

Analiza stabilnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita

Lacić, Petra

Master's thesis / Diplomski 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:159:189608>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ MOLEKULARNE BIOTEHNOLOGIJE

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Petra Lacić

**ANALIZA STABILNOSTI
LIZOZIMA U
NISKOTEMPERATURNIM
EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA
BAZI OSMOLITA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Cvjetko Bubalo.

Rad je djelomično napravljen u sklopu projekta "Intenzifikacija biokatalitičkih procesa za održivu valorizaciju otpada primjenom eutektičkih otapala u mikroreaktorima" (IPS-2022-02-3938) financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost; voditelj projekta: izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo, na njezinom stručnom vodstvu, znanju i podršci koje su mi pruženi tijekom izrade ovog diplomskog rada. Njezina strpljivost, razumijevanje i sugestije bile su ključne u oblikovanju i usavršavanju ovog rada.

Također se zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na korisnim savjetima, tehničkoj pomoći i doprinosu u realizaciji praktičnog dijela rada.

Ogromnu zahvalu upućujem svojoj obitelji, dečku i prijateljima na njihovoj stalnoj podršci, motivaciji i razumijevanju kroz moje studijsko putovanje. Vaša ljubav i ohrabrenje bili su moj izvor snage i inspiracije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

ANALIZA STABILNOSTI LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA

Petra Lacić, univ. bacc. ing. biotechn., 0058210429

Sažetak: Proučavanjem živih sustava identificiran je specifičan mehanizam zaštite organizma u stresnim uvjetima koji se oslanja na male neutralne i netoksične molekule poznate pod imenom osmoliti. Osmoliti, osim što djeluju kao obrambeni mehanizam, imaju ključnu ulogu u održavanju termodinamičke stabilnosti biomakromolekula bez narušavanja njihove funkcionalnosti. S obzirom da se smatraju „kompleksnim adaptivnim sustavima” koje karakteriziraju emergentna svojstva, nedavno je otkrivena povezanost sa niskotemperaturnim eutektičkim otapalima koja učinkovito repliciraju prirodno okruženje različitih biomolekula, a ujedno imaju slična svojstva osmolita. U ovom radu je ispitan utjecaj niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita (osmoDES) na toplinski induciranu agregaciju i termodinamičku stabilnost proteina lizozima pri ekstremnim temperaturama. S obzirom na rezultate, pripremljeni osmoDES-ovi imaju značajan potencijal za primjenu kao tekući skladišni medij proteina zbog svojih izuzetnih stabilizacijskih sposobnosti.

Ključne riječi: *osmoliti, niskotemperaturna eutektička otapala, stabilizacija proteina, agregacija*

Rad sadrži: 45 stranica, 17 slika, 5 tablica, 45 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo
3. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek
4. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Datum obrane: 30. studeni, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

ANALYSIS OF LYSOZYME STABILITY IN EUTECTIC SOLVENTS BASED ON OSMOLYTES

Petra Lacić, univ. bacc. ing. biotechn., 0058210429

Abstract: By studying living systems, a specific mechanism for protecting the organism in stressful conditions has been identified, which relies on small neutral and non-toxic molecules known as osmolytes. Osmolytes, apart from acting as a defense mechanism, play a crucial role in maintaining the thermodynamic stability of biomacromolecules without compromising their functionality. Considering them as „complex adaptive systems” characterized by emergent properties, a recent connection with eutectic solvents based on osmolytes (osmoDES) has been discovered, effectively replicating the natural environment of various biomolecules while sharing similar osmolyte properties. In this study, the impact of osmoDES on thermally induced aggregation and thermodynamic stability of lysozyme protein at extreme temperatures was investigated. Based on the results, the prepared osmoDES exhibit significant potential for application as a liquid storage medium for proteins due to their exceptional stabilizing capabilities.

Keywords: *osmolytes, low temperature deep eutectic solvents, protein stabilisation, aggregation*

Thesis contains: 45 pages, 17 figures, 5 tables, 45 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor

Reviewers:

1. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor
2. Marina Cvjetko Bubalo, Associate professor
3. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor
4. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor

Thesis defended: 30th of November, 2023.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA	2
2.1.1. Zelena otapala kao smjer zelene kemije	2
2.1.2. Definicija, struktura i svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala	3
2.1.3. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala	6
2.2. OSMOLITI	8
2.2.1. Mehanizmi djelovanja osmolita	10
2.2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Otopine i puferi	13
3.1.3. Enzimi i supstrati.....	13
3.1.4. Oprema i uređaji.....	14
3.2. METODE RADA	14
3.2.1. Priprema i karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita ..	14
3.2.2. Stabilnost lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri visokim temperaturama	16
3.2.3. Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri 14 °C i -80 °C	17
4. RASPRAVA I REZULTATI.....	19
4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA BAZI OSMOLITA	19
4.2. STABILNOST LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA PRI VISOKIM TEMPERATURAMA	28
4.2.1. Agregacija lizozima tijekom inkubacije pri 90 °C	28
4.2.2. Rezidualna aktivnost lizozima nakon inkubacije pri 80 °C.....	31
4.3. ODREĐIVANJE REZIDUALNE AKTIVNOSTI LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA NAKON INKUBACIJE PRI NISKIM TEMPERATURAMA	33
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

1. UVOD

Razumijevanje načina prilagodbe živih bića na promjene u okolišu, kao i proučavanje svojstava bioloških organizama i prirodnih procesa, mogu pomoći pri kreiranju inovativnih proizvoda i procesa. Proučavanjem živih sustava otkriven je jedinstveni mehanizam odgovora organizma na stresne uvjete koji uključuje akumulaciju malih organskih molekula zvanih osmoliti. Osmolitima se pripisuju razne biološke funkcije, među kojima je najizraženija sposobnost povećanja termodinamičke stabilnosti makromolekula bez narušavanja njihove izvorne funkcionalnosti. Upravo su zbog toga osmoliti privukli značajnu pažnju u različitim industrijskim područjima, a prvenstveno kao ekscipijensi za stabilizaciju proteina u tekućim i liofiliziranim pripravcima. Nedavno su Cvjetko Bubalo i sur. (2023) uspostavili vezu između osmolita i niskotemperaturnih eutektičkih otapala, zelenih otapala koja učinkovito oponašaju prirodno okruženje za različitih biomolekula te pokazali da niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita imaju sposobnost stabilizacije lizozima pri sobnoj temperaturi.

Cilj ovog rada bio je pripremiti i okarakterizirati niz niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita iz različitih kraljevstava života te eksperimentalno dokazati sposobnost ovih otapala u očuvanju izvorne konformacije i funkcionalnosti modelnog proteina lizozima pri ekstremnim temperaturama (termički šok i zamrzavanje). Otkrića prikazana u ovom radu ukazuju da otapala direktno inspirirana prirodnim mikrookolišem biomakromolekula mogu poslužiti kao učinkoviti medij za pohranjivanje proteina u tekućem obliku te poslužiti kao smjernice u dizajnu proteinskih pripravaka u farmaceutskoj industriji i biomedicini.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA

2.1.1. Zelena otapala kao smjer zelene kemije

Značajne količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala primjenjuju se u mnogim industrijskim procesima unutar reakcijskih sustava zbog njihove presudne uloge u otapanju krutih komponenti, prijenosu tvari i topline te pročišćavanju produkata. Takva praksa neizbježno pridonosi sve većem onečišćenju okoliša, što je postalo značajan globalni izazov u posljednjim godinama. Naime, procjenjuje se da hlapljiva organska otapala čine gotovo 60 % svih industrijskih emisija (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Stoga su brojna istraživanja usmjerena na razvoj zelenih tehnologija, točnije projektiranje novih ekološki prihvatljivih otapala koja istodobno zadovoljavaju tehničke i ekonomske zahtjeve. Zelena kemija ističe važnost smanjenja uporabe opasnih tvari kao sastavnog dijela inicijative za implementaciju održivog razvoja u području kemijske tehnologije. Karakterizira ju dvanaest načela prikazanih u tablici 1 koja obuhvaćaju dizajn ekološki prihvatljivijih kemijskih proizvoda i procesa usredotočujući se na smanjenje negativnih utjecaja na ljudsko zdravlje i okoliš (Anastas i Warner, 1998). Načela zelene kemije ističu da bi idealno otapalo trebalo biti netoksično, kemijski i fizički stabilno, karakterizirati se niskom hlapljivošću i imati sposobnost višekratne uporabe uz jednostavno rukovanje (Anastas i Eghbali, 2010). U tom kontekstu, poseban naglasak stavlja se na niskotemperaturna eutektička otapala, koja ispunjavaju navedene kriterije te se odlikuju biorazgrađivošću, jednostavnom sintezom, pristupačnom cijenom, visokom sposobnošću otapanja te mogućnosti strukturnog prilagođavanja (Hou i sur., 2018).

Što se tiče gore navedenih razmatranja, voda je prvi izbor otapala i već se koristi na industrijskoj skali, uglavnom u procesima emulzijske polimerizacije i hidrodestilacije. Međutim, zanemariva topljivost mnogih organskih i organsko-metalnih spojeva u vodi, kao i visoki energetske zahtjevi za uklanjanje vode nakon završetka procesa koji ju uključuje, ograničavaju njezine primjene. Stoga su razmatrana različita ekološki prihvatljiva, prilagodljiva i pametna otapala, među kojima se ističu ionske tekućine pri sobnoj temperaturi, nadkritični i podkritični fluidi te otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora kao najobecavajući pristupi za trenutne inovacije u području otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Tablica 1. Dvanaest načela zelene kemije (prema Anastas i Warner, 1998)

1. Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga obrađivati i uništavati nakon što je nastao.
2. Tok 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 proizvode 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 proizvode 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 (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).

2.1.2. Definicija, struktura i svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (*engl.* Deep Eutectic Solvent, DES) predstavljaju novu klasu ekološki prihvatljivih otapala koja se koriste kao zamjena za štetna tradicionalna organska otapala. Definišu se kao mješavine dvaju ili više komponenti povezanih vodikovim vezama koje u odgovarajućem omjeru tvore eutektičku tekuću smjesu s nižom točkom tališta u odnosu na pojedinačne komponente smjese (Zhang i sur., 2012).

Jedna od trenutno značajnih podgrupa DES-ova su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (*engl.* Natural Deep Eutectic Solvents, NADES) koja u potpunosti zadovoljavaju načela zelene kemije (Paiva i sur., 2014). To je posebna vrsta otapala dobivena od prirodnih spojeva, prvenstveno primarnih metabolita poput aminokiselina, šećera i alkohola. Njihova sve veća popularnost proizlazi iz njihovog sastava koji se temelji na prirodnim komponentama, ekološke prihvatljivosti te ekonomičnosti u usporedbi s konvencionalnim organskim otapalima. Ovi sustavi

ne samo da omogućuju izvrsnu topljivost biološki aktivnih tvari, već pružaju i stabilizaciju širokog spektra biomolekula, poput proteina, enzima i nukleinskih kiselina (Choi i sur., 2011).

DES-ovi su sustavi dobiveni stvaranjem eutektičke smjese između Lewisove ili Brønstedove kiseline i baze, odnosno formiranjem veze između akceptora (*engl.* Hydrogen Bond Acceptors, HBA) i donora (*engl.* Hydrogen Bond Donors, HBD) vodikove veze (Abbott i sur., 2003).

S obzirom da se sastoji od različitih kombinacija komponenti, DES-ovi nemaju jedinstvenu generalnu formulu. Međutim, mogu se definirati općom formulom Cat^+X^-zY pri čemu Cat^+ predstavlja bilo koji amonijev, fosfonijev ili sulfonijev kation, dok X označava Lewisovu bazu, najčešće anion jednog od halogenih elemenata, a Y Lewisovu ili Brønstedovu kiselinu. Cat^+ i X zajedno predstavljaju akceptor vodikove veze koji tvori kompleks sa Y , donorom vodikove veze, gdje oznaka z određuje broj molekula Y (Smith i sur., 2014).

DES-ovi se obično klasificiraju u četiri skupine čija je generalna formula opisana u tablici 2. Otapala tipa I građena su od kvaterne amonijeve soli te halogenida metala, dok otapala tipa II karakteriziraju kvaterne amonijeve soli s hidriranim metalnim halogenidima. Otapala tipa III uključuju spojeve kvaternih soli i donora vodikovih veza poput amida, kiselina i alkohola, a skupinu IV čine halogenidi metala i donori vodikovih veza poput amida i alkohola (Smith i sur., 2014).

Najzastupljenija kvaterna sol koja se upotrebljava kao akceptor vodikove veze je kolin-klorid koji lako stupa u interakcije s donorima vodika poput glicerola i uree. Zbog svojih karakteristika kao što su netoksičnost, biorazgradivost, ekonomičnost te visoka stabilnost opće je prihvaćen za upotrebu u različitim industrijama (Tang i Row, 2013).

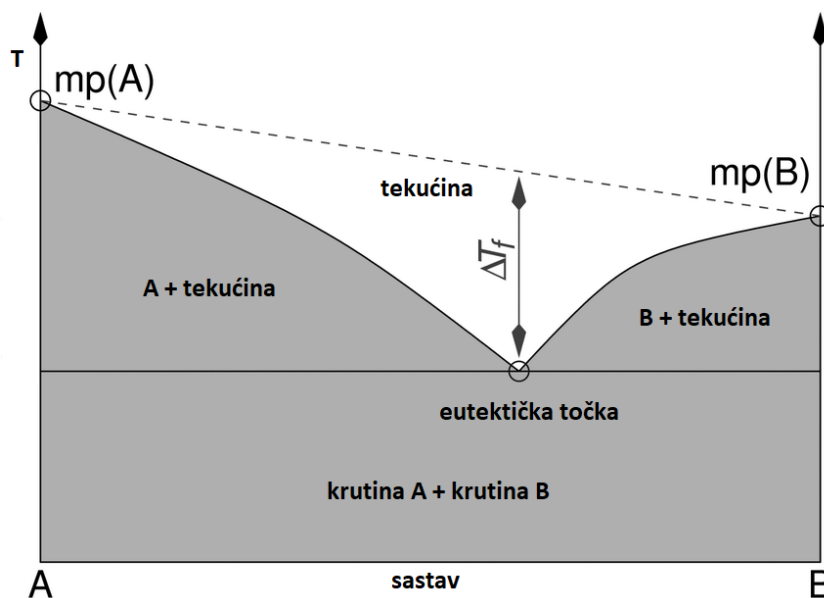
Tablica 2. Generalna formula klasifikacije DES-ova (*prema* Smith i sur., 2014)

Skupina	Generalna formula	Objašnjenje kratica
Tip I	$Cat^+ X^-zMCl_x$	$M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In$
Tip II	$Cat^+ X^-zMCl_x \cdot yH_2O$	$M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe$
Tip III	$Cat^+ X^-zRZ$	$Z = CONH_2, COOH, OH$
Tip IV	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1} + \cdot RZ + MCl_{x+1}$	$M = Al, Zn; Z = CONH_2, OH$

DES-ovi imaju specifična fizikalno-kemijska svojstva koja ovise o strukturi komponenata otapala te o njihovom molarnom omjeru. Neke od karakteristika koje ih zajednički opisuju su niska točka taljenja (T_t), visoka viskoznost (η) i gustoća (ρ) često veća od gustoće vode (Zhang i sur., 2012).

Niska točka taljenja (T_t) glavna je karakteristika DES-ova. Omogućava širok spektar primjene u procesima koji zahtijevaju rad i odvijanje katalize pri sobnoj temperaturi, ali i temperaturi nižoj od sobne. Posljedica je mjestimične delokalizacije naboja uslijed formiranja vodikovih veza između početnih sirovina otapala koje rezultira snižavanjem točke tališta smjese u odnosu na točke tališta polaznih komponenti (Zhang i sur., 2012). Prvi sintetizirani DES nastao je miješanjem kolin-klorida ($T_t = 302\text{ °C}$) i uree ($T_t = 133\text{ °C}$) u molarnom omjeru 1:2 čime se dobila smjesa s izrazito nižom točkom tališta ($T_t = 12\text{ °C}$) (slika 1) (Abbott i sur., 2003).

DES-ovi su pri sobnoj temperaturi tekućine relativno visoke viskoznosti te ih karakterizira obično veća gustoća u odnosu na gustoću vode. Uobičajeno, gustoća DES-ova prema podacima iz literature kreće se između $0,785 - 1,63\text{ g cm}^{-3}$, a većina ih spada u raspon gustoća većih od vode na sobnoj temperaturi tj. $1,0 - 1,35\text{ g cm}^{-3}$ (Tang i Row, 2013). Visoke vrijednosti viskoznosti posljedica su široke mreže vodikovih veza, elektrostatičkih i van der Waalsovih interakcija te veličine iona. Na spomenute karakteristike značajno utječe struktura polaznih komponenti otapala, molarni omjer i temperatura. Manipulacijom tih čimbenika mogu se ostvariti željene vrijednosti viskoznosti i gustoće za primjenu u industrijskim procesima (Abbott i sur., 2004).

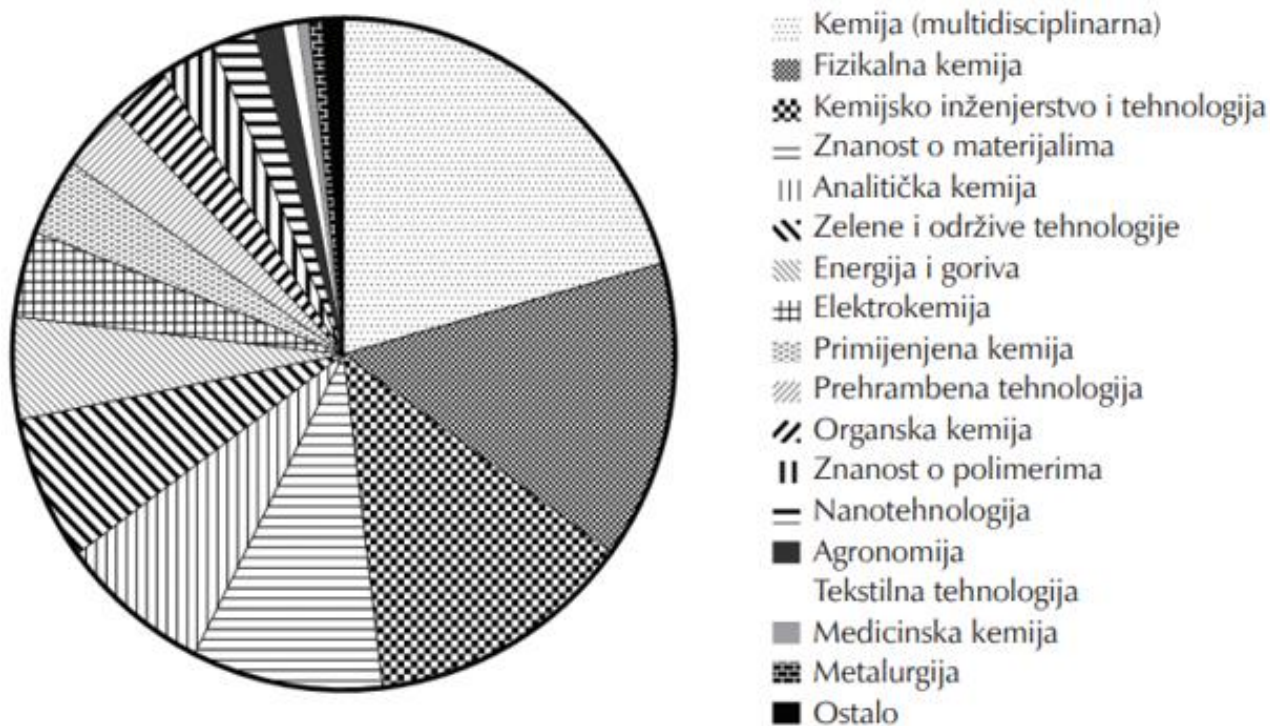


Slika 1. Fazni dijagram dvokomponentnog eutektičkog otapala (prema Smith i sur., 2014)

2.1.3. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Zahvaljujući širokom rasponu akceptora i donora vodikove veze koji rezultiraju velikim brojem mogućih kombinacija omogućeno je manipuliranje strukturom te fizikalno-kemijskim svojstvima samog otapala s ciljem dizajniranja otapala za specifične namjene (Paiva i sur., 2014). Zbog svoje raznolikosti i karakteristika, DES-ovi se intenzivno proučavaju u različitim područjima istraživanja poput sinteze, (bio)katalize, elektrokemije, biotehnologije, farmaceutske industrije biomedicine i ostalim područjima prikazanih na slici 2.

U području kemijske sinteze i (bio)katalize DES-ovi imaju značajnu ulogu zbog svoje sposobnosti otapanja različitih organskih i anorganskih tvari koje uključuju reaktante i (bio)katalizatore te u samoj stabilizaciji i poboljšanju selektivnosti (bio)katalizatora (Massolo i sur., 2016). Zbog mogućnosti otapanja različitih metalnih soli i oksida te električne provodljivosti, DES-ovi su pronašli primjenu u području elektrokemije gdje se koriste kao elektroliti u raznim elektrokemijskim procesima, uključujući elektrodepoziciju metala i baterijske aplikacije (Xie i sur., 2016). Također se koriste za obradu lignoceluloznih sirovina, proizvodnju biodizela te procesima ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljaka, algi i drugih prirodnih izvora u području biotehnologije i prehrambene tehnologije (Liu i sur., 2017). Nastavno na procese ekstrakcije primjenjuju se i u separacijskim procesima apsorpcije kiselih plinova te ekstrakcije dušikovih i sumporovih spojeva iz loživih ulja te kod razdvajanja spojeva aromatske i alifatske strukture (Hou i sur., 2018). DES-ovi se najčešće koriste u farmaceutskoj industriji, gdje imaju ključnu ulogu u formulaciji lijekova. Koriste se za poboljšanje topljivosti slabo topljivih spojeva, a također se primjenjuju prilikom razvijanja novih formulacija koje uključuju osjetljive ili terapijske komponente (Morrison i sur., 2009). Često se koriste u području biomedicine za zamrzavanje i očuvanje bioloških uzoraka, materijala i molekula poput DNA i proteina (Mondal i sur., 2013). Primjenu imaju i u razvoju novih materijala te sintezi biopolimera i biorazgradivih materijala s antibakterijskim svojstvima za tkivne implantate (Garcia-Argüelles i sur., 2013).



Slika 2. Zastupljenost znanstvenih područja u kojima su objavljeni znanstveni radovi o niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (prema Radović i sur., 2021)

2.1.3.1. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u stabilizaciji makromolekula

Iako se niskotemperaturna eutektička otapala najčešće primjenjuju zbog svoje sposobnosti otapanja raznih biološki aktivnih tvari i spojeva, važno je spomenuti i njihov značajan doprinos povećanju kemijske stabilnosti aktivnih tvari.

Nedavna istraživanja sugeriraju da se DES-ovi mogu nalaziti unutar živih organizama kao treći sustav, uz vodu i lipide. Prisutnost eutektičkih tekućina u živim organizmima mogla bi objasniti velik broj bioloških procesa koji uključuju nestabilne spojeve i metabolite slabo topive u vodi. Pretpostavlja se da sudjeluju u procesima biosinteze, otapanja i skladištenju različitih metabolita koji imaju ključnu ulogu u fiziološkim i kemijskim procesima (Cvjetko Bubalo i sur., 2023.) Kao rezultat toga, DES-ovi mogu imati izvanredan značaj u području biotehnologije, biomedicine i farmaceutske industrije zbog sposobnosti oponašanja prirodnih uvjeta stanice važnih za aktivaciju i stabilizaciju makromolekula poput proteina, enzima i nukleinskih kiselina. Primjerice,

zabilježeno je da DES-ovi temeljeni na kolin-kloridu pružaju dugoročnu stabilnost biomolekula kao što su DNA i proteini (Svigelj i sur., 2021).

DES-ovi imaju ključnu ulogu u enzimskim reakcijama gdje se primjenjuju za stabilizaciju enzima. Primjerice, važan klinički enzim kondroitinaza ABCI koji se koristi u liječenju lezija kralježnice, iznimno je nestabilan, što ograničava njegovu komercijalnu primjenu. Međutim, korištenjem DES-ova na bazi betaina i kolin-klorida kao medija za pohranu umjesto pufera, enzim je zadržao približno 82 % svoje početne aktivnosti nakon 120 minuta, dok je aktivnost enzima pala na 20 % u odsutnosti DES-a (Daneshjou i sur., 2017).

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) te ostale nukleinske kiseline često se primjenjuju u područjima biotehnologije i biomedicine tijekom različitih procesa. Međutim, njihova kemijska stabilnost u vodenim otopinama lako se narušava nefiziološkim parametrima poput temperature, pH i ionske jakosti. Dugoročna stabilnost održava se korištenjem DES-ova na bazi kolin-klorida. Stabilizacija je omogućena zahvaljujući elektrostatskom privlačenju između organskih kationa DES-a i fosfatne okosnice DNA, popraćena hidrofobnim i polarnim interakcijama između eutektičkih tekućina te velikih i manjih utora DNA. Višestruke mreže vodikovih veza DES-a stabiliziraju dupleks DNA učinkovitije od natrijevih iona prisutnih u vodenim puferima (Svigelj i sur., 2021; Zhao, 2014).

2.2. OSMOLITI

Kako bi osigurali svoj opstanak, adaptaciju i razvoj, mnogi organizmi moraju pravovremeno odgovoriti na mnoštvo stresnih uvjeta s kojima se suočavaju u svom prirodnom okruženju. U uvjetima stresa kada su stanice izložene promjenama poput gubitka vode u sušnim uvjetima i ekstremnim temperaturama može doći do osmotske neravnoteže. Bez adekvatne obrane organizma, takvi uvjeti uz nedostatak hranjivih tvari mogu imati negativan utjecaj na stanicu, njenu strukturu i samu funkcionalnost. Kako bi se očuvala osmotska ravnoteža te spriječio štetni učinak, većina organizama vrši akumulaciju spojeva zvanih osmoliti (Zhang, 2012). Osmoliti su male, električki neutralne i netoksične organske molekule koje imaju značajnu ulogu u zaštiti stanice (slika 3). Njihova raznolikost, netoksičnost i višestruka biološka funkcija doprinijeli su njihovoj širokoj upotrebi u područjima istraživanja poput biotehnologije, biomedicine i poljoprivrede, uglavnom u ulozi stabilizatora molekule i zaštite stanice (Vanda i sur., 2019).

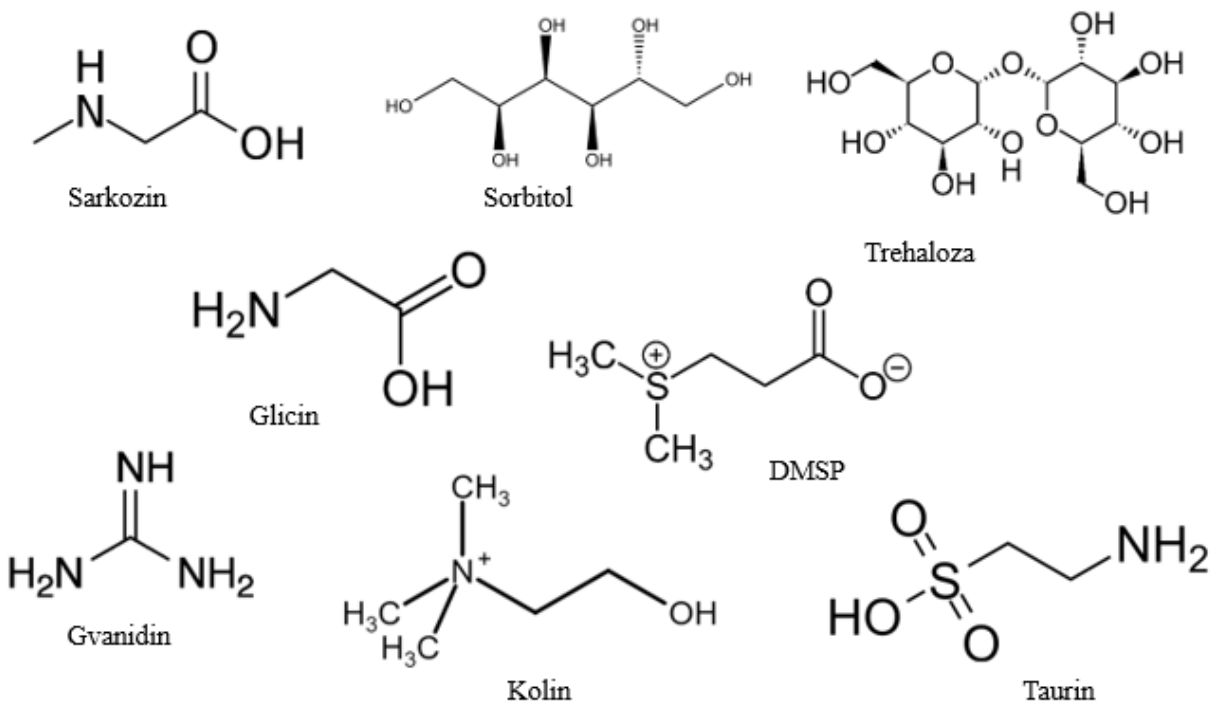
Osmoliti se, s obzirom na svoju kemijsku strukturu, mogu klasificirati u nekoliko primarnih kategorija:

1. Polioli i polioli ugljikohidrata (glicerol, sorbitol i ksilitol) prisutni u svim kraljevstvima
2. Ugljikohidrati i njihovi derivati (glukoza, saharoza i trehaloza) primarno akumulirani u biljkama, kukcima i polarnim ribama
3. Aminokiseline i njihovi derivati (glicin, prolin, ektoin i taurin) koje se tipično nalaze u prokariotskim stanicama i biljkama
4. Metilamini (trimetilamin N-oksid - TMAO, sarkozin i betain) koji su uglavnom prisutni u morskim ribama i biljkama
5. Metilsulfonijevi spojevi (dimetilsulfoniopropionat - DMSP) koji se nalazi u algama
6. Y-konjugirani spojevi (urea i gvanidin) koje koriste sisavci i morski organizmi (Yancey, 2005)

S obzirom na njihov utjecaj na makromolekule, posebice proteine, osmolite mogu se klasificirati u dvije skupine sa suprotnim učincima: kaotrope i kozmotrope. Kozmotropi su molekule koje stabiliziraju biološke makromolekule te doprinose održavanju strukturalnog integriteta proteina i drugih molekula. U njih se ubrajaju metilamini, metilsulfonijevi spojevi, ugljikohidrati, polioli, aminokiseline i njihovi derivati. Kaotropi su molekule suprotnog učinka od kozmotropa, koje narušavaju strukturu te destabiliziraju biološke makromolekule, potencijalno izazivajući strukturne poremećaje molekula te denaturaciju proteina. Najčešći primjeri kaotropa uključuju ureu i gvanidin hidroklorid (O Street i sur., 2006).

Iako netoksični, mnogi kozmotropi mogu biti štetni pri visokim koncentracijama u odsutnosti kaotropa. Optimalni učinak na organizam postignut je dodavanjem obje vrste osmolita u medij te njihovom sinergijskom interakcijom. Još uvijek je potrebno razjasniti mehanizam te istražiti razloge zbog kojih kozmotropi često postižu bolje rezultate kada se kombiniraju s kaotropima, nego kada djeluju izolirano (Cvjetko Bubalo i sur., 2023; Yancey, 2005).

Prisutnost osmolita u specifičnim kombinacijama i omjerima u prirodi prvenstveno je povezana s činjenicom da kozmotropi poput metilamina i aminokiselina, u određenim molarnim omjerima, mogu uravnotežiti štetne učinke uree na proteine i druge makromolekule. Daljnjim eksperimentima utvrđena je korelacija između kozmotropa i učinkovitosti stabilizacije strukture proteina te neutralizacije negativnog učinka kaotropa (Yancey i Somero, 1979).



Slika 3. Strukturne formule odabranih osmolita

2.2.1. Mehanizmi djelovanja osmolita

U posljednjem desetljeću, brojna provedena istraživanja koja su koristila eksperimentalne i teorijske metode nastojala su razjasniti molekularni mehanizam kojim kozmotropi, posebice TMAO stabiliziraju proteine u prisutnosti kaotropa poput uree. Na temelju istraživanja, predložena su dva moguća pristupa: neizravni i izravni mehanizam. Neizravni mehanizam sugerira da osmoliti utječu na savijanje proteina mijenjajući strukturu medija kroz slabe, nekovalentene interakcije s okolnim molekulama vode. Takve interakcije utječu na mrežu vodikovih veza vode, mijenjajući njene termodinamičke karakteristike, što može rezultirati u jačanju ili slabljenju te mreže. Formiranjem hidratacijske ljuske oko makromolekule pružena je zaštita od denaturacije i agregacije pod stresnim uvjetima. S druge strane, izravni mehanizam predlaže direktnu integraciju osmolita s peptidima ili aminokiselinama bočnih lanaca proteinske osnovice u svrhu stabilizacije prirodnog savijanja proteina gdje osmoliti djeluju kao kemijski *chaperoni* (Mukherjee i Mondal, 2020).

Međutim, dosadašnje studije koje su uzimale u obzir samo kumulativni učinak osmolita nisu još uspjele adekvatno razjasniti njihov sinergijski učinak na organizam te složene međusobne

interakcije s makromolekulama. U fenomenu prekomjerne stabilizacije se pokazalo da kozmotrop TMAO bolje stabilizira protein u prisustvu kaotropa uree nego kad djeluje samostalno (Rösgen i Jackson Atogi, 2012). Sličan obrazac sinergije uočen je i kod drugih kombinacija osmolita, poput betaina i sarkozina u interakcijama sa ureom, te je doveo do zaključka kako bi se učinci kozmotropa i kaotropa trebali razmatrati ne samo individualno i kumulativno, već i sinergijski s obzirom da su najbolji rezultati za organizam postignuti njihovim zajedničkim djelovanjem. Navedena opažanja su u skladu s konceptom „složenih adaptivnih sustava” koji pokazuju svojstva koja nadmašuju kumulativne učinke komponenti (Holland, 2006). Ovakvi sustavi ispoljavaju emergentna svojstva koja nastaju kao rezultat interakcija između komponenti, ali nisu objašnjiva pojedinačnim svojstvima tih komponenti (Cachel, 1986).

2.2.2. Niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita

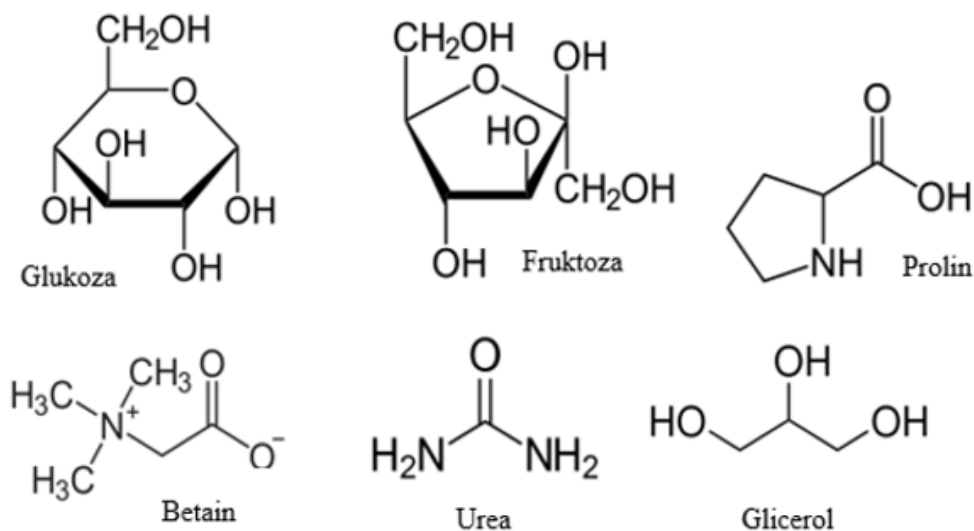
Cvjetko Bubalo i sur. (2023) su nedavno uspostavili vezu između dva glavna istraživačka područja koja su se ranije razvijala paralelno; DES-ova i osmolita. Nadahnuti prirodom i njenim uzorcima distribucije molekula, prvi put su koristili stabilizirajuće osmolite (trimetilamin N-oksidi, sarkozin, glicerofosforilkolin, dimetilsulfoniopropionat i ektoin) za stvaranje novih dvokomponentnih i trokomponentnih DES-ova u kombinaciji sa svim poznatim kaotropima (urea, gvanidin hidroklorid i arginin). Ujedno su izvijestili o stvaranju bioinspiriranih multikomponentnih otapala preuzimanjem točnih sastava (koktela) osmolita zajedno prisutnih u stanicama ili tkivu izloženom određenoj vrsti stresa. Na temelju opažanja utvrdili su da osmoliti *in vivo* stvaraju DES-ove te ukazali na velik potencijal primjene ovih novih sustava u stabilizaciji proteina. Stvaranjem poveznice između ova dva područja postignut je napredak u razvoju novih bioinspiriranih dvokomponentnih, trokomponentnih i višekomponentnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita koja mogu biti izvanredan alat za proučavanje kompleksnih sustava i repliciranje njihovog mikrookoliša na ekološki prihvatljivi način u svrhu pripreve tekućih medija za stabilizaciju proteina i ostalih biomolekula.

Naime, prethodno identificirane komponente korištene u pripremi DES-ova prvenstveno uključuju kvarterne amonijeve soli, poliole, ugljikohidrate, organske kiseline i aminokiseline. Većina ovih komponenata je ili slična ili identična prepoznatim prirodnim osmolitima (slika 4). Primjerice, kolin-klorid, kao najčešće korišteni metilaminski spoj u pripremi DES-ova, strukturalno je sličan prirodno prisutnim metilaminima poput betaina, sarkozina i TMAO-a.

Navedeni metilamini u organizmu imaju zaštitnu ulogu osmolita s naglaskom na stabilizaciju makromolekula suprotstavljajući se štetnim učincima kaotropa i drugih molekula (Cvjetko Bubalo i sur., 2023).

Iako je njihova povezanost tek nedavno otkrivena, osmoliti su u dosadašnjoj pripremi DES-ova često korišteni kao jedna od glavnih komponenti otapala. Naime, kao akceptor vodikove veze dosad je kao polazna sastavnica razmatran betain, zajedno sa osmolitima različitih klasa poput poliola (npr. glicerol), poliola šećera (npr. glukoza, saharoza, fruktoza) te aminokiselina (npr. prolin, lizin, arginin, histidin) (Yancey, 2005).

Eutektički sustavi bazirani na ostalim stabilizirajućim osmolitima također pokazuju obrazac formiranja DES-ova s kaotropnim molekulama (Cvjetko Bubalo i sur., 2023). Dobivena otapala karakterizira izrazito niža točka taljenja u odnosu na pojedinačne komponente, zadovoljavajući kriterije eutektičkih sustava. Potencijal formiranja DES-ova na bazi različitih podgrupa osmolita uočen je u svim istraženim skupinama te pruža nova znanstvena saznanja o suradnji molekula kozmotropa i kaotropa i njihovom utjecaju na stabilnost molekule. Rezultirajuće otapalo posjeduje nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalna otapala, kao što su niska toksičnost, ekonomičnost, jednostavnost pripreme te ekološka prihvatljivost. Osim toga, jedinstvena stabilizacijska svojstva tih otapala čine ih pogodnima za razne primjene u imobilizaciji enzima i pohrani proteina i drugih molekula.



Slika 4. Komponente DES-ova koje su ujedno i prepoznati osmoliti (*prema* Cvjetko Bubalo i sur., 2023)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Betain, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Destilirana voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Glicerol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Gvanidin hidroklorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kalijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Nile crvena solvatokromna proba, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Prolin, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sarkozin, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sorbitol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Taurin, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Urea, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.2. Otopine i puferi

- Kalij-fosfatni pufer (pH 7)

2,336g K_2HPO_4 i 1,577g KH_2PO_4 otopi se u destiliranoj vodi u ukupnom volumenu od 250 mL

3.1.3. Enzimi i supstrati

- Lizozim iz bjelanjka jaja pileta, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Suspenzija bakterije *Micrococcus lysodeikticus* u PBS puferu (7 mg mL⁻¹)

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.4. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete, Deltalab, Španjolska
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Homogenizator/inkubator ES-20/60, Biosan, Latvija
- Laboratorijska tresilica, KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (epruvete, kivete, laboratorijske čaše, menzure, odmjerne tikvice)
- Magnetska miješalica s grijanjem, Technica, Železnik, Slovenija
- Mikropipete Eppendorf (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1 mL, 5 mL)
- Piknometar, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- Univerzalan uređaj za mjerenje pH, mV/ORP i iona, Mettler Toledo/S220
- UV-Vis spektrofotometar, GENESYS 10S, ThermoFisher Scientific, Madison, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema i karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

3.2.1.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

Niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita (osmoDES) pripremljena su postupkom miješanja dviju ili više komponenti u specifičnom masenom omjeru. Određene kombinacije komponenti osmoDES-ova i njihove pripadajuće mase navedene su u tablici 3 i 4. Reakcijska smjesa se zagrijava na magnetskoj miješalici pri temperaturi od 60 °C kroz period od pola sata. Rezultat je transparentno, bezbojno i homogeno niskotemperaturno eutektičko otapalo. Otapala se čuvaju na sobnoj temperaturi do daljnje primjene.

Tablica 3. Pripravljeno višekomponentno niskotemperaturno eutektičko otapalo

DES		Kratica		Molarni omjer	
Betain:Sorbitol:Taurin: Kolin-klorid:Urea		Bet: Sor: Tau: ChCl: U		1,3.10:0,1:2,8:7,1	
Masa komponenata [g]					
Bet	Sor	Tau	ChCl	U	H ₂ O
0,26	1,24	0,03	0,86	0,94	2,22

Tablica 4. Pripravljena dvokomponentna niskotemperaturna eutektička otapala

DES	Kratica DES-a	Molarni omjer	Masa komp. 1 [g]	Masa komp. 2 [g]	Masa H ₂ O [g]
Kolin-klorid:Urea	ChCl:U	1:2	1,82	1,56	2,25
Kolin-klorid:Gvanidin	ChCl:G	1:2	1,40	1,91	2,20
Kolin-klorid:Glicerol	ChCl:Gly	1:2	1,40	1,84	2,16
Sarkozin:Urea	Sar:U	2:5	1,25	2,10	2,23
Sarkozin:Gvanidin	Sar:G	2:5	0,89	2,39	2,19
Sarkozin:Glicerol	Sar:Gly	1:2	1,07	2,21	2,19
Betain:Urea	Bet:U	1:1	2,23	1,14	2,24
Betain:Gvanidin	Bet:G	1:2	1,29	2,10	2,26
Betain:Glicerol	Bet:Gly	1:2	1,29	2,03	2,21
Prolin:Urea	Pro:U	2:1	2,53	0,66	2,13
Prolin:Gvanidin	Pro:G	2:1	2,30	0,96	2,17
Prolin:Glicerol	Pro:Gly	1:2	1,27	2,03	2,19

3.2.1.2. Karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita primjenom infracrvene spektroskopije sa Furijerovim transformacijama

Struktura pripremljenih osmoDES-ova identificirana je korištenjem metode infracrvene (FTIR) spektroskopije s Furijerovim transformacijama, koja koristi infracrveno zračenje za proučavanje strukture molekula.

Infracrveni spektri su snimljeni na FTIR spektrometru opremljenom modulom za atenuiranu totalnu refleksiju (Tensor II, Bruker, Ettlingen, Njemačka) s dijamantnim ATR kristalom u rasponu od 4000 do 400 cm⁻¹ s razlučivošću od 4 cm⁻¹. Prikazani spektri su prosjek 16 skeniranja.

3.2.1.3. Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi osmolita

U sklopu rada ispitivani parametri uključivali su mjerenje pH vrijednosti, polarosti te gustoće otapala na sobnoj temperaturi od 25 °C.

Mjerenje vrijednosti pH

Vrijednost pH osmoDES-ova utvrđena je pomoću unaprijed kalibriranog univerzalnog uređaja za mjerenje pH modela *Mettler Toledo/S220*. Mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi od 25 °C uranjanjem elektrode u otapalo te očitavanjem vrijednosti prikazane na uređaju nakon stabilizacije.

Gustoća

Gustoća osmoDES-ova izmjerena je pomoću piknometra, instrumenta dizajniranog za precizno određivanje gustoće tekućina. Metoda se temelji na Archimedovom principu i uključuje određivanje mase tekućine u piknometru, a zatim izračunavanje gustoće na temelju poznatog volumena piknometra. Otprilike 2 mL svakog otapala dodano je unutar piknometra. Zatvaranjem piknometra, višak tekućine je izašao van, omogućujući točno određeni volumen otapala. Masa piknometra s otapalom se zatim izmjerila na preciznoj vagi. Oduzimanjem mase praznog piknometra od ukupne mase dobila se masa određenog osmoDES-a. Gustoća osmoDES-a se zatim izračunala pomoću mase otapala i poznatog volumena piknometra.

Polarnost

Polarnost svakog pripremljenog osmoDES-a određena je pomoću *Nile red* solvatokromne probe. Crvena stock otopina koncentracije 1,0 g L⁻¹ pripremljena je u etanolu i pohranjena na 4 °C. Uzorci za spektrofotometar su pripremljeni u epicama od 2 mL prema slijedećem protokolu; 0,5 mL 100 puta razrijeđene stock otopine *Nile reda* pomiješanih sa 1,5 mL uzorka. Kontrola je provedena s polarnim otapalom vodom te nepolarnim heksanom. 800 µl pripremljenog uzorka dodano je u kivetu koja se postavlja u spektrofotometar. Apsorbancija je mjerena u rasponu od 340-800 nm metodom *Scan*. Apsorpcijski spektri snimljeni su pomoću spektrofotometra.

3.2.2. Stabilnost lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri visokim temperaturama

3.2.2.1. Praćenje agregacije lizozima tijekom inkubacije pri 90 °C

Toplinski inducirana agregacija proteina lizozima u osmoDES-ovima praćena je koristeći kontrolirani UV/VIS spektrofotometar. Promjena zamućenosti proteinske otopine koristi se kao pokazatelj nastajanja agregata, a identificirana je porastom vrijednosti apsorbancije pri 600 nm.

Proteinski uzorci koji sadrže lizozim koncentracije 5 mg mL^{-1} otopljeni su u osmoDES-ovima ili PBS puferu te podvrgnuti grijanju. Kako bi se spriječilo isparavanje ispitivanih uzoraka tijekom grijanja na visokim temperaturama, kivete koje sadrže uzorke prekrivene su uljem. Pripremljeni uzorci su zagrijani na temperaturu od $90 \text{ }^\circ\text{C}$ u izotermalnoj komori unutar spektrofometra. Izotermalne promjene apsorbancije prate se na valnoj duljini od 600 nm kao funkcija vremena. Rezultati su podvrgnuti različitim matematičkim transformacijama koristeći računalne programe te prikazani u obliku grafova.

3.2.2.2. *Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$*

Analiza stabilnosti modelnog proteina lizozima provedena je u osmoDES-ovima i referentnom otapalu i puferu praćenjem promjene enzimske aktivnosti nakon inkubacije otopine enzima pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom sat vremena u odgovarajućem otapalu.

Za potrebe istraživanja, pripremljeni su lizozimski uzorci koncentracije 5 mg mL^{-1} u različitim osmoDES-ovima i 10 mM kalij-fosfatnom puferu ($\text{pH } 7$). Za mjerenje enzimske aktivnosti $525 \text{ } \mu\text{l}$ 10 mM kalijevog fosfatnog pufera ($\text{pH } 7$) smješteno je u plastičnu kivetu, zajedno s $30 \text{ } \mu\text{l}$ unaprijed pripremljene suspenzije bakterije *Micrococcus lysodeikticus* otopljene u sterilnom PBS puferu (7 mg mL^{-1}). Dodatkom $30 \text{ } \mu\text{l}$ proteina lizozima započeta je reakcija. Neposredno nakon miješanja, kiveta je postavljena u UV/VIS spektrofotometar s ciljem mjerenja apsorbancije na valnoj duljini od 450 nm . Postupak je ponovljen nakon inkubacije lizozima na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ u periodu od sat vremena. Rezidualna aktivnost (%) izračunata je iz početne brzine reakcije koju je enzim postigao nakon inkubacije, u odnosu na onu izmjerenu prije izlaganja uvjetima inkubacije.

3.2.3. *Određivanje rezidualne aktivnosti lizozima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi osmolita nakon inkubacije pri $14 \text{ }^\circ\text{C}$ i $-80 \text{ }^\circ\text{C}$*

Analiza stabilnosti modelnog proteina lizozima provedena je u osmoDES-ovima i standardnom puferu te referentnom sustavu praćenjem promjene enzimske aktivnosti nakon inkubacije otopine enzima pri temperaturama od $-14 \text{ }^\circ\text{C}$ i $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom sat vremena u određenom otapalu.

Pripremljeni uzorci proteina lizozima koncentracije 5 mg mL^{-1} otopljeni u osmoDES-ovima ili 10 mM kalij-fosfatnom puferu ($\text{pH } 7$) podvrgnuti su pet ciklusa postupka zamrzavanja na temperaturama od $-14 \text{ }^\circ\text{C}$ i $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom perioda od 5 dana, pri čemu je svaki od ciklusa trajao 24 sata. Uzorci pohranjeni u hladnjaku su nakon svakog ciklusa zamrzavanja inkubirani na sobnoj

temperaturi od 25 °C prije mjerenja te nakon spektrofotometrijske analize ponovno podvrgnuti zamrzavanju. Postupak mjerenja aktivnosti lizozima identičan je postupku termostabilizacije navedenom u poglavlju 3.2.3. Rezidualna aktivnost (%) određena je na temelju početne brzine reakcije koju je enzim postigao nakon perioda inkubacije, u odnosu na onu izmjerenu prije izlaganja uvjetima zamrzavanja.

4. RASPRAVA I REZULTATI

Analizira načina na koji se živa bića nose s promjenama u okolišu te razumijevanje funkcija koje su prisutne u organizmima i procesima u prirodi, može pomoći u oblikovanju i stvaranju novih procesa i sustava. Biološki sustavi, često izloženi surovim i nepovoljnim uvjetima, preživljavaju na specifične načine u kompleksnim mikrookolišima. Mikrookoliši koji sadrže osmolite, kroz stalnu interakciju s biomakromolekulama, reguliraju brojna svojstva, omogućuju protok informacija i stabiliziraju komponente biološkog sustava. Upravo ove molekule, osmoliti, odgovorni su za suočavanje sa stresorima okoliša. Iako im se pripisuju razne funkcije, ona koja je ključna za ovaj rad je mogućnost termodinamičke stabilizacije biomakromolekula (Czech i sur., 2018). Nedavno uspostavljena veza s drugim područjem istraživanja, niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (*engl.* Deep Eutectic Solvents, DES), značajno je doprinijela razvoju novih alata za proučavanje složenih prirodnih sustava i repliciranju mikrookoliša osmolita – niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita (osmoDES) (Cvjetko Bubalo i sur., 2023). Suradnjom ova dva područja postignuto je stvaranje novih eutektičkih sustava koji posjeduju nova svojstva koja upravljaju njihovom interakcijom s makromolekulama.

Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal osmoDES-ova kao tekućeg medija za stabilizaciju proteina pri ekstremnim uvjetima (visoke temperature i zamrzavanje). Kao modelni protein koristio se lizozim. U tu svrhu pripravljeno je i okarakterizirano devet dvokomponentnih osmoDES-ova te jedan bioinspirirani višekomponentni osmoDES nastao repliciranjem osmolitskih uvjeta iz bubrega zeca.

4.1. PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA BAZI OSMOLITA

Priprema osmoDES-ova provodi se jednostavnim miješanjem dviju komponenti osmolita u specifičnom masenom omjeru s dodatkom vode. Upotrijebljene komponente te njihove kombinacije korištene u ovom radu su prikazane u tablici 5. Postupak obuhvaća miješanje smjese uz lagano zagrijavanje do formiranja bezbojne i homogene suspenzije. Proces pripreme otapala odlikuje se visokom učinkovitošću, budući da iskorištenje procesa iznosi 100 %, a činjenica da gotovo da i ne stvaraju otpad, velika je prednost u njihovoj primjeni. Prilikom pripreme DES-ova

zanemariva količina generiranog otpada dodatno naglašava njihovu ekološku prihvatljivost i ekonomsku održivost, uz lako dostupne, relativno povoljne, sigurne i biorazgradive sirovine.

Za potrebe istraživanja, uz pripravljeni referentni sustav koji se sastoji od 3 otapala, pripravljeno je ukupno 9 dvokomponentnih osmoDES-ova na bazi sarkozina, betaina i prolina kao akceptora vodikove veze s ureom, gvanidinom te glicerolom kao donorima vodika, pri čemu su u različitim molarnim omjerima s 40 % (w/w) vode. Osim toga, pripravljeno je i jedno višekomponentno bioinspirirano niskotemperaturno eutektičko otapalo betain:sorbitol:taurin:kolin-klorid:urea (tablica 5). Bioinspirirano višekomponentno otapalo pripravljeno je prema uzorku raspodjele osmolita u bubregu sisavaca (zec *Oryctolagus cuniculus*). Molarni omjeri sastojaka za stvaranje DES-a određeni su na temelju njihovih koncentracija u relevantnim tkivima, nakon čega su smjese tretirane prema uobičajenim uvjetima za stvaranje DES-a. Kao referentni DES pripremljen je kolin-klorid sa glicerolom, ureom i gvanidin hidrokloridom kao donatorom vodika (tablica 5).

Tablica 5. Eksperimentalni podaci fizikalno-kemijskih svojstava osmoDES-ova

Kratica	Molarni omjer komponenti	Gustoća [mg cm ⁻³]	Polarnost [kcal mol ⁻¹]	pH
ChCl:U	1:2	1130,75	49,63	7,70
ChCl:G	1:2	1106,10	49,81	4,74
ChCl:Gly	1:2	1134,55	49,60	6,18
Sar:U	2:5	1191,85	49,75	5,62
Sar:G	2:5	1193,00	49,05	4,80
Sar:Gly	1:2	877,05	49,48	5,17
Bet:U	1:1	1140,20	49,93	8,11
Bet:G	1:2	1158,60	49,05	5,76
Bet:Gly	1:2	1146,40	49,81	6,85
Pro:U	2:1	1163,40	49,81	7,21
Pro:G	2:1	1194,30	49,60	6,37
Pro:Gly	1:2	1178,95	49,93	6,54
Bet:Sor:Tau:ChCl:U	1,3.10:0,1:2,8:7,1	1175,90	49,24	6,84

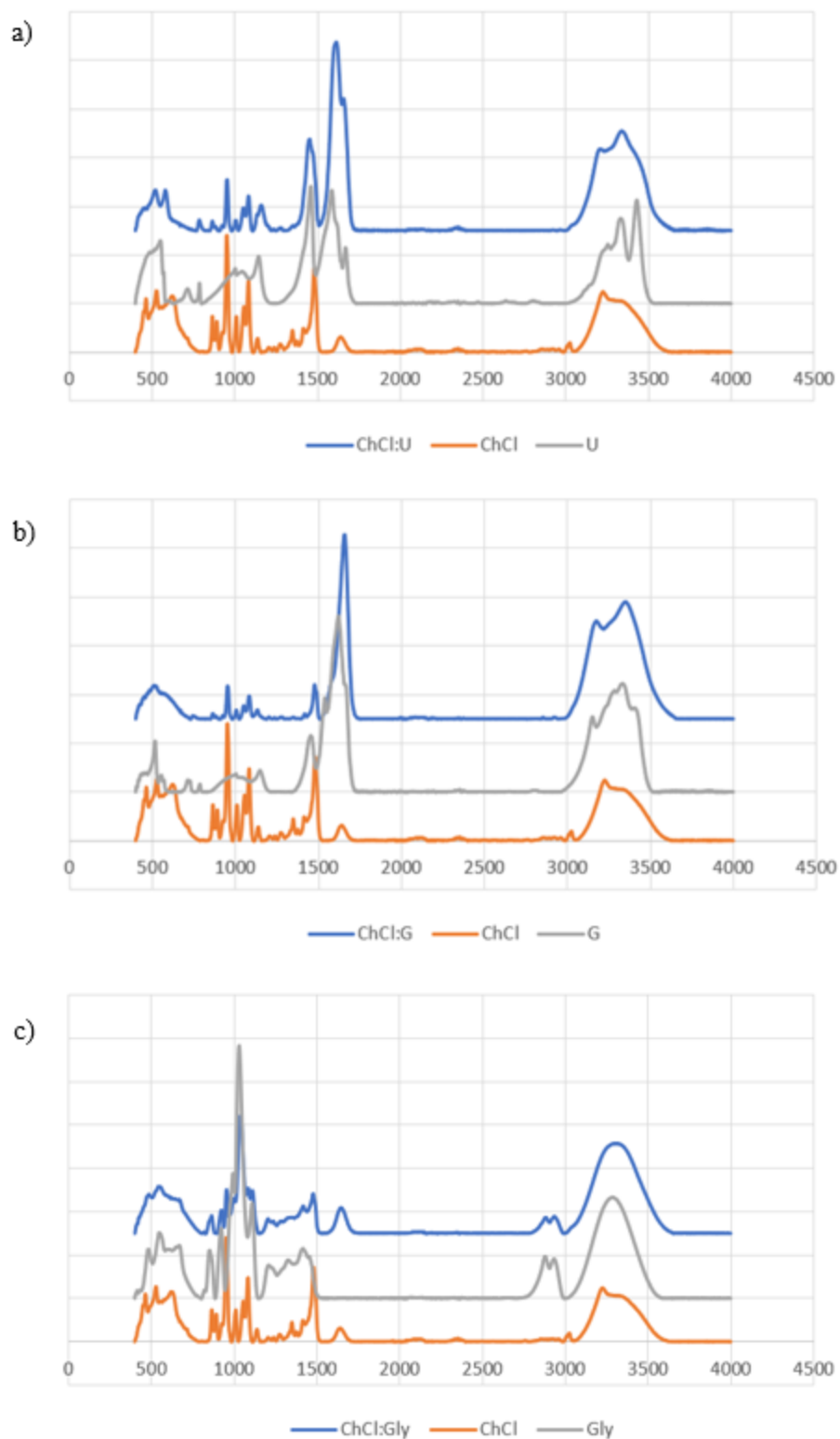
*Sar-sarkozin, U-urea, G-gvanidin, Gly-glicerol, ChCl-kolin-klorid, Bet-betain, Pro-prolin, Sor-sorbitol, Tau-taurin

Struktura pripremljenih osmoDES-ova detektirana je analitičkom metodom infracrvene spektroskopije s Furijerovim transformacijama (FTIR), pri čemu su rezultati prikazani u obliku infracrvenih spektara. FTIR spektri na temelju intenziteta apsorpcije infracrvenog zračenja omogućuju identifikaciju funkcionalnih skupina usporedbom frekvencije apsorbiranog svjetla s frekvencijom vibracije veza u molekuli. Infracrveni spektar prikazuje karakteristične vrpce

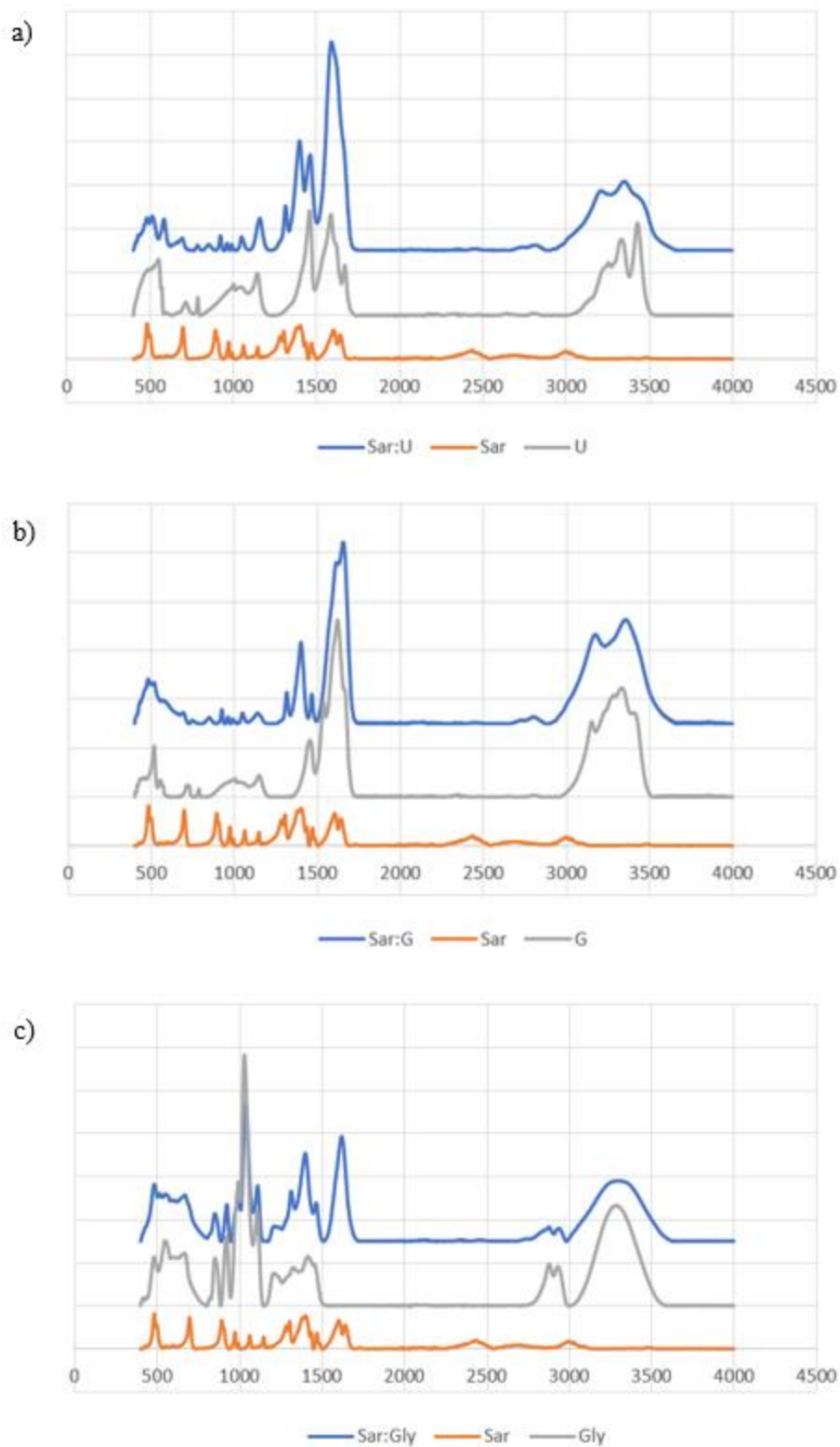
funkcionalnih skupina u točno unaprijed definiranim područjima valnih brojeva prikazane u obliku pikova, prilikom čega je na apscisi uvijek valni broj (cm^{-1}), a na ordinati apsorbancija. Identifikacijom formiranja vodikovih veza potvrđuje se struktura razvijenih osmoDES-a. Analizirani su spektri čistih donora i akceptora vodika, kao i pripremljenih osmoDES-ova, koji se nalaze na slikama 5-9. Rezultati potvrđuju da su promjene nastale između spektra čistih metabolita i osmoDES-ova u rasponu od 1200 do 1700 cm^{-1} te 3000 do 3600 cm^{-1} .

Kod FTIR spektara čistih komponenti na bazi HBA sarkozina (slika 6) uočen je pik karakterističan za prisutnost vibracija savijanja N-H veze u amidskoj skupini. S obzirom da sarkozin ima amidnu skupinu, vrpca se pojavljuje u rasponu od 1500-1600 cm^{-1} . Spektri HBA kolin-klorida (slika 5 i slika 9) prikazuju karakteristične pikove u rasponu od 3300 do 3500 cm^{-1} zbog vibracija pružanja N-H veze, vrpca prisutna u rasponu između 1000 do 1250 cm^{-1} koja se javlja zbog pružanja C-N veze te vrpca u rasponu od 1600 do 1700 cm^{-1} nastalu zbog vibracija pružanja C=O veze (Delgado-Mellado i sur., 2018). Prolin (slika 8), kao i akceptor betain (slika 7 i slika 9) također pokazuju karakterističan pik između 1600 i 1700 cm^{-1} zbog prisustva C=O veze (Pires i sur., 2022). Što se tiče spektara donora, kod glicerola (slika 5c-8c) je karakterističan vrh koji se javlja između 3200 i 3600 cm^{-1} , a označava prisutnost vibracije pružanja OH veze, te vrh prisutan između 2800 i 3000 cm^{-1} koji se javlja zbog C-H veze (Huang i sur., 2017). Urea (slika 5a-8a i slika 9) ima jednu karbonilnu skupinu, stoga se vrpca C=O obično javlja između 1600 i 1700 cm^{-1} zbog vibracija pružanja C=O veze, te vrpca između 3300 i 3500 cm^{-1} koja se javlja zbog N-H veze (Du i sur., 2016). Gvanidin (slika 5b-8b) ima nekoliko karakterističnih vrhova u FTIR spektru poput vrpce N-H koja se javlja pri 3300 i 3500 cm^{-1} te vrpce između 1600 i 1700 cm^{-1} zbog vibracija pružanja C=O veze. Gvanidin ima tri C-N veze, stoga se vrpca C-N javlja između 1000 i 1250 cm^{-1} zbog vibracija pružanja C-N veze (Selvanathan i sur., 2017).

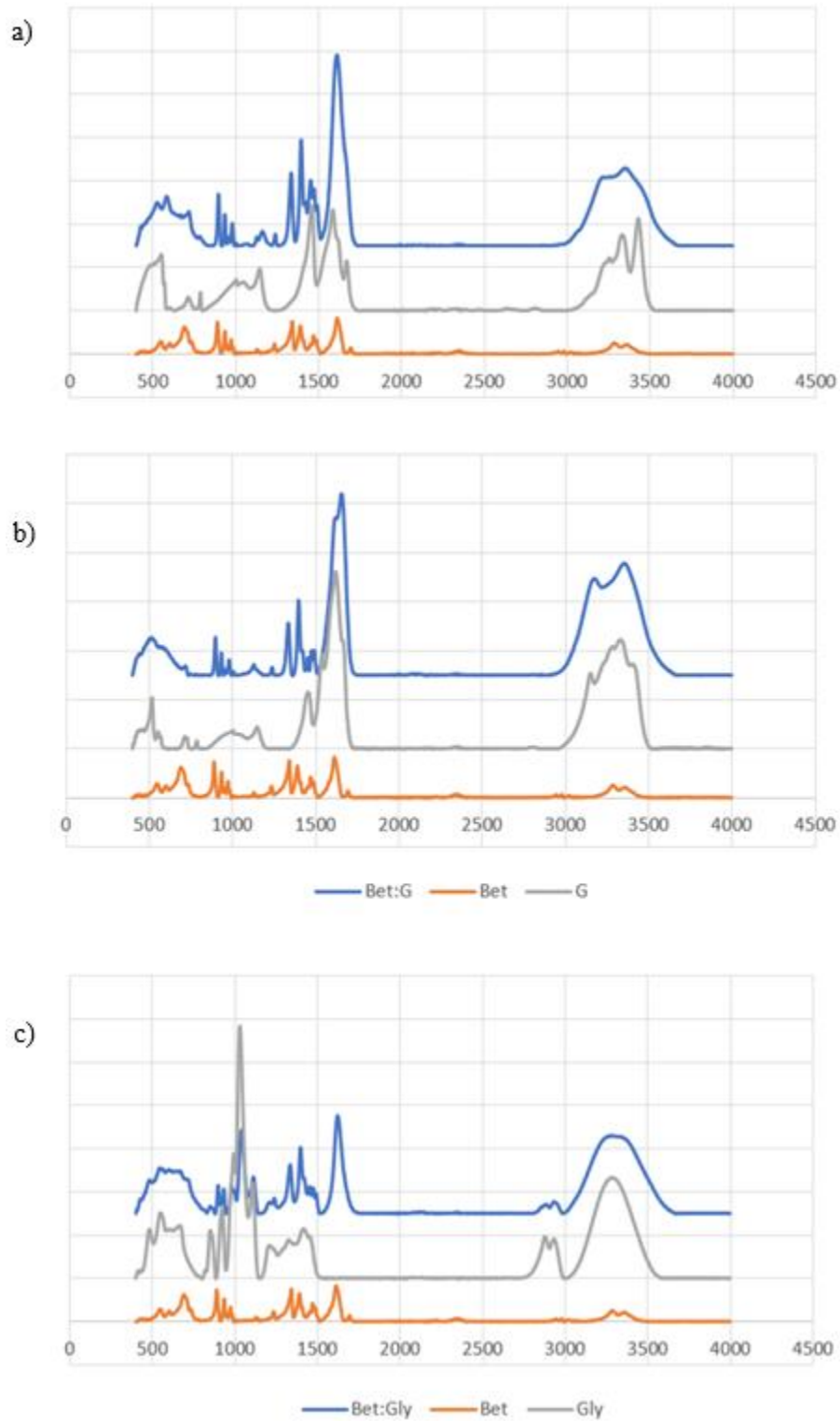
Formiranje osmoDES-ova potvrđeno je FTIR spektrima na temelju postojanosti vrpce koja se javlja između 3200 i 3600 cm^{-1} prisutne na svim spektrima razvijenih otapala, a označava prisutnost O-H vodikove veze nastale stvaranjem DES-ova (slika 5-9) (Jakubowska i sur., 2020). U spektru referentnog otapala na bazi kolin-klorida bilo je moguće potvrditi nestanak pika kolin-klorida koji odgovara simetričnom pružanju grupe CCN (1000 cm^{-1}), što se može pripisati uništavanju kristalne strukture čistih komponenti zbog pojave procesa taljenja (Delgado-Mellado i sur., 2018).



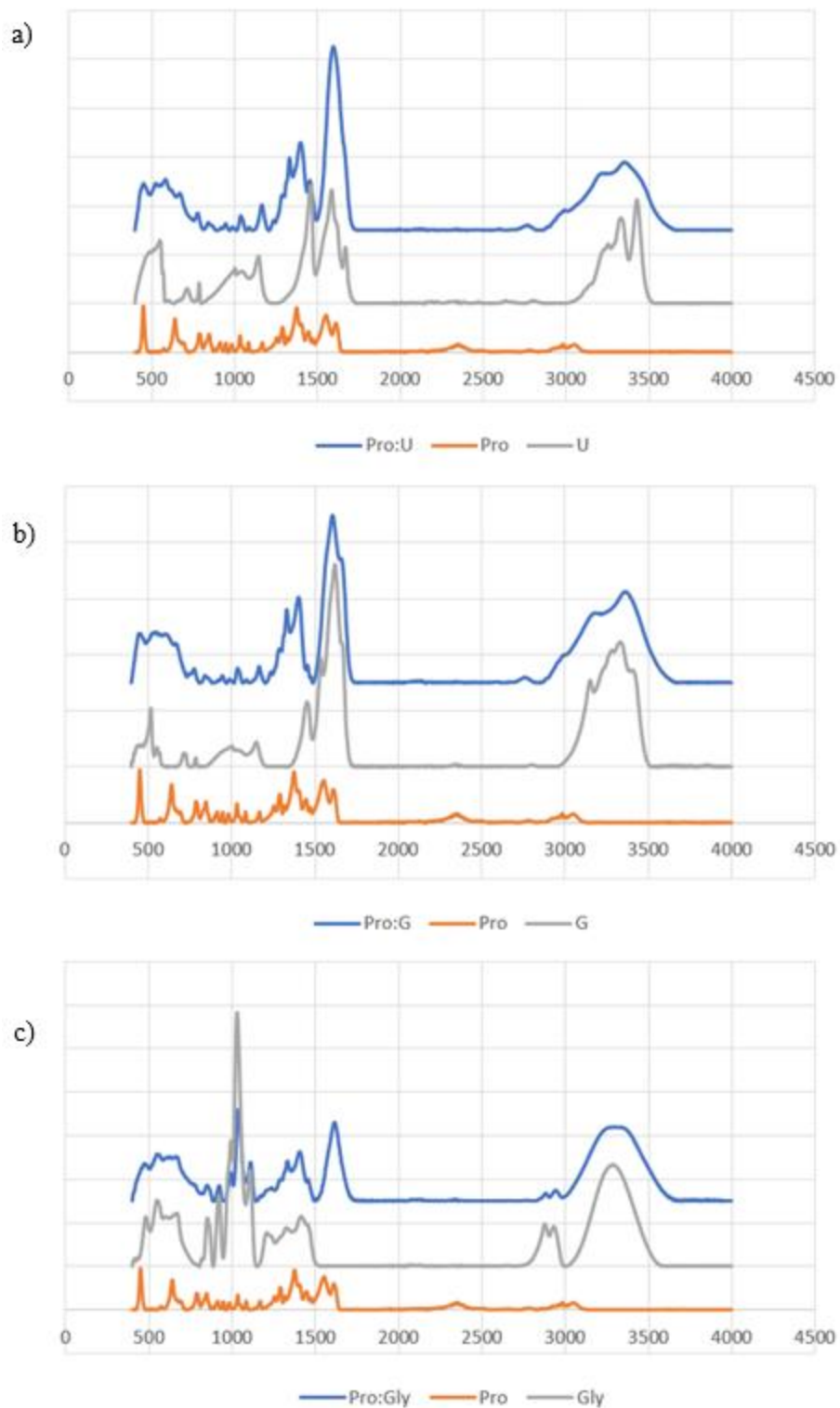
Slika 5. Usporedni prikaz infracrvenih spektara referentnog sustava na bazi kolin-klorida: a) ChCl:U, b) ChCl:G, c) ChCl:Gly te pojedinačnih komponenti od kojih se osmoDES pripravo



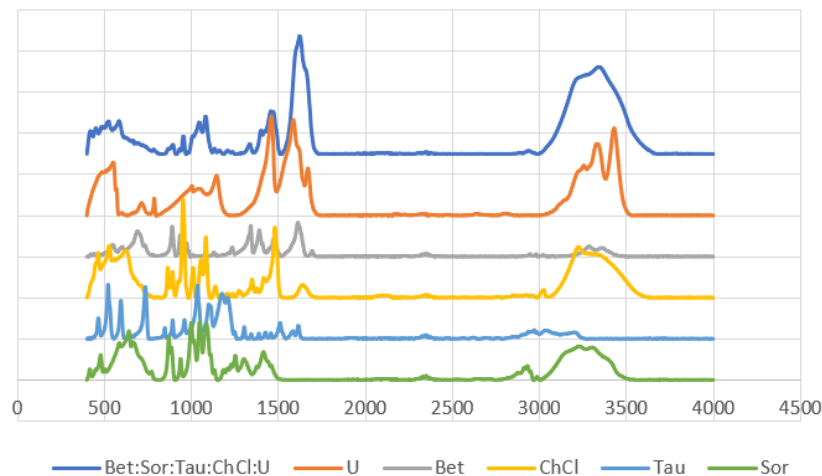
Slika 6. Usporedni prikaz infracrvenih spektara osmoDES-a na bazi sarkozina: a) Sar:U, b) Sar:G, c) Sar:Gly i pojedinačnih komponenti od kojih se osmoDES pripravo



Slika 7. Usporedni prikaz infracrvenih spektara osmoDES-a na bazi betaina: a) Bet:U, b) Bet:G, c) Bet:Gly i pojedinačnih komponenti od kojih se osmoDES pripravio



Slika 8. Usporedni prikaz infracrvenih spektara osmoDES-a na bazi prolina: a) Pro:U, b) Pro:G, c) Pro:Gly i pojedinačnih komponenti od kojih se osmoDES pripravo



Slika 9. Usporedni prikaz infracrvenih spektara bioinspiriranog višekomponentnog osmoDES-a Bet: Sor: Tau: ChCl: U i pojedinačnih komponenti od kojih se osmoDES pripravio

U sklopu rada provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija referentnog sustava i osmoDES-ova čiji su rezultati prikazani u tablici 5. Izmjereni parametri uključuju: gustoću, polarnost i pH na sobnoj temperaturi od 25 °C. Ova kombinacija mjerenja pružila je korisne informacije o sastavu i interakcijama komponenata u eutektičkoj smjesi, doprinoseći tako boljem razumijevanju svojstava i ponašanja formiranog osmoDES-a.

Raspon pH vrijednosti otapala u priloženim podacima kreće se između 4,74 i 8,11. Otapala pokazuju različite stupnjeve kiselosti i lužnatosti. Na vrijednost pH najveći utjecaj imaju početne komponente otapala, odnosno HBA i HBD. DES-ovi koji sadrže organske kiseline su, kao što se očekuje, kiseliji od onih koji sadrže polialkohole ili šećere, što je u skladu s rezultatima objavljenim u Panić i sur. (2022). Također, za DES-ove koji sadrže HBD ureu se očekuje da će biti lužnatija, od primjerice otapala koja sadrže HBD gvanidin, u obliku gvanidin hidroklorida, čiji pH je obično niži (Tiecco i sur., 2019). Najveću lužnatost, tj. najveću vrijednost pH ima otapalo betain:urea (Bet:U) čiji pH iznosi oko 8, dok je najkiselije otapalo s najnižim pH referentni sustav kolin-klorid:gvanidin (ChCl:G) s vrijednošću od 4,74, kojeg blisko slijedi otapalo sarkozin:gvanidin (Sar:G) s pH 4,80. Otapala koja kao jednu od komponenti sadrže ureu imaju veći iznos pH u odnosu na ostale donore u interakciji sa jednim od akceptora, dok otapala koja sadrže HBD gvanidin imaju najnižu vrijednost pH, odnosno veću kiselost od otapala ostalih donora istog akceptora. Primjerice, u otapalima koja sadrže HBA kolin-klorid, najveći pH postignut je u interakciji s HBD ureom (ChCl:U) u iznosu od 7,70, a najmanji pH se pojavljuje u kombinaciji s

donorom gvanidinom (ChCl:G) čija je vrijednost pH 4,74. Najveće vrijednosti pH su postignute uglavnom prilikom korištenja betaina kao akceptora vodikove veze u usporedbi s drugim HBA, dok najniži pH imaju otapala na bazi sarkozina. S obzirom na varijaciju pH vrijednosti otapala u navedenim podacima možemo zaključiti da osmoDES-ovi pružaju široki raspon kiselosti i alkalnosti. Ova fleksibilnost može biti od velikog značaja u primjeni otapala gdje je precizno upravljanje pH-om od esencijalne važnosti.

Na temelju dostupnih podataka, uočava se da gustoće pripremljenih niskotemperaturnih eutektičkih otapala variraju između 877,05 mg cm⁻³ i 1194,30 mg cm⁻³. Usporedbom rezultata primijećeno je da sva otapala, osim osmoDES-a sarkozin:glicerol (Sar:Gly), na sobnoj temperaturi od 25 °C imaju veću gustoću od gustoće vode ($\rho(\text{H}_2\text{O}) = 1000 \text{ mg cm}^{-3}$). Već spomenuto u poglavlju 2.1.1., uobičajeno većina DES-ova spada u raspon gustoća većih od vode na sobnoj temperaturi prema literaturnim podacima u iznosu 1,0–1,35 g cm⁻³ (Tang i Row, 2013). Najveću vrijednost gustoće ima otapalo prolin:gvanidin (Pro:G) koja iznosi 1194,30 mg cm⁻³ te ga blisko slijede otapala sarkozin:gvanidin (Sar:G) s gustoćom od 1193,00 mg cm⁻³ i sarkozin:urea (Sar:U) s vrijednošću gustoće u iznosu od 1191,85 mg cm⁻³. Najmanja gustoća uočena je kod otapala sarkozin:glicerol u iznosu od 877,05 mg cm⁻³ te je jedino otapalo čija je gustoća manja od gustoće vode. OsmoDES-ovi u kojima je prisutan donor vodikove veze gvanidin u prosjeku imaju veću gustoću u usporedbi sa gustoćom formiranih otapala ostalih donora vodikove veze, glicerola i uree. Otapala koja sadrže HBD glicerol najčešće imaju nižu vrijednost gustoće od otapala koja sadrže ostale donore. Primjerice, gustoća otapala koje se sastoji od akceptora sarkozina te donora gvanidina iznosi 1193,30 mg cm⁻³ te je veća u usporedbi sa gustoćom DES-ova koji sadrži ureu i glicerol čije su vrijednosti gustoće 1191,85 mg cm⁻³ (Sar:U) i 877,05 mg cm⁻³ (Sar:Gly). Iz navedenih podataka se primjeti kako je gustoća otapala koje sadrži donor glicerol uistinu najniža u odnosu na otapala koja se sastoje od drugih donora. Na temelju raspona gustoća ova otapala nude široki spektar mogućnosti za različite primjene, ovisno o specifičnim potrebama procesa ili reakcija u kojima se koriste. Različite kombinacije akceptor-donor parova pružaju fleksibilnost u dizajnu otapala, omogućujući optimizaciju svojstava otapala za određene uvjete ili primjene.

Polarnost eutektičkih otapala izuzetno je važno svojstvo, jer utječe na sposobnost otapanja raznih organskih i anorganskih spojeva (Dai i sur., 2013). Vrijednosti molarne tranzicijske energije (E_{NR}) otapala pri valnoj duljini od 450 nm u navedenim podacima variraju u iznosima od 49,05 do 49,93

kcal mol⁻¹, pri čemu otapala s nižom vrijednosti ukazuju na veću polarnost. Vrijednosti polarnosti ispitanih osmoDES-ova međusobno nemaju značajno velike razlike. Štoviše, razlika u polarnosti između najpolarnijeg otapala i najmanje polarnog otapala iznosi svega 0,88 kcal mol⁻¹. Navedeni podaci su u skladu s istraživanjima provedenih od strane Dai i sur. (2013) koji su proveli fizikalno-kemijsku karakterizaciju svojstva 13 najčešće korištenih DES-ova, te Craveiro i sur. (2016) koji su u svom radu odredili polarnost 11 eutektičkih otapala. Oba istraživanja su dala slične rezultate sa zaključkom da DES-ovi temeljeni na organskim kiselinama su najpolarniji, dok su najmanje vrijednosti polarnosti uočene kod DES-ova na bazi šećera i poliola. Najveću polarnost ima otapalo betain:urea (Bet:U) čija vrijednost molarne tranzicijske energije iznosi 49,93 kcal mol⁻¹, dok je najmanja polarnost uočena kod dva otapala, sarkozin:gvanidina (Sar:G) te betain:gvanidina (Bet:G) u iznosu od 49,05 kcal mol⁻¹.

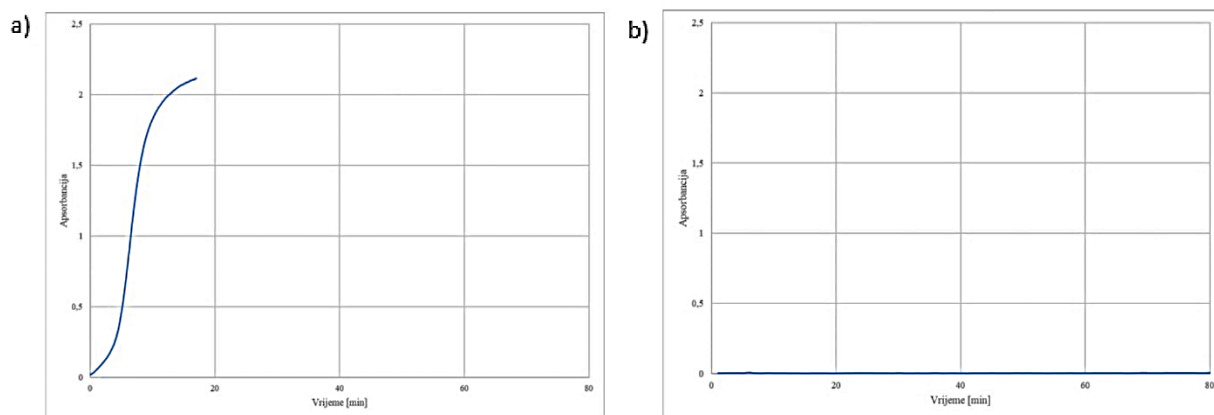
4.2. STABILNOST LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA PRI VISOKIM TEMPERATURAMA

4.2.1. Agregacija lizozima tijekom inkubacije pri 90 °C

Agregacija proteina, problem koji se često javlja tijekom presavijanja proteina, njihove solubilizacije proteina i skladištenja, predstavlja značajan izazov za razne industrije temeljene na proteinima. Proteinska agregacija može rezultirati gubitkom aktivnosti proteina, a u slučaju određenih terapijskih proteina, može dovesti i do nepoželjnih imunogenih odgovora. Pogrešno savijeni proteini imaju tendenciju stvaranja agregata s drugim pogrešno savijenim proteinima kako bi stabilizirali svoju konformaciju (Soto, 2003). Jednostavan, praktičan i uobičajen pristup rješavanja ovog problema je uporaba ekscipijensa u otopini. Različiti aditivi poput poliola, aminokiselina i slično, često se koriste u otopinama kako bi se smanjila ili potisnula agregacija proteina.

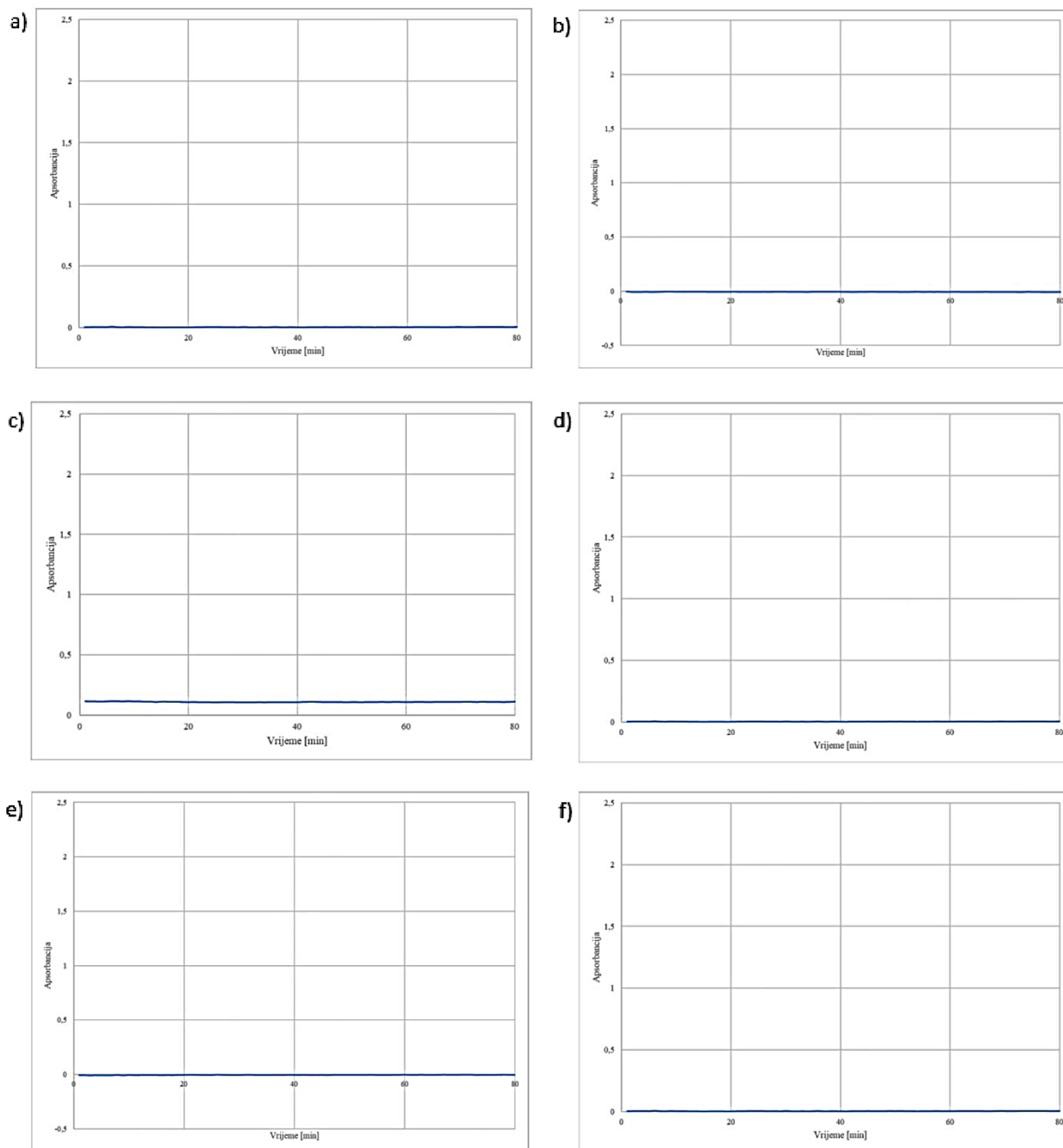
U ovom radu provedena je toplinski inducirana agregacija proteina lizozima pri 90 °C u referentnom puferu, referentnom sastavu koji uključuje DES-ove kolin-klorid:ureu, kolin-klorid:gvanidin, kolin-klorid:glicerol te osmoDES-ovima: betain:urea, betain:gvanidin, betain:glicerol, sarkozin:urea, sarkozin:gvanidin, sarkozin:glicerol, prolin:urea, prolin:gvanidin, prolin:glicerol, te bioinspiriranom višekomponentnom osmoDES-u betain:sorbitol:taurin:kolin-klorid:urea. Rezultati se nalaze na slikama 10-12.

Porast apsorbancije nakon izvršenog eksperimenta vidljiv je samo kod pufera (slika 10a). Kod referentnog sustava na bazi koln-klorida i ostalih pripremljenih osmoDES-ova nije došlo do porasta apsorbancije, te je rezultat ostao oko 0. Na temelju tih rezultata može se utvrditi da je agregacija prisutna samo kod pufera, dok kod ostalih otapala ne dolazi do stvaranja agregata. S obzirom da je agregacija nepoželjna pojava u odvijanju procesa, može se zaključiti da je pohrana u osmoDES-ovima pokazala puno bolje rezultate u usporedbi sa referentnim puferom.

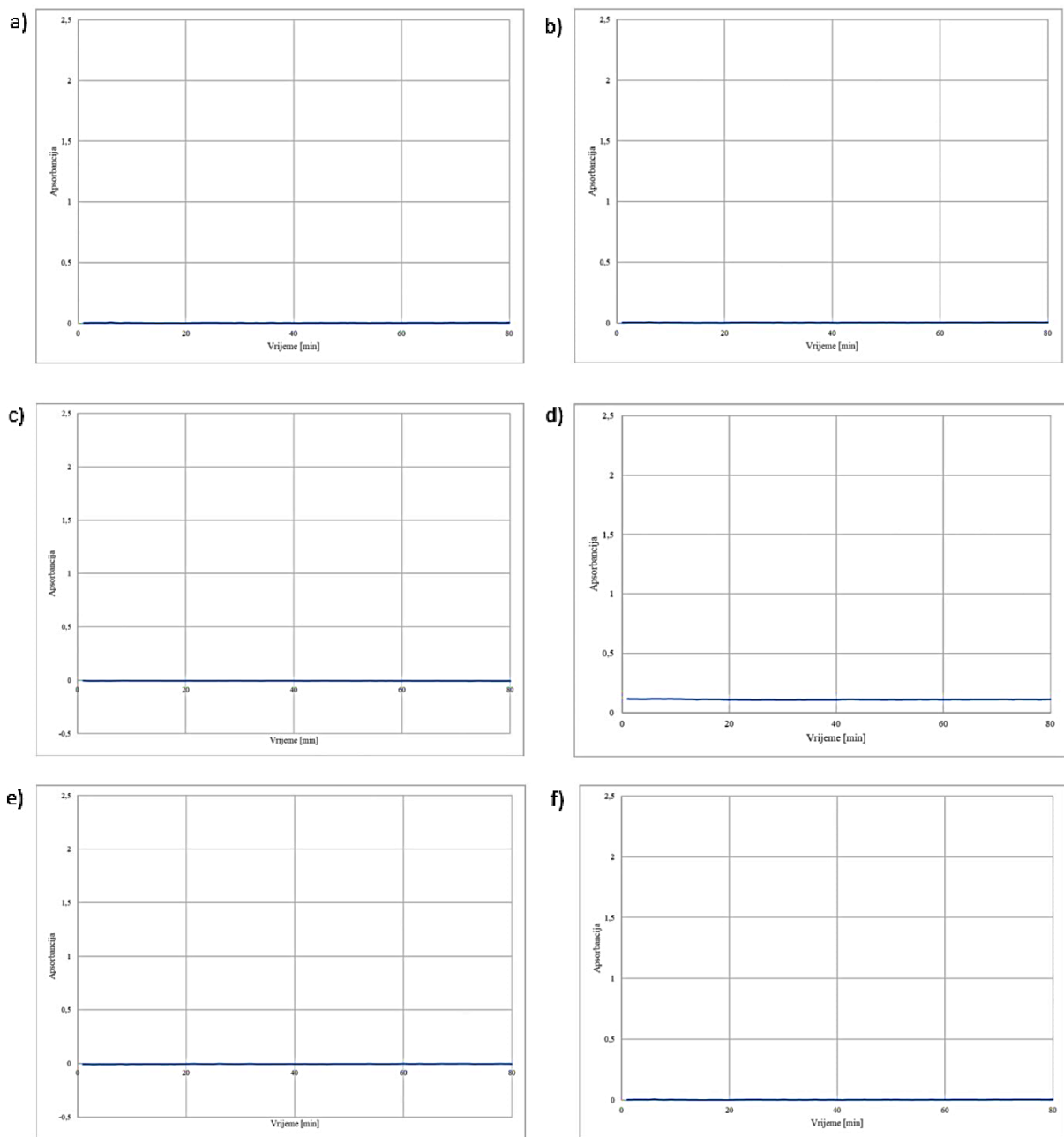


Slika 10. Promjena u apsorbanciji ($\lambda = 600$ nm) tijekom izlaganja lizozima u različitim DES-ovima pri 90 °C; a) pufer, b) bioinspirirani višekomponentni osmoDES Bet: Sor: Tau: ChCl: U

*Bet – betain, Sor – sorbitol, Tau – taurin, ChCl – koln-klorid, U - urea



Slika 11. Promjena u apsorbanciji ($\lambda = 600 \text{ nm}$) tijekom izlaganja lizozima u različitim DES-ovima pri $90 \text{ }^\circ\text{C}$; a) kolin-klorid:urea, b) betain:urea, c) kolin-klorid:gvanidin, d) betain:gvanidin, e) kolin-klorid:glicerol, f) betain:glicerol



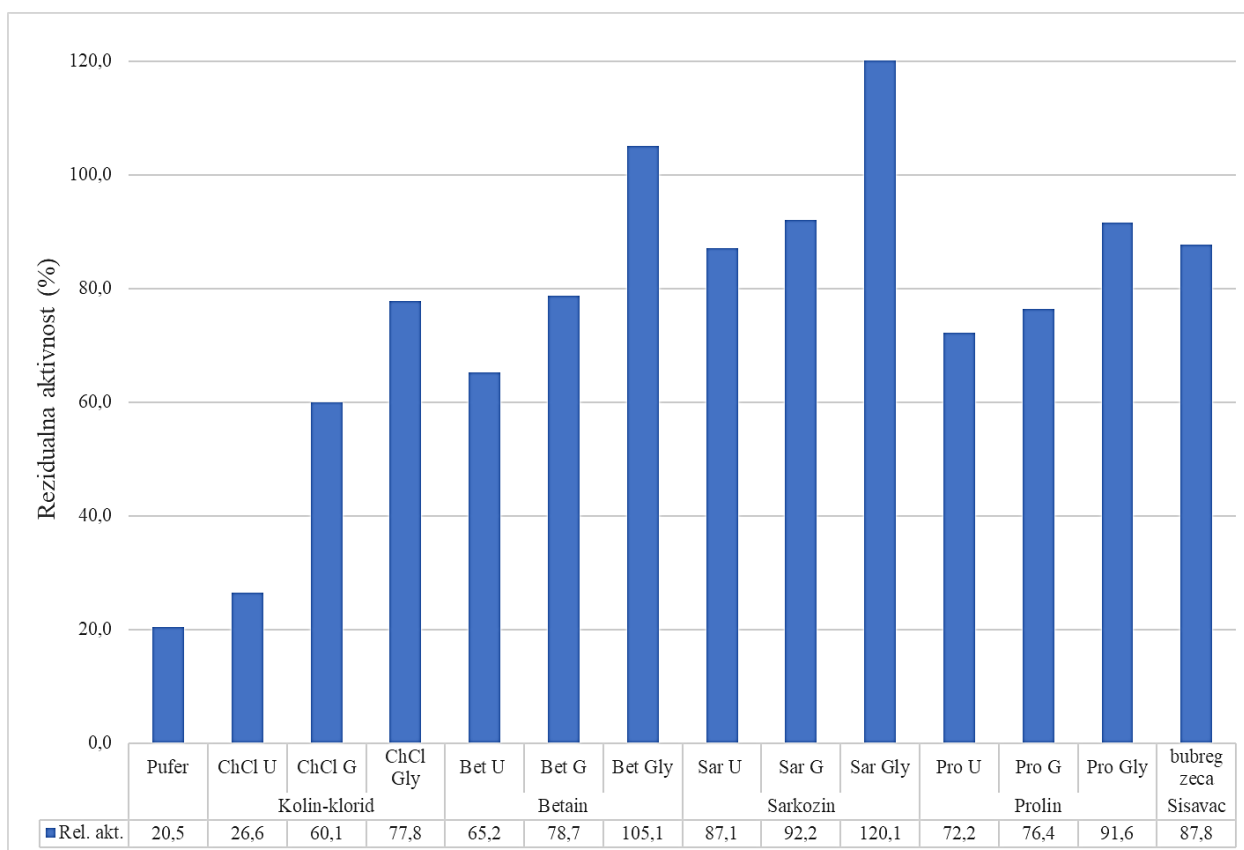
Slika 12. Promjena u apsorbanciji ($\lambda= 600 \text{ nm}$) tijekom izlaganja lizozima u različitim DES-ovima pri $90 \text{ }^\circ\text{C}$; a) sarkozin:urea, b) prolin:urea, c) sarkozin:gvanidin, d) prolin:gvanidin, e) sarkozin:glicerol, f) prolin:glicerol

4.2.2. Rezidualna aktivnost lizozima nakon inkubacije pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$

Kako bi se pokazalo da osmoDES-ovi imaju potencijal stabilizacije proteina pri ekstremnim uvjetima, u radu je praćeno ponašanje lizozima u navedenim otapalima tijekom inkubacije pri

povišenoj temperaturi (80 °C) praćenjem agregacije enzima te rezidualne aktivnosti nakon inkubacije.

Stabilnost modelnog proteina lizozima praćena je u pripremljenim osmoDES-ovima kako bi se pokazao njihov potencijal kao tekućih medija za pohranu biomolekula. Enzimska aktivnost praćena je prije i poslije inkubacije na temperaturi od 80 °C korištenjem UV/VIS spektrofotometrijske metode. Rezultat eksperimenta prikazan je na slici 13. Rezidualna aktivnost (%) dobivena je računanjem početne brzine reakcije koju je enzim ostvario nakon inkubacije, u usporedbi s brzinom reakcije izmjerenom prije nego što je uzorak bio izložen uvjetima inkubacije.



Slika 13. Rezidualna aktivnost proteina lizozima nakon inkubacije pri 80 °C u puferu, referentnom sustavu na bazi kolin-klorida te odgovarajućim dvokomponentnim osmoDES-ovima na bazi betaina, sarkozina, prolina i višekomponentnom bioinspiriranom osmoDES-u
 *ChCl – kolin-klorid, Bet – betain, Sar – sarkozin, Pro – prolina, U – urea, G – gvanidin, Gly - glicerol

Kao što je vidljivo na slici 13, svi pripremljeni osmoDES-ovi nakon sat vremena inkubacije na temperaturi od 80 °C pokazuju veće vrijednosti relativne aktivnosti u usporedbi s referentnim puferom koji zadržava 20,5 % početne enzimske aktivnosti proteina lizozima.

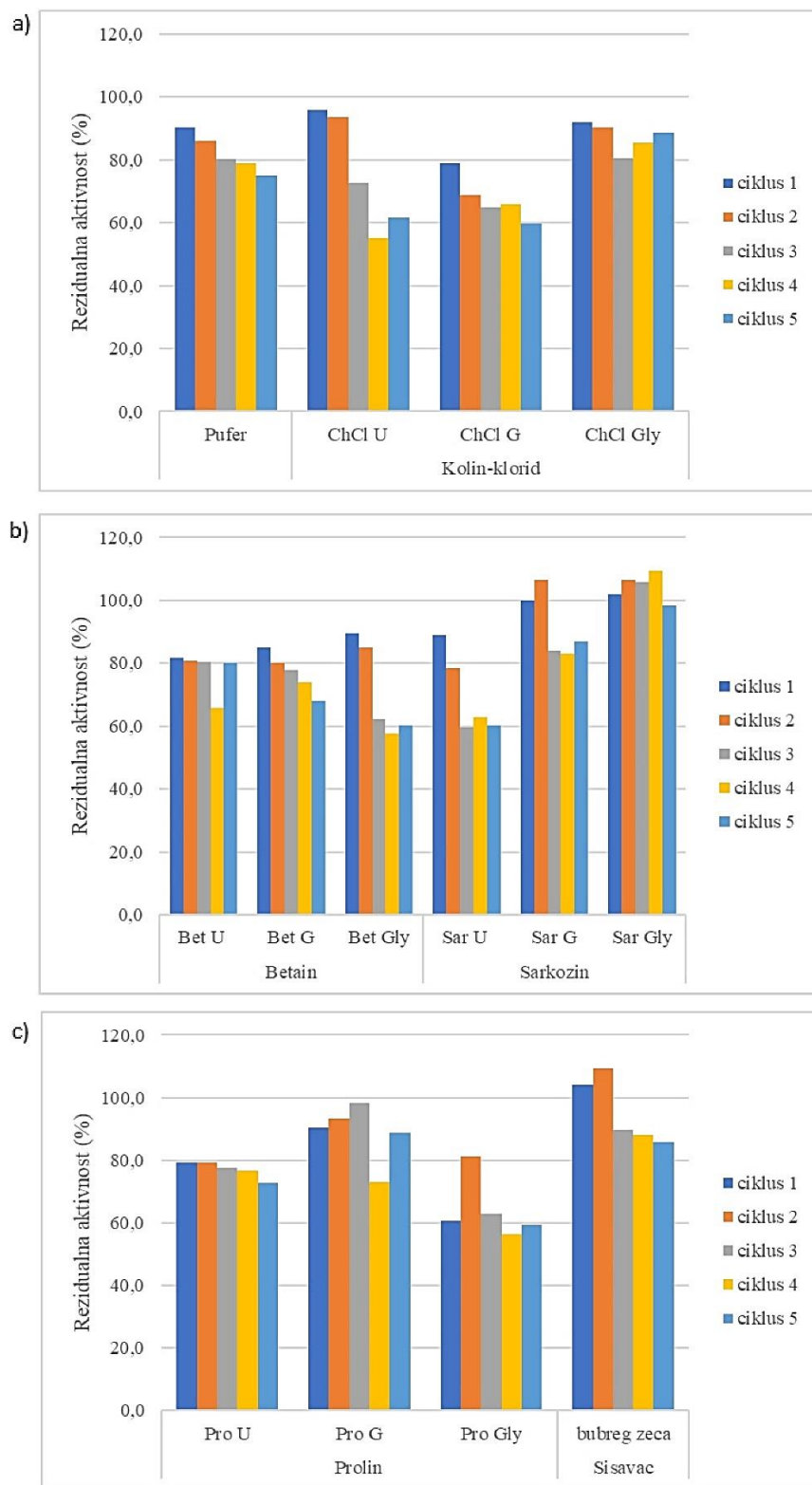
Gotovo svi pripremljeni osmoDES-ovi zadržavaju više od 60 % relativne aktivnosti, izuzev referentnog otapala kolin-klorid:urea (ChCl:U) koje pokazuje destabilizacijski učinak na funkcionalnost testiranog proteina lizozima.

Prisutnost sarkozina kao HBA pokazalo se najpovoljnijim za aktivnost enzima lizozima. Dobru stabilizaciju također omogućuju otapala betain:glicerol (Bet:Gly) sa relativnom aktivnošću od 105,1 % te otapalo prolin:glicerol (Pro:Gly) čija aktivnost iznosi 91,6 %. Međutim, bioinspirirani višekomponentni osmoDES koji sadrži iste osmolite kao i DES kolin-klorid:urea, kolin-klorid, pokazuje izvrsne sposobnosti stabilizacije proteina čija rezidualna aktivnost nakon inkubacije iznosi 87,8 %, što ukazuje na to da prisutnost dodatnih osmolita u multikomponentnom DES-u, poput betaina, sorbitola i taurina, u omjerima repliciranim iz prirodne okoline drastično poboljšava sposobnost DES-a da stabilizira protein. Najveći stabilizacijski učinak pokazuje otapalo sarkozin:glicerol (Sar:Gly) s najvišom vrijednošću relativne aktivnosti koja iznosi 120,1 %.

S obzirom da su gotovo svi formirani osmoDES-ovi pokazali visoke vrijednosti relativne aktivnosti nakon inkubacije, rezultati sugeriraju da DES-ovi bazirani na osmolitima pokazuju veliki potencijal stabilizacije proteinskog uzorka pohranjenog na povišenim temperaturama u usporedbi sa standardnom metodom pohrane lizozima, puferom. Ovi rezultati potvrđuju prethodno zapažanje koje je napravljeno sa glicinom i betainom (Arakawa i Timasheff, 1983) i ostalim osmolitima (Arakawa i Timasheff, 1985) gdje su potvrđeni kao stabilizatori proteinske strukture.

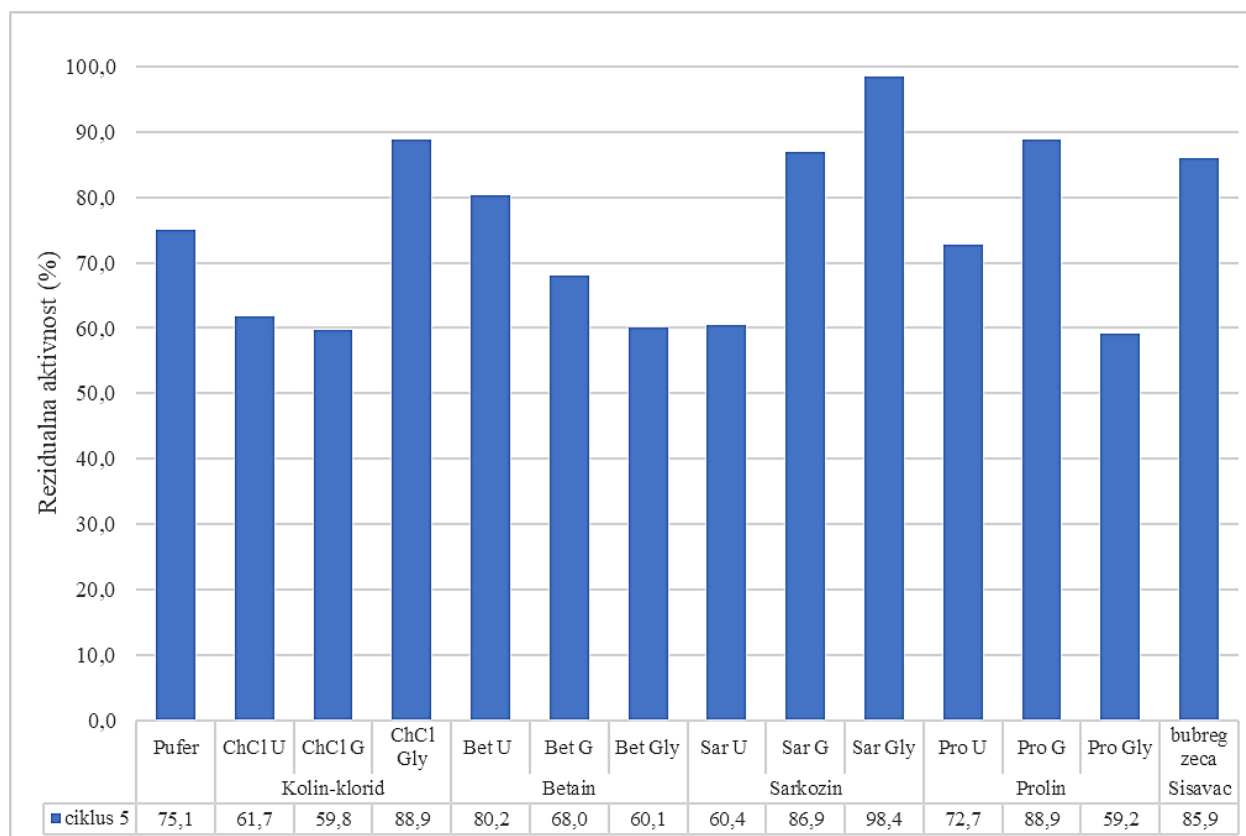
4.3. ODREĐIVANJE REZIDUALNE AKTIVNOSTI LIZOZIMA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA NA BAZI OSMOLITA NAKON INKUBACIJE PRI NISKIM TEMPERATURAMA

S obzirom na izvrsne rezultate termostabilizacije proteina lizozima u osmoDES-ovima, sljedeći korak bio je istražiti sposobnost stabilizacije proteina i pri niskim temperaturama. Enzimska aktivnost modelnog proteina lizozima praćena je pri temperaturama od -14 °C te -80 °C. Eksperiment je trajao 5 dana, te se sastojao od 5 ciklusa zamrzavanja, gdje su tijekom svakog od ciklusa uzorci bili pohranjeni u hladnjaku 24 sata. Stabilnost i funkcionalnost proteina praćena je korištenjem analitičke metode UV/VIS spektrofotometrije mjerenjem rezidualne aktivnosti čiji su rezultati prikazani na slikama 14 i 15. Rezidualna aktivnost (%) dobivena je računanjem na isti način kao kod mjerenja na visokim temperaturama.



Slika 14. Rezidualna aktivnost proteina lizozima nakon svakog ciklusa inkubacije pri -14 °C. a) pufer, ChCl:U, ChCl:G i ChCl:Gly b) Bet:U, Bet:G, Bet:Gly, Sar:U, Sar:G i Sar:Gly c) Pro:U, Pro:G, Pro:Gly i bioinspirirano višekomponentno otapalo
 *ChCl – kolin-klorid, Bet – betain, Sar – sarkozin, Pro – prolin, U – urea, G – gvanidin, Gly - glicerol

Radi lakšeg pregleda, na slici 15 su prikazani pojednostavljeni rezultati ukupne rezidualne aktivnosti nakon svih izvršenih ciklusa zamrzavanja.



Slika 15. Rezidualna aktivnost proteina lizozima nakon inkubacije pri -14 °C u puferu, referentnom sustavu na bazi kolin-klorida te odgovarajućim dvokomponentnim osmoDES-ovima na bazi betaina, sarkozina, prolina i višekomponentnom bioinspiriranom osmoDES-u
*ChCl – kolin-klorid, Bet – betain, Sar – sarkozin, Pro – prolin, U – urea, G – gvanidin, Gly – glicerol

Nakon izlaganja niskoj temperaturi od -14 °C najvišu aktivnost pokazuje enzim inkubiran u osmoDES-u sarkozin:glicerol (Sar:Gly) koji nakon 5 ciklusa zamrzavanja zadržava 98,4 % početne aktivnosti. Postotak aktivnosti lizozima je gotovo nepromijenjen od početne enzimske aktivnosti proteina te navedeni osmoDES ima najveći stabilizacijski učinak na lizozim. Najmanju aktivnost pokazuje enzim inkubiran u otapalu prolina:glicerol (Pro:Gly) čija je enzimska aktivnost pala na 59,2 % početne aktivnosti enzima lizozima.

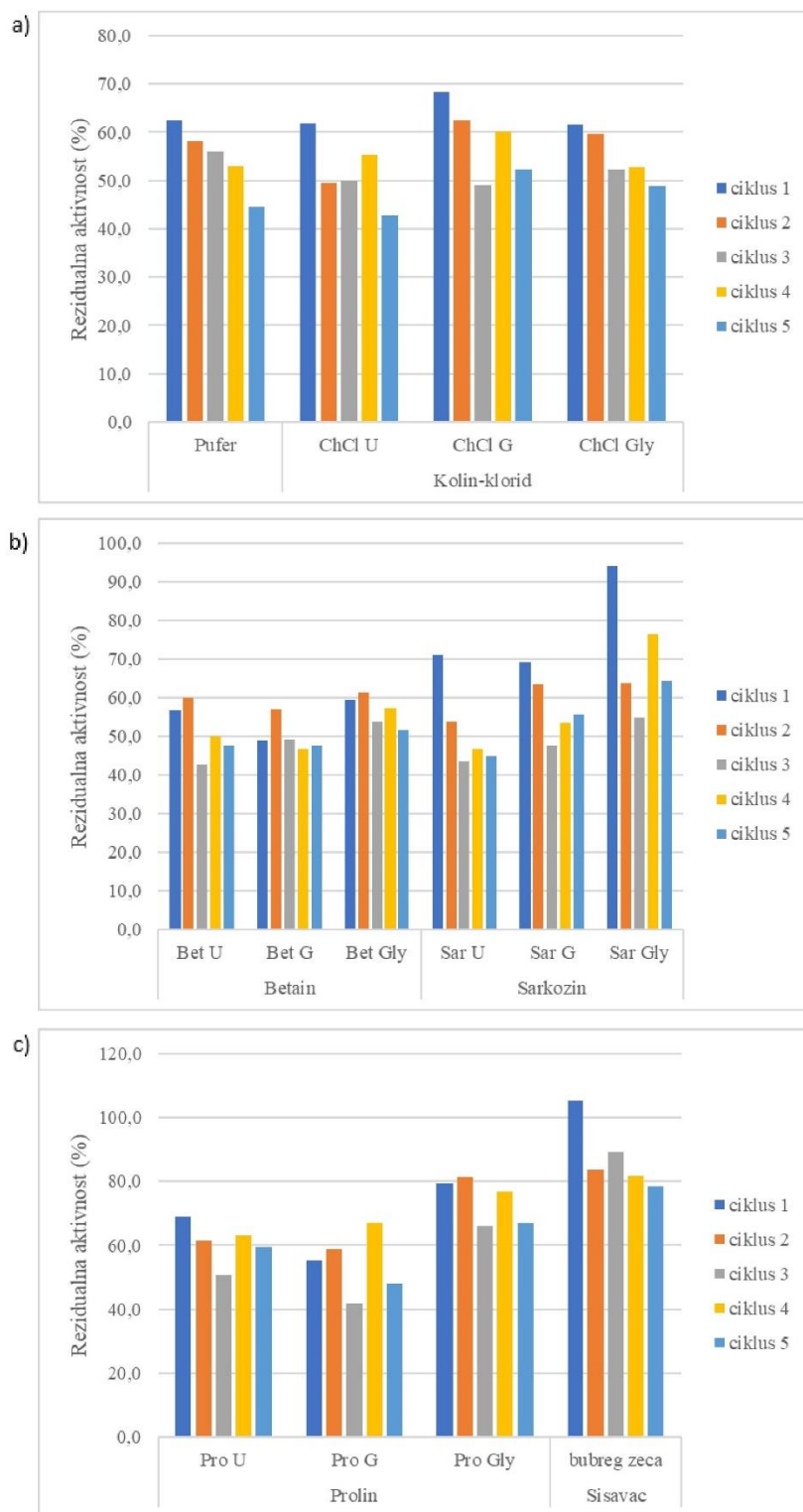
Najveći postotak relativne aktivnosti pokazuju osmoDES-ovi koji sadrže akceptor sarkozin, dok je najmanja aktivnost detektirana kod akceptora vodikove veze betaina.

Gotovo pola pripremljenih osmoDES-ova pokazuju veću rezidualnu aktivnost enzima lizozima u usporedbi s puferom čija aktivnost iznosi 75,1 % početne aktivnosti, dok druga polovica ima gotovo istu ili nižu aktivnost u odnosu na pufer.

Povoljan utjecaj na stabilizaciju proteina u usporedbi sa standardnim puferom pokazuju također otapala prolin:gvanidin (Pro:G) te referentni sustav kolin-klorid:glicerol (ChCl:Gly) s vrijednošću rezidualne aktivnosti od 88,9 %. Blisko ga slijedi dvokomponentno eutektičko otapalo sarkozin:gvanidin (Sar:G) s iznosom aktivnosti od 86,9 % te bioinspirirano višekomponentno otapalo čija je rezidualna aktivnost 85,9 %. Stabilizacijski učinak veći od utjecaja pufer također ima i osmoDES betain:urea (Bet:U) u iznosu od 80,2 % početne enzimske aktivnosti.

Destabilizacijski učinci u usporedbi s referentnim puferom primijećeni su također kod referentnog otapala kolin-klorid:gvanidin (ChCl:G) čija rezidualna aktivnost iznosi 59,8 % te kod osmoDES-a betain:glicerol (Bet:Gly) s iznosom aktivnosti od 60,1 %. Slijede ih otapala sarkozin:urea (Sar:U) s enzimskom aktivnošću od 60,4 % i kolin-klorid:urea (ChCl:U) sa 61,7 % rezidualne aktivnosti. Otapala betain:gvanidin (Bet:G) i prolin:urea (Pro:U) imaju nešto više vrijednosti aktivnosti, međutim nedovoljno visoke da bi nadmašile rezultat standardnog pufera.

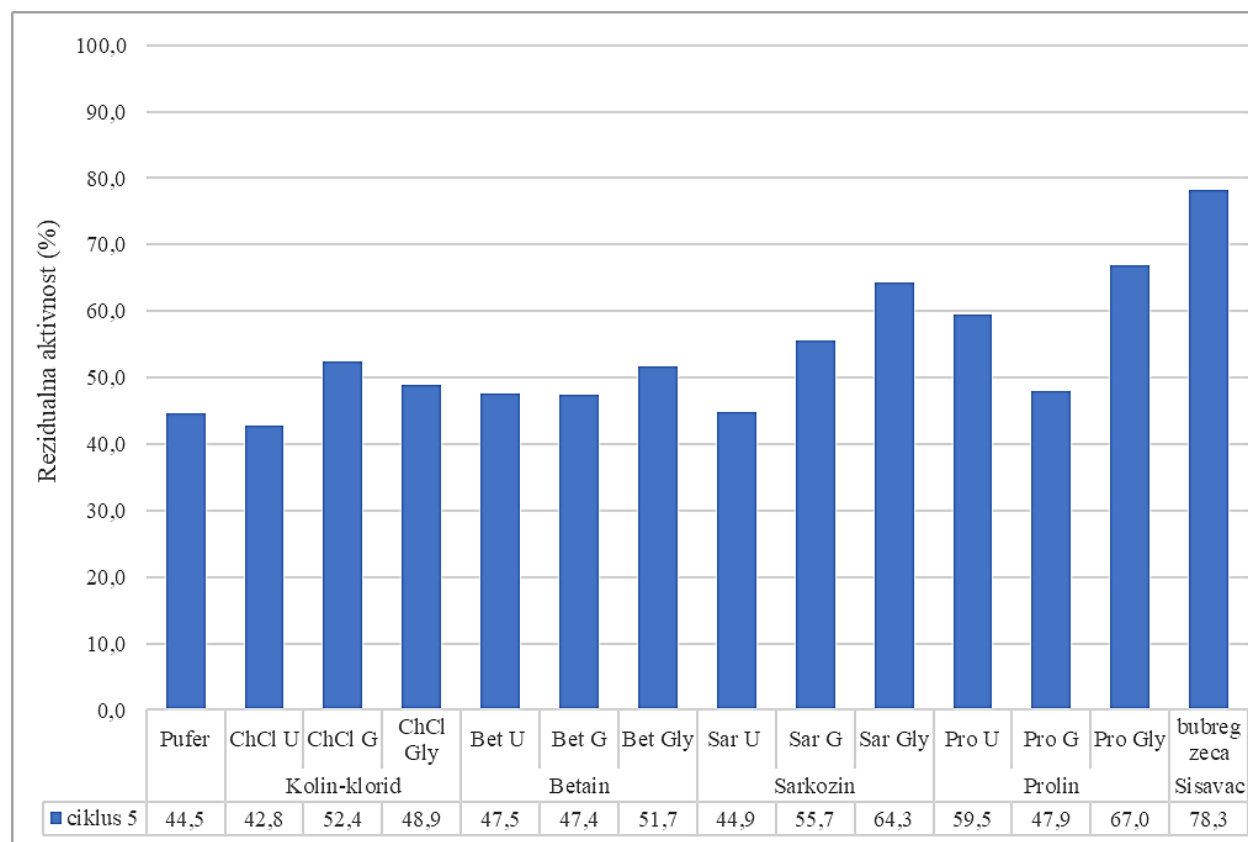
Enzimska aktivnost proteina lizozima također je praćena u ekstremnim uvjetima pri temperaturi od -80 °C tijekom 5 ciklusa zamrzavanja u trajanju od 5 dana, a rezultati rezidualne aktivnosti pojedinačnih osmoDES-ova nakon svakog ciklusa su prikazani na slici 16.



Slika 16. Reidualna aktivnost proteina lizozima nakon svakog ciklusa inkubacije pri -80 °C a) pufer, ChCl:U, ChCl:G i ChCl:Gly b) Bet:U, Bet:G, Bet:Gly, Sar:U, Sar:G i Sar:Gly c) Pro:U, Pro:G, Pro:Gly i bioinspirirano višekomponentno otapalo

*ChCl – kolin-klorid, Bet – betain, Sar – sarkozin, Pro – prolin, U – urea, G – gvanidin, Gly - glicerol

Radi lakšeg pregleda, ukupni rezultati nakon svih ciklusa zamrzavanja prikazani su na slici 17.



Slika 17. Rezidualna aktivnost proteina lizozima nakon inkubacije pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u puferu, referentnom sustavu na bazi kolin-klorida te odgovarajućim dvokomponentnim osmoDES-ovima na bazi betaina, sarkozina, prolina i višekomponentnom bioinspiriranom osmoDES-u
*ChCl – kolin-klorid, Bet – betain, Sar – sarkozin, Pro – prolin, U – urea, G – gvanidin, Gly – glicerol

Rezultati eksperimenta pokazuju da svi pripremljeni osmoDES-ovi imaju bolji stabilizacijski učinak na protein lizozim u usporedbi s referentnim puferom. Otapalo referentnog sustava kolin-klorid:urea jedini ima destabilizacijski učinak. Enzimska aktivnost mu je pala na 42,8 % početne aktivnosti enzima lizozima, u odnosu na 44,5 % aktivnosti standardnog pufera.

Međutim, zgodno je primijetiti kako nakon inkubacije pri temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ najveću enzimsku aktivnost pokazuje bioinspirirano višekomponentno eutektičko otapalo pripravljeno prema uzorku raspodjele osmolita u bubregu zeca *Oryctolagus cuniculus*, koje nakon 5 ciklusa zamrzavanja zadržava 78,3 % početne aktivnosti koje sadrži komponente kolin-klorid i ureu, gdje ponovno možemo zaključiti kako dodatak drugih osmolita u smjesu uistinu utječe na sposobnost stabilizacije proteina.

Visoke rezultate iznad 60 % preostale aktivnosti daju i osmoDES-ovi prolin:glicerol (Pro:Gly) s aktivnosti od 67 % te sarkozin:glicerol (Sar:Gly) čija aktivnost iznosi 64,3 % početne enzimske aktivnosti proteina lizozima. Najveći postotak relativne aktivnosti pokazuju osmoDES-ovi koji sadrže akceptor vodikove veze sarkozin te bioinspirirano višekomponentno otapalo. Najmanja aktivnost detektirana je kod osmoDES-ova na bazi akceptora betaina i kolin-klorida.

S obzirom da gotovo sva pripremljena otapala pokazuju povoljnije učinke od referentnog pufera, može se primijetiti da osmoDES-ovi pokazuju veliki potencijal pohrane medija i očuvanja aktivnosti proteinskih uzoraka pri ekstremnim temperaturama. Eksperimentalno je utvrđeno da snižavanjem temperature osmoDES-ovi ne gube mogućnost stabilizacije proteina, već pokazuju upravo suprotan učinak u usporedbi sa standardnim puferom. Činjenica da osmoDES-ovi pokazuju pozitivan utjecaj ne samo pri povišenim temperaturama, već i pri ekstremno niskim pruža nove perspektive u primjeni takvih otapala u procesima stabilizacije te pohrane enzima i drugih biomakromolekula. Rekreacija uzoraka distribucije osmolita u biološkim okolinama ujedno doprinosi kreiranju ne samo dvokomponentnih već i novih višekomponentnih DES-ova s izuzetnim stabilizacijskim sposobnostima, pružajući nove pristupe za očuvanje proteina i aktivnosti, bez potrebe za dodatnim ekscipijensima.

5. ZAKLJUČCI

Svrha ovog rada bila je priprema dvokomponentnih i bioinspiriranih višekomponentnih osmoDES-ova repliciranjem uvjeta distribucije u njihovoj prirodnoj okolini. Također je ispitan utjecaj formiranih osmoDES-ova na stabilizaciju proteina lizozima pri ekstremnim temperaturama te utjecaj na nastajanje proteinskih agregata.

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

1. Procesom toplinski inducirane agregacije pri temperaturi od 90 °C nije došlo do stvaranja agregata niti u jednom od pripremljenih osmoDES-ova u usporedbi sa referentnim puferom u kojem je prisutna proteinska agregacija.
2. Akceptori vodikove veze sarkozin, prolin, betain i kolin-klorid u odgovarajućim molarnim omjerima i uspješno tvore niskotemperaturna eutektička otapala na bazi osmolita sa donorima vodikove veze ureom, gvanidinom i glicerolom, uz dodatak 40 % (w/w) vode.
3. Uspješno su replicirani uvjeti distribucije osmolita u bubregu sisavca (zec *Oryctolagus cuniculus*) te formirano bioinspirirano višekomponentno niskotemperaturno eutektičko otapalo.
4. Pripremljeni osmoDES-ovi iskazuju višu vrijednost rezidualne aktivnosti proteina te značajno poboljšanje u stabilizaciji proteina lizozima na povišenim temperaturama od 80 °C, u odnosu na konvencionalni pufer. Najveća rezidualna aktivnost enzima uočena je kod osmoDES-a sarkozin:glicerol.
5. Pri temperaturi od -14 °C polovica pripremljenih osmoDES-ova demonstrira veću rezidualnu aktivnost proteina u usporedbi sa referentnim puferom, dok pri temperaturi od -80 °C svi konstituirani osmoDES-ovi pokazuju veći stabilizacijski učinak na protein lizozim u odnosu na pufer, što je potvrđeno većim iznosom rezidualne aktivnosti. Najveću destabilizacijski učinak ima referentno otapalo kolin klorid:urea. Rezidualna enzimska aktivnost pri -14 °C najveća je u osmoDES-u sarkozin:glicerol, a pri -80 °C u bioinspiriranom višekomponentnom eutektičkom otapalu pripremljenom prema uzorku raspodjele osmolita u bubregu zeca *Oryctolagus cuniculus*.
6. Pripremljeni osmoDES-ovi imaju značajan potencijal za primjenu kao tekući skladišni medij proteina zbog svojih izuzetnih stabilizacijskih sposobnosti.

6. LITERATURA

Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed R (2004) Deep eutectic solvents formed between cholin chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc* **29**, 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah T (2003) Novel solvent properties of choline chloride/ urea mixtures. *Chem Commun* **1**, 70–71. <https://doi.org/10.1039/B210714G>

Anastas PT, Eghbali N (2010) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev* **39**, 301–312. <https://doi.org/10.1039/B918763B>

Anastas PT, Warner JC (1998) Green Chemistry Theory and Practice, Oxford University Press, New York

Arakawa T, Timasheff SN (1983) Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch Biochem Biophys* **224**, 169–177. [10.1016/0003-9861\(83\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90201-1)

Arakawa T, Timasheff SN (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**, 411–414. [10.1016/S0006-3495\(85\)83932-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(85)83932-1)

Cachel S (1986) The Growth of Biological Thought Revisited. *Am Anthropol* **88**, 452–454. <https://www.jstor.org/stable/677578>

Choi YH, Van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE i sur. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol* **156**, 1701–1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>

Craveiro R, Aroso I, Flammia V, Carvalho T, Viciosa MT, Dionísio M i sur. (2016) Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **215**, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>

Cvjetko Bubalo M, Andreou T, Panić M, Radović M, Radošević K, Radojčić Redovniković I (2023) Natural multi-osmolyte cocktails form deep eutectic systems of unprecedented complexity:

discovery, affordances and perspectives. *Green Chem* **9**, 3398–3417. <https://doi.org/10.1039/d2gc04796a>

Cvjetko Bubalo M, Jokić S, Radojčić Redovniković I, Vidović S (2015) Green Solvents for Green Technologies. *J Chem Technol Biotechnol* **90**, 1631–1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>

Czech L, Hermann L, Stoveken N, Richter AA, Hoppner A, Smits SHJ i sur. (2018) *Genes* **9**, 177. [10.3390/genes9040177](https://doi.org/10.3390/genes9040177)

Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>

Daneshjoo S, Khodaverdian S, Dabirmanesh B, Rahimi F, Daneshjoo S, Ghazi F i sur. (2017) Improvement of chondroitinases ABCI stability in natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **227**, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.11.130>

Delgado-Mellado N, Larriba M, Navarro P, Rigual V, Ayuso M, Garcia J (2018) Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis. *J Mol Liq* **260**, 37 – 43. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.076>

Du C, Zhao B, Chen XB, Birbilis N, Yang H (2016) Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid. *Sci Rep* **6**, 29225. <https://doi.org/10.1038/srep29225>

García SA, Serrano MC, Gutiérrez MC, Ferrer ML, Yuste L, Rojo F i sur. (2013) Deep eutectic solvent-assisted synthesis of biodegradable polyesters with antibacterial properties. *Langmuir* **29**, 9525–9534. <https://doi.org/10.1021/la401353r>

Holland JH (2006) Studying Complex Adaptive Systems. *J Syst Sci Complex* **19**, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11424-006-0001-z>

Hou YC, Yao CF, Wu WZ (2018) Deep eutectic solvents: Green solvents for separation applications. *Acta Phys Chim Sin* **34**, 873–885. <https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201802062>

Huang Z, Jiang B, Yang H, Wang B, Zhang N, Dou H i sur. (2017) Investigation of glycerol-derived binary and ternary systems in CO₂ capture process. *Fuel* **210**, 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.08.043>

Jakubowska E, Gierszewska M, Nowaczyk J, Olewnik-Kruszkowska E (2020) Physicochemical and storage properties of chitosanbased films plasticized with deep eutectic solvent. *Food Hydrocoll* **108**, 106007. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106007>

Liu Y, Chen W, Xia Q, Guo B, Wang Q, Liu S i sur. (2017) Efficient Cleavage of Lignin–Carbohydrate Complexes and Ultrafast Extraction of Lignin Oligomers from Wood Biomass by Microwave-Assisted Treatment with Deep Eutectic Solvent. *Chem Sus Chem* **10**, 1692–1700. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601795>

Massolo E, Palmieri S, Benaglia M, Capriati V, Perna FM (2016) Stereoselective organocatalysed reactions in deep eutectic solvents: Highly tunable and biorenewable reaction media for sustainable organic synthesis. *Green Chem* **18**, 792–797. <https://doi.org/10.1039/c5gc01855b>.

Mondal D, Sharma M, Mukesh C, Gupta V, Prasad K (2013) Improved solubility of DNA in recyclable and reusable biobased deep eutectic solvents with long-term structural and chemical stability. *Chem Commun* **49**, 9606–9608. <https://doi.org/10.1039/c3cc45849k>.

Morrison HG, Sun CC, Neervannan S (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int J Pharm* **378**, 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.039>.

Mukherjee M, Mondal J (2020) Unifying the Contrasting Mechanisms of Protein-Stabilizing Osmolytes. *J Phys Chem* **124**, 11316–11323. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04757>

O Street T, Bolen DW, Rose GD (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 17064. [10.1073/pnas.0606236103](https://doi.org/10.1073/pnas.0606236103)

Paiva A, 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. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>

Panić M, Radović M, Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Rogošić M, Coutinho JAP i sur. (2022) Prediction of pH Value of Aqueous Acidic and Basic Deep Eutectic Solvent Using COSMO-RS σ Profiles' Molecular Descriptors. *Mol* **27**, 4489. [doi:10.3390/molecules27144489](https://doi.org/10.3390/molecules27144489)

Pires IV, Sakurai YCN, Ferreira NR, Moreira SGC, Rodrigues AMC, da Silva LHM (2022) Elaboration and Characterization of Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs): Application in the Extraction of Phenolic Compounds from pitaya. *Mol* **27**, 8310. <https://doi.org/10.3390/molecules27238310>

Radović M, Panić M, Radošević K, Bubalo MC, Redovniković IR (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kem* **70**, 9–10. <https://doi.org/10.15255/kui.2020.074>

Rösgen J, Jackson-Atogi R (2012) Volume Exclusion and H-Bonding Dominate the Thermodynamics and Solvation of Trimethylamine-N-oxide in Aqueous Urea. *J Am Chem Soc* **134**, 3590–3597. <https://doi.org/10.1021/ja211530n>

Selvanathan V, Azzahari AD, Halim AAA, Yahya R (2017) Ternary natural deep eutectic solvent (NADES) infused phthaloyl starch as cost efficient quasi-solid gel polymer electrolyte. *Carbohydr Polym* **167**, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.023>

Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev* **114**, 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

Soto C (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev* **4**, 49–60. [doi: 10.1038/nrn1007](https://doi.org/10.1038/nrn1007)

Svigelj R, Dossi N, Grazioli C, Toniolo R (2021) Deep Eutectic Solvents (DESs) and their application in biosensor development. *Sens* **21**, 4263. <https://doi.org/10.3390/s21134263>

Tang B, Row KH (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh Chem* **144**, 1427–1454. <https://doi.org/10.1007/s00706-013-1050-3>

Tiecco M, Cappellini F, Nicoletti F, Del Giacco T, Germani R, Di Profio P (2019) Role of the hydrogen bond donor component for a proper development of novel hydrophobic deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **281**, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.107>

Vanda H, Verpoorte R, Klinkhamer PGL, Choi YH (2019) Natural deep eutectic solvents: From their discovery to their applications. *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications* **1**, 61–81. [10.1002/9783527818488.ch4](https://doi.org/10.1002/9783527818488.ch4)

Xie X, Zou X, Lu X, Zheng K, Cheng H, Xu Q i sur. (2016) Voltammetric Study and Electrodeposition of Cu from CuO in Deep Eutectic Solvents. *J Electrochem Soc* **163**, 537–543. <https://doi.org/10.1149/2.1241609jes>

Yancey PH (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**, 2819–2830. [10.1242/jeb.01730](https://doi.org/10.1242/jeb.01730)

Yancey PH, Somero GN (1979) Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem J* **183**, 317–323. [10.1042/bj1830317](https://doi.org/10.1042/bj1830317)

Zhang G (2012) Biomimicry in biomedical research. *Organogenesis* **8**, 101–102. [10.4161/org.23395](https://doi.org/10.4161/org.23395)

Zhang Q, De Oliveira KV, Royer S, Jérôme F (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **41**, 7108–7146. [10.1039/c2cs35178a](https://doi.org/10.1039/c2cs35178a)

Zhao H (2014) DNA stability in ionic liquids and deep eutectic solvents. *J Chem Technol Biotechnol* **90**, 19–25. <https://doi.org/10.1002/jctb.4511>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Petra Lacić izjavljujem da je ovaj diplomski 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