

# Analiza stabilnosti formijat dehidrogenaze i koenzima NADH u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

---

Nikolić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:308718>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Maja Nikolić

**ANALIZA STABILNOSTI FORMIJAT  
DEHIDROGENAZE I KOENZIMA NADH U  
NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM  
OTAPALIMA**

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

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

## ZAHVALA

*Želim izraziti zahvalnost svim osobama koje su me podržavale i vodile tijekom izrade ovog diplomskog rada. Prije svega, zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Marini Cvjetko Bubalo čija su stručnost, savjeti i nesebična podrška bili ključni u usmjeravanju mog istraživanja. Hvala Vam na strpljenju, vremenu koje ste uložili i povjerenju koje ste mi ukazali. Posebnu zahvalnost dugujem i dr. sc. Marijanu Logarušiću, na prenesenom znanju i savjetima, kao i na tome što me kroz rad naučio važnosti strpljenja tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela istraživanja.*

*Od srca zahvaljujem i svim svojim prijateljima, koji su mi tijekom cijelog puta bili izvor podrške, razumijevanja i radosti. Hvala vam što ste uz mene bili u svim trenucima, bodrili me i davali mi snagu kada je bilo najteže, kao i slavili svaki mali uspjeh. Posebno hvala mojoj Anamariji i mojoj Petri, koje su uvijek bile uz mene, pružajući mi nesebičnu podršku i motivaciju kad god mi je zatrebala. Hvala vam na svim razgovorima, osmijesima i trenucima koje smo dijelile ,vaša bliskost i prijateljstvo učinili su ovaj put lakšim i ispunjenijim.*

*Na kraju, kao najposebnijim ljudima u mom životu, želim zahvaliti svojoj obitelji, svojoj mami, svom tati i svom bratu, koji su mi uvijek bili najveći oslonac i čija je podrška najviše utjecala na moj uspjeh. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi, razumijevanju i stalnom ohrabrenju kroz sve uspone i padove. Bez vašeg primjera, vrijednosti rada i upornosti, ne bih bila osoba koja sam danas. Ovaj uspjeh posvećujem vama jer je rezultat vašeg truda, ljubavi i neiscrpne vjere u mene.*

## 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 FORMIJAT DEHIDROGENAZE I KOENZIMA NADH U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Maja Nikolić, univ. bacc. ing. biotechn.0058216139

**Sažetak:** Ovaj diplomski rad istražuje potencijal primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) u biokatalitičkim procesima, kroz proučavanje stabilnosti oksido-reduktivnog enzima formijat dehidrogenaze (FDH) i pripadajućeg nikotinamidnog koenzima NADH u različitim DES-ovima. Analizom stabilnosti ovih biomolekula u DES-ovima na bazi betaina i kolin-klorida s glicerolom kao donorom vodika pri različitim udjelima vode odnosno pufera, ustanovljeno je da su enzim FDH te koenzim NADH najstabilniji u DES-ovima na bazi kolin-klorida te da udio vode/pufera ima ključan učinak na stabilizaciju. Nadalje, primjenom Spearmanove koleracijske matrice ispitan je utjecaji ključnih fizičko-kemijskih parametara (viskoznost, pH, gustoća) te molekularnih deskriptora (sigma profili generirani primjenom softvera *COSMOtherm*) DES-ova na stabilnost FDH i NADH te se pokazalo kako svi izmjereni parametri, osim pH, značajno utječu na stabilnost ispitivanih biomolekula, dok sigma profili upućuju da DES-ovi bogati regijama akceptora vodika te nepolarnim regijama uspješnije stabiliziraju FDH i NADH. Također, u sklopu istraživanja izrađeni su i matematički modeli koji opisuju utjecaj fizikalno-kemijskih parametara i sigma profila DES-ova na stabilnost ispitivanih biomolekula te su se isti pokazali pouzdanima prema vrijednostima za omjer predviđanja i odstupanja (*RPD*) i prikladnim za kontrolu kvalitete prema vrijednostima za omjer raspona pogreške (*RER*). Ovom analizom pruženi su novi uvidi u stabilnost enzima i koenzima u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, otvarajući put za njihovu učinkovitiju primjenu u biokatalitičkim procesima.

**Ključne riječi:** niskotemperaturna eutektička otapala, biokataliza, formijat-dehidrogenaza, NADH, matematičko modeliranje

**Rad sadrži:** 46 stranica, 14 slika, 6 tablica, 61 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

**Pomoć pri izradi:** Marijan Logarušić, dr.sc.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv.prof.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek (predsjednik)
2. izv.prof.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo (mentor)
3. prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković (član)
4. izv.prof.dr.sc. Davor Valinger (zamjenski član)

**Datum obrane:** 21.studeni 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

### ANALYSIS OF FORMATE DEHYDROGENASE AND NADH COENZYME STABILITY IN DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Maja Nikolić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058216139

**Abstract:** This thesis explores the potential application of Deep Eutectic Solvents (DES) in biocatalysis by examining the stability of the oxidoreductase enzyme formate dehydrogenase (FDH) and its nicotinamide coenzyme NADH in various DES. An analysis of the stability of these biomolecules in DES based on betaine and choline chloride with glycerol as a hydrogen donor, at different water or buffer contents, revealed that the enzyme FDH and coenzyme NADH were most stable in choline chloride-based DESs, and that the water/buffer content has a critical effect on stabilization. Furthermore, by applying a Spearman correlation matrix, the study examined the impact of key physicochemical parameters (viscosity, pH, density) and molecular descriptors (sigma profiles generated using COSMOtherm software) of DESs on the stability of FDH and NADH. It was shown that all measured parameters, except pH, significantly influence the stability of the tested biomolecules, while sigma profiles indicated that DESs rich in hydrogen acceptor and nonpolar regions more effectively stabilize FDH and NADH. Additionally, mathematical models were developed within the research to describe the influence of physicochemical parameters and sigma profiles of DESs on the stability of the tested biomolecules. These models proved reliable based on values for the ratio of prediction to deviation (RPD) and suitable for quality control according to the ratio of the error range (RER). This analysis provides new insights into the stability of enzymes and coenzymes in low-temperature eutectic solvents, paving the way for their more efficient application in biocatalytic processes

**Keywords:** deep eutectic solvents, biocatalysis, formate dehydrogenase, NADH, mathematical modeling

**Thesis contains:** 46 pages, 14 figures, 6 tables, 61 references,

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** Marijan Logarušič, PhD

**Reviewers:**

1. Ana Jurinjak Tušek PhD, Associate Professor (president)
2. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate Professor (mentor)
3. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full Professor (member)
4. Davor Valinger PhD, Associate Professor (substitute)

**Thesis defended:** November 21<sup>st</sup> 2024



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA .....	2
2.1.1. Niskotemperaturna eutektička otapala: definicija i klasifikacija .....	2
2.1.2. Karakteristike i primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	5
2.2. ZELENA KEMIJA I BOKATALIZA.....	6
2.2.1. Uloga biokatalize u organskoj kemiji .....	6
2.2.2. Biokatalizatori.....	7
2.2.2.1. Hidrolaze .....	7
2.2.2.2. Oksidoreduktaze.....	8
2.2.2.3. Liazze i transferaze .....	8
2.2.2.4. Ligaze i izomeraze .....	9
2.2.2.5. Izolacija novih biokatalizatora .....	10
2.2.3. Inovativni pristupi održivim otapalima.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Enzim.....	13
3.1.2. Kemikalije .....	13
3.1.3. Puferi.....	13
3.1.4. Oprema i uređaji .....	13
3.1.5. Računalni programi.....	14
3.2. METODE.....	14
3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	14
3.2.2. Karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala .....	15
3.2.2.1. Određivanje <i>pH</i> -vrijednosti.....	16
3.2.2.2. Određivanje gustoće .....	16
3.2.2.3. Određivanje viskoznosti .....	16
3.3.3. Priprema matičnih otopina enzima, koenzima i supstrata.....	16
3.3.4. Praćenje stabilnosti FDH u pripremljenim otapalima.....	17
3.3.5. Praćenje stabilnosti koenzima NADH .....	18
3.3.6. Statistička analiza i matematički modeli enzima FDH i koenzima NADH.....	18
3.3.6.1. Osnovna statistička analiza, raspodjela podataka i korelacijska matrica .....	18
3.3.6.2. Računanje molekularnih deskriptora DES-ova primjenom COSMO-RS programskog paketa .....	19
3.3.6.3. Izrada korelacijskog modela između stabilnosti FDH-a i NADH i molekularnih deskriptora.....	20

<b>3.3.6.4. Model djelomične linearne regresije(DLR)</b> .....	<b>20</b>
<b>4.REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1. PRIPREMA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA I FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2.STABILNOST ENZIMA FDH</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3. STABILNOST NADH</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA I MATEMATIČKO MODELIRANJE</b> .....	<b>36</b>
<b>4.4.1. Matematički modeli za opisivanje stabilizacijskog učinka DES-ova</b> .....	<b>38</b>
<b>5.ZAKLJUČCI</b> .....	<b>41</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>42</b>

# 1. UVOD

Biokataliza, odnosno primjena enzima kao katalizatora u kemijskim reakcijama, zauzima sve značajniju ulogu u razvoju održivih i ekološki prihvatljivih kemijskih procesa. Jedna od ključnih komponenti uspješne biokatalize je izbor odgovarajućeg medija za odvijanje reakcije. Tradicionalno, biokatalitičke reakcije provode se u vodenim sustavima, no sve češće se istražuju alternativna otapala, poput ionskih tekućina (engl. *Ionic Liquid, ILs*) i niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*), radi poboljšanja stabilnosti enzima i ukupne učinkovitosti reakcije. DES-ovi se ističu kao "zelena" otapala zbog jednostavne pripreme, biokompatibilnosti, niske toksičnosti i mogućnosti prilagodbe njihovih svojstava. Pokazali su i značajan potencijal u poboljšanju biokatalize kroz različite mehanizme, poput poboljšanja topljivosti supstrata, djelovanja kao pametnih ko-supstrata, stabilizacije enzima i koenzima te i utjecaja na stereokemiju enzima (Zhang i sur., 2024). Teško je pronaći pravi DES među toliko kandidata jer svaki sastav ima jedinstvene karakteristike koje različito utječu na stabilnost biomolekula. COSMO-RS model (engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) nudi računalni pristup za generiranje  $\sigma$ -profila (molekularnih deskriptora) DES-ova, koji pružaju ključne informacije o vodikovim vezama, elektrostatskim i disperzijskim interakcijama u otopinama (Klamt, 2005). Ovi deskriptori olakšavaju screening DES kandidata za topljivost i fizikalno-kemijska svojstva, čineći računalne alate važnima za odabir optimalnih DES-ova za biokatalitičke reakcije.

Dehidrogenaze, ključni enzimi u oksidacijskim i redukcijским reakcijama, pokazuju povećanu stabilnost i aktivnost u DES-ovima u usporedbi s klasičnim medijima (Bittner i sur., 2022). Formijat dehidrogenaza (FDH) koristi se za redukciju CO<sub>2</sub> u formijat uz prisutnost koenzima NADH, važne reakcije u nastojanjima za smanjenjem štetnog CO<sub>2</sub> nastalog u različitim industrijskim procesima. Međutim, ovaj enzim te pripadajući koenzim (NADH) izrazito su nestabilni u vodenim medijima. Novija istraživanja su pokazala da DES-ovi stabiliziraju ove biomolekule kroz interakcije poput vodikovih veza, smanjujući rizik od denaturacije enzima i degradacije NADH (Radović i sur., 2024).

Obzirom na navedeno, cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati stabilizacijski učinak betainijevih i kolinijevih DES-ova u kombinaciji s glicerolom na formijat dehidrogenazu i koenzim NADH te detaljnom statističkom analizom ustanoviti koje značajke ovih otapala utječu na stabilizacijski učinak. Osim toga, u sklopu rada razvijena su dva matematička modela, temeljena na linearnoj regresiji, kako bi se opisala veza između fizikalnih svojstava DES-ova, njihovih  $\sigma$ -profila te stabilnosti enzima FDH i stabilnosti koenzima NADH.

## 2. TEORIJSKI DIO

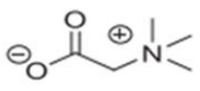
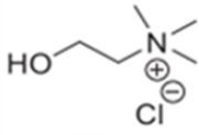
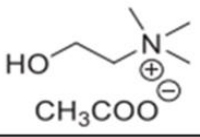
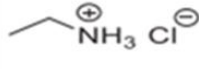
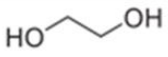
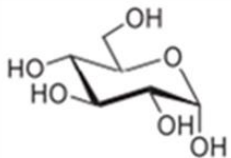
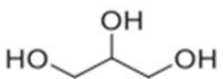
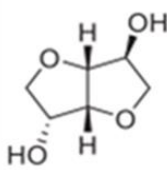
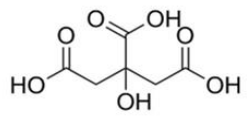
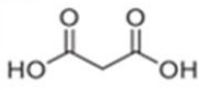
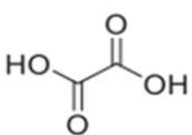
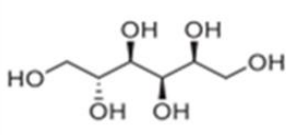
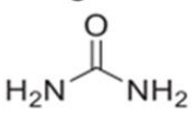
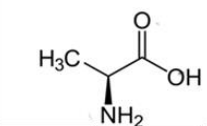
### 2.1. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA

#### 2.1.1. Niskotemperaturna eutektička otapala: definicija i klasifikacija

Pojam "niskotemperaturno eutektičko otapalo" (engl. *Deep Eutectic Solvent, DES*) prvi se put pojavio u literaturi 2004. godine, kada su Abbott i suradnici izvijestili o smjesama kvaternih amonijevih soli (poput kolin-klorida) i uree sa značajno nižim točkama taljenja u usporedbi od očekivanih za eutektičke smjese. Od tada je prijavljeno na stotine strukturno različitih DES-ova, a s vremenom se prvotna definicija tih otapala proširila. Coutinhova istraživačka skupina istaknula je kako se pojam "niskotemperaturno eutektičko otapalo" često pogrešno koristi zbog nedostatka jasne i stroge definicije. Zbog toga su nedavno predložili novu definiciju: "Eutektičko otapalo je sustav koji tvori eutektičku smjesu te je tekuć na željenoj temperaturi, gdje bi barem jedna od njegovih komponenti inače bila čvrsta i neprikladna za upotrebu kao otapalo". Točnije, DES je eutektičko otapalo čije komponente pokazuju entalpijski vođena negativna odstupanja od termodinamičke idealnosti, a što bi u praksi značilo da se bilo koja smjesa s određenim sastavom koja je u tekućem stanju na odgovarajućoj temperaturi može definirati i koristiti kao DES (Martins i sur., 2019). Značajno sniženje točke taljenja u DES-ovima pripisuje se delokalizaciji naboja zbog stvaranja jakih međumolekularnih interakcija, poput vodikovih, ionskih i van der Waalsovih veza, unutar određenog omjera komponenti.

DES-ovi se tradicionalno klasificiraju u četiri velike kategorije (slika 2) : tip I (kvaterne soli  $Cat^+X^-$  u kombinaciji s metalnim halidima poput Zn, Sn, Fe), tip II (kvaterne soli  $Cat^+X^-$  s metalnim halidima kao što su Cr, Co, Fe), tip III (kvaterne soli  $Cat^+X^-$  u kombinaciji s donorima vodikovih veza kao što su amidi, kiseline i alkoholi) i tip IV (metalni halidi zajedno s donorima vodikovih veza poput amida i alkohola). Nedavno je uveden i peti tip DES-ova, koji uključuje smjese sa samo neionskim, molekularnim akceptorima vodikovih veza (engl. *Hydrogen Bond Acceptor, HBA*) i donorima vodikovih veza (engl. *Hydrogen Bond Donor, HBD*), kao što su tercijarni amini i alkoholi (Abranches i sur., 2019). Većina poznatih DES-ova pripada tipu III i V, pri čemu se najčešće koriste kvaterne amonijeve soli poput kolin-klorida ili metilamina betaina kao jeftini i netoksični akceptori vodikovih veza, dok su šećeri, polioli, amidi i organske kiseline česti donori vodikovih veza. Uz navedene donore i akceptore vodikovih veza (slika 1), voda se često upotrebljava kao sastavni dio DES-a, jer svojim prisustvom značajno doprinosi njegovom formiranju, mijenjajući fizikalno-kemijska svojstva supramolekularne strukture. Osim toga, neka istraživanja sugeriraju da voda može djelovati kao dodatni mali donor vodikovih veza u vodenim smjesama DES-ova temeljenih na kolin-kloridu (ChCl) (Hammond i sur., 2017). Kolin-klorid je

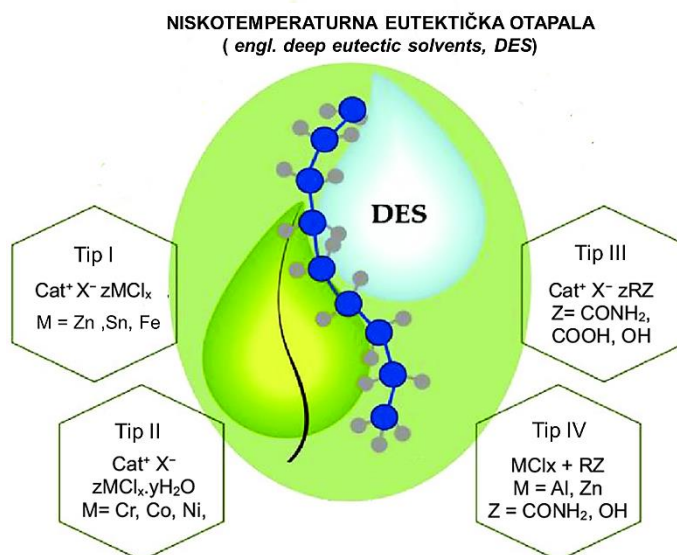
jedan od najčešće korištenih sastojaka u DES formulacijama zbog svoje niske cijene i biorazgradivosti. Kombiniranjem s različitim donorima vodikove veze kao što su glicerol, šećeri i organske kiseline, kolin-klorid omogućava stvaranje DES-ova s prilagođenim fizičkim i kemijskim svojstvima, poput točke smrzavanja, viskoznosti, električne provodnosti i pH (Svigelj i sur., 2021).

Akceptori vodikove veze			
Betain		Kolin-klorid	
Kolin-acetat		Etilamonijev klorid	
Donori vodikove veze			
Etilen glikol		Glukoza	
Glicerol		Izosorbid	
Limunska kiselina		Malonska kiselina	
Oksalna kiselina		Sorbitol	
Urea		Alanin	

**Slika 1.** Primjeri akceptora i donora vodikove veze korištenih za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala (*prema Lozano,2017*)

U prvom desetljeću DES-ovi tipova I–IV korišteni su u organskoj sintezi, katalizi i elektrokemiji. Zbog ograničenih primjena u vodenim ili lipofilnim uzorcima, 2015. godine Van Osch i suradnici predstavili su novu vrstu DES-ova s hidrofobnim karakteristikama, nazvanu hidrofobni DES-ovi (engl. *Hydrophobic Deep Eutectic Solvent*, HDES). Prvi HDES nastao je miješanjem dugolančanih kvaternih amonijevih soli s dekanskom kiselinom. Ova hidrofobna otapala pokazala su se korisnima u ekstrakcijama tekuće-tekuće, formiranju hidrogelova i

analitičkoj kemiji. Osim tradicionalne klasifikacije DES-ova, otapala se kategoriziraju i prema podrijetlu njihovih sastojaka ili namjeni. Prirodni DES-ovi (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) sastoje se od spojeva prisutnih u prirodi, kao što su polioli, šećeri, organske kiseline i aminokiseline. Ove sirovine postoje prirodno i imaju relativno niske troškove proizvodnje. Pretpostavlja se da su NADES-ovi niske toksičnosti, što potvrđuju dosadašnja istraživanja (Martínez i sur., 2022). To je u suprotnosti s ILs-ovima koji zahtijevaju višestupanjske sinteze i skuplje procese, poput alkilacije i izmjene aniona, čime je sinteza ILs-ova kompleksnija i financijski zahtjevnija (Hallett i Welton, 2011). Terapijski niskotemperaturni eutektički sustavi (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES) su još jedna podskupina DES-ova koja uključuje farmaceutске aktivne sastojke (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API). Ovi sustavi mogu poboljšati topljivost, bioraspoloživost i kontrolirano oslobađanje API-ja. Od tada su DES-ovi intenzivno istražuju kao otapala za topljenje farmaceutskih spojeva u različitim formulacijama, posebno za lokalnu primjenu (Morrison i sur., 2009).



**Slika 2.** Klasifikacija DES-ova u četiri tipa na temelju njihove strukture (prema Mubashir, 2021)

Niska temperatura smrzavanja ( $T_f$ ) omogućava DES-ovima da ostanu u tekućem stanju tijekom biokatalitičkih procesa, budući da se većina biokatalitičkih reakcija odvija u tekućem okruženju, bilo u monofaznom ili dvofaznom sustavu. Povećanje hidroksilne grupe HBD povećava vrijednost  $T_f$ . Na primjer, u otapalu s kolin-kloridom i glicerolom (ChCl:Gly), glicerol ima tri hidroksilne grupe i topi se na  $-40\text{ }^\circ\text{C}$ , dok se u otapalu s kolin-kloridom i etilen-glikolom (ChCl:EG), etilen-glikol topi na  $-66\text{ }^\circ\text{C}$  i ima dvije hidroksilne grupe (Zhang i sur. 2012). DES-ovi s različitim molarnim omjerima HBA i HBD također pokazuju različite  $T_f$ , ali nije zabilježena očita tendencija. Glicerol-bazirani DES-ovi s metil trifeniil fosfonijevim bromidom kao HBA (1:2–

1:4, molarni omjer) imaju raspon  $T_f$  od  $-5,5$  do  $15,8$  °C (Shahbaz i sur. 2011). Tipična priprema DES-ova uključuje miješanje komponenti u određenom molarnom omjeru (npr. 1:2=HBA:HBD) uz stalno miješanje na umjerenoj temperaturi. Ova jednostavna sinteza je 100 % atom-ekonomična i ne zahtijeva daljnje pročišćavanje.

### 2.1.2. Karakteristike i primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala

DES-ovi su inovativna otapala s niskom hlapljivošću, nezapaljivošću i niskom toksičnošću, a jednostavno se pripremaju bez potrebe za otapalima, koristeći prirodne izvore. Nude prednosti u usporedbi s konvencionalnim otapalima jer se njihova struktura, a time i svojstva, mogu prilagoditi odabirom komponenti te njihovim molarnim omjerima. Ponašanje ovih otapala također ovisi o temperaturi, pH i sadržaju vode, što omogućuje pripremu DES-ova s precizno određenim karakteristikama poput viskoznosti, provodnosti i pH (Francisco i sur., 2013), nudeći fleksibilnost u oblikovanju svojstava prema zahtjevima određene primjene. Njihova visoka viskoznost na sobnoj temperaturi doprinosi niskoj električnoj vodljivosti, a viskoznost se može dodatno regulirati dodatkom vode ili povećanjem temperature, što smanjuje međumolekulske interakcije i samu viskoznost (Aroso i sur., 2017). Međutim, viskoznost je u DES-ovima često visoka zbog prisutnosti mreže vodikovih veza među komponentama, kao i drugih interakcija poput van der Waalsovih i elektrostatskih sila. Ta struktura mreže čini ih stabilnima i smanjuje hlapljivost, no može ograničiti mobilnost molekula unutar otapala, što je važno razmotriti pri primjeni u određenim procesima (van Osch i sur., 2017). S obzirom na toksičnost i biorazgradivost, DES-ovi su općenito prepoznati kao ekološki prihvatljiva otapala, no njihova toksičnost ovisi o sastavu. Na primjer, DES-ovi na bazi kolin-klorida pokazuju nižu toksičnost u usporedbi s fosfonijevim DES-ovima, dok DES-ovi na bazi metalnih soli, poput klase I i II, mogu sadržavati metalne ione koji se mogu nakupiti u okolišu, što zahtijeva dodatne mjere recikliranja. S druge strane, mnogi DES-ovi na bazi prirodnih komponenti, kao što su glicerol, šećeri i organske kiseline, pokazuju visoku biorazgradivost. DES-ovi s kolin-kloridom i glicerolom postižu razgradnju veću od 60 % unutar 14 dana, dok neki, poput  $\text{ChCl}$ , dosežu čak 96% (Radošević i sur., 2015).

DES-ovi i NADES-ovi stvaraju mrežu vodikovih veza koja omogućuje otapanje širokog spektra molekula, čineći ih univerzalnim otapalima za ekstrakciju i separaciju polarnih i nepolarnih spojeva (Svigelj i sur., 2021). Zbog jednostavnog recikliranja, ekonomski su isplativi i održivi, što ih čini atraktivnom alternativom toksičnim organskim otapalima tradicionalno korištenim u kemijskim procesima. Njihova primjena obuhvaća kemijsku, farmaceutsku i prehrambenu industriju, s naglaskom na sintezu i pročišćavanje biodizela, apsorpciju  $\text{CO}_2$ , elektrodepoziciju metala, sintezu nanomaterijala te se koriste kao otapala i sredstva za ekstrakciju enzima u biokatalitičkim procesima (Ünlü i sur., 2019). DES-ovi također djeluju kao

ekološki prihvatljivi surfaktanti, omogućujući bolju disperzibilnost čvrstih čestica i kontrolu viskoznosti, što povećava njihovu praktičnost u raznim industrijskim procesima (Liu i sur., 2022).

## 2.2. ZELENA KEMIJA I BOKATALIZA

### 2.2.1. Uloga biokatalize u organskoj kemiji

Priroda je oduvijek bila izvor inspiracije za kemičare, a kompleksni biokemijski procesi unutar živih organizama predstavljaju vrhunski primjer učinkovitog korištenja energije i tvari, pri čemu se gotovo potpuno izbjegavaju neželjene transformacije. Ključ te učinkovitosti leži u enzimima, prirodnim katalizatorima, koji omogućuju selektivne kemijske reakcije u uvjetima blagim za okoliš. Njihova važnost postaje još očitija kada uzmemo u obzir da jedina informacija koja se prenosi između generacija u bilo kojem živom sustavu, zahvaljujući replikaciji genetskog materijala, kodira samo sintezu proteina (i određenih RNK s katalitičkim aktivnostima). Enzimi su proteini s katalitičkom aktivnošću koji omogućuju preživljavanje i razvoj živih organizama kroz niz složenih reakcija u različitim biološkim okruženjima. Njihova posebna trodimenzionalna struktura omogućuje visokoselektivne interakcije s molekulama supstrata, koje usmjeravaju prema prijelaznom stanju i smanjuju energiju aktivacije potrebnu za reakciju, čime se poboljšava brzina i selektivnost transformacije. Specifičan raspored aminokiselina u katalitičkom centru enzima osigurava visoku selektivnost, omogućujući razlikovanje između različitih molekula, pa čak i između optičkih izomera. Nesumnjivo, ove značajke (visoka učinkovitost i selektivnost te niske energetske potrebe) su ciljevi svakog industrijskog procesa radi povećanja prinosa. Osim toga, enzimi zahtijevaju blage reakcijske uvjete, poput neutralnog pH i temperature od oko 37 °C, čime dodatno smanjuju operativne troškove i omogućuju ekološki prihvatljivije procese.

S obzirom na specifična katalitička svojstva enzima, uložena su značajna sredstva u njihovo istraživanje i razvoj, što je dovelo do niza inovacija u industriji. No upotreba enzima u kemijskim procesima nije nova. Od davnina su ljudi koristili enzime prisutne u živim organizmima, primjerice za fermentaciju u proizvodnji kruha i alkoholnih pića. Ključni pomaci u razumijevanju enzima dogodili su se početkom 19. stoljeća kada su znanstvenici poput Anselmea Payena, Jeana Françoisa Persoza i Edwarda Buchnera prvi put izolirali enzime i dokazali njihovu katalitičku aktivnost izvan živog organizma. To je otvorilo put za njihovu primjenu kao slobodnih katalizatora, neovisnih o stanici. Sredinom 20. stoljeća, postignuta je sve veća primjena enzima u kemijskoj industriji, donoseći prvi val biokatalize s naglaskom na katalitičku izvrsnost, jednostavnije metode i smanjenu potrebu za otapalima. U ovom kontekstu, jedan od prvih primjera biokatalitičke sinteze bila je proizvodnja kortizona, gdje je korištenje gljive *Rhizopus nigricans* za selektivnu hidroksilaciju progesterona drastično skratilo proces s



31 na 11 koraka, značajno povećavajući učinkovitost (Peterson i Murray, 1952). Ubrzo su fermentacijski procesi cijelih organizama postali usmjereni prema sintezi drugih vrijednih spojeva, poput mliječne kiseline, aminokiselina i vitamina (Sheldon i Brady, 2018).

Još jedan ključan razlog koji je potaknuo korištenje biokatalize je prijelaz na biološku industriju, potaknut iscrpljivanjem fosilnih sirovina i zabrinutošću zbog utjecaja na okoliš. S aspekta održivosti i ekološke prihvatljivosti, obnovljive sirovine predstavljaju visoko dostupne, biorazgradive i nisko toksične izvore ugljika i energije, omogućujući dizajn ekološki prihvatljivijih procesa. Budući da su organske molekule i polimeri posrednici u kruženju ugljika kroz biosferu, njihove emisije CO<sub>2</sub> već su uključene u ciklus ugljika, čime se smanjuje industrijski ekološki otisak i emisija stakleničkih plinova. U tom kontekstu, enzimi su najbolji katalizatori za transformaciju biomase jer su specifično prilagođeni za sintezu i razgradnju biomolekula (Dale, 2003).

### 2.2.2. Biokatalizatori

Biokatalizatori, najčešće enzimi, cijele stanice ili mikroorganizmi, ubrzavaju kemijske konverzije te se obično dobivaju iz mikroorganizama poput kvasaca, bakterija i gljiva, te bakterija i životinja. Oni djeluju u blagim uvjetima reakcije, kao što su temperature između 20-40 °C i pH 5-8, i potpuno su biorazgradivi. Zahvaljujući visokoj specifičnosti i selektivnosti, enzimi omogućuju precizne kemijske transformacije u sintezi organskih spojeva, uključujući kemoselektivne, regioselektivne i kiralnoselektivne reakcije. Enzimi su dizajnirani za specifične reakcije i koriste se za dobivanje optički čistih proizvoda u asimetričnim procesima, uz mogućnost prilagodbe svojstava poput selektivnosti i stabilnosti. Dodatno, enzimi mogu funkcionirati i u ekstremnim uvjetima, zamjenjujući konvencionalne kemikalije te štedeći energiju i vodu u proizvodnim procesima. Biokataliza tako smanjuje pojavu neželjenih nuspojava, poput izomerizacije i racemizacije, čime nadmašuje tradicionalne metode sinteze. Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB*), enzimi su klasificirani u šest glavnih klasa koje čine: oksidoreduktaze, transferaze, liaze, ligaze, izomeraze te hidrolaze (Webb E. C., 1992), a njihova učestalost korištenja prikazana je na slici 3.

#### 2.2.2.1. Hidrolaze

Hidrolaze su enzimi koji kataliziraju cijepanje kemijskih veza određenih supstrata s pomoću molekule vode. Jednostavnost korištenja hidrolaza i nepostojanje potrebe za kofaktorima potaknuli su veliki interes za razvoj reakcija kataliziranih hidrolazama u organskoj sintezi. To uključuje širok spektar enzima kao što su lipaze, esteraze, amidaze, nitrilaze, proteaze i epoksidne hidrolaze. Među njima, lipaze se posebno ističu svojom sposobnošću

reagiranja s različitim nukleofilima, što omogućuje široku primjenu u sintetskim reakcijama umjesto hidrolitičkih procesa (Kaushik, 2014).

#### 2.2.2.2. Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze kataliziraju prijenos elektrona između molekula donora i akceptora kroz reakcije poput prijenosa elektrona, ekstrakcije protona, prijenosa hidrida i ugradnje kisika. Prisutne su u prirodi i kataliziraju razne kemijske reakcije s visokom specifičnošću i učinkovitošću, a dijele se na oksidaze, dehidrogenaze, hidroksilaze, oksigenaze, peroksidaze i reduktaze. Zbog biorazgradivosti i selektivnosti, oksidoreduktaze se široko primjenjuju u industriji, uključujući tekstilnu, medicinsku, prehrambenu i kemijsku sintezu, s ciljem poboljšanja kvalitete proizvoda i smanjenja ekoloških utjecaja (Younus, 2019).

Međutim, izazov u primjeni oksidoreduktaza je oslanjanje na skupe kofaktore poput NADH i NADPH, potrebne za mnoge reakcije. Recikliranje ovih kofaktora može se provesti enzimskim, kemijskim i elektrokemijskim metodama, pri čemu su enzimске metode ekološki prihvatljivije. Najčešće korišteni enzimi za regeneraciju uključuju formijat-dehidrogenazu (FDH), glukoza-dehidrogenazu (GDH), alkohol dehidrogenazu (ADH) i fosfit-dehidrogenazu (PDH), svaki sa specifičnim ograničenjima. Zbog osjetljivosti ADH na temperaturu i pH, FDH se smatra obećavajućim kandidatom za regeneraciju (Maier i sur., 2024).

NAD-ovisna formijat-dehidrogenaza, pronađena u mnogim bakterijama i kvascima, katalizira oksidaciju formijata u ugljikov dioksid uz istodobnu redukciju  $\text{NAD}^+$  u NADH. Zbog termodinamičke stabilnosti reakcije, FDH se koristi za regeneraciju NADH u asimetričnoj sintezi kiralnih spojeva, pri čemu se može proizvoditi u velikim količinama pomoću kvasca *Candida boidinii*. Ipak, zbog ograničene stabilnosti na oksidativni stres, FDH iz *C. boidinii* kloniran je i izražen u *E. coli*, čime su smanjeni troškovi za sintetske reakcije (Slusarczyk i sur., 2000). Značajne industrijske primjene FDH uključuju fiksaciju  $\text{CO}_2$  i recikliranje nikotinamida, no njegova učinkovitost i stabilnost još uvijek predstavljaju izazov. Stoga su primijenjene strategije proteinskog inženjerstva kako bi se poboljšala stabilnost i enzimska učinkovitost FDH-a za komercijalne potrebe (Gajardo-Parra i sur., 2023).

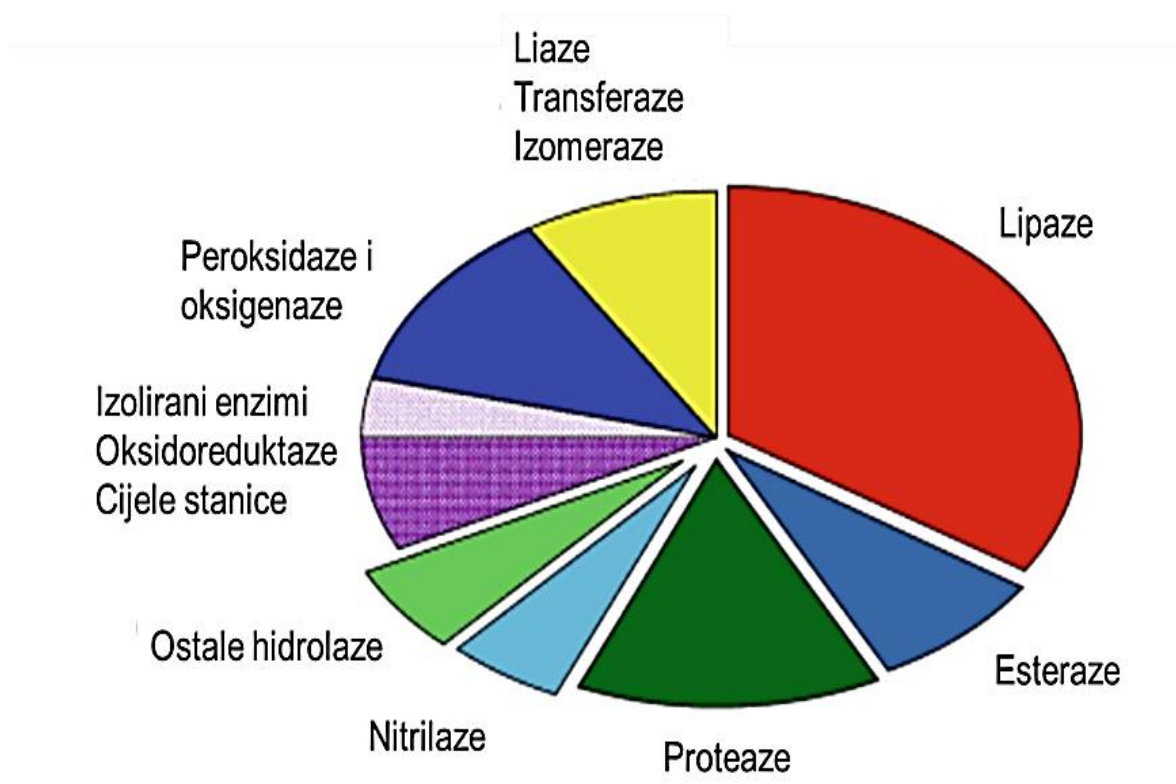
#### 2.2.2.3. Liaze i transferaze

Transferaze i liaze predstavljaju održiva rješenja za kemijske transformacije. Transferaze kataliziraju prijenos funkcionalnih skupina, (npr. amino, metil, hidroksimetil, glikozil, acil, alkil, fosfat i sulfat skupine) putem nukleofilne supstitucijske reakcije. Industrijske primjene transferaza uključuju korištenje različitih glikoziltransferaza za sintezu oligosaharida. Primjeri ove klase enzima uključuju metiltransferaze, aminotransferaze, kinaze i fosforilaze. Liaze, s druge strane, kataliziraju reakcije adicije i eliminacije te su prisutne u mnogim staničnim

procesima, organskoj sintezi, ciklusu limunske kiseline i u proizvodnji cijanohidrina. Primjeri ove klase enzima uključuju dekarboksilaze, aldolaze i sintaze (Kaushik i sur., 2014).

#### 2.2.2.4. Ligaze i izomeraze

Ligaze su enzimi koji kataliziraju stvaranje kemijskih veza između dviju molekula, često koristeći nukleotidne trifosfate kao izvor energije. Ovi enzimi igraju ključnu ulogu u staničnim procesima, poput povezivanja nukleotida tijekom replikacije DNK, a primjeri enzima iz ove klase uključuju sintetaze i karboksilaze. Izomeraze, s druge strane, kataliziraju preuređivanje atoma unutar molekula, uključujući procese racemizacije i epimerizacije. Glukoza izomeraza je značajan primjer u industrijskoj primjeni jer se koristi u proizvodnji kukuruznog sirupa s visokim udjelom fruktoze, popularne zamjene za saharozu u prehrambenoj industriji. Primjeri enzima iz ove klase su racemaze i mutaze (Kaushik i sur., 2014).



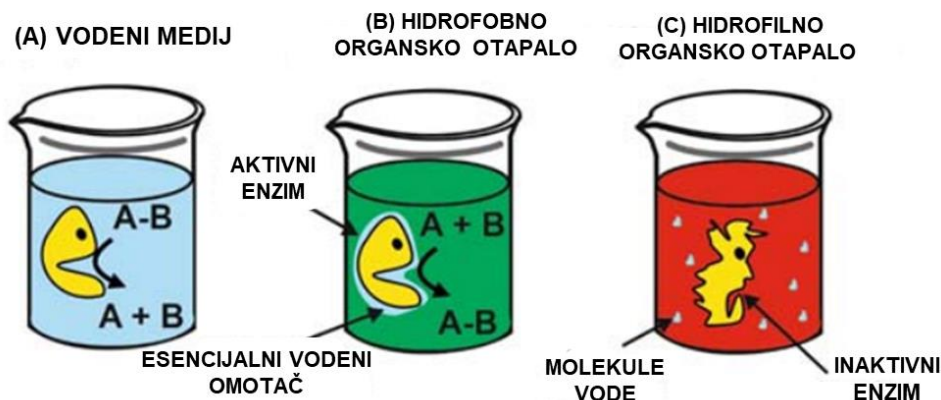
**Slika 3.** Učestalost korištenja određenih biokatalizatora u biostransformacijama (prema Faber, 2011)

#### 2.2.2.5. Izolacija novih biokatalizatora

U ekstremnim staništima, mikroorganizmi su razvili raznolikost molekularnih strategija za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. Istraživanje bioraznolikosti takvih mikroorganizama u ekstremnim uvjetima pH, temperature, visoke slanosti ili čak organskih medija omogućilo je identifikaciju robusnijih enzima ili enzima s drugim vrijednim svojstvima za industrijsku primjenu (Stepankova i sur., 2013). Biokatalizatori izolirani iz tih organizama, poznati kao ekstremozimi, posjeduju izvanredna svojstva otpornosti na sol, termostabilnost i prilagodljivost hladnoći, čineći ih vrlo otpornima na ekstremne uvjete zbog njihove čvrste strukture. Njihova primjena nudi nove mogućnosti za biokatalizu i biotransformacije, kao i za razvoj gospodarstva i novih istraživačkih pravaca. Enzimi iz termofilnih mikroorganizama sposobni su podnijeti proteolizu i ekstremne situacije poput prisutnosti denaturirajućih agenasa, organskih otapala i visoke slanosti. Korištenje tih enzima smanjuje rizik od kontaminacije te povećava topljivost supstrata. Bakterije tolerantne na organska otapala, kao i halofilni i alkalofilni organizmi, izvor su velikog broj enzima pogodnih za primjenu u organskim otapalima ili pri visokim koncentracijama soli. Na primjer, *Pseudomonas aeruginosa* bila je izvor mnogih enzima otpornih na otapala, poput proteaza i lipaza (Ogino i sur., 2000; Ogino i sur., 1999). Istraživanja provedena s tim enzimima također su korisna za identificiranje strukturnih osnova njihove povećane stabilnosti i učinkovitosti u takvim nepovoljnim uvjetima. Ovo znanje omogućuje dublje razumijevanje odnosa između strukture i funkcije enzima te je snažan alat za svjesnu modifikaciju drugih biokatalizatora. U prehrambenoj industriji, enzimi prilagođeni hladnoći vrlo su važni zbog svoje visoke aktivnosti i niske strukturne stabilnosti. Ovi enzimi imaju veliki potencijal za primjenu u biotransformacijama, uključujući hlapljive supstrate, kao i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, primjerice za proizvodnju enantiomernih peptida, lipida i šećera (Dumorne i sur., 2017).

#### 2.2.3. Inovativni pristupi održivim otapalima

U biokatalitičkim procesima, enzimi najbolje funkcioniraju u vodenim medijima jer voda omogućava stabilnost njihove strukture i aktivnosti. Međutim, organski procesi često zahtijevaju otapanje složenih reakcijskih komponenti, što u vodenom mediju nije moguće, a to posljedično povećava troškove proizvodnje i otežava pročišćavanje proizvoda. Ključno je da organski mediji zadrže minimalnu količinu vode na površini enzima, kako bi oni zadržali katalitičku aktivnost. S druge strane, potpuno uklanjanje vode može uzrokovati denaturaciju enzima i gubitak funkcije (slika 4).



**Slika 4.** Uloga vode u enzimskim transformacijama i strukturi proteina u različitim reakcijskim medijima (prema Lozano, 2017)

(A) U vodenim medijima enzimi su potpuno aktivni, ali su njihove reakcije ograničene na sudjelovanje vode; (B) U hidrofobnim organskim otapalima enzimi zadržavaju esencijalni vodeni omotač kako bi ostali aktivni, a niska razina vode nije dovoljna da promijeni ravnotežu reakcije; (C) Hidrofilna organska otapala obično uklanjaju vodeni omotač, što dovodi do denaturacije enzima

Organska otapala imaju značajan utjecaj na enzime, jer mogu stabilizirati ili destabilizirati njihove strukture. Niska koncentracija organskih otapala obično stabilizira enzime, dok ih visoke koncentracije destabiliziraju. Osim toga, organska otapala mogu prodrijeti u aktivno mjesto enzima i utjecati na njegovu selektivnost. Pravilnim uvjetima moguće je optimizirati reakcije enzima u organskim medijima i poboljšati njihovu učinkovitost. Unatoč korisnosti, organska otapala često su povezana s problemima poput visoke hlapljivosti i zapaljivosti, što predstavlja ozbiljan rizik za primjenu u biokatalitičkim procesima. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova, poput viskoznosti, aktivnosti vode i pH, izravno utječu na stabilnost i učinkovitost enzima. Dok je voda je ključna za stabilnost enzima i održavanje ravnoteže reakcije, pojedine komponente DES-ova, poput uree, mogu izazvati denaturaciju enzima i smanjiti njihovu aktivnost (Attri i sur., 2011). Enzimi poput lipaza i proetaza najčešće se koriste kao katalizatori u DES-ovima. U DES-ovima, lipaze su pokazale visoke stope konverzije, kao što je *Pseudomonas cepacia* lipaza, koja je postigla 22 % konverzije u DES-u ChCl:Gly u usporedbi s 5% u toluenu (Gorke i sur., 2008). Zhao i suradnici, 2011.godine, istražili su aktivnosti transesterifikacije katalizirane proteazama u glicerol-baziranim DES-ovima s kolinovim solima (klorid ili acetat). Rezultati su pokazali ključnu ulogu vode; povećanjem sadržaja vode s 2 % na 4 %, Ova otapala također su učinkovita za sintezu peptida, kao što je slučaj s  $\alpha$ -himotripsinom u DES sustavu, koji je postigao produktivnost od  $20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  uz dodatak 10 – 30 % vode (Maugeri i sur., 2013).

Imobilizirani papain u DES-u ChCl:urea omogućio je sintezu *N*-(benziloksikarbonil)-alanilglutamina s prinosom od 71,5 %, pri čemu je veća koncentracija glutamina poboljšala prinos, dok je visoki omjer glutamina prema benziloksikarbonil-alanin-metil esteru (Gln:Z-Ala-

Ome) od 3:1 do 4:1 učinkovito inhibirao sporednu reakciju (Cao i sur., 2015). Nadalje, DES-ovi predstavljaju posebnu kategoriju otapala koja imaju sposobnost korištenja ko-supstrata za regeneraciju kofaktora, što ih čini izuzetno korisnim u raznim biokatalitičkim procesima. Koncept povezanih enzimskih reakcija razvijen je kao učinkovit pristup za regeneraciju kofaktora, posebno u sustavima gdje DES-ovi dodatno poboljšavaju redoks reakcije. Na primjer, Baeyer-Villiger monooksigenaze (BVMO), u kombinaciji s fosfit dehidrogenazom (PTDH) koja regenerira NADPH, korištene su za održivu redukcijsku reakciju (Torres Pazmiño i sur.,2008). Ovaj pristup proširen je povezivanjem BVMO i ADH s različitim enzimima za regeneraciju, poput PTDH, GDH i FDH. Najbolji rezultati postignuti su kada je PTDH korišten u paru s enzimom, jer je oksidacija fosfita ireverzibilna (Woodyer i sur.,2003). Takve reakcije najčešće se provode u vodenoj puferiranoj otopini (Tris-HCl, pH 7,5), gdje je potrebno vanjsko dodavanje ko-supstrata (poput glukoze, formata ili fosfita). No, kada se DES koristi kao „pametno ” otapalo, ova potreba za vanjskim dodavanjem ko-supstrata može se izbjeći. U takvom sustavu DES može djelovati ne samo kao otapalo, već i kao izvor kosupstrata, gdje komponenta HBD iz DES-a služi kao ko-supstrat, čime se eliminira potreba za dodatnim dodavanjem. Primjerice, kada je ChCl korišten za redukciju acetofenona s ADH-om iz *Lactobacillus brevis* (LbADH), nije bilo potrebe za dodavanjem glukoze kao ko-supstrata za regeneraciju kofaktora (Mourelle-Insua i sur., 2019). Umjesto toga, glukoza prisutna kao HBD u DES-u oksidirana je u D-glukono-1,5-lakton pomoću GDH, dok je istovremeno NADP<sup>+</sup> konvertirao u NADPH, čime je postignuta regeneracija kofaktora. Ova dvostruka namjena otapala i njegovih komponenti predstavlja značajan napredak u tehnikama regeneracije kofaktora. Takva inovativna primjena DES-a, koja uklanja potrebu za vanjskim dodavanjem ko-supstrata za regeneraciju kofaktora, naglašava učinkovitost i fleksibilnost DES-ova kao otapala koje unapređuje redoks reakcije. Možda iznenađujuće, neki tipovi stanica (npr. kultivirane biljne stanice, mikrobne stanice) pokazali su poboljšanu propusnost, stabilnost i smanjenu citotoksičnost u prisutnosti DES-ova (Panić i sur.,2018) . Na primjer, cijele stanice *Cyberlindnera saturnus* korištene su za sintezu (S)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil etanola] iz 3,5-bis(trifluorometil)acetofenona (BTAP) u DES-u L-karnitin : lizin .Uvođenje DES-a L-karnitin : lizin povećalo je propusnost stanica za supstrat i smanjilo toksičnost supstrata (BTAP) (Bi i sur.,2021). Dakle, redukcija karbonilnih spojeva pomoću cijelih stanica u prisutnosti DES-a pokazala je značajne prednosti u odnosu na vodene medije. S obzirom na navedene značajke, DES-ovi se nameću kao održiva zamjena tradicionalnim otapalima i ILs-ovima te sve češće nalaze primjenu u zelenoj kemiji i biokatalizi. Njihova niža cijena, jednostavnija sinteza i visoka sigurnost čine ih ključnim komponentama u razvoju ekološki prihvatljivih industrijskih procesa

## 3.EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1.MATERIJALI

#### 3.1.1.Enzim

- NADH-ovisna formijat dehidrogenaza (FDH)

Za enzimske reakcije provedene u ovoj studiji korištena je NADH-ovisna formijat dehidrogenaza (FDH) iz *Pseudomonas sp.* 101 (Tishkov i sur., 1993)

#### 3.1.2.Kemikalije

- Betain, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
  - Dikalijev hidrogenfosfat , Kemika, Zagreb, RH
  - Etanol (96 % v/v), Kemika, Zagreb, Hrvatska
  - Glicerol, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
  - Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika ,Zagreb, RH
  - Kolin-klorid, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
  - Natrijev formijat, Kemika ,Zagreb ,RH
  - Natrijev hidroksid , Kemika, Zagreb , RH
  - Nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirani), p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
  - Nikotinamid adenin dinukleotid (reducirani), p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Sve kemikalije upotrijebljene u ovom radu bile su analitičke čistoće. Za pripravu eutektičkih otopala i otopina koristila se destilirana voda PBF-a.

#### 3.1.3. Pufferi

- Kalij-fosfatni puffer, (50mM, pH=7,5)
- 4,3522 g  $K_2HPO_4$  i 3,4005 g  $KH_2PO_4$  otopi se u 500ml destilirane vode te se pH otopine podesi na 7,5 dodatkom 4M NaOH

#### 3.1.4.Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Eppendorf epruvete
- Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Hladnjak, Gorenje, Slovenija
- Homogenizator IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

- Homogenizator/inkubator ES-20/60, Biosan, Latvija
- Laboratorijska tresilica, KL2, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Njemačka
- Laboratorijsko posuđe (Eppendorf kivete, Falcon tube, odmjerne tikvice, menzure, kivete, laboratorijske čaše)
- Mikropipete (10 µL, 100 µL, 1000 µL)
- pH staklena elektroda (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Računalni program BOVIA COSMOtherm 2020, Verzija 20.0.0 (Revision 5273M), Dassault Systems
- Rotacioni viskozimetar (Anton Paar ViscoQC 300, Ashland, Virginia, SAD)
- UV-Vis spektrofotometar, SpectraMax® ABS Plus, Molecular Devices, San Jose, CA, SAD

#### 3.1.5. Računalni programi

- BIOVIA TmoleX19 2021 (Dassault Systems, Pariz, Francuska)
- BIOVITA COSMOtherm 2020 (Dassault Systems, Pariz, Francuska)
- Statistica 14.0. (Tibco Software Inc, Santa Clara, SAD)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Za pripremu DES-ova, akceptor vodikovih veza (HBA) i donor vodikovih veza (HBD) miješani su u točno definiranom molarnom omjeru od 1:2 s dodatkom deionizirane vode ili 50 mM fosfatnog pufera kalijevog fosfata (pH 7,5), prema specificiranim udjelima prikazanim u tablici 1. Detaljnije, izračunate mase pojedinih komponenti precizno su izmjerene analitičkom vagom i prenesene u Falcon epruvete. Pipetiranjem je u svaku smjesu dodana odgovarajuća količina vode ili pufera kako bi koncentracija vode ili pufera u otapalu iznosila 10 %, 30 %, 50 %, 80 % ili 90 % (w/w). Prije uporabe, kolin-klorid je sušen u vakuumskom koncentratoru na 60 °C tijekom 24 sata. Smjese su se miješale i zagrijavale na 60 °C dok se nije formirala bezbojna i homogena tekućina. Svi pripremljeni DES-ovi čuvani su u zatvorenim bocama do daljnje upotrebe.



**Tablica 1.** Pripremljena niskotemperaturna eutektička otapala

DES	Voda/ pufer	Akceptor vodika	Donor vodika	Molarni omjer (akceptor vodika: donor vodika)	Udio vode/pufer a u DES- u(%)	Kratica
<b>Kolin-klorid: glicerol(ChCl:Gly)</b>	voda	kolin- klorid	glicerol	1:2	10	ChCl:Gly <sub>10</sub> %V
					30	ChCl:Gly <sub>30</sub> %V
					50	ChCl:Gly <sub>50</sub> %V
					80	ChCl:Gly <sub>80</sub> %V
					90	ChCl:Gly <sub>90</sub> %V
<b>Kolin-klorid: glicerol(ChCl:Gly)</b>	pufer	kolin- klorid	glicerol		10	ChCl:Gly <sub>10</sub> %P
					30	ChCl:Gly <sub>30</sub> %P
					50	ChCl:Gly <sub>50</sub> %P
					80	ChCl:Gly <sub>80</sub> %P
					90	ChCl:Gly <sub>90</sub> %P
<b>Betain: glicerol(B:Gly)</b>	voda	betain	glicerol		10	B:Gly <sub>10</sub> %V
					30	B:Gly <sub>30</sub> %V
					50	B:Gly <sub>50</sub> %V
					80	B:Gly <sub>80</sub> %V
					90	B:Gly <sub>90</sub> %V
<b>Betain: glicerol(B:Gly)</b>	pufer	betain	glicerol		10	B:Gly <sub>10</sub> %P
					30	B:Gly <sub>30</sub> %P
					50	B:Gly <sub>50</sub> %P
					80	B:Gly <sub>80</sub> %P
					90	B:Gly <sub>90</sub> %P

### 3.2.2 . Karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Pripremljenim DES-ovima određene su pH vrijednost, gustoća i viskoznost pri sobnoj temperaturi od 25 °C. Sve mjere su izvršene u tri ponavljanja, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost.

### 3.2.2.1. Određivanje pH-vrijednosti

pH vrijednosti pripremljenih DES-ova određene su korištenjem univerzalnog uređaja za mjerenje pH, koji je bio prethodno kalibriran. Elektroda je bila uronjena u otapalo, a nakon stabilizacije, na uređaju su očitane vrijednosti pH.

### 3.2.2.2. Određivanje gustoće

Gustoća DES-ova izmjerena je pomoću piknometra, instrumenta koji se koristi za precizno određivanje gustoće tekućina. U piknometar je dodano otprilike 2 mL svakog otapala. Kada se piknometar zatvori, višak tekućine izlazi van, omogućujući točno određeni volumen otapala. Na tehničkoj vagi najprije je izvagan potpuno čist, suh i prazan piknometar, zajedno sa staklenim čepom. Zatim je piknometar napunjen uzorkom te ponovo izvagan. Masa DES-a izračunata je prema jednadžbi 1, a iz dobivene mase izračunata je gustoća DES-a prema jednadžbi 2:

$$m = m_{\text{puni piknometar}} - m_{\text{prazni piknometar}} [g] \quad [1]$$

$$\rho_{DES-a} = \frac{m_{DES-a}}{V_{\text{pikonemtar}}} \left[ \frac{kg}{m^3} \right] \quad [2]$$

### 3.2.2.3. Određivanje viskoznosti

Viskoznost prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala izmjerena je pomoću rotacijskog viskozimetra. Nastavak uređaja za mjerenje napuni se otapalom, a mjerenje se pokreće odabirom željenih radnih postavki prema uputama prikazanim na ekranu uređaja, nakon čega se dobiva vrijednost viskoznosti.

## 3.3.3. Priprema matičnih otopina enzima, koenzima i supstrata

### 3.3.3.1. Priprema matične otopine enzima (12,8 mg mL<sup>-1</sup>)

6,4 mg enzima formijat dehidrogenaze (FDH) je izvavano i otopljeno u 500 μL testiranih DES-a i u referentnom puferu. Korišteni DES-ovi su bili betain-glicerol i kolin klorid-glicerol s različitim udjelima vode ili pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %). Pripremljena otopina enzima je izmješana na vortexu uz zagrijavanje do potpunog otapanja.

### 3.3.3.2. Priprema matične otopine koenzima (25 mg mL<sup>-1</sup>)

6,25 mg NAD<sup>+</sup> je izvavano i otopljeno u 250 μL DES-a (ChCl:U= 1:2, 80 % dH<sub>2</sub>O). Pripremljena otopina koenzima je izmješana na vortexu te čuvana na +4 °C do korištenja. Prije korištenja ishodna otopina enzima je inkubirana na sobnu temperaturu.

### 3.3.3.3. Priprema matične otopine supstrata (0,5 g mL<sup>-1</sup>)

125 mg natrijeva formijata je izvagano i otopljeno u 250 µL deionizirane vode. Pripremljena otopina supstrata je izmiješana na vortexu. Matična otopina supstrata svježe je pripremljena svakog dana.

### 3.3.4. Praćenje stabilnosti FDH u pripremljenim otapalima

Kako bi se procijenila stabilnost FDH-a, pripremljene su matične otopine enzima (12,8 mg mL<sup>-1</sup>) u ispitivanim DES otopinama i referentnom puferu. Ove otopine su pohranjene u zatvorenim bočicama na 30 °C u tami. Uzorci su uzimani u redovitim intervalima tijekom razdoblja od 14 dana te je u tom periodu praćena aktivnost FDH-a. Za određivanje aktivnosti FDH-a, uzastopno su dodani FDH enzim, koenzim NAD<sup>+</sup> i supstrat Na formijat u različite sustave otapala, čime su postignute konačne koncentracije od 1,5 mg mL<sup>-1</sup> za FDH, 0,1 mg mL<sup>-1</sup> za NAD<sup>+</sup> i 10 mg mL<sup>-1</sup> za Na formijat. Ukupan volumen reakcijske smjese iznosio je 251 µL (tablica 2).

**Tablica 2.** Sastav reakcijske smjese za određivanje stabilnosti enzima FDH

Komponenta	Volumen	Koncentracija matične otopine
Enzim (FDH)	30 µL	12,8 mg mL <sup>-1</sup>
Koenzim (NAD <sup>+</sup> )	1 µL	25 mg mL <sup>-1</sup>
Supstrat (Na formijat)	5 µL	0,5 g mL <sup>-1</sup>
Pufer (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	215 µL	

Brzina degradacije NADH-a mjerena je odmah u mikrotitarskoj ploči s 96-jažica tijekom 5 minuta na 340 nm koristeći UV-Vis spektrofotometar. Konstanta brzine deaktivacije prvog reda ( $k_{FDH}$ , dan<sup>-1</sup>) procijenjena je iz kinetičkog modela prvog reda za smanjenje preostale enzimske aktivnosti tijekom vremena. ( $A_{Res}(t)$ ) (jednadžba 3):

$$k_{FDH} = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{A_{Res,0}}{A_{Res}(t)} \right) \quad [3]$$

gdje je  $A_{Res}$  preostala aktivnost enzima (bilo u trenutku nula,  $A_{Res,0}$ , ili u vremenu  $t$ ,  $A_{Res}(t)$ ). Kinetički parametri procijenjeni su prilagodbom eksperimentalnih podataka nelinearnoj jednadžbi korištenjem Levenberg–Marquardtovog algoritma implementiranog u WR Mathematica 10.0.

Poluživot enzima ( $t_{1/2, FDH}$ , dan) izračunat je pomoću prethodno određene vrijednosti  $k_{FDH}$  (jednadžba 3), prema jednadžbi 4:

$$t_{1/2,FDH} = \frac{\ln 2}{k_{FDH}} \quad [4]$$

### 3.3.5. Praćenje stabilnosti koenzima NADH

Mjerenja stabilnosti koenzima NADH u raznim sustavima otapala ( $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pratila su se do 14 dana. Uzorci su pohranjeni na tamnom mjestu na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a apsorpcijski spektri u rasponu od 230 do 400 nm redovito su snimani pomoću UV-Vis spektrofotometra. Svako mjerenje provedeno je u tri ponavljanja. Apsorpcijsko spektralno područje NADH pokazuje karakterističan vrh s maksimalnom apsorpcijom na 260 nm, što je uzorkovano prisutnošću adenzin monofosfatnog dijela te drugi vrh na 340 nm, koji proizlazi iz neutralnog nikotinamidnog dijela. Smanjenje apsorpcije na 340 nm slijedilo je kinetiku prvog reda. (jednadžba 5):

$$k_{NADH} = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{A_0}{A_t} \right) \quad [5]$$

gdje je  $k_{NADH}$  konstanta brzine degradacije prvog reda ( $\text{dan}^{-1}$ ),  $A$  je apsorpcija na 340 nm, bilo u trenutku nula,  $A_0$ , ili u trenutku  $t$ ,  $A_t$  (Wu i sur., 1986). Vrijeme poluživota NADH ( $t_{1/2, NADH}$ , dan) izračunato je koristeći prethodno određenu  $k_{NADH}$  (Jednadžba 5), prema jednadžbi 6:

$$t_{1/2,NADH} = \frac{\ln 2}{k_{NADH}} \quad [6]$$

### 3.3.6. Statistička analiza i matematički modeli enzima FDH i koenzima NADH

#### 3.3.6.1. Osnovna statistička analiza, raspodjela podataka i korelacijska matrica

Sva mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava DES-eva, rezidualne aktivnosti formijata dehidrogenaze i NADH provedena su u tri paralele i osnovna statistička analiza (srednja vrijednost i standardna devijacija) provedena je u programskom paketu Statistica 14.0. Korelacije između eksperimentalnih podataka analizirane su primjenom Spearmanove korelacijske matrice u programskom paketu Statistica 14.0. Spearmanov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) je neparametarske prirode, a računa se prema jednadžbi 7:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N d_i^2}{N^3 - N} \quad [7]$$

u kojoj N označava broj podataka,  $d_i$  kvadrat razlike rangova prve (nezavisne) i druge (zavisne) varijable. Kada je određivana značajnost koeficijenta korelacije, kao granična vrijednost značajnih i neznajnih koeficijenata uzeta je 0,05, odnosno ako je  $\rho < 0,05$  korelacija je značajna, a ako je  $\rho > 0,05$  koeficijent korelacije nije značajan.

### 3.3.6.2 Računanje molekulskih deskriptora DES-ova primjenom COSMO-RS programskog paketa

U svrhu karakterizacije DES-a kao otapala korišten je termodinamički model COSMO-RS. Prema teoriji COSMO-RS, tekućina se opisuje kao skup gusto zbijenih molekula koje imaju idealno definirane površinske naboje, označene grčkim slovom sigma ( $\sigma$ ). Ovaj programski paket generira krivulju vjerojatnosti distribucije  $\sigma$ , poznatu kao  $\sigma$  profil.  $\sigma$  profili za pojedine komponente izračunati su pomoću programa COSMO-RS. Na temelju postojeće baze podataka geometrijski i energijski optimiziranih molekula, izračunata je krivulja  $\sigma$  profila, koja predstavlja kvantitativni prikaz naboja na polarnoj površini molekule. Molekule koje djeluju kao HBA imaju pikove u području negativnih potencijala, dok molekuli koji su HBD pokazuju pikove u području pozitivnih potencijala. Nepolarne molekule obično imaju pikove u blizini nule. Osim elektrostatičkih interakcija i interakcija vodikovih veza, COSMO-RS također razmatra van der Waalsove sile između površinskih segmenata. Da bi se definirali molekularni deskriptori za sve komponente DES-a,  $\sigma$  krivulja za svaki HBA, HBD i vodu podijeljena je u 10 intervala, pri čemu širina svakog intervala iznosi  $0.005 \text{ e}/\text{Å}^2$ , obuhvaćajući raspon od  $-0.025$  do  $+0.025 \text{ e}/\text{Å}^2$ . Površina ispod svake regije integrirana je zasebno kako bi se dobila numerička vrijednost koja će poslužiti kao ulazni podaci za statističku analizu. Numeričke vrijednosti u svakom od 10 područja zbrojene su, a vrijednosti na granicama svakog područja prepolovljene su i pridružene susjednim vrijednostima. Tako je dobiven  $\sigma$  profil svake komponente korištene u izradi DES-ova (HBD, HBA, voda) podijeljen na 10 intervala.

Jednom dobiveni sigma profil pojedinačnih komponenata dovedeni su u direktnu vezu s korištenim otapalima za stabilnost FDH I NADH. Za svaki DES izračunato je 10 molekularnih deskriptora prema jednadžbi 8. u kojoj  $X_j$  predstavlja molarni udio svake pojedinačne komponente j,  $\sigma_{\sigma\text{-profile},j}^i$  sigma profil pojedinačne komponente j, a BK broj komponenata u smjesi. Ovime je dobiveno 10 ulaznih i nezavisnih varijabli, koje ujedno predstavljaju termofizikalne karakteristike svakog DES-a, označenih s  $\sigma_{DES}^i (i=1-10)$  kojima se ispituje učinak DES-a na stabilnost FDH i NADH

$$\sigma_{DES}^i = \sum_{j=1}^{BK} X_j \cdot \sigma_{\sigma\text{-profile},j}^i \quad [8]$$

### 3.3.6.3. Izrada korelacijskog modela između stabilnosti FDH-a i NADH i molekularnih deskriptora

Polazna pretpostavka statističke obrade podataka bila je ta da se eksperimentalno dobivene vrijednosti za stabilnost FDH te stabilnost NADH u DES-ovima mogu opisati kao funkcije fizičkih svojstava DES-a i  $\sigma$ -profila smjese, koji su izraženi pomoću skupa  $\sigma_{mix}^i$  deskriptora prema jednadžbi 9:

$$t_{1/2,FDH} / t_{1/2,NADH} = f(\rho, \eta, pH, \sigma_{mix}^1, \sigma_{mix}^2, \sigma_{mix}^3, \sigma_{mix}^4, \sigma_{mix}^5, \sigma_{mix}^6, \sigma_{mix}^7, \sigma_{mix}^8, \sigma_{mix}^9, \sigma_{mix}^{10}) \quad [9]$$

### 3.3.6.4. Model djelomične linearne regresije(DLR)

Za opisivanje odnosa između ulaznih (molekularnih deskriptora DES-a) i izlaznih varijabli (stabilnosti FDH i stabilnosti NADH u DES-ovima) korišteni su modeli djelomične linearne regresije (engl. *Piecewise Linear Regression, PRL*). Ulazne varijable modela odabrane su na temelju Spearmanove korelacijske matrice (jednadžba 10)

$$t_{1/2,FDH} / t_{1/2,NADH} = (b_{01} + b_{11} \cdot \rho + b_{21} \cdot \eta + b_{31} \cdot pH + b_{41} \cdot \sigma_{mix}^1 + b_{51} \cdot \sigma_{mix}^2 + b_{61} \cdot \sigma_{mix}^3 + b_{71} \cdot \sigma_{mix}^4 + b_{81} \cdot \sigma_{mix}^5 + b_{91} \cdot \sigma_{mix}^6 + b_{101} \cdot \sigma_{mix}^7 + b_{111} \cdot \sigma_{mix}^8 + b_{121} \cdot \sigma_{mix}^9 + b_{131} \cdot \sigma_{mix}^{10}) \cdot (t_{1/2,FDH} / t_{1/2,NADH} \leq b_n) + (b_{02} + b_{12} \cdot \rho + b_{22} \cdot \eta + b_{32} \cdot pH + b_{42} \cdot \sigma_{mix}^1 + b_{52} \cdot \sigma_{mix}^2 + b_{62} \cdot \sigma_{mix}^3 + b_{72} \cdot \sigma_{mix}^4 + b_{82} \cdot \sigma_{mix}^5 + b_{92} \cdot \sigma_{mix}^6 + b_{102} \cdot \sigma_{mix}^7 + b_{112} \cdot \sigma_{mix}^8 + b_{122} \cdot \sigma_{mix}^9 + b_{132} \cdot \sigma_{mix}^{10}) \cdot (t_{1/2,FDH} / t_{1/2,NADH} > b_n) \quad [10]$$

Princip djelomične linearne regresije temelji se na podjeli izmjerenih podataka u nekoliko regija koje slijede linearne trendove, čime se postiže bolje podudaranje modela s podacima. U ovom radu, dobiveni podatci za stabilnost FDH i stabilnost NADH podijeljene su u dvije regije s jednom točkom prijeloma. Parametri su procijenjeni putem dviju regresijskih jednadžbi: jedna za slučajeve kada su vrijednosti zavisne varijable (Y) manje ili jednake vrijednosti točke prijeloma  $b_n$ , i druga za vrijednosti kada su zavisne varijable (Y) veće od točke prijeloma  $b_n$ . Parametri modela djelomične linearne regresije procijenjeni su koristeći Levenberg-Marquardtov algoritam implementiran u softveru Statistica 14.0. Skup podataka od 63 točke za svaku izlaznu varijablu nasumično je podijeljen u omjeru 70:30 na skup podataka za kalibraciju i skup podataka za predviđanje. Primjenjivost razvijenih kalibracijskih modela procijenjena je pomoću koeficijenta determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}^{2adj}$ ) i korijena srednje kvadratne pogreške za kalibraciju (engl. *Root Mean Square Error for Calibration, RMSEC*). Učinkovitost predviđanja modela procijenjena je pomoću koeficijenta determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^{2adj}$ ), korijena srednje kvadratne pogreške za predviđanje (engl. *Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP*), standardne pogreške

predviđanja (engl. *Standard Error of Prediction, SEP*), omjera predviđanja i odstupanja (engl. *Ratio of Prediction to Deviation, RPD*) i omjera raspona pogreške (engl. *Ratio of the Error Range, RER*) (Fearn, 2002).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Niskotemperaturna eutektična otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*) igraju ključnu ulogu u biokatalizi, posebno u primjeni enzima kao katalizatora u kemijskim reakcijama. DES-ovi se sastoje od akceptora vodikovih veza (engl. *Hydrogen Bond Acceptor, HBA*) poput kolin-klorida, tetrabutilamonijeva klorida i betaina te donora vodikovih veza (engl. *Hydrogen Bond Donor, HBA*) poput različitih poliola, organskih kiselina i jednostavnih šećera. Ističu se svojom biokompatibilnošću, niskom toksičnošću i mogućnošću prilagodbe strukture, odnosno svojstava, za specifičnu namjenu. Zahvaljujući svojim jedinstvenim fizikalno-kemijskim svojstvima, DES-ovi ne samo da poboljšavaju enzimsku aktivnost, već također mogu djelovati kao ko-supstrati, poboljšati topljivost supstrata, utjecati na stereokemiju enzima te stabilizirati enzime i ostale sudionike reakcije (npr. supstrate, ko-supstrate i kofaktore) tijekom kemijskih reakcija. Njihova upotreba omogućuje smanjenje potreba za tradicionalnim organskim otapalima, čime se smanjuje utjecaj kemijskih procesa na okoliš (Zhang i sur., 2024; Francisco i sur., 2013).

Ovo istraživanje se fokusira na analizu stabilnosti oksido-reduktivnog enzima formijata dehidrogenaze (FDH) i koenzima NADH u kolinijevim i betainijevim DES-ovima s glicerolom kao donorom vodika. Ovi DES-ovi su odabrani na temelju dosadašnjih istraživanja koja upućuju da su DES-ovi na bazi poliola, koji sadrže kolin klorid ili betain kao HBA, najučinkovitiji mediji za stabilizaciju različitih dehidrogenaza, uključujući FDH (Gajardo-Parra i sur., 2023; Bittner i sur., 2022). Navedene studije također naglašavaju da voda igra ključnu ulogu u stabilizaciji dehidrogenaza te da je udio vode ključan u stabilizaciji odnosno destabilizaciji enzima. Konačno, DES-ovi na bazi poliola smatraju se netoksičnima i biorazgradivima (Radošević i sur., 2015). Sukladno navedenom, u ovom je radu pripremljeno i fizikalno-kemijski okarakterizirano 20 otapala na bazi kolinijevih odnosno betainijevih DES-ova sa glicerolom s različitim udjelima pufera odnosno vode (10 – 90 %, w/w). U tim DES-ovima odvojeno su inkubirani enzim odnosno koenzim te je praćena njihova inaktivacija odnosno degradacija tijekom vremena, a dobiveni rezultati statistički su obrađeni kako bi se utvrdilo koja svojstva DES-ova doprinose stabilizaciji ovih biomolekula. Uz to, razvijeni su matematički modeli temeljeni na linearnoj regresiji kako bi se opisala povezanost između fizikalnih svojstava DES-ova, njihovih molekularnih deskriptora ( $\sigma$ -profila) s njihovim stabilizacijskim učinkom na enzim FDH te koenzim NADH.



#### 4.1. PRIPREMA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA I FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA

Istraživanje fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova važno je za njihovu primjenu u industriji. Njihova molekularna struktura, kemijska svojstva te omjer sastojaka i vode mogu se prilagoditi odabirom specifičnih komponenti. Zbog velikog broja mogućih kombinacija, izbor DES-ova treba suziti na temelju dostupnih podataka iz literature. Za potrebe ovog istraživanja, pripremljena su dva DES-a na bazi glicerola (Gly), s kolin kloridom (ChCl) ili betainom (B) kao HBA u molarnom omjeru 1:2, te njihove odgovarajuće otopine u vodi odnosno 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7,5) (10 - 90 % w/w). Otopine u puferu pripremljene su kako bi pH otapala bio sličan optimalnoj pH vrijednosti enzima. DES-ovi razrijeđeni s više od 50 % vode (w/w) mogu se smatrati vodenim otopinama DES komponenti (Hammond i sur., 2017). Ipak, te su smjese uključene u istraživanje budući da je visok sadržaj vode unutar DES-a često ključan za održavanje katalitičke aktivnosti enzima (Taklimi i sur., 2023).

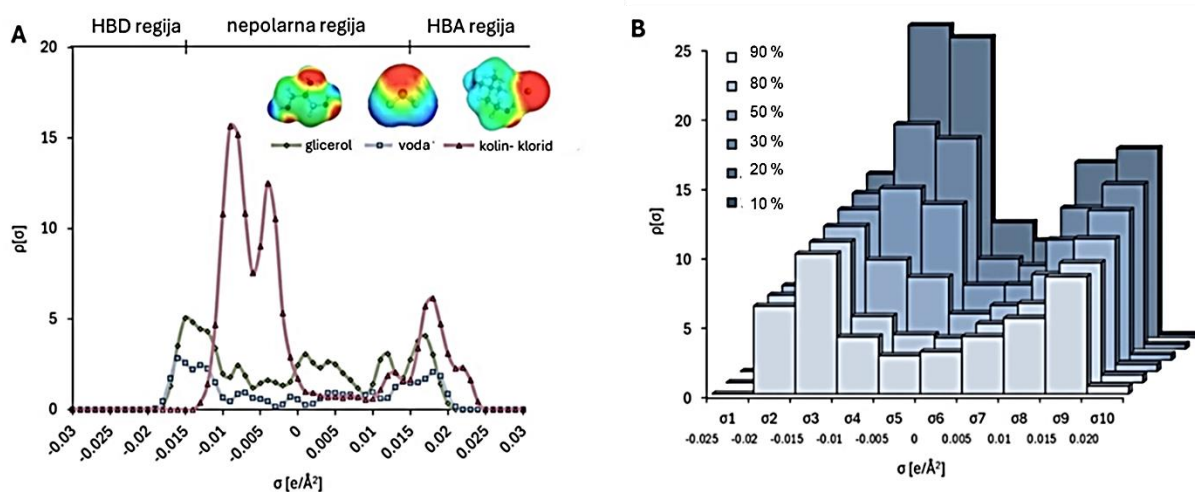
Ukupno je pripremljeno i fizikalno-kemijski karakterizirano 20 otapala na bazi DES-a (tablica 3). Sva mjerenja su izvršena u tri ponavljanja, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost. Kao što se očekivalo, gustoća i viskoznost vodenih otopina DES-a bile su snažno pod utjecajem sadržaja vode/puferskog otapala, dostižući vrhunac u smjesama s 10 % vode (do  $1,21 \text{ g cm}^{-3}$  i  $353,70 \text{ mPa s}$  za B:Gly<sub>10</sub> % v, te  $1,17 \text{ g cm}^{-3}$  i  $82,63 \text{ mPa s}$  za ChCl:Gly<sub>10</sub> % v). Općenito, smjese na bazi betaina bile su gušće i viskoznije od njihovih ekvivalenata na bazi ChCl. Sve ispitivane smjese imale su pH vrijednosti u rasponu od 5,3 do 9,2, pri čemu su smjese na bazi betaina bile kiselije od onih na bazi ChCl-a. Otopina DES-a u puferu obično je održavala pH vrijednosti između 7,5 i 8. Sve smjese DES-ova bile su stabilne tijekom tri mjeseca skladištenja na sobnoj temperaturi i nisu pokazivale znakove kontaminacije ili taloženja.

**Tablica 3.** Izmjerene fizikalno-kemijske karakteristike DES

Kratica	pH	$\eta$ (mPa s)	$\rho$ (g cm <sup>-3</sup> )
ChCl:Gly <sub>10</sub> %V	7,51	77,88	1,17
ChCl:Gly <sub>30</sub> %V	6,60	18,98	1,14
ChCl:Gly <sub>50</sub> %V	7,12	4,16	1,09
ChCl:Gly <sub>80</sub> %V	6,48	2,27	1,03
ChCl:Gly <sub>90</sub> %V	6,25	1,48	1,02
ChCl:Gly <sub>10</sub> %P	9,19	82,63	1,17
ChCl:Gly <sub>30</sub> %P	8,75	19,61	1,14
ChCl:Gly <sub>50</sub> %P	8,33	5,74	1,11
ChCl:Gly <sub>80</sub> %P	7,75	2,50	1,06
ChCl:Gly <sub>90</sub> %P	7,67	1,31	1,04
B:Gly <sub>10</sub> %V	6,48	353,70	1,21
B:Gly <sub>30</sub> %V	5,96	20,86	1,15
B:Gly <sub>50</sub> %V	5,33	8,84	1,13
B:Gly <sub>80</sub> %V	5,29	2,27	1,04
B:Gly <sub>90</sub> %V	5,47	1,31	1,03
B:Gly <sub>10</sub> %P	7,85	219,05	1,21
B:Gly <sub>30</sub> %P	7,46	32,87	1,17
B:Gly <sub>50</sub> %P	7,45	6,45	1,13
B:Gly <sub>80</sub> %P	7,49	2,27	1,06
B:Gly <sub>90</sub> % P	7,47	1,19	1,04
pufer	7,50	1,39	1,02

Za statističku analizu i matematičko modeliranje ovisnosti stabilizacijskog učinka DES-ova na odabrane biomolekule (FDH i NADH) o strukturi DES-ova odnosno njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, što je jedan od ciljeva ovog rada, ključno je, pored izmjerenih fizikalno-kemijskih svojstava, identificirati molekularne deskriptore DES-ova koji predstavljaju strukture komponenata u obliku numeričke vrijednosti (Venkatraman i sur., 2018). Napredni i precizni molekularni deskriptor je sigma profil ( $\sigma$ -profil), nenormalizirani histogram površinskog naboja molekule (Klamt, 2005).  $\sigma$ -profili se razlikuju od drugih prikaza jer mogu opisati nijansirane efekte poput polarizacije i asimetrije u gustoći elektrona (Abranches i sur., 2022).  $\sigma$ -profil može se podijeliti na tri ključne regije: (i) HBD regiju s negativnim gustoćama naboja, (ii) nepolarnu regiju s gotovo neutralnim gustoćama naboja i (iii) HBA regiju s pozitivnim gustoćama naboja (slika 5A). Ova podjela temelji se na činjenici da se svaki atom u molekuli HBA ili HBD može prepoznati po specifičnom vrhu s određenom vrijednošću gustoće površinskog naboja ( $\sigma$ ) (Lemaoui i sur., 2020). Ovdje je  $\sigma$ -profil svake smjese na bazi DES-a izračunat pomoću BOVIA

COSMO $therm$  softvera: krivulje  $\sigma$ -profila za svaki HBA i HBD podijeljene su u 10 regija, a površina ispod svake regije izračunata je uzimajući u obzir molarne omjere komponenti i sadržaj vode (tablica 4). Za glicerol,  $\sigma$ -profil otkriva vrhove na negativnim polarnim koordinatama (lijeva strana) koji odgovaraju pozitivno polarnim H atomima u -OH skupini, dok vrhovi na pozitivnim polarnim koordinatama (desna strana) odgovaraju O atomima u -OH skupini (slika 5A) (Cheng i sur., 2018). Ove polarne regije stupaju u interakciju s nasuprotnim polarnim segmentima u otopini. Proširenje  $\sigma$ -profila u jako polarne regije ( $-0,022 \text{ e}/\text{\AA}^2 < \sigma < -0,01 \text{ e}/\text{\AA}^2$  na lijevoj strani i  $0,01 \text{ e}/\text{\AA}^2 < \sigma < 0,013 \text{ e}/\text{\AA}^2$  na desnoj strani) je asimetrično, što ukazuje na to da glicerol ima veću površinu pozitivnog polariteta. Ovaj elektrostatički nesklad sugerira da glicerol teži djelovati kao HBD te stoga pokazuje veću afinitet prema HBA u otopini (Cui i sur., 2021). Nasuprot tome,  $\sigma$ -profil vode se proteže simetričnije u jako polarne regije, ukazujući na uravnoteženu sposobnost djelovanja i kao HBD i kao HBA. Konačno, za kolin-klorid, kao i za betain (Radović i sur., 2024), najjači vrh pojavljuje se u nepolarnoj regiji, odgovarajući kolinijevom kationu, praćen vrhom u HBA regiji, povezanim s  $\text{Cl}^-$  anionom. Slika 5A prikazuje  $\sigma$  površine komponenti DES-a (kolin klorid, glicerol i voda) generirane pomoću softvera TmoleX19. Boje predstavljaju izračunati gradijent naboja, u rasponu od područja siromašnih nabojem do područja bogatih nabojem: HBD regije označene su tamnoplavom bojom, a HBA regije tamnocrvenom na površini. Nепolarne regije označene su zelenom bojom (Quaid i Reza, 2023). Slika 5B pokazuje da čak i male promjene u smjesi ChCl, poput povećanja sadržaja vode s 10 % na 90 %, rezultiraju otapalima s različitim raspodjelama polariteta. Ovo pokazuje da korišteni softver može uhvatiti nijansirane fenomene, što je ključno za istraživanje kemijskog spektra ovih otapala i razumijevanje njihovog potencijalnog utjecaja na ponašanje enzima i koenzima.



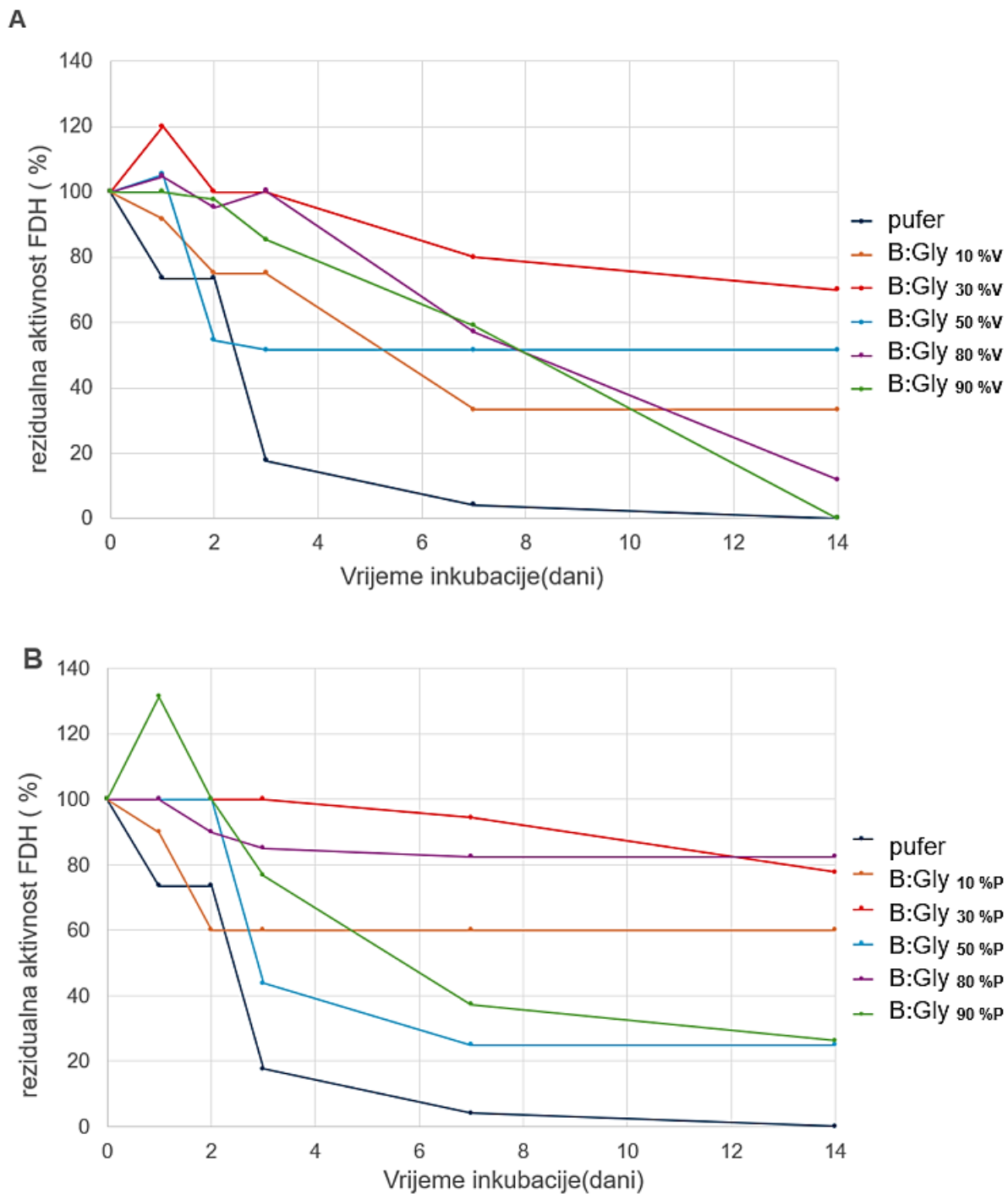
**Slika 5.**  $\sigma$ -površina (A) i  $\sigma$ -profili (B) pojedinačnih sastojaka DES-a (kolin klorid, glicerol i voda), te  $\sigma$ -profil odgovarajućih DES otopina u puferu (10 - 90%, w/w)

**Tablica 4.** Popis DES-ova i pripadajućih  $\sigma$ -profilu (molekularnih deskriptora)

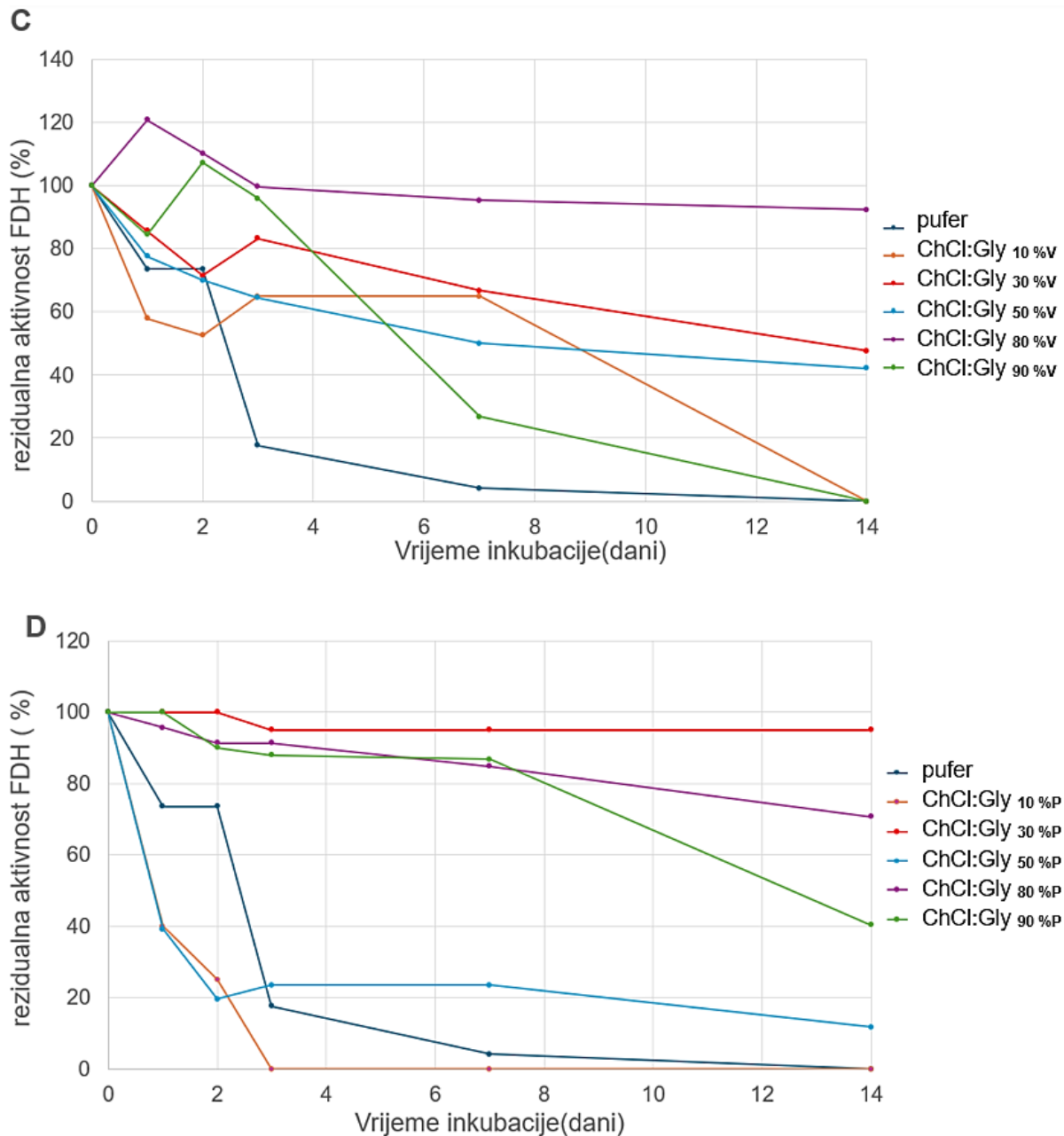
Oznaka	Sigma profil									
	$\sigma^1$	$\sigma^2$	$\sigma^3$	$\sigma^4$	$\sigma^5$	$\sigma^6$	$\sigma^7$	$\sigma^8$	$\sigma^9$	$\sigma^{10}$
voda	0,000	6,350	10,027	3,520	2,164	2,873	4,055	5,229	8,277	0,578
B:Gly <sub>10</sub> %V	0,005	5,652	10,974	21,584	22,626	8,235	6,377	10,666	12,207	1,914
B:Gly <sub>30</sub> %V	0,003	6,016	10,479	12,150	11,940	5,434	5,164	7,826	10,154	1,216
B:Gly <sub>50</sub> %V	0,001	6,178	10,260	7,968	7,203	4,193	4,627	6,568	9,244	0,907
B:Gly <sub>80</sub> %V	0,000	6,301	10,093	4,775	3,585	3,245	4,216	5,606	8,550	0,670
B:Gly <sub>90</sub> %V	0,000	6,328	10,057	4,091	2,811	3,042	4,128	5,401	8,401	0,620
B:Gly <sub>10</sub> %B	0,005	5,652	10,974	21,584	22,626	8,235	6,377	10,666	12,207	1,914
B:Gly <sub>30</sub> %B	0,003	6,016	10,479	12,150	11,940	5,434	5,164	7,826	10,154	1,216
B:Gly <sub>50</sub> %B	0,001	6,178	10,260	7,968	7,203	4,193	4,627	6,568	9,244	0,907
B:Gly <sub>80</sub> %B	0,000	6,301	10,093	4,775	3,585	3,245	4,216	5,606	8,550	0,670
B:Gly <sub>90</sub> %B	0,000	6,328	10,057	4,091	2,811	3,042	4,128	5,401	8,401	0,620
ChCl:Gly <sub>10</sub> %V	0,005	5,671	11,807	22,499	21,631	8,309	6,995	12,632	13,637	0,246
ChCl:Gly <sub>30</sub> %V	0,002	6,033	10,858	12,380	11,252	5,411	5,428	8,685	10,779	0,423
ChCl:Gly <sub>50</sub> %V	0,001	6,188	10,451	8,041	6,801	4,168	4,755	6,992	9,553	0,499
ChCl:Gly <sub>80</sub> %V	0,000	6,305	10,146	4,786	3,462	3,235	4,251	5,722	8,634	0,555
ChCl:Gly <sub>90</sub> %V	0,000	6,329	10,081	4,095	2,754	3,037	4,144	5,453	8,439	0,567
ChCl:Gly <sub>10</sub> %B	0,005	5,671	11,807	22,499	21,631	8,309	6,995	12,632	13,637	0,246
ChCl:Gly <sub>30</sub> %B	0,002	6,033	10,858	12,380	11,252	5,411	5,428	8,685	10,779	0,423
ChCl:Gly <sub>50</sub> %B	0,001	6,188	10,451	8,041	6,801	4,168	4,755	6,992	9,553	0,499
ChCl:Gly <sub>80</sub> %B	0,000	6,305	10,146	4,786	3,462	3,235	4,251	5,722	8,634	0,555
ChCl:Gly <sub>90</sub> %B	0,000	6,329	10,081	4,095	2,754	3,037	4,144	5,453	8,439	0,567

## 4.2. STABILNOST ENZIMA FDH

Stabilnost enzima format dehidrogenaze (FDH) praćena je periodičkim mjerenjem aktivnosti FDH tijekom 14 dana inkubacije u pripremljenim otopinama DES-ova. Promjene u aktivnosti enzima praćene su spektrofotometrijski prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.4., pri ćemu je rezidualna aktivnost (%) definirana kao omjer početne brzine reakcije nakon inkubacije i brzine reakcije prije inkubacije enzima u otopinama DES-ova. Vrijednosti rezidualne aktivnosti enzima FDH u različitim DES-ovima su prikazane na slikama 6 i 7.



**Slika 6.** Rezidualna aktivnost enzima FDH u DES-u betain:glicerol (B:Gly)=1:2 tijekom inkubacije u B:Gly A) pri različitim udjelima vode (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %) te B) pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %)



**Slika 7.** Rezidualna aktivnost enzima FDH u DES-u kolin-klorid:glicerol (ChCl:Gly)=1:2 tijekom inkubacije u ChCl:Gly C) pri različitim udjelima vode (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %) te C) pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %)

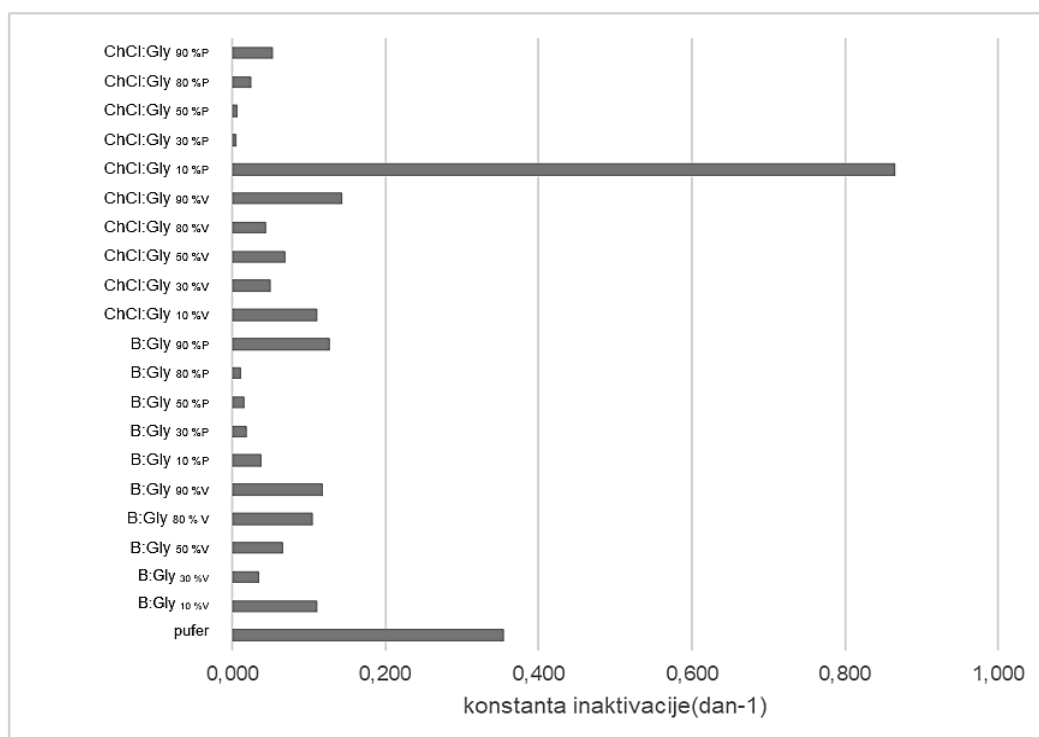
Kod referentnog pufera i u smjesama s DES-ovima, inaktivacija FDH slijedila je kinetiku prvog reda, što nam je omogućilo korištenje ovog kinetičkog modela za izračunavanje konstante inaktivacije te vrijeme poluživota FDH ( $t_{1/2,FDH}$ ). Niže konstante inaktivacije ukazuju na bolju stabilnost enzima tijekom vremena, dok više vrijednosti sugeriraju bržu deaktivaciju enzima. Rezultati konstanti inaktivacija i vremena poluživota enzima FDH prikazani su na slikama 8 i 9. Rezidualna aktivnost enzima FDH u referentnom puferu smanjila se na manje od 20 % već nakon nekoliko dana inkubacije, a nakon 7. dana aktivnost enzima gotovo je potpuno

izgubljena. Rezultati pokazuju da referentni pufer nije optimalan za očuvanje stabilnosti FDH, što je vidljivo iz kratkog vremena poluživota ( $t_{1/2,FDH} = 2,1$  dan) i visoke konstante inaktivacije ( $0,331 \text{ dan}^{-1}$ ). Otopine DES-ova B:Gly i ChCl:Gly s niskim udjelom vode (10 %) nisu omogućile dugotrajnu stabilnost enzima FDH. Ovaj trend ukazuje na brzu destabilizaciju enzima FDH u DES-ovima u kojima je sadržaj vode < 30 %, što je također u skladu s visokim konstantama inaktivacije i kratkim vremenima poluživota u ovim DES-ovima. Međutim, DES na bazi kolin-klorida s niskim udjelom vode (10%) pokazuje nešto bolju stabilnost enzima FDH-a u usporedbi s DES-om na bazi betaina, što se može vidjeti kroz dulje vrijeme poluživota (B:Gly<sub>10 %V</sub>,  $t_{1/2,FDH} = 6,5$  dana, ChCl:Gly<sub>10 %V</sub>,  $t_{1/2,FDH} = 9,0$  dana). Otopine DES-ova s 30 % i 50 % vode, omogućile su bolju stabilnost enzima. U ovim uvjetima, vrijeme poluživota enzima za DES B:Gly<sub>30 %V</sub> je  $t_{1/2,FDH} = 21,4$  dana, a za ChCl:Gly<sub>30 %V</sub> je  $t_{1/2,FDH} = 14,7$  dana, što upućuje na to da umjerena razina vode može pomoći u očuvanju strukture enzima i njegove funkcionalnosti. Vremena poluživota za otopine DES-ova sa 50 % vode su nešto niže, ali je i dalje stabilnost enzima u njima dobro očuvana. Otopina DES-a ChCl:Gly<sub>80 %V</sub>, pokazuje bolju stabilizaciju enzima FDH u odnosu na B:Gly<sub>80 %V</sub>. U DES-u ChCl:Gly<sub>80 %V</sub> enzim je nakon 14. dana inkubacije očuvao čak 90 % svoje rezidualne aktivnosti, dok je u DES-u B:Gly<sub>80 %V</sub> rezidualna aktivnost pala već nakon 3. dana inkubacije. To je potvrđeno duljim vremenom poluživota (18,22 dana naspram 7,05 dana) i nižom konstantom inaktivacije ( $0,043 \text{ dan}^{-1}$  naspram  $0,103 \text{ dan}^{-1}$ ). Za razliku od toga, visok udio vode (90 %) smanjuje stabilizacijske interakcije između komponenata DES-a, čime otopina gubi karakteristike DES-a i ponaša se više kao vodeni sustav, sličan referentnom puferu. DES otopine s puferom također su pokazale različitu stabilnost enzima FDH ovisno o koncentraciji pufera. DES-ovi s udjelom puferskog otapala od 80 % (w/w) omogućili su značajno dulje očuvanje aktivnosti enzima u usporedbi s referentnim puferom. Primjerice,  $t_{1/2,FDH}$  za B:Gly<sub>80 %B</sub> iznosio je 65,6 dana s konstantom inaktivacije od  $0,011 \text{ dan}^{-1}$ , dok je ChCl:Gly<sub>80 %B</sub>  $t_{1/2,FDH}$  iznosio 29,9 dana s konstantom inaktivacije od  $0,023 \text{ dan}^{-1}$ , što predstavlja čak 30 puta veći stabilizacijski efekt u odnosu na referentni pufer. S druge strane, DES-ovi s niskim udjelom pufera od 10 %, nisu bili učinkoviti za održavanje stabilnosti enzima FDH, što je slično rezultatima za DES-ove s niskim udjelima vode. Zanimljivo je da B:Gly<sub>10 %P</sub> pokazuje veću stabilnost enzima FDH nego ChCl:Gly<sub>10 %P</sub>, obzirom da su rezultati s vodom pokazali suprotno. Rezidualna aktivnost za DES ChCl:Gly<sub>30 %P</sub> gotovo je nepromijenjena tijekom cijelog perioda inkubacije, pri čemu je vrijeme poluživota iznosilo  $t_{1/2,FDH} = 17,8$  dana, a konstanta inaktivacije je  $0,004 \text{ dan}^{-1}$ . Kod ChCl:Gly<sub>50 %P</sub> konstanta inaktivacije je nešto viša ( $0,005 \text{ dan}^{-1}$ ), dok je vrijeme poluživota blago povećano na  $t_{1/2,FDH} = 19,0$  dana. S druge strane konstanta inaktivacije za B:Gly<sub>30 %P</sub> iznosila je  $0,0018 \text{ dan}^{-1}$  a vrijeme poluživota  $t_{1/2,FDH} = 40,1$  dan, a za B:Gly<sub>50 %P</sub> konstanta inaktivacije iznosila je  $0,0015 \text{ dan}^{-1}$  a vrijeme poluživota se povećalo na  $t_{1/2,FDH} = 55,2$  dana. Iz toga

slijedi da je stabilnost enzima bolja u DES-u na bazi kolin-klorida s 30 % pufera nego u DES-u na bazi kolin-klorida s 50 % pufera. Nasuprot tome, stabilnost enzima pokazala se bolja u DES-u na bazi betaina s 50 % pufera nego u DES-u na bazi betain s 30 % puferske otopine. Razlike u stabilnosti enzima FDH između DES-ova s dodatkom vode i onih s puferom upućuju na to da stabilnost enzima uvelike ovisi o specifičnim interakcijama koje proizlaze iz kombinacije komponenti DES-a i vrste otapala. Visoki udio pufera (90 %) smanjuje stabilizacijski učinak enzima, međutim DES na bazi kolin-klorida pokazao je bolju stabilizaciju enzima FDH nego DES na bazi betaina.

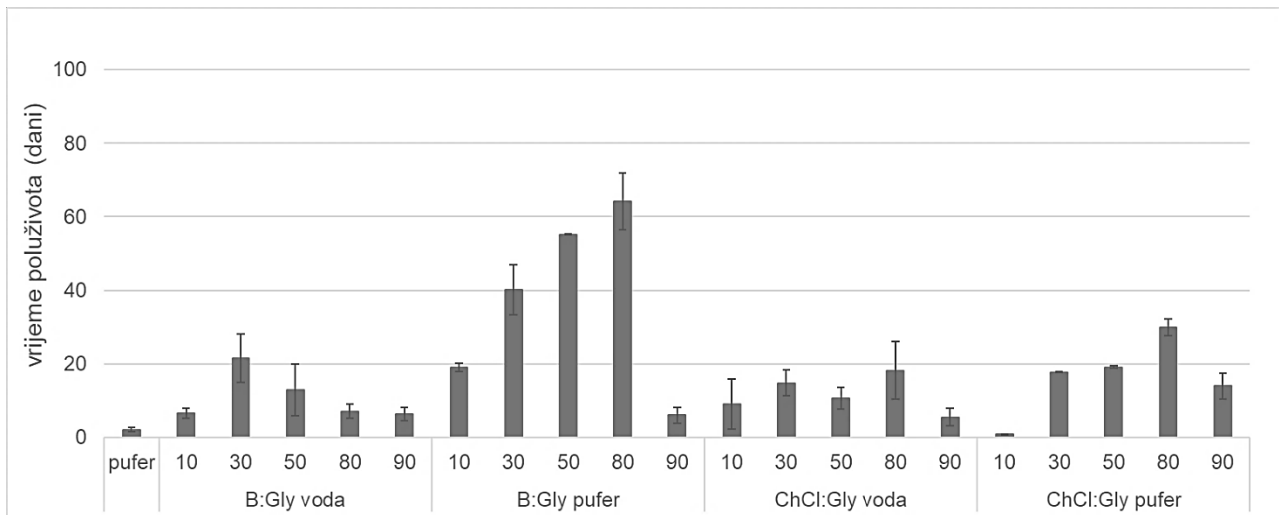
Usporedbom različitih otopina DES-ova, DES-ovi na bazi kolin-klorida općenito su se pokazali pogodnijima za očuvanje stabilnosti FDH u usporedbi s DES-ovima na bazi betaina. Kolin-klorid osigurava stabilnije ionsko okruženje, što omogućava veću stabilnost enzima tijekom vremena. Dobiveni rezultati sugeriraju da su DES-ovi s udjelima vode ili pufera između 30 % i 80 % (w/w) najpovoljniji za očuvanje aktivnosti enzima FDH.

Pojedini rezultati pokazali su neočekivane vrijednosti aktivnosti enzima nakon prvog dana, pri čemu se rezidualna aktivnost enzima povećala od početne vrijednosti od 100 %, nakon čega je slijedilo postupno smanjenje. Prolazni porast aktivnosti enzima može biti rezultat adaptacije na DES i viskozni medij, pri čemu enzim prolazi kroz konformacijske promjene svoje strukture (Guo i sur., 2023; Varriale i sur., 2022; Delorme i sur., 2020). Osim toga, ovaj porast može biti posljedica manjih pogrešaka u pripremi uzoraka ili uvjetima inkubacije koji utječu na mjerenja.



**Slika 8** . Konstante inaktivacije enzima FDH tijekom inkubacije u B:Gly i ChCl:Gly pri različitim udjelima vode (10 %,30 %, 50 %, 80 %, 90 %) te pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %)

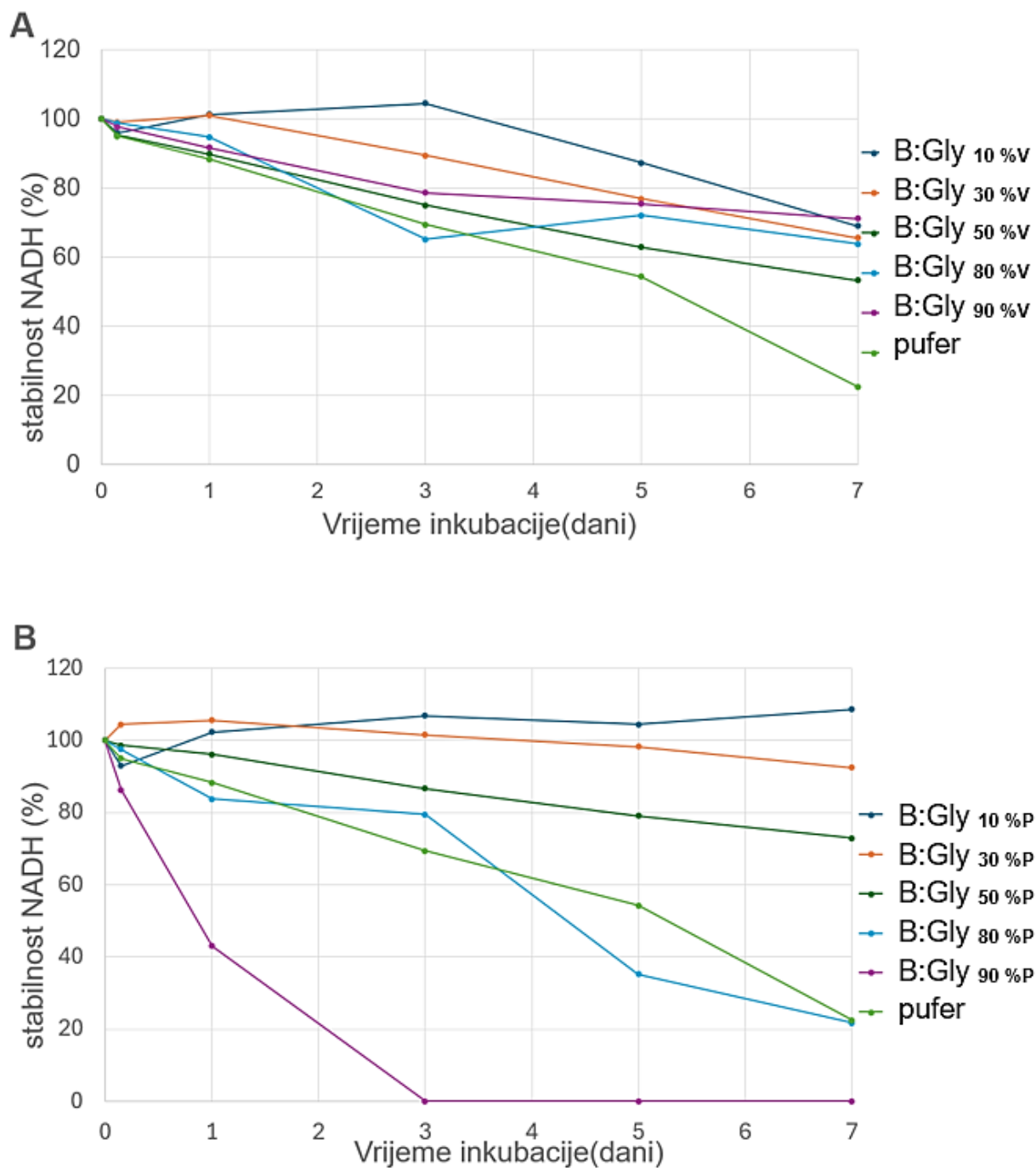




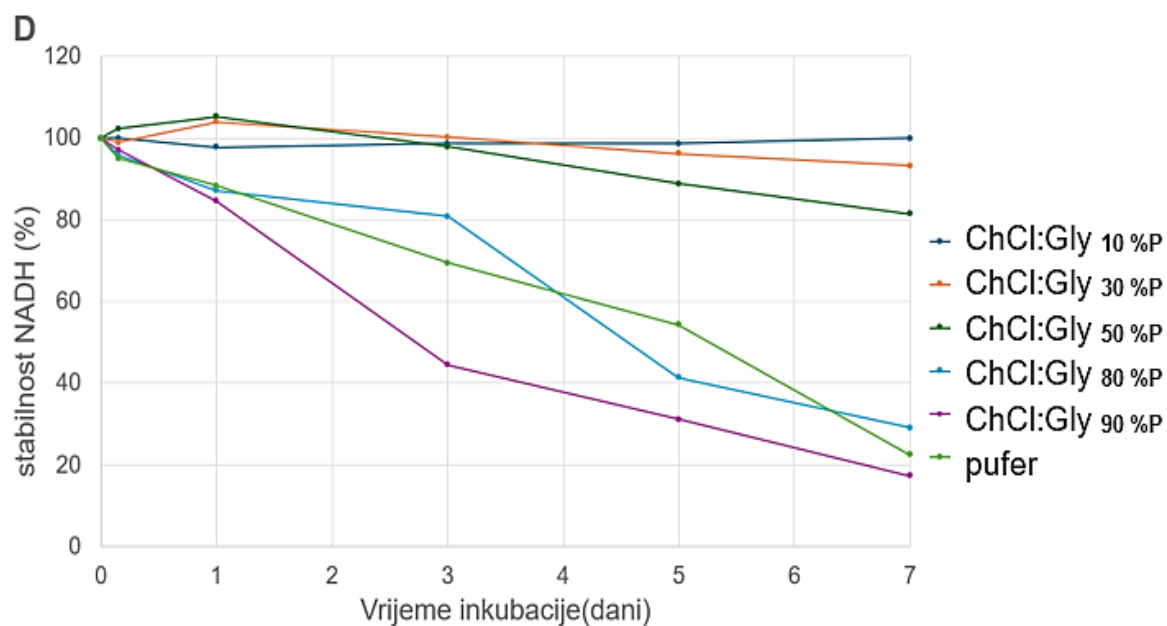
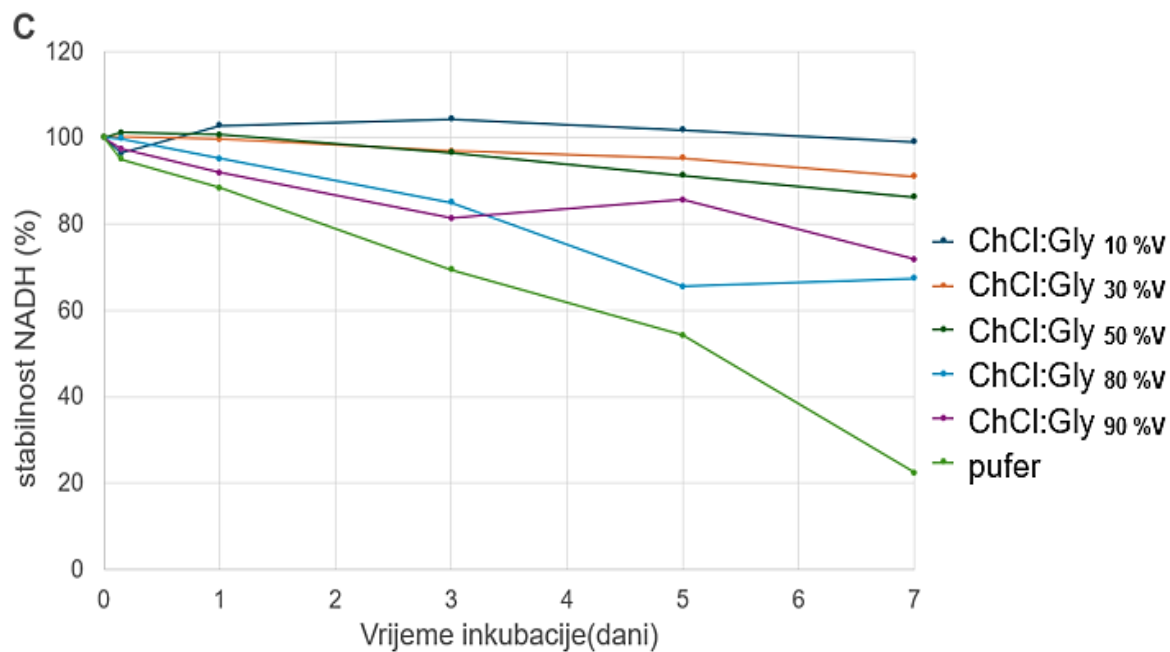
**Slika 9.** Vrijeme poluživota enzima FDH tijekom inkubacije u B:Gly i ChCl:Gly pri različitim udjelima vode (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %) te pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %)

#### 4.3. STABILNOST NADH

Enzimi za svoju aktivnost zahtijevaju prisutnost kofaktora, stoga je ispitana i stabilnost koenzima NADH tijekom inkubacije u eutektičkim otapalima, koristeći spektrofotometrijsku metodu. Stabilnost je praćena analizom promjena u apsorpcijskom spektru u rasponu od 230 do 400 nm. Ova metoda se pokazala pogodnom za praćenje stabilnosti koenzima zbog prisutnosti adenina i piridinskog prstena u strukturi NADH, koji apsorbiraju svjetlost na valnim duljinama od 260 nm i 340 nm (Rover Jr. i sur., 1998). Stabilnost koenzima NADH prati se mjerenjem preostale koncentracije tijekom vremena kako bi se odredila brzina njegove degradacije i utvrdilo koliko dugo zadržava svoju funkcionalnost u određenim uvjetima (slike 10 i 11).



**Slika 10.** Stabilnost koenzima NADH u DES-u betain:glicerol (B:Gly) = 1:2 tijekom inkubacije u B:Gly A) pri različitim udjelima vode (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %) te B) pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %)



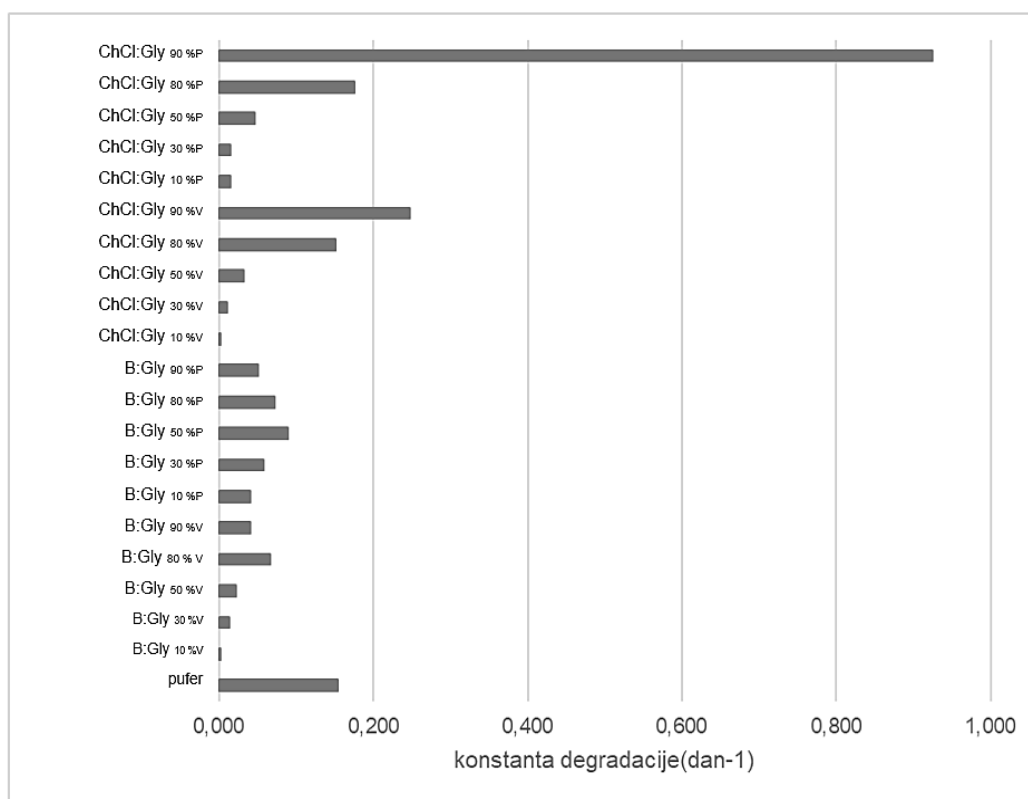
**Slika 11.** Stabilnost koenzima NADH u DES-u kolin-klorid:glicerol (ChCl:Gly)=1:2 tijekom inkubacije u ChCl:Gly C) pri različitim udjelima vode (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %) te D) pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %)

Tijekom inkubacije, gubitak apsorbancije na 340 nm pratio je kinetiku prvog reda, koja je korištena za izračunavanje konstante degradacije i vremena poluživota NADH. Niža konstanta degradacije znači da je degradacija koenzima sporija, što rezultira duljim vremenom poluživota i većom stabilnošću NADH. Rezultati konstanti inaktivacije i vremena poluživota koenzima NADH prikazani su na slikama 12 i 13.

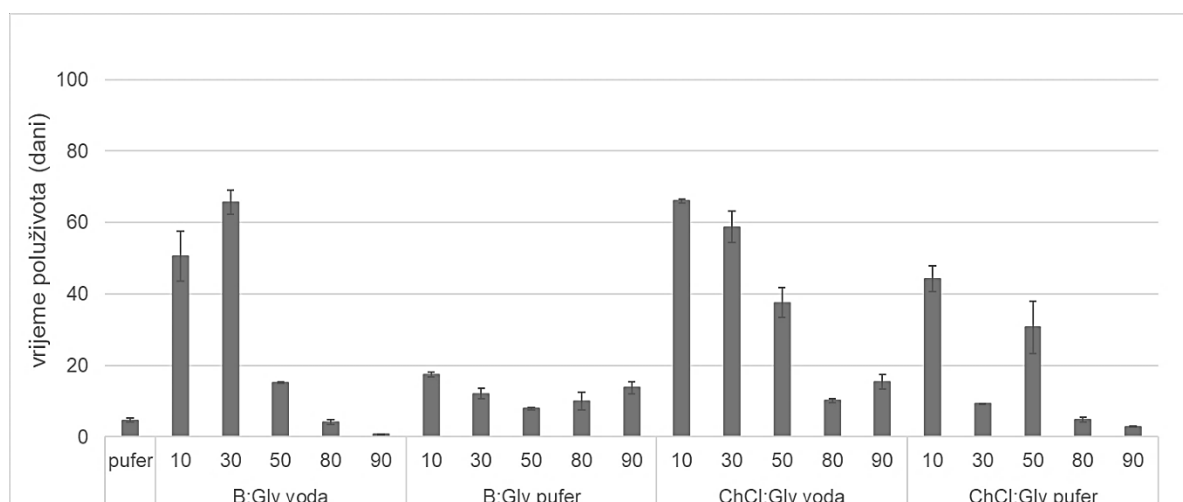
Stabilnost NADH brzo opada u referentnom puferu, što je potvrđeno kratkim vremenom poluživota koje iznosi  $t_{1/2,NADH} = 4,6$  dana i visokom konstantom degradacije koja je iznosila  $k_{NADH} = 0,153 \text{ dan}^{-1}$ . Ovi rezultati pokazuju da referentni pufer nije optimalan za očuvanje stabilnosti NADH, sličan efekt primijećen je i kod enzima FDH. U otopinama DES-ova s niskim udjelom vode, poput B:Gly<sub>10 %V</sub> i ChCl:Gly<sub>10 %V</sub> stabilnost NADH ostaje viša kroz dulji vremenski period, budući da se NADH u ovim otopinama sporije razgrađuje. Te rezultate, potvrdile su i niske konstante degradacije koje iznose  $0,001 \text{ dan}^{-1}$  za oba DES-a i visoka vremena poluživota koja iznose  $t_{1/2,NADH} = 50,5$  za B:Gly<sub>10 %V</sub> i  $t_{1/2,NADH} = 66,0$  dana za ChCl:Gly<sub>10 %V</sub>. U otopini DES-a na bazi kolin klorida s 10 % vode enzim NADH pokazuje najbolju stabilnost, te pokazuje čak 15 puta bolje rezultate nego referentni pufer. Otopine DES-a s 30% vode također su pokazale vrlo dobre rezultate, obzirom da je vrijeme poluživota koenzima NADH u njima  $t_{1/2,NADH} = 65,7$  dana za B:Gly<sub>30 %V</sub> i  $t_{1/2,NADH} = 58,8$  dana za ChCl:Gly<sub>30 %V</sub>, što je u skladu i sa njihovim niskim konstantama degradacije ( $0,013 \text{ dan}^{-1}$  za B:Gly<sub>30 %V</sub> i  $0,015 \text{ dan}^{-1}$  za ChCl:Gly<sub>30 %V</sub>). DES na bazi kolin-klorida sa 50 % vode pokazao je bolju znatno bolju stabilnost koenzima NADH nego DES na bazi betaina sa 50 % vode, što je popraćeno nižom konstantom degradacije i dužim vremenom poluživota. Udio vode od 80% i 90% značajno smanjuje stabilnost NADH u oba DES-a, jer se otopine DES-ova ponašaju više kao vodene otopine i gube specifična ionska svojstva DES-a koja stabiliziraju NADH. Stabilnost koenzima NADH praćena je i u otopinama DES-a s dodatkom pufera kako bi se istražio utjecaj različitih omjera pufera na dugotrajnu stabilnost koenzima. Stabilnost koenzima NADH pokazala se najboljom u otopinama DES-ova sa niskim razinama pufera (10 % pufera), osobito u DES-u na bazi kolin-klorida kao što je bilo i u otopinama DES-a razrijeđenim vodom. Vrijeme poluživota za NADH u B:Gly<sub>10 %P</sub> iznosilo je 17,5 dana, dok je u ChCl:Gly<sub>10 %P</sub> iznosilo 44,2 dana. U skladu s tim su i njihove konstante degradacije, pri čemu je konstanta inaktivacije  $k_{NADH} = 0,04 \text{ dan}^{-1}$  u B:Gly<sub>10 %P</sub> veća od konstante inaktivacije  $k_{NADH} = 0,015 \text{ dan}^{-1}$  u ChCl:Gly<sub>10 %P</sub>. U otopinama DES-ova sa 30 % i 50 % pufera koenzim NADH također je pokazao dobru stabilnost, a stabilnijim se pokazao u otopinama na bazi kolin-klorida obzirom da se u njima sporije degradira ( $k_{NADH}$  B:Gly<sub>30 %P</sub> =  $0,058 \text{ dan}^{-1}$ ,  $k_{NADH}$  ChCl:Gly<sub>30 %P</sub> =  $0,014 \text{ dan}^{-1}$ ,  $k_{NADH}$  B:Gly<sub>50 %P</sub> =  $0,089 \text{ dan}^{-1}$ ,  $k_{NADH}$  ChCl:Gly<sub>50 %P</sub> =  $0,046 \text{ dan}^{-1}$ ). Vrijeme poluživota koenzima u B:Gly<sub>30 %P</sub> iznosilo je 12,1 dana dok je u ChCl:Gly<sub>30 %P</sub> iznosilo je 9,2 dana. Iako DES na bazi betaina ima duže vrijeme poluživota, u DES-u na bazi kolin-klorida koenzim pokazuje bolju stabilnost zahvaljujući sporijoj degradaciji. U B:Gly<sub>50 %P</sub> vrijeme poluživota iznosilo je 7,8 dana, a u ChCl:Gly<sub>50 %P</sub> 30,6 dana, što ukazuje da je vrijeme poluživota 4 puta dulje u DES-u na bazi kolin-klorida. Stabilnost NADH smanjena je u otopinama DES-a s višim udjelima pufera (80%,90% pufera, w/w) te su rezultati slični kao i u referentom puferu.

Općenito, DES-ovi na bazi ChCl-a bili su pogodniji za stabilizaciju koenzima od DES-

ova na bazi betaina. Veći udio DES-a pozitivno je utjecao na sposobnost otapalnih sustava da stabiliziraju koenzim za sve testirane DES-ove.



**Slika 12.** Konstante degradacije koenzima NADH tijekom inkubacije u B:Gly i ChCl:Gly pri različitim udjelima vode (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %) te pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90 %)



**Slika 13.** Vrijeme poluživota koenzima NADH tijekom inkubacije u B:Gly i ChCl:Gly pri različitim udjelima vode (10%, 30%, 50 %, 80%, 90 %) te pri različitim udjelima pufera (10 %, 30 %, 50 %, 80 %, 90%)

#### 4.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA I MATEMATIČKO MODELIRANJE

Korelacije između fizikalno-kemijskih svojstava (pH, viskoznost i gustoća) korištenih DES-ova, DES deskriptora ( $\sigma$ -profila), stabilnosti i FDH-a te stabilnosti NADH analizirane su korištenjem Spearmanove korelacijske matrice, koja je odabrana zbog ne-normalne distribucije podataka. Analiza je potvrdila naše gore navedene pretpostavke i nalaze iz eksperimentalnog ispitivanja: ciljna svojstva reakcije pod utjecajem sastava DES-a dovela su do proturječnih rezultata. Odnosno, stabilnost FDH-a u testiranim sustavima otapala pokazala je negativne korelacije sa stabilnošću NADH-a (tablica 5).

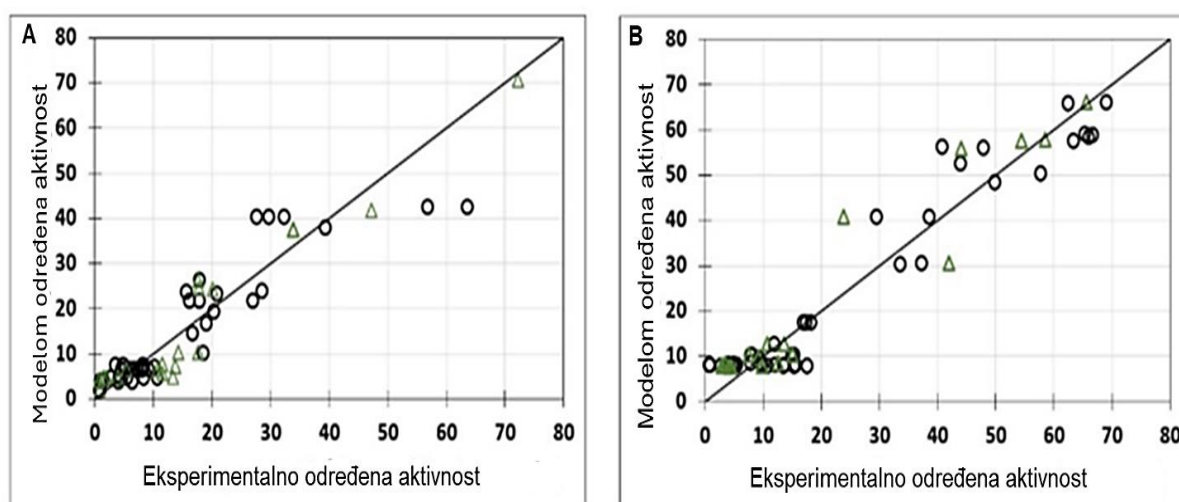
Spearmanova korelacijska matrica prikazana u tablici 5 naglašava složenu međusobnu povezanost fizikalno-kemijskih svojstava DES-a (pH, gustoća, viskoznost) i DES deskriptora s performansama FDH-a i stabilnošću njegovog kofaktora NADH-a. Stabilnost NADH-a pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju s gustoćom/viskoznošću otapalnih sustava s DES-ovima, što se može pripisati sporijoj ukupnoj dinamici otapala koja pružaju manje štetno okruženje za otopljeni NADH. Stabilnost NADH-a značajno je pod utjecajem pH vrijednosti, dok za stabilnost FDH-a nije pronađena korelacija s ovom kemijskom osobinom. Dobro je poznato da je stabilnost NADH-a (Zachos i sur., 2019) ovisna o pH-u. Međutim, učestala izvješća o sposobnosti DES-ova da stabiliziraju različite enzime neovisno o pH vrijednosti dalje izazivaju nedoumice. Ova zanimljiva opažanja upućuju na druge mehanizme, poput izravnih interakcija između komponenti DES-a i proteina ili s obližnjim molekulama vode, koji potencijalno mijenjaju aktivnost vode u mediju (Damjanović i sur., 2024). Nadalje, analiza je otkrila da su gotovo svi DES deskriptori značajno utjecali na ciljana svojstva. Konkretno,  $\sigma^1_{\text{mix}}$  i  $\sigma^2_{\text{mix}}$  (HBD regija, srednja polariteta),  $\sigma^3_{\text{mix}}$  -  $\sigma^5_{\text{mix}}$  (nepolarna regija, pozitivni naboji),  $\sigma^6_{\text{mix}}$  -  $\sigma^8_{\text{mix}}$  (nepolarna regija, negativni naboji) i  $\sigma^9_{\text{mix}}$  (HBA regija) (Lemaoui i sur., 2020), su pokazali značajan utjecaj na proučavana svojstva. Stabilnost FDH-a i stabilnost NADH-a pokazale su pozitivne korelacije sa svim deskriptorima, osim za  $\sigma^2_{\text{mix}}$ , koji je pokazao negativnu korelaciju. Nadalje je pokazano da: otapala bogata HBA i nepolarnim domenama stabiliziraju enzim (i koenzim), dok otapala bogata HBD-om mogu dovesti destabilizacije.

**Tablica 5.** Spearmanova korelacijska matrica. Korelacije značajne pri  $\rho < 0,05$  označene su podebljano

	$t_{1/2, FDH}$	$t_{1/2, NADH}$	$\rho$	$\eta$	pH	$\sigma^1_{mix}$	$\sigma^2_{mix}$	$\sigma^3_{mix}$	$\sigma^4_{mix}$	$\sigma^5_{mix}$	$\sigma^6_{mix}$	$\sigma^7_{mix}$	$\sigma^8_{mix}$	$\sigma^9_{mix}$	$\sigma^{10}_{mix}$
$t_{1/2, FDH}$	1,000														
$t_{1/2, NADH}$	-0,045	1,000													
$\rho$	<b>0,199</b>	<b>0,635</b>	1,000												
$\eta$	<b>0,142</b>	<b>0,663</b>	<b>0,942</b>	1,000											
pH	<b>0,063</b>	-0,104	<b>0,461</b>	<b>0,301</b>	1,000										
$\sigma^1_{mix}$	<b>0,146</b>	<b>0,679</b>	<b>0,964</b>	<b>0,974</b>	<b>0,316</b>	1,000									
$\sigma^2_{mix}$	<b>-0,146</b>	<b>-0,679</b>	<b>-0,964</b>	<b>-0,974</b>	<b>-0,316</b>	<b>-1,000</b>	1,000								
$\sigma^3_{mix}$	<b>0,101</b>	<b>0,727</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000							
$\sigma^4_{mix}$	<b>0,101</b>	<b>0,727</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000						
$\sigma^5_{mix}$	<b>0,146</b>	<b>0,679</b>	<b>0,964</b>	<b>0,974</b>	<b>0,316</b>	1,000	<b>-1,000</b>	<b>0,948</b>	<b>0,948</b>	1,000					
$\sigma^6_{mix}$	<b>0,110</b>	<b>0,694</b>	<b>0,948</b>	<b>0,964</b>	<b>0,286</b>	<b>0,990</b>	<b>-0,990</b>	<b>0,958</b>	<b>0,958</b>	<b>0,990</b>	1,000				
$\sigma^7_{mix}$	<b>0,101</b>	<b>0,727</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000	<b>0,948</b>	<b>0,958</b>	1,000			
$\sigma^8_{mix}$	<b>0,101</b>	<b>0,727</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000	<b>0,948</b>	<b>0,958</b>	1,000	1,000		
$\sigma^9_{mix}$	<b>0,101</b>	<b>0,727</b>	<b>0,909</b>	<b>0,957</b>	0,170	<b>0,948</b>	<b>-0,948</b>	1,000	1,000	<b>0,948</b>	<b>0,958</b>	1,000	1,000	1,000	
$\sigma^{10}_{mix}$	0,249	-0,139	0,177	0,099	<b>0,439</b>	0,144	-0,144	-0,144	-0,144	0,144	0,044	-0,144	-0,144	-0,144	1,000

#### 4.4.1. Matematički modeli za opisivanje stabilizacijskog učinka DES-ova

Polazna hipoteza ove statističke analize bila je da se stabilnost FDH i NADH u DES-ovima mogu opisati kao funkcija fizičkih svojstava DES-a (gustoće, viskoznosti, pH) i  $\sigma$ -profila smjese. Ovi  $\sigma$ -profili predstavljaju raspodjelu različitih funkcionalnih skupina u smjesi, a izraženi su pomoću deset  $\sigma^{i_{mix}}$  deskriptora, koji su navedeni u tablici (od  $\sigma^{1_{mix}}$  do  $\sigma^{10_{mix}}$ ). Djelomična linearna regresija (DLR) koristi se kako bi se opisala povezanost ulaznih varijabli (fizička svojstva DES-a i  $\sigma^{i_{mix}}$  deskriptori) i izlaznih varijabli (stabilnost FDH i NADH). Ovdje se koristi princip podjele podataka u dvije regije kako bi se bolje uhvatili nelinearni odnosi između varijabli. Oba grafa (za stabilnost FDH i NADH) pokazuju većinu raspodjelu eksperimentalnih točaka oko regresijskog pravca, što sugerira da modeli dobro opisuju stabilnost biomolekula na temelju ulaznih varijabli (slika 14).



**Slika 14.** Usporedba između eksperimentalnih podataka i podataka predviđenih djelomičnim linearnim modelom za A) poluživot FDH ( $t_{1/2,FDH}$ ) i B) poluživot NADH ( $t_{1/2,NADH}$ ). (○) kalibracijski skup podataka, (△) predikcijski skup podataka.



**Tablica 6.** Djelomični linearni regresijski modeli za predviđanje stabilnosti FDH i stabilnosti NADH na temelju specifičnih ulaznih varijabli

Izlazna varijabla	Ulazna varijabla	Jednadžba modela	$R_{kal}^2$ $R_{kal}^2_{adj}$	$RMSEC$	$R_{pred}^2$ $R_{pred}^2_{adj}$	$RMSEP$	$RPD$	$RER$
Poluživot FDH	Viskoznost ( $X_1$ )	$Y_2 = (3,489 - 0,015 X_1 - 7,078 X_2 - 1,359 X_3 + 0,113 X_4 + 7,413 X_5 - 6,365 X_6 - 6,827 X_7 + 2,733 X_8 + 12,839 X_9 + 8,943 X_{10} + 2,277 X_{11} - 3,795 X_{12})$ (for $Y_2 \leq 14,041$ ) +	0,829	4,775	0,738	4,944	3,292	10,456
	Gustoća ( $X_2$ )	$(4,429 - 0,229 X_1 - 285,320 X_2 + 11,223 X_3 + 0,109 X_4 + 19,063 X_5 + 10,294 X_6 - 10,294 X_7 - 10,649 X_8 + 9,620 X_9 + 12,795 X_{10} + 8,317 X_{11} + 1,174 X_{12})$ (for $Y_2 > 14,041$ )	0,827		0,731			
Poluživot NADH	Viskoznost ( $X_1$ )	$Y_3 = (11,199 + 0,001 X_1 + 4,581 X_2 + 0,121 X_3 + 21,634 X_4 - 26,329 X_5 - 10,074 X_6 - 0,219 X_7 + 29,394 X_8 + 25,508 X_9 + 11,581 X_{10} - 11,355 X_{11})$ (for $Y_3 \leq 23,872$ ) + (-	0,930	4,789	0,856	6,150	3,595	14,193
	Gustoća ( $X_2$ )	$0,217 - 0,175 X_1 + 691,395 X_2 + 0,157 X_3 - 30,392 X_4 - 58,475 X_5 - 3,406 X_6 - 7,604 X_7 + 28,916 X_8 + 14,168 X_9 + 28,553 X_{10} - 24,523 X_{11})$ (for $Y_3 > 22,872$ )	0,929		0,853			

\*(Koefficient determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}^2$ ), prilagođeni koefficient determinacije za kalibraciju ( $R_{kal}^2_{adj}$ ), korijen srednje kvadratne pogreške za kalibraciju ( $RMSEC$ ), koefficient determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^2$ ), prilagođeni koefficient determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^2_{adj}$ ), korijen srednje kvadratne pogreške predviđanja ( $RMSEP$ ), omjer predviđanja i odstupanja ( $RPD$ ), omjer raspona pogreške ( $RER$ )).

Odnos između opaženih podataka i predviđanja modela je procijenjen korištenjem koefficienta determinacije za predviđanje ( $R_{pred}^2$ ), prilagođenog koefficienta determinacije za kalibraciju ( $R_{pred}^2_{adj}$ ), korijena srednje kvadratne pogreške predviđanja ( $RMSEP$ ), omjera predviđanja i odstupanja ( $RPD$ ) i omjera raspona pogreške ( $RER$ ). Kao što je prikazano u tablici 6 i na slici 14, razvijeni modeli opisuju eksperimentalne podatke s visokom preciznošću. Najveće odstupanje između modela i eksperimentalnih podataka pronađeno je za poluživot FDH (slika 14A) ( $R_{kal}^2 = 0,829$ ,  $R_{kal}^2_{adj} = 0,827$ ,  $RMSEC = 4,775$  dana,  $R_{pred}^2 = 0,738$ ,  $R_{pred}^2_{adj} = 0,731$ ,  $RMSEP = 4,944$  %,  $RPD = 3,292$ ,  $RER = 10,456$ ). Prema Hussainu i suradnicima,  $R^2$  vrijednost od 0.75 smatra se značajnom,  $R^2$  vrijednost od 0.50 smatra se umjerenom, a  $R^2$  vrijednost od 0.26 smatra se slabom (Hussain i sur., 2018). Nadalje, modeli s  $RPD < 1.4$  smatraju se nepouzdanim, oni s  $RPD$  u rasponu od 1,4 do 2 smatraju se pravednima, dok se modeli s  $RPD > 2$  opisuju kao izvrsni modeli (Chang i sur., 2001). Modeli s  $RER > 4$  prihvatljivi su za probir podataka, modeli s  $RER > 10$  mogu se koristiti za kontrolu kvalitete, dok se modeli s  $RER > 15$  mogu koristiti za kvantifikaciju (Sim i sur., 2023). Stoga se DLR model razvijen za

predviđanje poluživota NADH na temelju  $R_{pred}$  može smatrati značajnim, dok se model razvijen za predviđanje poluživota FDH može smatrati umjerenim. Na temelju  $RPD$  vrijednosti, oba modela mogu se smatrati pouzdanima, dok na temelju  $RER$  vrijednosti, oba modela mogu se koristiti za kontrolu kvalitete. Stoga se može zaključiti da bi izvedivost matematičkih modela za predviđanje ciljnih svojstava ili primjena DES-ova korištenjem lako mjerljivih fizikalno-kemijskih svojstava i kemijskih deskriptora, kao što je ovdje prikazano, mogla biti vrijedna i za industrijske primjene i za istraživačke napore usmjerene na ova otapala. Osim toga, korištenje ovih QSPR modela ne samo da može pomoći u predviđanju svojstava od interesa, već može pružiti i vrijedne uvide u odnos između strukture DES-ova i njihovih mjerljivih svojstava. Analizom kako različite strukturne značajke utječu na ciljana svojstva, ovi modeli mogu pomoći u rasvjetljavanju temeljnih mehanizama koji pokreću ponašanje biomolekula u DES-ovima. Ovo razumijevanje može informirati dizajn i optimizaciju DES-ova, što dovodi do učinkovitijih i prilagođenijih primjena u različitim područjima.

U zaključku, ovaj znanstveni rad doprinosi razumijevanju uloge fizikalnih karakteristika, kao što su pH, viskoznost i gustoća, na stabilnost enzima i koenzima u DES-ovima. Korištenjem molekularnih deskriptora i matematičkih modela, omogućeno je preciznije predviđanje ponašanja DES-ova u specifičnim biokatalitičkim uvjetima. Rezultati pokazuju da su određene kombinacije DES-ova, uzimajući u obzir njihove fizikalne osobine, izrazito učinkovite u očuvanju stabilnosti enzima i koenzima, što otvara put prema racionalnom dizajnu otapala koja optimiziraju biokatalitičke procese. Međutim, kako bi se u potpunosti iskoristile prednosti DES-ova u biokatalizi, nužna su daljnja istraživanja i razvoj računalnih alata te održivih metoda za dobivanje proizvoda. Naš kombinirani eksperimentalni i računalni pristup povećava pouzdanost, optimizira resurse i ubrzava razvoj DES otapala za stabilizaciju enzima te drugih industrijskih primjena ovih zelenih otapala.

## 5.ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Fizikalno-kemijske karakteristike DES-ova, poput viskoznosti, gustoće i pH, ovise o udjelu vode, pri čemu su DES-ovi na bazi betaina gušći i viskozniji od DES-ova na bazi kolin-klorida te DES otopine u puferu održavaju stabilan pH za optimalnu enzimsku aktivnost.
2. Stabilnost enzima FDH i koenzima općenito je bolja u DES-ovima na bazi kolin-klorida nego betaina. Enzim FDH najstabilniji je u DES-ovima na bazi kolin-klorida s 30 - 80 % vode ili pufera. Koenzim NADH najstabilniji je u DES-ovima na bazi kolin-klorida s 10 - 30% vode ili pufera.
3.  $\sigma$ -profil pomaže u analizi stabilnosti DES-ova, gdje DES-ovi bogati HBA i nepolarnim regijama stabiliziraju FDH i NADH, dok HBD-om bogata otapala mogu destabilizirati FDH i NADH. Također, viskoznost i gustoća značajno utječu na stabilnost, s visokom viskoznošću koja smanjuje stabilnost FDH-a, ali povećava stabilnost NADH.
4. Modeli za stabilnost FDH i NADH su pouzdani prema *RPD* vrijednostima i prikladni za kontrolu kvalitete prema *RER* vrijednostima, što naglašava potencijal za primjenu u industriji i istraživanjima te pruža uvid u odnos između strukture DES-ova i njihovih fizikalno-kemijskih karakteristika.
5. Ovaj rad značajno doprinosi razumijevanju i primjeni DES-ova u biokatalitičkim procesima, nudeći integrirani pristup koji kombinira laboratorijska istraživanja s računalnim modeliranjem za racionalni dizajn otapala, čime se povećava stabilnost enzima i koenzima te se optimizira primjena u proizvodnji i ekonomičnost procesa.

## 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), 9142-7. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>

Abranches DO, Martins, MAR, Silva LP, Schaeffer N, Pinho SP, Coutinho JAP (2019) Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: the quest for type V DES. *Chem Commun* **55**, 10253–10256. <https://doi.org/10.1039/C9CC04846D>

Abranches DO, Zhang Y, Maginn EJ, Colón YJ (2022). Sigma profiles in deep learning: towards a universal molecular descriptor. *Chem Commun* **58**, 5630–5633. <https://doi.org/10.1039/D2CC01549H>

Aroso IM, Paiva A, Reis RL, Duarte ARC (2017) Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine – Physicochemical properties. *J Mol Liq* **241**, 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.05>

Attri P, Venkatesu P, Kumar A, Byrne N (2011) A protic ionic liquid attenuates the deleterious actions of urea on alpha-chymotrypsin. *Phys Chem Chem Phys* **13**(38), 17023–17026. <https://doi.org/10.1039/C1CP22195G>

Bi S, Liu H, Lin H, Wang P (2021) Integration of natural deep-eutectic solvent and surfactant for efficient synthesis of chiral aromatic alcohol mediated by *Cyberlindnera saturnus* whole cells. *Biochem Eng J* **172**, 108053. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108053>

Bittner JP, Smirnova I, Jakobtorweihen S (2024). Investigating Biomolecules in Deep Eutectic Solvents with Molecular Dynamics Simulations: Current State, Challenges and Future Perspectives. *Molecules* **29**(3), 703. <https://doi.org/10.3390/molecules29030703>

Bittner JP, Zhang N, Huang L, Domínguez De María P, Jakobtorweihen S, Kara S. (2022). Impact of deep eutectic solvents (DESs) and individual DES components on alcohol dehydrogenase catalysis: Connecting experimental data and molecular dynamics simulations. *Green Chem* **24**, 1120–1131. <https://doi.org/10.1039/D1GC04059F>

Cao SL, Xu H, Li XH, Lou WY, Zong MH (2015) Papain@magnetic nanocrystalline cellulose nanobiocatalyst: a highly efficient biocatalyst for dipeptide biosynthesis in deep eutectic solvents. *ACS Sustain Chem Eng* **3**(7), 1589–1599. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00290>

Chang CW, Laird DA, Mausbach MJ, Hurburgh CR (2001) Near-Infrared Reflectance Spectroscopy–Principal Components Regression Analyses of Soil Properties. *Soil Sci Soc Am J* **65**, 480–490. <https://doi.org/10.2136/sssaj2001.652480x>

Cheng H, Liu C, Zhang J, Chen L, Zhang B, Qi Z (2018) Screening deep eutectic solvents for extractive desulfurization of fuel based on COSMO-RS model. *Chem Eng Process - Process Intensif* **125**, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.02.006>

Cui Z, Enjome Djocki AV, Yao J, Wu Q, Zhang D, Nan S i sur. (2021) COSMO-SAC-supported evaluation of natural deep eutectic solvents for the extraction of tea polyphenols and process optimization. *J Mol Liq* **328**, 115406. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115406>

Dale BE (2003) Greening' the chemical industry: research and development priorities for biobased industrial products, *J Chem Technol Biotechnol* **78**, 1093-1103. <https://doi.org/10.1002/jctb.850>

Damjanović A, Logarušić M, Tumir LM, Andreou T, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2024). Enhancing protein stability under stress: osmolyte-based deep eutectic solvents as a biocompatible and robust stabilizing medium for lysozyme under heat and cold shock. *Phys Chem Chem Phys* **26**, 21040-21051. <https://doi.org/10.1039/D4CP02275K>

Delorme AE, Andanson JM, Verney V (2020) Improving laccase thermostability with aqueous natural deep eutectic solvents. *Int J Biol. Macromol* **163**, 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.022>

Dumorne K, Cordova DC, Astorga-Elo M, Renganathan P (2017) Extremozymes: a potential source for industrial applications, *J Microbiol Biotechnol* **27**(4), 649-659. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11006>

Faber K (2011) State of the Art and Outlook. U: Faber K (ured.) In: Biotransformations in Organic Chemistry, 5.izd., Springer, Berlin, Heidelberg ,str. 391-396

Francisco M, Bruinhorst A, Kroon MC (2013) Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew Chem Int Ed* **52**(11), 3074–3085. <https://doi.org/10.1002/anie.201207548>

Gajardo-Parra NF, Rodríguez G, Arroyo-Avirama AF, Veliju A, Happe T, Canales RI i sur. (2023) Impact of Deep Eutectic Solvents on Kinetics and Folding Stability of Formate Dehydrogenase. *Processes* **11**(10), 2815. <https://doi.org/10.3390/pr11102815>

Gorke JT, Srienc F, Kazlauskas RJ (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem Commun* **10**,1235–1237. <https://doi.org/10.1039/B716317G>

Hallett JP i Welton T (2011) Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. *Chem Rev* **111**(5), 3508–3576. <https://doi.org/10.1021/cr1003248>

Hammond OS, Bowron DT, Edler KJ, (2017). The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angew Chemie In Ed* **56**, 9782–9785. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201702486>

Kaushik N, Biswas S, Singh J (2014) Biocatalysis and biotransformation processes-an insight. *Sci Technol J* **1**(08), 15-17.

Klamt A (2005). COSMO-RS: from quantum chemistry to fluid phase thermodynamics and drug design. *Chem Eng dana* **51**(4), 480. <https://doi.org/10.1021/je0602317>

Lemaoui T, Darwish AS, Hammoudi NEH, Abu Hatab F, Attoui A, Alnashef IM i sur. (2020). Prediction of Electrical Conductivity of Deep Eutectic Solvents Using COSMO-RS Sigma Profiles as Molecular Descriptors: A Quantitative Structure-Property Relationship Study. *Ind Eng Chem Res* **59**, 13343–13354. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c02542>

Liu J, Li X, Row KH (2022) Development of deep eutectic solvents for sustainable chemistry. *J Mol Liq* 119654. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119654>

Logarušić M, Šubar K, Nikolić M, Tušek AJ, Damjanović A, Radović M i sur. (2024). Harnessing the potential of deep eutectic solvents in biocatalysis: design strategies using CO<sub>2</sub> to formate reduction as a case study. *Front Chem* **12**, 1467810. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1467810>

Lozano P (2022) Biocatalysis in Green Solvents. A volume in Foundations and Frontiers in Enzymology, 1.izd., Elsevier Science ,Španjolska

- Maier A, Mguni LM, Ngo ACR, Tischler D (2024) Formate Dehydrogenase: Recent Developments for NADH and NADPH Recycling in Biocatalysis. *Chem Cat Chem* **16**, e202401021. <https://doi.org/10.1002/cctc.202401021>
- Martínez GM, Townley GG, Martínez-Espinosa RM (2022) Controversy on the toxic nature of deep eutectic solvents and their potential contribution to environmental pollution, *Heliyon* **8**, 12567. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12567>
- Martins MAR, Pinho SP, Coutinho JAP (2019) Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *J Solution Chem* **48**, 962–982. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>
- Maugeri Z, Leitner W, Domínguez de María P (2013) Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in deep eutectic solvents. *Eur J Org Chem* **20**, 4223–4228. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300448>
- 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>
- Mourelle-Insua Á, Lavandera I, Gotor-Fernández V (2019) A designer natural deep eutectic solvent to recycle the cofactor in alcohol dehydrogenase-catalysed processes. *Green Chem* **21**, 2946-2951. <https://doi.org/10.1039/C9GC00318E>
- Mubashir, M, D'Angelo, FN i Gallucci, F (2021). Recent Advances and Challenges of Deep Eutectic Solvent based Supported Liquid Membranes. *Sep Purif Rev* **51**(2), 226–244. <https://doi.org/10.1080/15422119.2021.1901742>
- Ogino H, Nakagawa S, Shinya K, Muto T, Fujimura N, Yasuda Mi sur.(2000) Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J Biosci Bioeng* **89**(5), 451-457. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89095-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89095-7)
- Ogino H, Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S, Hirose T, Noguchi A i sur.(1999). Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. *J Biosci Bioeng* **87**, 61–68. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80009-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80009-7)
- Panić M, Elenkov MM, Roje M, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2018) Plant-mediated stereoselective biotransformations in natural deep eutectic solvents, *Process Biochem* **66**, 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.12.010>
- Peterson DH i Murray HC (1952) Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. *J Am Chem Soc* **74**, 1871–1872. <https://doi.org/10.1021/ja01127a531>
- Quaid T i Reza T (2023). COSMO prediction of siloxane compounds absorption on type 3 and type 5 deep eutectic solvents. *Chem Eng J Adv* **14**, 100489. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.100489>
- Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Radojčić Redovniković I (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf* **112**, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>
- Radović M, Jurinjak Tušek A, Kroutil W, Reiter T, Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M (2024). Rational Design of Deep Eutectic Solvents for the Stabilization of Dehydrogenases An Artificial Neural Network Prediction Approach. *Front Chem* **12**, 1436049. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1436049>

Shahbaz K, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM (2011) Using deep eutectic solvents based on methyl triphenyl phosphonium bromide for the removal of glycerol from palm-oil-based biodiesel. *Energy Fuels* **25**(6), 2671–2678. <https://doi.org/10.1021/ef2004943>

Sheldon RA i Brady D (2018) The limits to biocatalysis: pushing the envelope, *Chem Comm* **54**, 6088-6104. <https://doi.org/10.1039/C8CC02463D>

Sim J, McGoverin C, Oey I, Frew R, Kebede B (2023). Near-infrared reflectance spectroscopy accurately predicted isotope and elemental compositions for origin traceability of coffee. *Food Chem* **427**, 136695. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136695>

Slusarczy H, Felber S, Kula M , Pohl M (2000) Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Eur J Biochem* **267**, 1280–1289. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01123.x>

Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J (2013) Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. *ACS Catalysis* **3**(12), 2823–2836. <https://doi.org/10.1021/cs400684x>

Svigelj R, Dossi N, Grazioli C, Toniolo R (2021) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Application in Biosensor Development. *Sensors* **21**(13), 4263. <https://doi.org/10.3390/s21134263>

Taklimi SM, Divsalar A, Ghalandari B, Ding X, Di Gioia ML, Omar KA i sur. (2023). Effects of deep eutectic solvents on the activity and stability of enzymes. *J Mol Liq* **377**, 121562. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121562>

Tishkov VI, Galkin AG, Marchenko GN, Egorova OA, Sheluho DV, Kulakova LB i sur. (1993). Catalytic properties and stability of a *Pseudomonas* sp.101 formate dehydrogenase mutants containing cys-255-ser and cys-255-met replacements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 976–981. <http://doi.org/10.1006/BBRC.1993.1511>

Torres Pazmiño DE, Snajdrova R, Baas B, Ghobrial M, Mihovilovic MD, Fraaije MW (2008) Self-sufficient baeyer–villiger monooxygenases: effective coenzyme regeneration for biooxygenation by fusion engineering. *Angew. Chem Int Ed* **47**, 2275-2278. <https://doi.org/10.1002/anie.200704630>

Ünlü AE, Arikaya A, Takaç S (2019) Use of deep eutectic solvents as catalyst: A mini-review. *Green Process Synth*, **8**(1), 355-372. <https://doi.org/10.1515/gps-2019-0003>

Van Osch DJGP, Zubeir LF, Van Den Bruinhorst A, Rocha MAA, Kroon MC (2015) Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants, *Green Chem.* **17**, 4518 - 4521. <https://doi.org/10.1039/C5GC01451D>

Venkatraman V, Evjen S, Knuutila HK, Fiksdahl A, Alsberg BK (2018). Predicting ionic liquid melting points using machine learning. *J Mol Liq* **264**, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.090>

Woodyer R, Van Der Donk WA, Zhao H (2003) Relaxing the nicotinamide cofactor specificity of phosphite dehydrogenase by rational design. *Biochemistry* **42**, 11604-11614. <https://doi.org/10.1021/bi035018b>

Younus, H. (2019). Oxidoreductases: Overview and Practical Applications. U: Husain Q, Ullah M (ured.) Biocatalysis. Springer Cham., str. 39-55

Zachos I, Nowak C, Sieber V (2019). Biomimetic cofactors and methods for their recycling. *Curr Opin Chem Biol* **49**, 59–66. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b00721>

Zhang N, Domínguez de María P, Kara, S. (2024). Biocatalysis for the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients in Deep Eutectic Solvents: State-of-the-Art and Prospects. *Catal* **14**(1), 84. <https://doi.org/10.3390/catal14010084>

Zhang Q, Vigier K, Royer S, Jérôme F (2012) Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev* **41**(21), 7108-7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>

Zhao DB, Liao YC, Zhang ZD (2007) Toxicity of ionic liquids. *Clean Soil Air Water* **35**(1),42–48. <https://doi.org/10.1002/clen.200600015>

Zhao H, Baker GA, Holmes S (2011) Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *J Mol Catal B Enzym* **72**(3–4), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.015>



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Maja Nikolić 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