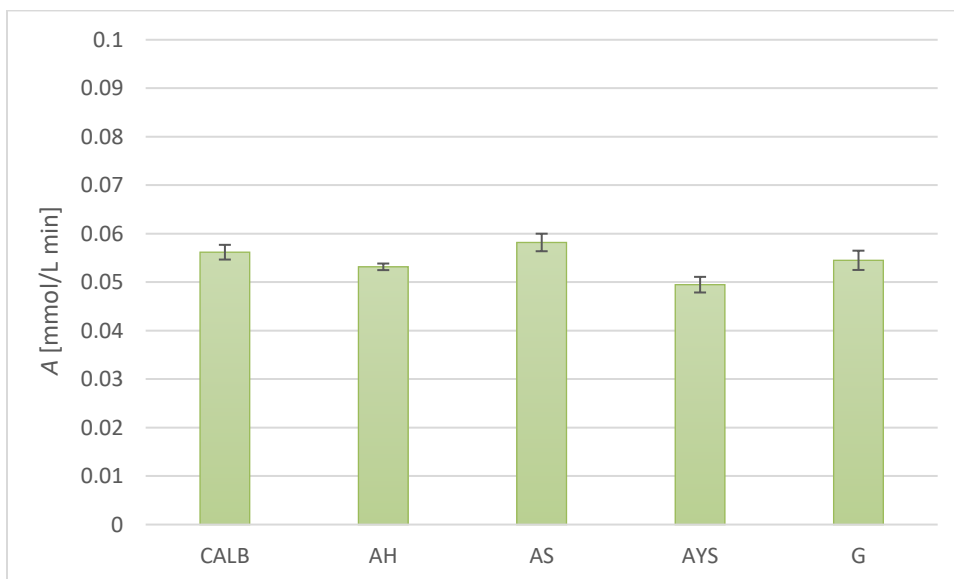


(Faber, 2011). U sklopu ovog rada ispitana je aktivnost lipaza iz različitih mikroorganizama (CALB, AH, AS, AYS, G) u reakciji hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u kalij-fosfatnom puferu.

Prethodno je izrađen baždarni dijagram *p*-nitrofenola (slika 6) prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u *p*-nitrofeniletanol. Sve ispitivane lipaze aktivne su u kalij-fosfatnom puferu, a kako bi se međusobno usporedila njihova aktivnost izračunata je inicijalna brzina reakcije hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata (slika 7).



**Slika 6.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije *p*-nitrofeniletanola



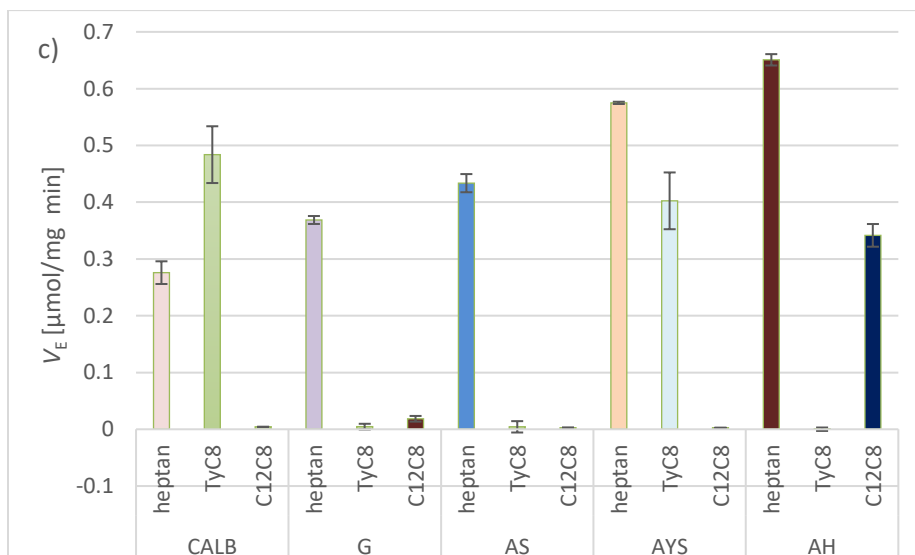
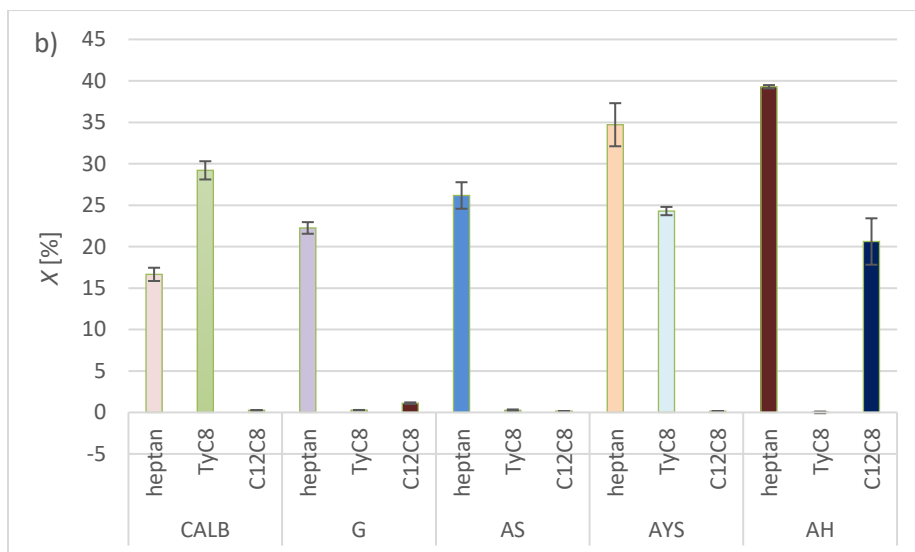
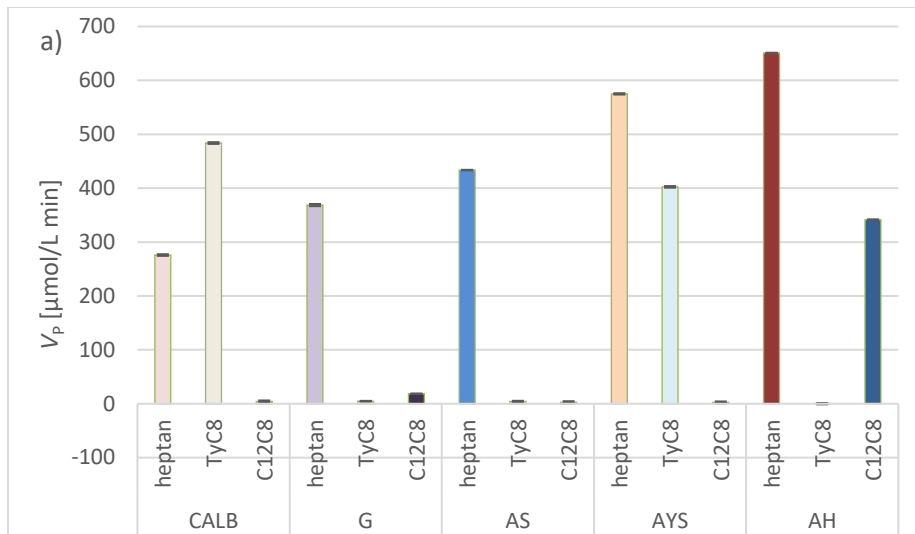
**Slika 7.** Inicijalna brzina reakcije hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata katalizirane različitim lipazama u kalij-fosfatnom puferu. Reakcijski uvjeti: 10 mg/mL *p*-nitrofenilpalmitata; 1 mg lipaze; 30 °C; 30 min; 1000 rpm. CALB - lipaza B izolirana iz *Candida antarctica*, AH - lipaza AH "Amano" izolirana iz *Pseudomonas cepacia*, AS - lipaza AS "Amano" izolirana iz *Aspergillus niger*, AYS - lipaza AYS "Amano" izolirana iz *Candida cylindracea*, G - lipaza G "Amano" izolirana iz *Penicillium camembertii*.

Vrijednosti inicijalnih brzina (*A*) reakcije hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata kreću se u rasponu od 0,0495 mmol/L min do 0,0582 mmol/L min. Najvišu inicijalnu brzinu imaju lipaze AS (*A* = 0,0582 mmol/L min) i CALB (*A* = 0,0562 mmol/L min), dok nešto manju vrijednost inicijalne brzine ima lipaza G (*A* = 0,0545 mmol/L min).

Prema dobivenim vrijednostima inicijalne brzine, sve lipaze (CALB, AH, AS, AYS, G) aktivne su u kalij-fosfatnom puferu te su korištene dalje u radu za provođenje enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola opisane u poglavlju 3.2.3. s ciljem ispitivanja aktivnosti, odnosno stabilnosti lipaza u hidrofobnim eutektskim otapalima.

### **4.3. Utjecaj niskotemperaturnih eutektskih otapala na aktivnost lipaza**

Niskotemperaturna eutektska otapala su se pokazala kao obećavajuća alternativa za organska otapala i ionske kapljevine u mnogim biokatalitičkim procesima, pri čemu se mogu koristiti kao čista otapala, kootapala u vodenom mediju i kao dio dvofaznog sustava (Pei Xu i sur., 2017). Pogodna su za primjenu u biotransformacijama zbog zahtjeva za visokim stupnjem enantiomerne čistoće biološki aktivnih kiralnih spojeva (Ai Nguyen i sur., 2006). Karakterizira ih nezapaljivost, nehlapljivost, niska toksičnost te jednostavnost pripreme i niska cijena zahvaljujući dostupnim i obnovljivim sirovinama. Stoga, posljednjih godina sve je veća pažnja usmjerena istraživanju prirodnih eutektskih otapala te njihove potencijalne primjene u biokatalizi. U sklopu ovog rada, ispitana je mogućnost primjene hidrofobnih prirodnih eutektskih otapala u lipazom kataliziranoj enantioselektivnoj esterifikaciji kiralnog alkohola (*R,S*)-1-fenil-etanola s vinil acetatom. U tu svrhu korištene su lipaze izolirane iz različitih mikroorganizama (CALB, AH, AS, AYS, G), dok su eutektska otapala selektirana u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije (Galović). Kao referentno otapalo korišten je heptan. Rezultati su prikazani na slici 8.



**Slika 8.** Volumetrijska produktivnost (a), konverzija enantioselektivne esterifikacije (b) i specifična produktivnost enzima (c) enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-fenil-etanola katalizirane različitim lipazama u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol/L (*R,S*)-1-fenil-etanola; 1 mg lipaze; 25 °C; 30 min; 1000 rpm. Ty:C<sub>8</sub> - timol:oktanska kiselina, C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> - laurinska kiselina:oktanska kiselina.

Vrijednosti volumetrijskih produktivnosti ( $V_P$ ) ispitivanih lipaza u heptanu kreću se u rasponu od 275,9  $\mu\text{mol/L min}$  do 650,8  $\mu\text{mol/L min}$ . U hidrofobnom eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> najveću volumetrijsku produktivnost imaju lipaze CALB ( $V_P = 483,7 \mu\text{mol/L min}$ ) i AYS ( $V_P = 402,4 \mu\text{mol/L min}$ ), dok je volumetrijska produktivnost ostalih lipaza zanemariva. U drugom eutektičkom otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> najveću volumetrijsku produktivnost ima lipaza AH ( $V_P = 341,6 \mu\text{mol/L min}$ ).

Iz slike b) vidljivo je da su sve lipaze aktivne u heptanu te da se vrijednosti njihove konverzije ( $X$ ) kreću u rasponu od 16,7 % do 39,3 %. U eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> najaktivnije su lipaze CALB ( $X = 29,2 \%$ ) i AYS ( $X = 24,3 \%$ ), dok je u eutektičkom otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> najaktivnija lipaza AH ( $X = 20,6 \%$ ). Aktivnosti ostalih lipaza su  $< 1 \%$  u navedenim otapalima.

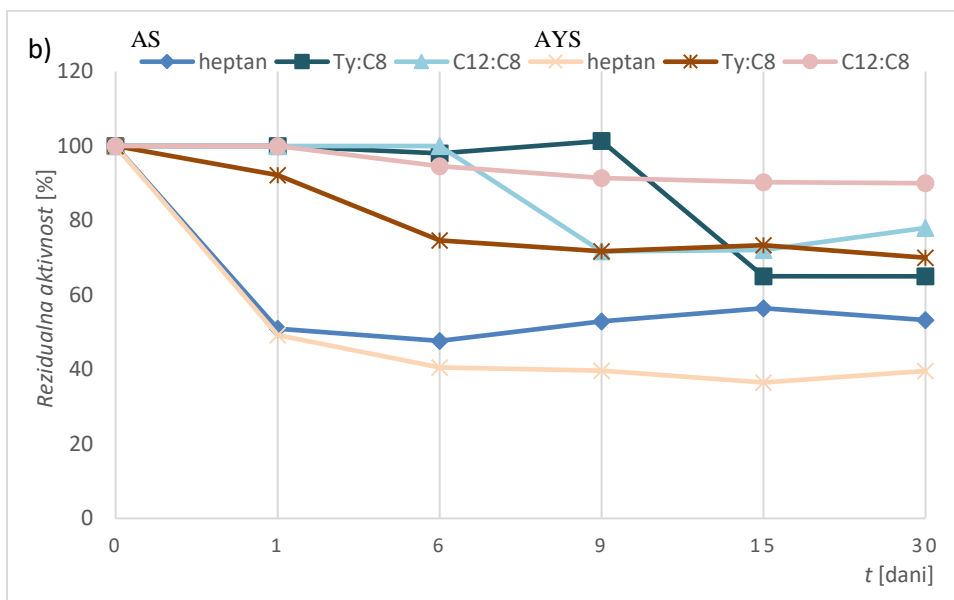
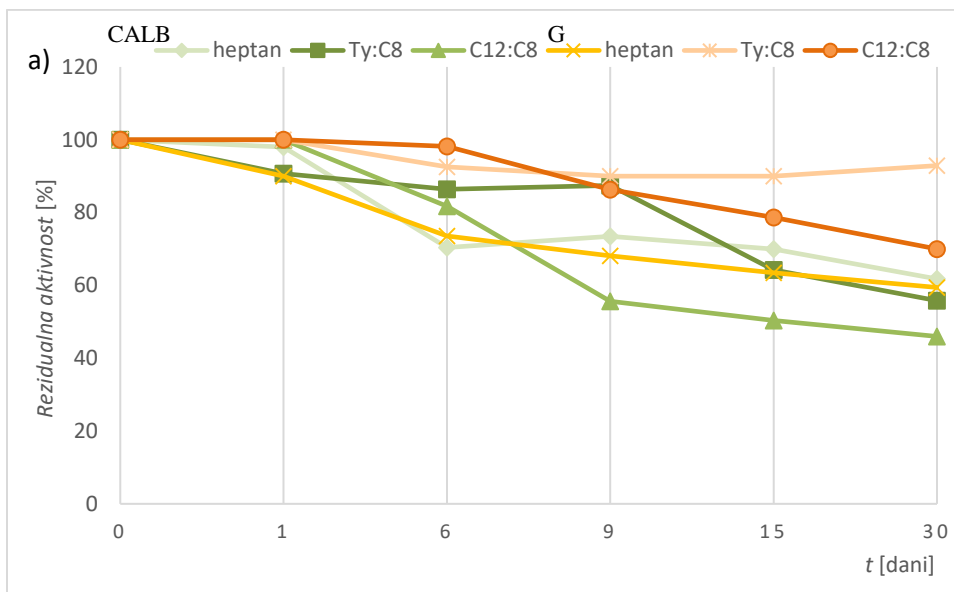
Vrijednosti specifičnih produktivnosti lipaza ( $V_E$ ) u heptanu su u rasponu od 0,27  $\mu\text{mol/mg min}$  do 0,65  $\mu\text{mol/mg min}$ . Najvišu vrijednost specifične produktivnosti u eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> imaju lipaze CALB ( $V_E = 0,48 \mu\text{mol/mg min}$ ) i AYS ( $V_E = 0,4 \mu\text{mol/mg min}$ ), dok su vrijednosti ostalih lipaza zanemarive. U eutektičkom otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> najvišu vrijednost specifične produktivnosti ima lipaza AH ( $V_E = 0,34 \mu\text{mol/mg min}$ ).

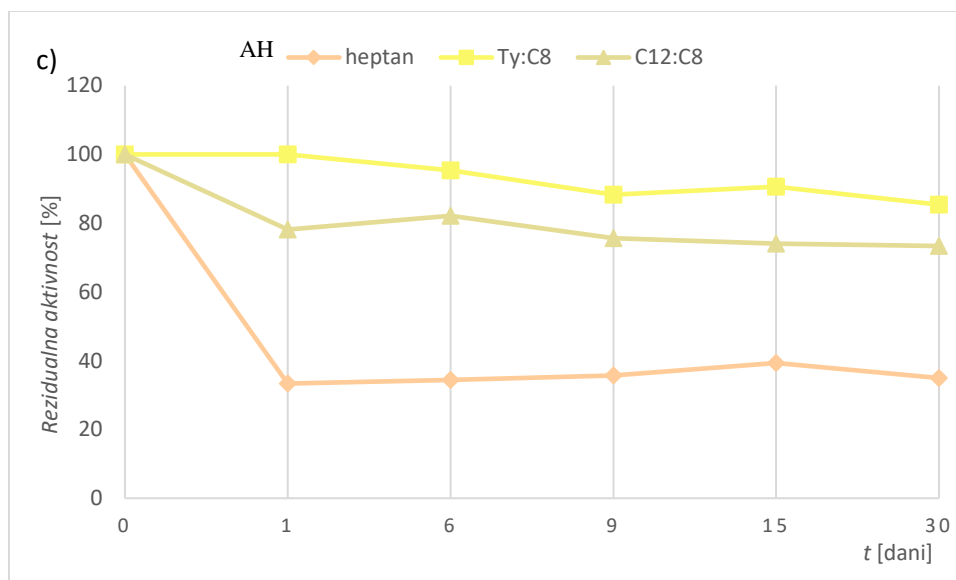
Prema dobivenim vrijednostima, najviše vrijednosti pokazatelja uspješnosti enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-fenil-etanola u hidrofobnom eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> pokazuje lipaza CALB, dok nešto manje vrijednosti pokazuje lipaza AYS. U hidrofobnom eutektičkom otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> najveće vrijednosti pokazatelja uspješnosti ima lipaza AH. Sve ispitivane lipaze korištene su u daljnjem istraživanju s ciljem ispitivanja njihove stabilnosti tijekom vremena u hidrofobnim eutektičkim otapalima.

#### 4.4. Utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na stabilnost lipaza

Aktivnost enzima, zajedno sa stabilnošću, jedne su od najvažnijih karakteristika enzima prilikom njihove primjene u različitim industrijskim procesima. Pravilno skladištenje enzima ključni je

faktor za dugoročno očuvanje njihove aktivnosti. Posljednjih nekoliko godina, sve je veći broj istraživanja usmjerenih na proučavanje eutektičkih otapala s ciljem zamjene i smanjenja uporabe štetnih organskih otapala u industrijskim procesima. Skladišna stabilnost lipaza ispitivana je istom metodologijom kao i njihova aktivnost, tako da su enzimi inkubirani u referentnom otapalu heptanu i eutektičkim otapalima Ty:C<sub>8</sub> i C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> tijekom 30 dana. Skladišna stabilnost pojedine lipaze izražena je kao rezidualna aktivnost (%) enzima, a rezultati su prikazani na slici 9.





**Slika 9.** Rezidualna aktivnost različitih lipaza u heptanu i eutektičkim otapalima Ty:C<sub>8</sub> i C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> u ovisnosti o vremenu inkubacije. a) lipaze CALB i G, b) lipaze AS i AYS, c) lipaza AH. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol/L (R,S)-1-fenil-etanola; 1 mg lipaze; 25 °C; 30 min; 1000 rpm; 30 dana. CALB - lipaza B izolirana iz *Candida antarctica*, AH - lipaza AH "Amano" izolirana iz *Pseudomonas cepacia*, AS - lipaza AS "Amano" izolirana iz *Aspergillus niger*, AYS - lipaza AYS "Amano" izolirana iz *Candida cylindracea*, G - lipaza G "Amano" izolirana iz *Penicillium camembertii*, Ty:C<sub>8</sub> - timol:oktanska kiselina, C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> - laurinska kiselina:oktanska kiselina.

Iz slike 9 a) vidljiv je pad vrijednosti rezidualnih aktivnosti lipaza CALB i G tijekom vremena, kako u heptanu, tako i u eutektičkim otapalima. Međutim, lipaza CALB ima višu rezidualnu aktivnost u eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> u odnosu na referentno otapalo tijekom prvih 13 dana, a zatim trend krivulje prati rezidualnu aktivnost u heptanu te nakon 30 dana iznosi 60 %. Lipaza G pokazuje značajno veće vrijednosti rezidualne aktivnosti u eutektičkim otapalima u odnosu na heptan te na kraju vremena inkubacije u eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> iznosi 92 %, dok u eutektičkom otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> iznosi 70 %.

Lipaze AS i AYS također pokazuju značajno veće vrijednosti rezidualnih aktivnosti tijekom vremena u eutektičkim otapalima u odnosu na heptan, što je vidljivo iz slike 9 b). Rezidualna aktivnost lipaze AS u eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> tijekom prvih 9 dana inkubacije ostaje nepromijenjena, a zatim iako smanjena, ostaje konstantna na 65 %. U eutektičkom otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> njena rezidualna aktivnost opada nakon 6 dana te ostaje konstantna na 78 %. Lipaza AYS

u eutektičkom otapalu Ty:C<sub>8</sub> zadržava rezidualnu aktivnost tijekom cijelog vremena inkubacije na 90 %, dok u eutektičkom otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> ona iznosi 70 %.

Na slici 9 c) prikazana je rezidualna aktivnost lipaze AH tijekom vremena. Vidljiv je značajan pad aktivnosti u heptanu tijekom vremena, dok u eutektičkim otapalima, iako smanjena, rezidualna aktivnost ostaje konstantna te na kraju vremena inkubacije u otapalu Ty:C<sub>8</sub> iznosi 85 %, a u otapalu C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> 73 %.

Unatoč rezultatima aktivnosti pojedinih lipaza (V<sub>P</sub>, X, V<sub>E</sub>), u kojima se referentno otapalo ističe kao najpogodnije, rezultati stabilnosti tijekom 30 dana pokazuju drugačije trendove. Usporedbom korištenih otapala, eutektičko otapalo Ty:C<sub>8</sub> nameće se kao superiornije otapalo za očuvanje skladišne stabilnosti različitih lipaza. Iznimka je eutektičko otapalo C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub> u kojem lipaza AYS i nakon 30 dana inkubacije zadržava rezidualnu aktivnost od 90 %.

Na ovaj način je ispitan utjecaj hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na aktivnost i skladišnu stabilnost lipaza te mogućnost njihove potencijalne primjene kao reakcijskih i skladišnih medija. Rezultati su pokazali da je hDES Ty:C<sub>8</sub> pogodan reakcijski medij za modelnu reakciju enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-fenil-etanola s lipazom CALB kao biokatalizatorom, dok je za ostale vrste lipaza (AH, AS, AYS, G) ipak nešto pogodnije referentno otapalo heptan. S druge strane, analizom rezultata rezidualne aktivnosti lipaza, utvrđeno je da su hDES-ovi pogodniji za očuvanje skladišne stabilnosti lipaza u odnosu na heptan te obećavajući skladišni mediji i zamjena za organska otapala.

## 5. ZAKLJUČCI

U sklopu ovog rada ispitan je utjecaj hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (hDES) na aktivnost i skladišnu stabilnost različitih lipaza (CALB, AH, AS, AYS, G). Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Sve ispitivane lipaze aktivne su u kalij-fosfatnom puferu. Analizom inicijalne brzine reakcije hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata u *p*-nitrofeniletanol, kao najaktivnije lipaze ističu se CALB i AH.
2. Analizom konverzije reakcije, specifične aktivnosti enzima i volumetrijske produktivnosti modelne reakcije enantioselektivne esterifikacije (*R,S*)-1-feniletanola u (*R*)-1-feniletil-acetat, najuspješnijim biokatalizatorom pokazala se lipaza CALB u hDES-u Ty:C<sub>8</sub>. Ostvarena je konverzija od 29,2 %, volumetrijska produktivnost od 483,7 μmol/L min te specifična produktivnost enzima od 0,48 μmol/mg min.
3. Analizom vrijednosti rezidualnih aktivnosti enzima, kao najprikladnije otapalo za održavanje skladišne stabilnosti lipaza pokazao se hDES Ty:C<sub>8</sub>. Rezidualna aktivnost lipaza (CALB, AH, AS i G) na kraju vremena inkubacije kretala se u intervalu od 60 % do 92 %.
4. Najvišu skladišnu stabilnost na kraju vremena inkubacije pokazale su lipaza G u hDES-u Ty:C<sub>8</sub> te lipaza AYS u hDES-u C<sub>12</sub>:C<sub>8</sub>. Rezidualna aktivnost lipaze G u navedenom otapalu iznosila je 92 %, dok je lipaza AYS pokazivala rezidualnu aktivnost od 90 %.
5. Hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala pokazuju potencijal za primjenu u industriji i zamjeni štetnih organskih otapala kao skladišni medij za lipaze.



## 6. LITERATURA

Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK (2004) Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (29), 9142-9147.

Ai Nguyen L, He H, Pham-Huy C (2006) Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. Biomed. Sci.* **2** (2), 85-100.

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

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** (3-4), 164-168.

Čanak I, Berkics A, Bajcsi N, Kovacs M, Belak A, Teparić R, Maraz A, Mrša V (2016) Purification and characterization of a novel cold-active lipase from the yeast *Candida zeylanoides*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 403 – 411.

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

Galović P (2021) Rational Design of Deep Eutectic Solvents for Lipase Catalyzed Kinetic Resolution (*R,S*)-1-Phenylethanol, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Gorke JT, Srienc F, Kazlauskas RJ (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.* **10**, 1235-1237.

Hayyan M, Hashim MA, Al-Saadi MA, Hayyan A, AlNashef IM, Mirghani MES (2013a) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455-459.

Hayyan M, Hashim MA, Hayyan A, Al-Saadi MA, AlNashef IM, Mirghani MES, Saheed OK (2013b) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193-2195.

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

Lancaster M (2002) Principles of Sustainable and Green Chemistry. U: Handbook of Green Chemistry and Technology, Clark J., Macquarrie D., Blackwell Science Ltd., str. 10-26.

Lee J, Jung D, Park K (2019) TrAC. *Trends in Analytical Chemistry* **118**, 853-868.

Paiva P, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural Deep Eutectic Solvents - Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063-1071.

Panić M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **96** (1), 14-30.

Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syldatk C, Holtmann D (2019) Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends in Biotechnology* **37** (9), 943-959.

Radojčić Redovniković I, Mitar A, Panić M, Prlić Kardum J, Halambek J, Sander A, i sur. (2019) Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chem Biochem Eng Q*, **33** (1), 1-18.

Radović M (2020) Natural Deep Eutectic Solvent Impact on Activity and Storage Stability of Immobilized and Free Lipase Form, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala - racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kem. Ind.* **70** (9-10), 551-562.

Shekaari H, Zafrani-Moattar MT, Mokhtarpour M (2017) Solubility, volumetric and compressibility properties of acetaminophen in some aqueous solutions of choline based deep eutectic solvents at T = (288.15 to 318.15) K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **109**, 121 – 130.

Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews* **114** (21), 11060-11082.

Stradomska D, Heba M, Czernek A, Kuźnik N, Gillner D, Maresz K, i sur. (2021) Lipase Immobilized on MCFs as Biocatalysts for Kinetic and Dynamic Kinetic Resolution of sec-Acohols'. *Catalysts* **11** (4), str. 518.

Tang B, Row KH (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **144** (10), 1427-1454.

Vanda H, Dai Y, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH (2018) Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *C R Chim.* **21** (6), 628-638.

van Osch DJGP, Zubeir LF, van den Bruinhorst A, Rocha MAA, Kroon MC (2015) Green Chem. **17**, str. 4518.

Warrag SEE, Kroon MC (2019) Hydrophobic Deep Eutectic Solvents. *Deep Eutectic Solvents*, 83-93.

Xu P, Zheng GW, Zong MH, Li N, Lou WY (2017) Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresour. Bioprocess.* **4** (34).

Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Wong WF (2021) Hydrophobic deep eutectic solvents: Current progress and future directions. *J of Ind Eng Chem*, **97**, 142-162.

Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jerome F (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev*, **41** (21), 7108-7146.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Iva Mihaljević