

Primjena biotehnologije u zelenoj kemiji

Salopek, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:144739>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Marta Salopek

7388/N

PRIMJENA BIOTEHNOLOGIJE U ZELENOJ KEMIJI

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Odabrana poglavlja zelene kemije

Mentorica: Doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

Zagreb, 2020.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na susretljivosti i pomoći tijekom izrade završnog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Primjena biotehnologije u zelenoj kemiji

Marta Salopek, 0058210887

Sažetak: Narušavanje ekološke ravnoteže i negativan utjecaj na zdravlje ljudi samo su neke od posljedica djelovanja kemijske industrije. Temeljen na znanstvenim i ekonomskim načelima, 1990. prezentiran je koncept zelene kemije s ciljem smanjenja štetnih učinaka te povećanja održivosti i energetske učinkovitosti proizvodnih procesa. U ovom je radu prikazana primjena biotehnologije u zelenoj kemiji u kontekstu sinteze biopolimera, biogoriva te organske sinteze. Razvitak biokemijskog, genetičkog i metaboličkog inženjerstva, kao i srodnih područja, rezultirao je mnogobrojnim postignućima. Međutim, neki od izazova još su uvijek nepremostivi, stoga su edukacija i ulaganje u biotehnoška područja od neupitne važnosti.

Ključne riječi: biogoriva, biopolimeri, biotehnologija, organska sinteza, zelena kemija

Rad sadrži: 27 stranica, 16 slika, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentorica: doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

Datum obrane: 15. rujan 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Application of biotechnology in green chemistry

Marta Salopek, 0058210887

Abstract: Disturbance of ecological balance along with negative impact on human health are just some of the consequences of the chemical industry. In 1990, based on scientific and economical principles, the concept of green chemistry was presented in order to reduce harmful effects as well as increase the sustainability and energy efficiency of production processes. In this thesis the use of biotechnology in green chemistry applied to biopolymers, biofuels and organic synthesis is presented. The development of biochemical, genetic and metabolic engineering, as well as related fields, has resulted in numerous achievements. Even so, some of the challenges are still insurmountable, hence education and investment in biotechnology areas are of indisputable importance.

Keywords: biofuels, biopolymers, biotechnology, green chemistry, organic synthesis

Thesis contains: 27 pages, 16 figures, 50 references

Original in: Croatian

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

Mentor: doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić

Defence date: September 15th 2020

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. BIOPOLIMERI	2
3. BIOGORIVA	8
4. ORGANSKA SINTEZA	15
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

Razvitak kemijske industrije rezultirao je narušavanjem ekološke ravnoteže i negativnim utjecajem na zdravlje ljudi. Stoga je 1990. u SAD-u prezentiran koncept zelene kemije koji se temelji na znanstvenim i ekonomskim načelima u cilju smanjenja štetnih učinaka na okoliš te povećanja održivosti i energetske učinkovitosti proizvodnih procesa.

Implementacija navedenih ciljeva temelji se na 12 principa zelene kemije koje su 1998. predstavili Paul T. Anastas i John C. Warner. Navedeni principi nalažu smanjenje otpada; korištenje sintetskih puteva u kojima je u konačni proizvod uključeno što više ulazne sirovine; upotrebu netoksičnih kemikalija i pomoćnih sredstava kao i osmišljavanje produkata koji su što učinkovitiji, a pritom što manje toksični – osim negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje i okoliš, odlaganje je opasnih tvari skupo. Nadalje, cilj zelene kemije je upotreba obnovljivih sirovina te provođenje sintetskih procesa pri standardnim uvjetima. U proizvodnim procesima poželjno je izbjegavati kemijsku derivatizaciju, a reagense koji se koriste u stehiometrijskim količinama zamijeniti (bio)katalitičkim. Nakon što prestanu djelovati, kemijski produkti moraju imati mogućnost pretvorbe u neškodljive oblike. U cilju smanjenja nastanka opasnih tvari proizvodne procese treba analizirati i nadzirati, a mogućnost nastanka štetnih posljedica svesti na minimum.

Europska federacija za biotehnologiju navodi da biotehnologija uključuje upotrebu prirodnih i inženjerskih znanosti te molekula, organizama i stanica u svrhu dobivanja raznih proizvoda koji pridonose dobrobiti čovječanstva. Cilj je ovog rada opisati primjenu biotehnologije u zelenoj kemiji u kontekstu proizvodnje biopolimera, biogoriva te novih alternativa tradicionalnim reakcijama organske sinteze.

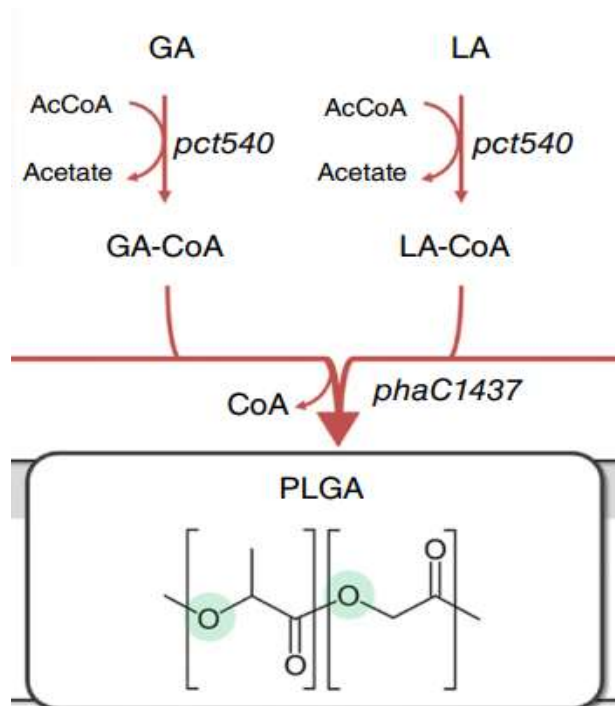
2. BIOPOLIMERI

Biopolimere sintetiziraju živi organizmi polimerizacijom monomernih jedinica – poput aminokiselina, ugljikohidrata, amida, estera, anhidrida i organskih kiselina – uz pomoć enzima. Za razliku od većine polimera dobivenih iz petrokemijskih sirovina, biopolimeri se ne zadržavaju u okolišu te ne uzrokuju nakupljanje otpada, već imaju svojstvo biorazgradljivosti – razgrađuju se enzimskim djelovanjem mikroorganizama prisutnih u prirodi (bakterije, fungi, alge). Brzina biorazgradnje ovisi o uvjetima u okolišu te svojstvima biopolimera. Dodatna se prednost očituje u tome što prilikom razgradnje i same proizvodnje biopolimera nastaju neškodljivi produkti. Nadalje, kao supstrati tijekom proizvodnje nastoje se koristiti industrijski otpad i nusprodukti što ima prednost i s ekonomske strane. Budući da su biokompatibilni tj. nisu toksični i ne uzrokuju aktivaciju imunskog sustava, primjenjuju se u prehrambenoj industriji te u biomedicinske svrhe (Fasciotti, 2017).

Bakterije sintetiziraju velik broj biopolimera različitih karakteristika i funkcija (rezervni materijal, zaštitna uloga). Mogu ih sintetizirati intra- i ekstracelularno, a po sastavu su polisaharidi (npr. dekstran, ksantan), poliesteri [polihidroksialkanoati (PHA)], poliamidi [poli(γ -glutamat), poli(L-lizin)] i anorganski polianhidridi (Rehm, 2010).

Metodama genetičkog inženjerstva bakterije se modificiraju u svrhu proizvodnje biopolimera vrlo specifičnih svojstava. Nadalje, primjenom novih saznanja nastoje se konstruirati nove vrste biopolimera ciljanih karakteristika poput hidrofilnosti, elastičnosti, viskoznosti, poroznosti i sl. Takvi bi se biopolimeri među ostalim mogli koristiti kao materijali i kemikalije, a u svrhu biomedicinskih i inženjerskih primjena (npr. tkivno inženjerstvo, testiranje lijekova) (Moradali i Rehm, 2020).

Choi i suradnici (2016) modificirali su bakteriju *E. coli* te uspješno proveli polimerizaciju D-laktil-CoA i glikolil-CoA u poli(mliječnu-ko-glikolnu kiselinu) (PLGA). Glukoza i ksiloza korištene su kao početne sirovine te su alternativnim i optimiziranim metaboličkim putem uz enzime kao katalizatore prevedene u PLGA (Slika 1). Nastali PLGA svojstvima je usporediv onime dobivenim kemijskom sintezom. Međutim, ovdje provedena jednostupanjska izravna mikroba fermentacija prihvatljivija je od kemijske sinteze koja podrazumijeva upotrebu metala kao katalizatora, a dodatni se troškovi očituju u odlaganju nastalih nusprodukata. FDA (*US Food and Drug Administration*) navodi PLGA kao komercijalno dostupnog poliestera stoga su kemijska čistoća, biorazgradljivost i biokompatibilnost od iznimne važnosti budući da se najčešće primjenjuje u biomedicinske svrhe.

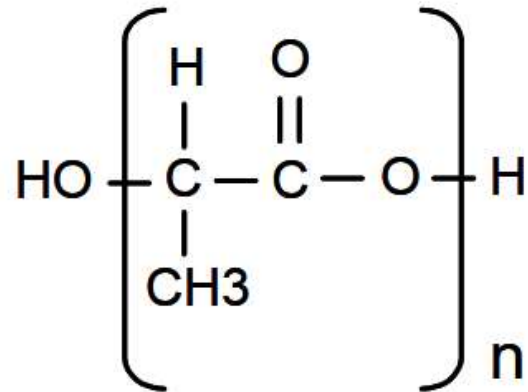


Slika 1. Sinteza PLGA iz laktil-CoA i glikolil-CoA (Choi i sur., 2016)

Geni koji kodiraju za ksiloza dehidrogenazu i ksilonolaktonazu klonirani su pomoću plazmida iz *Caulobacter crescentus* u *Escherichia coli* čime je omogućeno nastajanje glikolata iz ksiloze. Nadalje, delecijom četiriju gena onemogućeno je nastajanje fermentativnih nusprodukata, dok je određenim genima povećana ekspresija pomoću promotora. Kako bi se onemogućila pretvorba D-laktata u piruvat deletiran je gen koji kodira za laktat dehidrogenazu. Propionil-CoA transferaza prevodi D-laktat u D-laktil-CoA, a glikolat u glikolil-CoA, dok PHA (polihidroksialkanoat) sintaza provodi polimerizaciju tih dvaju monomera u PLGA (Slika 1). Osim toga, korištene su 2-, 3-, 4-, 5- i 6-hidroksikarboksilne kiseline te su dobiveni kopolimeri različitih molarnih masa i karakteristika. Ovaj se pristup nastoji primijeniti prilikom sinteze drugih biopolimera pomoću genetički modificiranih mikroorganizama.

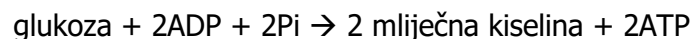
Kao što je već navedeno, biopolimeri imaju značajnu primjenu u biomedicinskom području i pritom je prilikom odabira pogodnog materijala ključna karakteristika njegova razgradljivost. Implantabilni biomedicinski uređaji moraju biti biokompatibilni, a pritom stabilni u biološkim uvjetima kako bi im se funkcionalnost dugoročno održala. S druge strane, polimeri koji se primjenjuju u tkivnom inženjerstvu, kao i nanočestice koje imaju ulogu u kontroliranom oslobađanju lijekova, moraju se nakon određenog vremena razgraditi i izlučiti iz organizma (Delplace i Nicolas, 2015).

Poli(mliječna kiselina) (PLA) je biorazgradljiv termoplastični linearni poliester (Slika 2).



Slika 2. PLA (Shen i sur., 2009)

Proizvodnja PLA temelji se na biljnim izvorima škroba, poput kukuruza i pšenice, a uz prisustvo mikroorganizama anaerobnom fermentacijom glukoze uz enzim laktat dehidrogenazu nastaje mliječna kiselina:



Razvoj polimerizacijskih tehnika i napredak u proizvodnji mliječne kiseline omogućili su porast proizvodnje PLA (Shen i sur., 2009). Prvi je postupak u procesu proizvodnje ekstrakcija škroba odnosno šećera iz biljnog materijala što se postiže mljevenjem sirovina, a škrob se kiselinskom ili enzimskom hidrolizom prevodi u glukozu. Potom slijedi mikrobna fermentacija koja se može provesti šaržnim ili kontinuiranim procesom, a budući da dolazi do smanjenja pH provodi se i neutralizacija, najčešće vapnom. Kako bi se laktat dobio u slobodnom obliku dodaje se sumporna kiselina (H_2SO_4), a kao nusprodukt nastaj gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Početakom 80-ih godina prošlog stoljeća nekoliko je tvrtki nastojalo razviti nove tehnologije, a koje bi bile prihvatljivije u kontekstu utroška energije i nastajanja nusprodukata. Do nastajanja gipsa kao nusprodukta ne dolazi kod naprednijih metoda kao što su membranski procesi (koji među ostalim uključuju nanofiltraciju i ultrafiltraciju), destilacija, kristalizacija i elektrodijaliza. Tvrtka *Cargill* razvila je način proizvodnje laktida visoke čistoće, a uz kontinuirani proces bazirani na reaktivnoj destilaciji.

Polimerizacija se provodi kontinuiranim procesom uz otvaranje prstena laktida (*Ring-opening polymerization* - ROP). Kondenzacija mliječne kiseline rezultira polimerom niske molekularne mase. Povišenjem temperature i snižavanjem tlaka dolazi do depolimerizacije i

nastajanja smjese stereoizomera laktida. Smjesa se pročišćava vakuumskom destilacijom. Preostali monomeri izdvoje se uz vakuum te iskoriste tj. recikliraju u sljedećem ciklusu. Svojstva nastalog PLA mogu biti različita, ovisno o stereoizomerima koji ga čine, što je moguće kontrolirati samim ROP procesom.

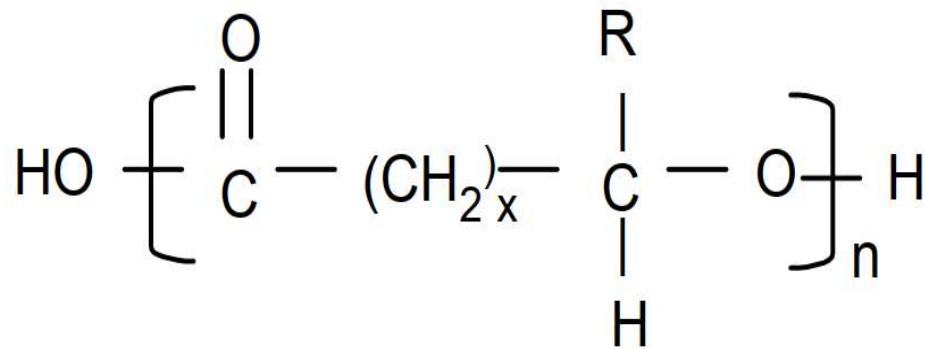
Općenito, PLA ima dobra fizikalna i mehanička svojstva stoga je u nekim područjima dobra zamjena materijalima proizvedenim iz petrokemijskih izvora. Elastičnost, krutost i tvrdoća čine ga pogodnim u primjeni kao ambalažnog materijala (npr. boce). Također je prikladan za pakiranje viskoznih i masnih tekućina te namirnica kratkog roka trajnosti (Slika 3), no zbog neprihvatljivih barijernih svojstava nije prikladan kao ambalažni materijal za gazirana pića. Biorazgradljivost i barijerna svojstva karakteristike su koje su zajedničke i ostalim biopolimerima, dok ga svojstvo savijanja čini usporedivim s papirom ili folijom. Razvoj nanotehnologije pruža nove mogućnosti u poboljšanju svojstava PLA (Shen i sur., 2009).

PLA se primjenjuje u raznim područjima poput kemijske, prehrambene i tekstilne industrije, medicine, agrikulture, elektronike itd.



Slika 3. PLA kao ambalažni materijal (Anonymous 1, 2020)

Poli(hidroksialkanoat) (PHA) je biorazgradiv i kompostibilan alifatski poliester dobiven mikrobnom fermentacijom obnovljivih sirovina. Akumulira se u obliku granula u citoplazmi stanica te služi kao rezervni materijal. Struktura PHA prikazana je na Slici 4 na kojoj R označava vodik ili ugljikovodični lanac (npr. etil, metil, propil) (Shen i sur., 2009).



Slika 4. PHA (Shen i sur., 2009)

80-ih godina prošlog stoljeća mnoge su tvrtke nastojale proizvesti PHA zbog pretpostavke da će cijena petrokemijskih sirovina rasti, kao i svijest o važnosti ekološki prihvatljivijih materijala. Međutim, očekivan porast cijene petrokemijskih sirovina nije se dogodio pa značajan razvoj proizvodnje PHA nije zaživio sve do novog stoljeća. PHA je netopljiv u vodi te se za razliku od PLA sastoji od različitih monomera, stoga je njegova proizvodnja skuplja. Ipak, razvoj novih tehnologija u području molekularne biologije pridonosi sve većoj proizvodnji i implementaciji PHA u raznim područjima. Učinkovitost proizvodnje ovisi o nekoliko faktora poput cijene početne sirovine, jednostavnosti i cijeni metode kojom se ekstrahira i pročišćava, efikasnosti konverzije supstrata u produkt te konačnoj gustoći i prirastu stanica. *Ralstonia eutropha* najčešći je mikroorganizam divljeg tipa koji se koristi u proizvodnji nekih PHA [npr. poli(D-3-hidroksibutirata) (PHB)] (Chen, 2009). *Alcaligenes latus* također se pokazao djelotvornim, dok širok spektar supstrata kao i niska specifičnost enzima PHA sintaze omogućuju *P. oleovorans* i *P. putida* da sintetiziraju više od 100 PHA sastavljenih od različitih monomera (Steinbüchel i Valentin, 1995).

Sama proizvodnja sastoji se od tri koraka: fermentacija, izolacija i pročišćavanje te miješanje i paletiranje. Nakon inokulacije i prvotne fermentacije u bioreaktor se dodaju minerali te inokuliraju mikroorganizmi. Akumulacija PHA je završena nakon što se potroši izvor ugljika (Shen i sur., 2009). U teoriji, bilo koji izvor ugljika može poslužiti kao početna sirovina, uključujući i lignocelulozu kao nusprodukt iz agrikultura što pridonosi smanjenju troškova

(Chen, 2009). *E. coli* najčešće se prihranjuje lipidima i saharidima, a *R. eutrophi* smjesa glukoze i propionata. Trajanje fermentacije je između 38 i 48 sati.

Konvencionalna ekstrakcijska metoda podrazumijeva izdvajanje PHA na temelju svojstva topljivosti u kloroformu te netopljivosti u metanolu. Iako je metoda uspješna, za industrijsku proizvodnju nije prihvatljiva zbog lošeg utjecaja organskih otapala na zdravlje i okoliš. Kako bi se izbjegla, može se koristiti smjesa enzima (proteaza, nukleaza, lizozima) što rezultira razgradnjom staničnih stijenki, proteina i nukleinskih kiselina. Proizvodnja se može provesti i u samom biljnom tkivu izravno uz fotosintezu tj. CO₂ i H₂O. Ova je tehnologija perspektivna, no potrebna su daljnja istraživanja (Shen i sur., 2009).

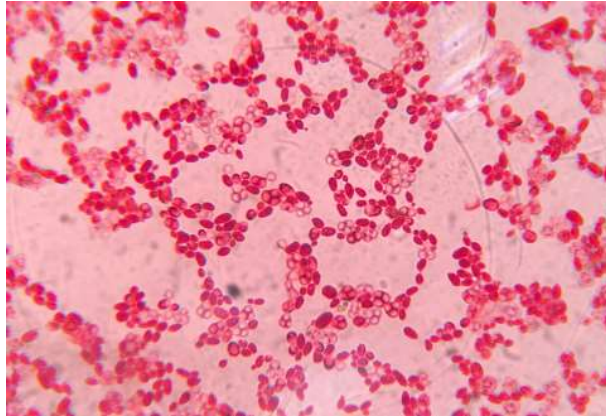
PHA se najčešće primjenjuje kao ambalažni materijal. Nadalje, može se koristiti kao materijal u području tkivnog inženjerstva, prilikom printanja te tijekom proizvodnje uredskog materijala i pribora za jelo. Smanjenje troškova kod proizvodnje nastoji se postići uporabom nusprodukata kao početnih sirovina, rekombinantne *E. coli* te genetski modificiranih biljaka (Shen i sur., 2009).

3. BIOGORIVA

Ograničene zalihe fosilnih goriva, kao i fluktuacije u njihovoj cijeni te ekološka neodrživost rezultirale su potragom za alternativnim izvorima energije, a jedni su od njih biogoriva. Biogoriva podrazumijevaju goriva dobivena iz biomase koja mogu biti u kapljevitom ili plinovitom obliku. Biomasa je među ostalim biorazgradljiv otpad iz poljoprivredne, prehrambene i srodnih industrija te može biti biljnog ili životinjskog podrijetla. Proizvodnja goriva dobivenih iz obnovljivih izvora ugljika danas je jedno od glavnih područja primjene biotehnologije (Fasciotti, 2017). Osim potencijala, prednost biomase u odnosu na fosilna goriva očituje se i u manjoj emisiji štetnih plinova i otpadnih tvari. Nadalje, nastali se plinovi mogu iskoristiti u proizvodnji energije, a također se stvara mogućnost otvaranja novih radnih mjesta te povećanja gospodarskih aktivnosti i prihoda (Šljivac i Šimić, 2009).

Međutim, uzme li se u obzir potrošnja vode, iscrpljivanje tla te učinkovitost pretvorbe biomase u biogorivo dolazi se do zaključka da je održivost, kao i profitabilnost biogoriva relativan pojam koji ovisi o mnogobrojnim čimbenicima. Osim s tehnološkog i ekološkog, proizvodnja biogoriva predstavlja izazov i s ekonomskog, a i političko-društvenog aspekta.

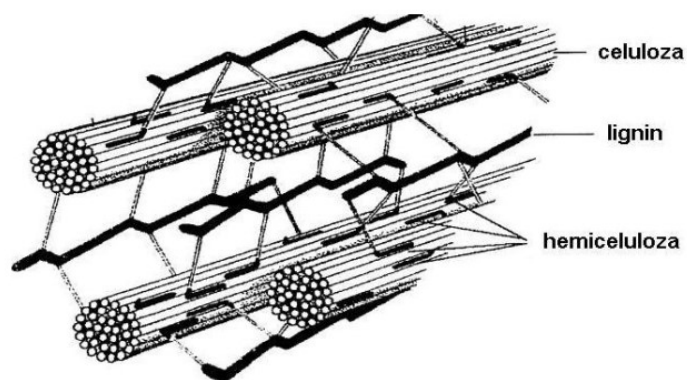
Biogoriva **prve generacije** kao početnu sirovinu podrazumijevaju uporabu sirovina poput kukuruza, pšenice i šećerne trske (Gnansounou i Dauriat, 2015). Uporaba prehrambenih sirovina u ove svrhe odražava se i na cijenu istih što dovodi do političkih i etičkih dilema, a također prilikom proizvodnje dolazi do nastajanja nusprodukata. Međutim, biogoriva prve generacije globalno su najzastupljenija zbog relativno jednostavne i jeftine proizvodnje. Većina se proizvodnje provodi u SAD-u (bioetanol iz kukuruza) i Brazilu (bioetanol iz šećerne trske) (Fasciotti, 2017). Bioetanol se može koristiti u motorima s unutarnjim izgaranjem sa ili bez smjese s benzinom. Preinake na motorima nisu potrebne u slučaju smjese s do 20% bioetanola, dok je za više udjele potrebna modifikacija što poskupljuje cijenu vozila. Oko 15% brazilskih vozila kreće se na bioetanol, dok njih oko 40% na smjesu s benzinom (Šljivac i Šimić, 2009). Nadalje, budući da sadrži više molekula kisika, dolazi do potpunijeg sagorijevanja ugljikovodika, a također nastaje manje štetnih plinova (Ivančić Šantek i sur., 2016) što je u skladu s načelima zelene kemije.



Slika 5. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Slika 5) često se upotrebljava u proizvodnji bioetanola. Od šećernih sirovina uglavnom koriste šećerna repa i trska (Ivančić Šantek i sur., 2016). Razgradnjom šećera heksoza (maltoza, saharoza, fruktoza, glukoza) tj. glikolizom nastaju dvije molekule piruvata. Piruvat se zatim dekarboksilira u anaerobnim uvjetima uz enzim piruvat-dekarboksilazu i nastaje acetaldehid. Alkohol-dehidrogenaza reducira acetaldehid u etanol uz koenzim NADH (Berg i sur., 2013). Visoka temperatura, nizak pH te nedostatak nutrijenata neki su od negativnih čimbenika koji utječu na *S. cerevisiae* tijekom fermentacije. Škrobne sirovine poput kukuruza prvo se podvrgavaju postupku suhog mljevenja u grubo brašno ili krpicu. Škrob se zatim hidrolizira na maltozu i glukozu pomoću enzima glukoamilaze i α -amilaze. Međutim, hidroliza škroba pomoću enzima rezultira poskupljenjem proizvodnog procesa. Stoga se metodama genetičkog inženjerstva nastoji konstruirati soj kvasca *S. cerevisiae* koji bi proizvodio enzime za razgradnju i hidrolizu škroba, a u istom bi bioreaktoru (tzv. konsolidirani bioproceni sustav) nastajao i etanol. Transesterifikacijom otpadnih i biljnih ulja te masti životinjskog podrijetla proizvodi se biodizel (Ivančić Šantek i sur., 2016).

Kao početna sirovina pri proizvodnji biogoriva **druge generacije** koristi se lignoceluloza. Lignoceluloza se sastoji od lignina, celuloze i hemiceluloze (Slika 6), a podrazumijeva poljoprivredne ostatke (sijeno, trava, ostaci od pšenice, kukuruza, repe) i ostatke drvene biomase te industrije papira. Prednosti lignoceluloze su laka dostupnost i niska cijena te nekonkurentnost cijenama prehrambenih proizvoda, no zbog svoje strukture zahtjeva predobradu što rezultira složenijim i skupljim proizvodnim procesima (Rezić, 2012).



Slika 6. Shematski prikaz stanične stijenke biljaka (Janušić i sur., 2008)

Enzimi koji se koriste u predobradi jedni su od čimbenika koji povećavaju troškove. Nakon predobrade slijedi hidroliza celuloze, fermentacija, izdvajanje te obrada nusproizvoda (Ivančić Šantek i sur., 2016). Odabir efikasnog radnog organizma od velikog je značaja. Kako bi se povećava isplativost nužno je unaprijediti proizvodne procese. Pritom se metoda simultane hidrolize i fermentacije pokazala najpogodnijom zbog manje vjerojatnosti pojave inhibicije supstratom i smanjenja troškova te povećanja produktivnosti, a tome pridonosi i kontinuirani postupak vođenja bioprocesa. U tom su procesu metode saharifikacije (hidrolize) i fermentacije sirovine (alkoholno vrenje hidrolizata) povezane (Rezić i sur., 2016). Negativna je strana ovog procesa što su za rast mikroorganizma i enzimsku hidrolizu supstrata nejednaki optimalni uvjeti (Ivančić Šantek i sur., 2016). Nastoji se konstruirati sustav u kojem bi jedan radni organizam provodio biosintezu enzima, saharifikaciju i fermentaciju (konsolidirani bioproceni sustav) čime bi se dodatno smanjili troškovi i povećala produktivnost. Međutim, dovoljno efikasan radni organizam još uvijek nije pronađen (Rezić i sur., 2016).

Treća se generacija biogoriva temelji na korištenju algi. Alge su fotosintetički organizmi te poput biljaka koriste energiju sunca za pretvorbu CO₂ i H₂O u ugljikohidrate i/ili lipide koji se mogu ekstrahirati i preraditi u gorivo. Prednost algi je što mogu rasti na različitim područjima i medijima (npr. otpadne vode), dok s druge strane prehrambene sirovine zahtijevaju dodatne potrebe za zemljištima. Nadalje, od velikog je značaja što određene alge imaju sposobnost povećavanja proizvodnje lipida u suboptimalnim uvjetima.

Mikroalge obitavaju na raznim područjima poput termalnih izvora, pustinja te slanih i slatkih voda. Rast u ekstremnim uvjetima omogućava im njihova jednostavna stanična struktura. Njih 77% pripada porodici zelenih mikroalgi, a 8% cijanobakterijama. Lipidi iz biomase algi mogu se koristiti kao početna sirovina pri proizvodnji biodizela. Nadalje, biomasa algi može se upotrijebiti i za proizvodnju kozmetičkih, prehrambenih i farmaceutskih proizvoda. Međutim, postojeći bioprocesi ne omogućavaju proizvodnju koja bi ekonomski bila isplativa, stoga je nužno unaprijediti postupke proizvodnje i pročišćavanja. Tome može pridonijeti optimiranje procesa te upotreba novih vrsta bioreaktora. Odabir efikasne mikroalge također je od značaja, a potrebno je i osigurati optimalne uvjete pri uzgoju. Kao izvor ugljika mogu se koristiti sirovine poput glicerola i melase, a kao izvor dušika sojino brašno i kukuruzna močevina. Proizvodnja u otvorenim i zatvorenim bioreaktorima (foto-bioreaktorima, Slika 7) omogućava izrazito veliko iskorištenje površine naspram uzgoja biljaka, a udio lipida i proces proizvodnje biomase visoko su produktivni. Utrošak vode važan je faktor kod proizvodnje biodizela, a ušteda se može ostvariti reciklacijom procesne vode. Korištenjem otpadnih voda kao hranjivih podloga u skladu je s načelima zelene kemije, međutim kod njihove je uporabe povećan rizik od kontaminacije (Rezić i sur., 2014).

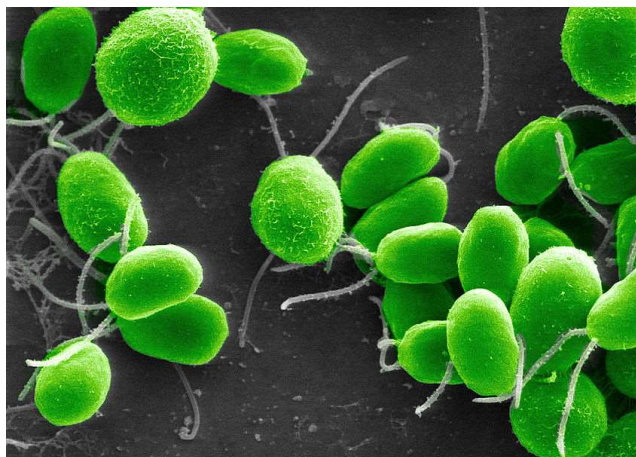


Slika 7. Serijski povezani foto-bioreaktori (Blažina, 2019)

Postoje četiri načina kojima se dobiva biomasa mikroalgi (Chen i sur., 2011): (1) ftoheterotrofni – mikroalge koriste organski izvor ugljika i svjetlost; (2) fotoautotrofni – CO₂ je izvor ugljika što je prednost s ekološke i ekonomske strane, međutim smanjeni su udio

lipida i prinos biomase; (3) miksotrofni – organski i anorganski izvor ugljika i (4) heterotrofni – organski izvor ugljika (manoza, laktoza, glukoza, saharoza), prednost je što se lipidi sintetiziraju i u periodima slabe osvjetljenosti te ih karakterizira veća produktivnost u odnosu na autotrofni uzgoj (Rezić i sur., 2014).

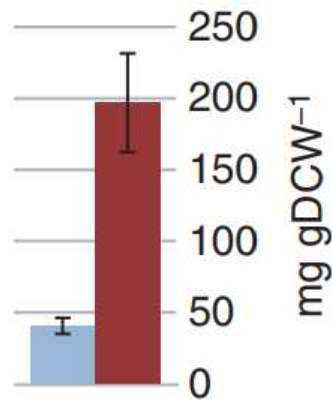
Nakon što je proces proizvodnje biomase završen, slijedi izdvajanje mikroalgi i sušenje. Metode koje se mogu koristiti pri izdvajanju su filtracija, flokulacija, flotacija, prešanje, sedimentacija te centrifugiranje (Uduman i sur., 2010). Zatim slijedi razbijanje stanica i ekstrakcija lipida. Razbijanje se provodi upotrebom mikrovalova i mlinova te procesa liofilizacije ili hidrolize stanične stijenke lužinom, kiselinom ili enzimima. U kontekstu zelene kemije valja istaknuti upotrebu superkritičnih fluida i ionskih tekućina kao metoda ekstrakcije. Iz ekstrahiranih se lipida potom proizvodi biodizel, a metode kojima se to postiže su *in situ* transesterifikacija te transesterifikacija u homogenim odnosno heterogenim uvjetima okoline (Rezić i sur., 2014).



Slika 8. Mikroalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Anonymous 2, 2020)

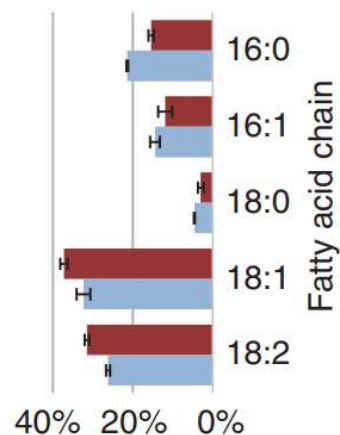
Pri ograničenim izvorima dušika mikroalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Slika 8) skladišti triacilgliceride (Rezić i sur., 2014). Kerkhoven i suradnici (2016) prikazali su kako regulacija metabolizma aminokiselina uz dušik kao granični supstrat kod kvasca *Yarrowia lipolytica* može dovesti do povećane sinteze lipida koji se mogu koristiti u svrhu proizvodnje biogoriva i kemikalija (Slika 9). *Y. lipolytica* ima sposobnost skladištenja lipida do 70% svoje suhe biomase, najčešće u obliku triacilglicerola (TAG). Paralelno se mjerenje provodilo uz ugljik (u obliku glukoze) kao granični supstrat. Nadalje, u kvascu je bila pojačana ekspresija gena koji kodira za enzim diacilglicerol aciltransferazu, koji provodi zadnju reakciju sinteze

triacilglicerola. Kod dušika (u obliku NH_4^+) kao graničnog supstrata ugljik se preusmjerava u sintezu lipida umjesto u sintezu citrata, a također je izmjerena pojačana izmjena O_2 i CO_2 , odnosno proces oksidativne fosforilacije.



Slika 9. Ukupan sadržaj lipida; crveno prikazuje mjerenje u kojem je dušik bio granični supstrat, a plavo ugljik (Kerkhoven i sur., 2016)

Od skupine fosfolipida u oba su mjerenja fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin i fosfatidil inozitol bili najviše zastupljeni. Ukupan je sadržaj lipida bio za gotovo 4 puta veći kod dušika kao graničnog supstrata (slika 9). Sadržaj masnih kiselina je bio analiziran pomoću plinske kromatografije i spektrometrije masa, a prikazan je na Slici 10.



Slika 10. Sadržaj pojedinih masnih kiselina; crveno prikazuje mjerenje u kojem je dušik bio granični supstrat, a plavo ugljik (Kerkhoven i sur., 2016)

Sekvencioniranjem RNA potvrđeno je kako *Y. lipolytica* uz dušik kao granični supstrat smanjuje metaboličke procese u kojima sudjeluje dušik. Nadalje, dobivenim je podacima dokazano da je sinteza lipida povezana s regulacijom na razini transkripcije metabolizma aminokiselina, a ne metabolizma lipida.

Biomasa algi može se iskoristiti i pri proizvodnji dodataka prehrani. Primjer su *Pavlova salina* i *Tisochrysis lutea* koje sintetiziraju ω -3 masne kiseline EPA (eikosapentaenska) i DHA (dokosaheksaenska) (Slocombe i sur., 2013). Ove su dvije masne kiseline vrlo važne u organizmu čovjeka – prekursori su eikosanoida, hormona s mnogobrojnim funkcijama u organizmu (Štalić, 2017). Međutim, u prehrani zapadnih zemalja rijetko su dovoljno zastupljene, stoga je biomasa mikroalgi važan izvor ovih molekula.

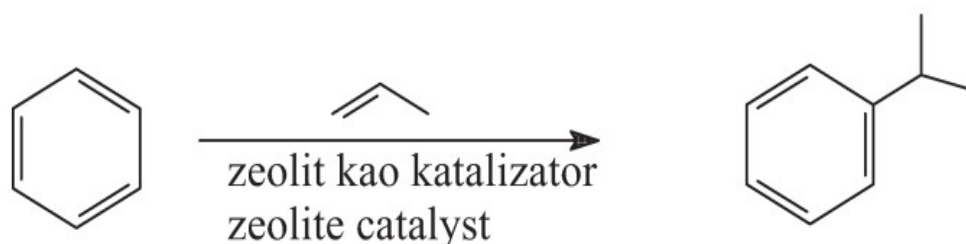
Napredak u biotehnologiji i metaboličkom inženjerstvu doveo je do definiranja i **četvrte generacije** biogoriva koja se također temelji se na upotrebi fotosintetskih mikroorganizama. Međutim, treća generacija podrazumijeva procesiranje biomase i ekstrakcije određenog biogoriva, dok kod četvrte dolazi do direktne proizvodnje biogoriva uz pomoć cijanobakterija i kvasaca (Fasciotti, 2017).

4. ORGANSKA SINTEZA

Industrijski procesi koji uključuju organsku sintezu značajno doprinose nastanku zagađivača i štetnog otpada (Fasciotti, 2017). Uzrok je upotreba toksičnih otapala i reaktanata, najčešće uz žestoke reakcijske uvjete (Jukić i sur., 2004). Stoga je nužno osmisliti nove ili unaprijediti postojeće procese koji će biti u skladu s načelima zelene kemije navedenim u uvodu ovog rada.

Organska sinteza među ostalim podrazumijeva reakcije nitriranja, sulfoniranja, oksidacije, alkiliranja i halogeniranja (Jukić i sur., 2004). Kako bi se smanjio nastanak HCl-a kao nusprodukta prilikom procesa halogeniranja, osmišljen je modificirani Deaconov proces. Umjesto nastanka Cl₂, nakon provođenja reakcije HCl-a i bakrova (II) oksida (pri 200°C) nastali se kompleks kloro i bakra oksidira kisikom (pri 360°C). Zanimljiva je i upotreba CO₂ u tekućem obliku kao zamjena vodi i diklormetanu u svrhu selektivnog uklanjanja kafeina iz sirovih zrna kave (Jukić i sur., 2004).

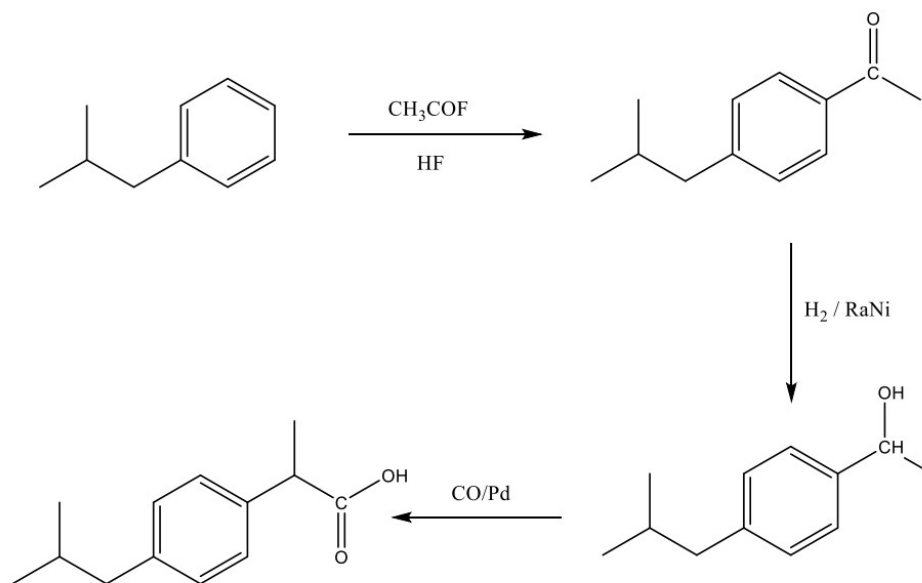
Zeoliti pokazuju katalitička svojstva stoga se često primjenjuju u organskoj industriji – npr. prilikom sinteze kemikalija, izomerizacije i sinteze goriva te kod krekiranja sirove nafte (Vojnović i sur., 2013). Nadalje, njima se može zamijeniti uporaba opasnih katalizatora prilikom sinteze kumena – tzv. Mobil/Badgerov postupak alkiliranja benzena (Slika 11) (Jukić i sur., 2004).



Slika 11. Mobil/Badgerova sinteza kumena (Jukić i sur., 2004)

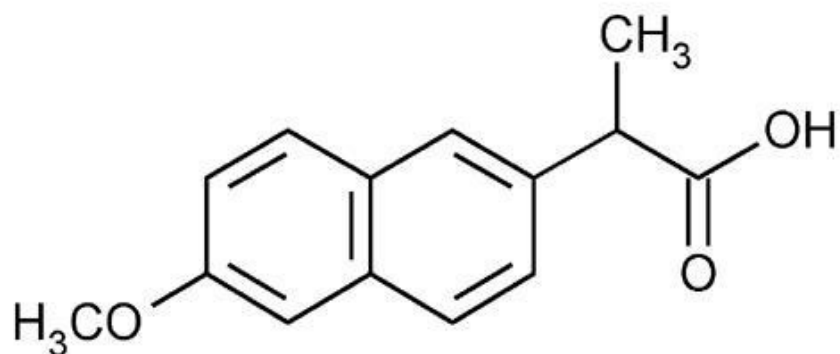
Analgetici su tvari koje služe za ublažavanje ili uklanjanje boli. Acetilsalicilna kiselina, paracetamol i ibuprofen jedni su od najpoznatijih neopioidnih analgetika (Barbarić i Sunara, 2012). 60-ih godina prošlog stoljeća *Boots* kompanija razvila je sintezu ibuprofena koja je podrazumijevala 6 stupnjeva, relativno nisku konverziju (40%) reaktanata te uporabu velikih količina otapala (Jukić i sur., 2004). Početkom 90-ih godina od strane *Hoechst – Celanese*

kompanije (Pavković, 2016) razvijena je nova metoda koja podrazumijeva 3 reakcijska stupnja te veću ekonomsku i ekološku isplativost – smanjena je količina nastalih nusprodukata te povećana selektivnost reakcije (Jukić i sur., 2004). Prvi je korak Friedel–Craftsovo aciliranje, slijedi hidrogeniranje uz Raney nikal (RaNi) te karboniliranje – uvođenje ugljikovog monoksida (CO) uz paladij (Pd) kao katalizator (Pavković, 2016) (Slika 12).



Slika 12. Zelena sinteza ibuprofena (Pavković, 2016)

Naproxen (Slika 13), još jedan lijek, sintetiziran je pomoću kiralnog katalizatora s prijelaznim metalom rutenijem (Akutagawa, 1995) koji sadrži BINAP (2,2'-bis(diarilfosfeno)-1,1'-binaftil) kiralni ligand. Katalizatori prijelaznih metala visoke su selektivnosti te se njihovom upotrebom smanjuje ili čak eliminira upotreba otapala kao sredstva za razdvajanje (Jukić i sur., 2004).

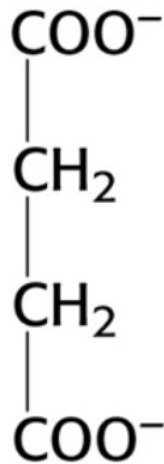


Slika 13. Naproxen (Anonymous 3)

U organskoj sintezi važnu ulogu ima uporaba rekombinantnih (genetički modificiranih) mikroorganizama kao biokatalizatora – npr. prilikom sinteze jantarne kiseline (1,4-dikarboksilne kiseline) (Slika 14). Jantarnu kiselinu sintetiziraju gotovo sve mikrobne, biljne i životinjske stanice. Međuspoj je Krebsovog ciklusa (citratni ciklus; ciklus limunske kiseline; ciklus trikarboksilne kiseline – TCA) – središnjeg metaboličkog procesa tijekom kojeg dolazi do oksidacije molekula do CO₂ u svrhu kasnije sinteze ATP-a. Nadalje, ovaj je ciklus u animalnim stanicama značajan izvor preteča za molekule poput porfirina, aminokiselina i nukleotidnih baza (Berg i sur., 2013), dok kod mikrobnih i biljnih stanica tu ulogu ima glioksilatni ciklus (Teparić, 2019). Sukcinat ima široku primjenu u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Zeikus i sur., 1999) te je preteča brojnih industrijski važnih kemikalija kao što su tetrahidrofuran i 1,4-butandiol (Ahn i sur., 2016).

U kontekstu zelene kemije, bakterije i kvasci imaju najznačajniju ulogu u industrijskoj proizvodnji jantarne kiseline. Genom *Saccharomyces cerevisiae* bio je prvi u potpunosti sekvencionirani eukariotski genom što je omogućilo primjenu metoda genetičkog i metaboličkog inženjerstva te posljedično pridonijelo njegovoj ulozi u sintezi brojnih kemikalija, među ostalim etanola i jantarne kiseline. Tijekom sinteze jantarne kiseline optimalan je pH između 3 i 6, što je prednost u odnosu na bakterije kod kojih iznosi oko 7 te zahtijeva neutralizaciju. Inaktivacijom gena koji kodira za alkohol dehidrogenazu, enzima koji katalizira redukciju acetaldehida u etanol, onemogućava se nastajanje etanola. Nadalje, inaktivacijom gena koji kodiraju za podjedinice sukcinat dehidrogenaze (enzima citratnog ciklusa koji katalizira oksidaciju sukcinata u fumarat) povećava se proizvodnja sukcinata. Međutim, navedenim se modifikacijama smanjuje rast stanica koji ovisi o proizvodnji etanola. Tome se može doskočiti reakcijama glioksilatnog ciklusa. Inaktivacijom gena koji kodiraju za izocitrat

dehidrogenazu onemogućuje se pretvorba izocitrata u α -ketoglutarat. Obzirom da je α -ketoglutarat preteča za esencijalnu aminokiselinu glutamat, takvi su mikroorganizmi auksotrofi za glutamat – ne mogu rasti na podlozi bez glutamata. Ta se aminokiselina stoga mora dodati u podlogu (Ahn i sur., 2016), što nije optimalan pristup.



Slika 14. Sukcinat (Teparić, 2019)

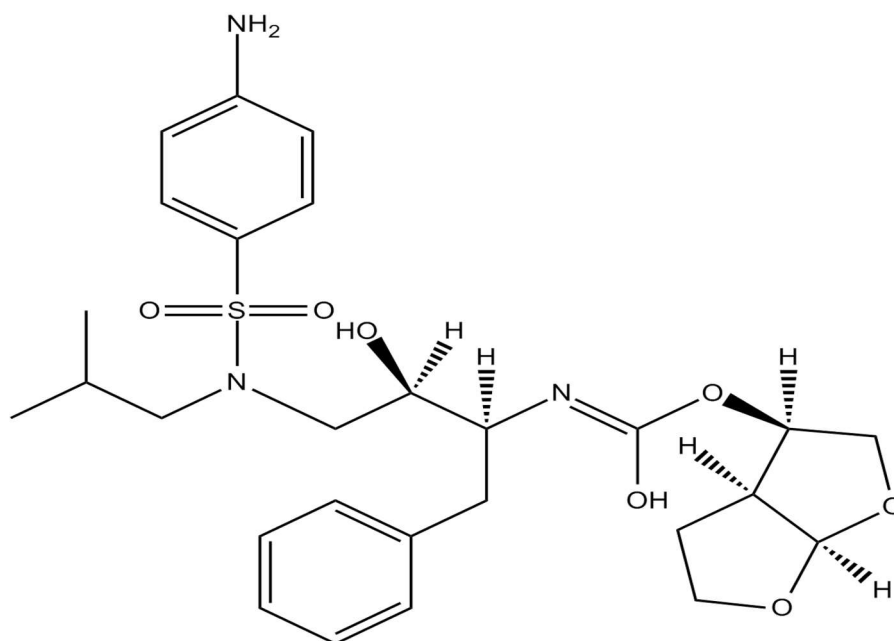
Optimalan put sinteze sukcinata preko reduktivnog Krebsovog ciklusa opisali su 2014. Yan i suradnici. Konstruiran je soj *S. cerevisiae* kojemu je deletiran gen koji kodira za enzim piruvat dekarboksilazu što onemogućava dekarboksilaciju piruvata u acetaldehid. Piruvat se stoga karboksilira u oksaloacetat uz enzim piruvat karboksilazu 2 čiji je gen overekspimiran. Nadalje, overekspimiran je i gen koji kodira za malat dehidrogenazu koja reducira oksaloacetat u malat (Teparić, 2019). Budući da fumaraza ima veći afinitet prema fumaratu nego malatu, u cilju onemogućavanja hidratiziranja fumarata u malat, deletiran je gen koji kodira za taj enzim. Međutim, pomoću plazmidnog je vektora unesen gen iz bakterije *E. coli* koji je overekspimiran i koji kodira za fumarazu, a koja navedenu reakciju održava u ravnoteži – nema veći afinitet prema nijednom od supstrata. Time se količina sukcinata značajno povećava. Nadalje, sinteza se dodatno povećava delecijom gena koji kodira za glicerol-3-fosfat dehidrogenazu čime se glukoza ne preusmjerava prema glicerolu već isključivo prema piruvatu. Dodatno, ovim reakcijama ne dolazi do otpuštanja CO_2 – štoviše, dolazi do fiksiranja što je prednost s ekološkog stajališta. U podlogu su među ostalim u optimalnim količinama dodani biotin, urea i CaCO_3 , a regulirana je i količina CO_2 u bioreaktoru. Na ovaj se, ekološki i ekonomski prihvatljiv način, omogućava sinteza sukcinata s relativno visokim prinosom.

Značajno se veći prinos, kao i produktivnost, postiže uporabom rekombinantne *Escherichia coli*. Vemuri i suradnici (2002) proveli su uzgoj rekombinantne *E. coli* u aerobnim uvjetima, a zatim u anaerobnim sintezu sukcinata. Iz bakterije *Rhizobium etli* kloniran je i overeksprimiran gen koji kodira za piruvat karboksilazu te su deletirani geni koji kodiraju za enzime koji prevode piruvat u laktat i metanoat. Nadalje, Lee i suradnici (2005) proveli su sintezu sukcinata u anaerobnim uvjetima uz šaržni uzgoj s prihranom, a osim laktata i metanoata, onemogućena je i sinteza acetata i etanola.

Osim rekombinantne *E. coli*, visoku produktivnost sinteze sukcinata pokazuje *Mannheimia succiniciproducens* – gram negativna, fakultativno anaerobna, mezofilna, nesporotvorna bakterija (Lee i sur., 2002) koja može metabolizirati različite izvore ugljika poput laktoze, škroba, glukoze, fruktoze (Hong i sur., 2004) te glicerola – nusprodukta proizvodnje biodizela (Ahn i sur., 2016). Uz prednost relativne dostupnosti i niske cijene, glicerol je relativno reducirana molekula te stoga optimalan supstrat za *M. succiniciproducens*. Lee i suradnici (2014) u svom su patentu uporabili saharozu uz glicerol te je inaktivacijom određenih gena onemogućen nastanak laktata i acetata. Uz navedene mikroorganizme, za industrijsku se proizvodnju sukcinata koriste još i rekombinantna *Pichia kudriavzevii*, *Basfia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes* i *Corynebacterium glutamicum* (Ahn i sur., 2016).

Potencijalnim padom vrijednosti fosilnih goriva dovodi se u pitanje isplativost organske sinteze iz obnovljivih izvora. Međutim, sinteza sukcinata se i u tom segmentu pokazala isplativijom i naravno, ekološki prihvatljivijom (Ahn i sur., 2016).

Sinteza katehola uz *Escherichia coli* (Balderas-Hernández i sur., 2014) još je jedan primjer uspješne implementacije rekombinantnih mikroorganizama u kontekstu zelene kemije. Naime, uobičajena sinteza iz benzena podrazumijeva nekoliko stupnjeva, nastanak nusprodukata te žestoke uvjete, dok je sinteza uz *E. coli* ekonomski i ekološki prihvatljivija (Jukić i sur., 2004).

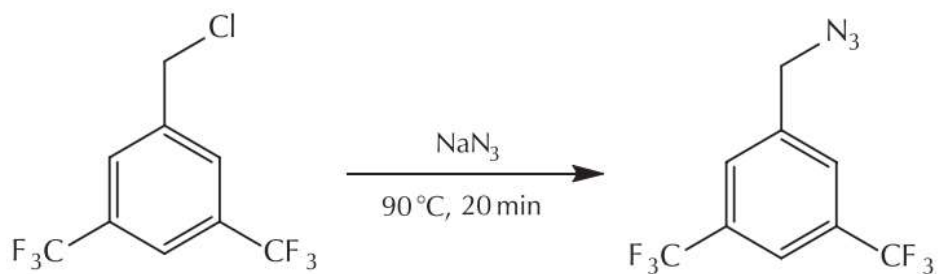


Slika 15. Darunavir – antiretrovirusni lijek (Anonymous 4, 2020)

Neadekvatno opremljeni laboratoriji te često složeni sintetski putevi nerijetko su prepreka unapređenju postupaka organske sinteze. Kao jedno od rješenja pokazala se primjena cijevnih mezo- i mikroreaktora (Pavlović i sur., 2019). Neke od prednosti takvih sustava su povećanje sigurnosti, produktivnosti i selektivnosti; smanjenje trajanja reakcije te olakšano optimiranje, a posljedično i kontroliranje procesa i procesnih parametara. Dodatno, smanjen je i nastanak nusprodukata. Nadalje, kod ovakvih je reaktora bolja transmisija svjetlosti po reakcijskoj smjesi prilikom provedbe reakcije fotokemijskih sinteza. Značajan je napredak ostvaren uporabom ovakvih sustava prilikom proizvodnje aktivnih farmaceutika (npr. lumacaftor/ivacaftor i darunavir) (Slika 15) (Pavlović i sur., 2019). Neki od primjera uspješne implementacije mezo- i mikroreaktora u kontekstu fotokemijskih reakcija i organskih sinteza su:

- (1) fotocikloadicija 1-cijanonaftalenskog derivata (Maeda i sur., 2005),
- (2) fotokemijsko kloriranje toluen-2,4-diizocijanata (Ehrich i sur., 2002),
- (3) sinteza flucitozina iz citozina (Harsanyi i sur., 2017),
- (4) sinteza klorarena (Fortt i sur., 2003),
- (5) sinteza azida (Slika 16) (Kopach i sur., 2009) i
- (6) metiliranje 3-piridin-3-ilpropanske kiseline (Lu i sur., 2004).

Međutim, protočni sustavi nisu uvijek prikladni odnosno ne mogu uvijek nadomjestiti sve mane šaržnih sustava (Pavlović i sur., 2019).



Slika 16. Sinteza azida (Pavlović i sur., 2019)

5. ZAKLJUČAK

Sve se više resursa ulaže u smanjenje štetnog utjecaja brojnih industrijskih procesa na ljude i okoliš, uz to, ekološka osviještenost i održivi razvoj imperativ su na globalnoj razini. Uloga biotehnologije sve je značajnija u rješavanju brojnih izazova i problema s kojima se suočava područje zelene kemije. Brojna su postignuća već ostvarena, međutim situacija je daleko od idealne. Edukacija i ulaganje u biotehnološka područja stoga su od neupitne važnosti.

U ovom su radu navedeni neki od primjera te je opisana primjena biotehnologije u reakcijama i procesima prilikom organske sinteze te sinteze biopolimera i biogoriva uz primjenu načela zelene kemije. Sigurnost za ljude i okoliš, povećana selektivnost, produktivnost, kao i jednostavnost procesa samo su neki od ciljeva koji se nastoje implementirati. Osim toga, biotehnološki procesi u nekim slučajevima pridonose smanjenju operativnih troškova, kao i troškova potrebnih za odlaganje štetnih nusprodukata. Od početne sirovine do željenog produkta nerijetko su prisutni brojni izazovi, stoga je nužna suradnja i integracija biotehnologije i drugih srodnih područja.

6. LITERATURA

Ahn J.H., Jang Y.S., Lee S.Y. (2016) Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* **42**: 54-66.

Akutagawa S. (1995) Asymmetric synthesis by metal BINAP catalysts. *Applied Catalysis A: General* **128**: 171-207.

Anastas P. T., Warner J. C. (1998) Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York. str. 30–58.

Anonymous 1 (2020) < <https://www.italianfoodtech.com/eco-friendly-plasticizers-for-pla-films/>> pristupljeno: 21. svibnja 2020.

Anonymous 2 (2020) < <https://mosys.univie.ac.at/research/topics/clamydomonas-as-energy-resource/>> pristupljeno: 3. lipnja 2020.

Anonymous 3 (2020) < <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=8994a912-df58-2031-e053-2995a90a284f&type=display> > pristupljeno: 8. kolovoza 2020.

Anonymous 4 (2020) < <http://www.apexbt.com/darunavir.html> > pristupljeno: 7. kolovoza 2020.

Balderas-Hernández V.E., Treviño-Quintanilla L.G., Hernández-Chávez G. i sur. (2014) Catechol biosynthesis from glucose in *Escherichia coli* anthranilate-overproducer strains by heterologous expression of anthranilate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Cell Factories* **13**: 136.

Barbarić M. i Sunara I. (2012) Biotransformacije odabranih analgetika. *Farmaceutski glasnik* **68**: 323-342.

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2013) Biokemija, Školska knjiga, Zagreb. str. 435-446.

Blažina M. (2019) Skupovi i događaji. *Kemija u industriji* **68**: 143–150.

Chen C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J., Chang J.S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* **102**: 71–81.

Chen G.-Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Review* **38**: 2434–2446.

- Choi S.Y., Park S.J., Kim W.J., Yang J.E., Lee H., Shin J., Lee S.Y. (2016) One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **34**: 435-440.
- Delplace V. i Nicolas J. (2015) Degradable vinyl polymers for biomedical applications. *Nature Chemistry* **7**: 771-784.
- Ehrich H., Linke D., Morgenschweis K., Baerns M., Jahnisch K. (2002) Application of microstructured reactor technology for the photochemical chlorination of alkylaromatics, *Chimia* **56**: 647–653
- Fasciotti M. (2017) Perspectives for the use of biotechnology in green chemistry applied to biopolymers, fuels and organic synthesis: from concepts to a critical point of view. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **6**: 82-89.
- Fata Moradali M., Rehm H. A. (2020) Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology* **18**: 195–210.
- Fortt R., Wootton R. C. R., de Mello A. J. (2003) Continuous-flow generation of anhydrous diazonium species: monolithic microfluidic reactors for the chemistry of unstable intermediates, *Organic Process Research & Development* **7**: 762–768.
- Gnansounou J.E. i Dauriat A. (2005) Ethanol fuel from biomass: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research* **64**: 809-821.
- Harsanyi A., Conte A., Pichon L., Rabion A., Grenier S., Sandford G. (2017) One-step continuous flow synthesis of antifungal WHO essential medicine flucytosine using fluorine. *Organic Process Research & Development* **21**: 273–276.
- Hong SH, Kim JS, Lee SY, In YH, Choi SS, Rih J-K, Kim CH, Jeong H, Hur CG, Kim JJ (2004) The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *Nature Biotechnology* **22**: 1275-1281.
- Ivančić Šantek M., Miškulin E., Beluhan S., Šantek B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva, *Kemija u Industriji* **65**: 25-38.
- Janušić V., Ćurić D., Krička T., Voća N., Matin A. (2008) Pretreatment technologies in bioethanol production from lignocellulosic biomass. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Jukić M., Đaković S., Filipović Kovačević Ž., Kovač V., Vorkapić Furač J. (2005) Dominantni trendovi „zelene“ kemije, *Kemija u Industriji* **54**: 255-272.

Jukić M., Đaković S., Filipović Kovačević Ž., Vorkapić Furač J. (2004) „Zelena“ kemija otvara put čistim ekološkim prihvatljivim kemijskim procesima, *Kemija u Industriji* **53**: 217-224.

Kerkhoven E.J., Pomraning K.R., Baker S.E., Nielsen J. (2016) Regulation of amino-acid metabolism controls flux to lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *NPJ Syst. Biol. Appl.* **2**, 16005.

Kopach M.E., Murray M.M., Braden T.M., Kobierski M.E., Williams O.L. (2009) Improved synthesis of 1-(azidomethyl)-3,5-bis-(trifluoromethyl)benzene: development of batch and microflow azide processes, *Organic Process Research & Development* **13**: 152-160.

Lee P., Lee S., Hong S., Chang H. (2002) Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 663-668.

Lee SJ, Lee D-Y, Kim TY, Kim BH, Lee J, Lee SY (2005) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation. *Applied Environmental Microbiology* **71**: 7880-7887.

Lee SY, Lee JW, Choi S, Yi J (2014) Mutant microorganism producing succinic acid simultaneously using sucrose and glycerol, and method for preparing succinic acid using same. US patent, US8691516B2

Lu S., Watts P., Chin F. T., Hong J., Musachio J. L., Briard E., Pike V. W. (2004) Syntheses of ¹¹C- and ¹⁸F-labeled carboxylic esters within a hydrodynamically-driven micro-reactor. *Lab on a Chip* **4**: 523–525.

Maeda H., Mukae H., Mizuno K. (2005) Enhanced efficiency and regioselectivity of intramolecular [2π+2π] photocycloaddition of 1-cyanonaphthalene derivative using microreactors. *Chemistry Letters* **34**: 66–67.

Pavković M. (2016) Sinteza i svojstva ibuprofena. Završni rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Pavlović K., Ratković A., Gojun M., Šalić A., Zelić B., Škorić I. (2019) Primjena cijevnih mezo- i mikroreaktora u organskoj sintezi i fotokemiji. *Kemija u Industriji* **68**: 477-485.

Rehm H. A. (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 578-592.

Rezić T. (2012) Industrijska biotehnologija, Biotehnološka proizvodnja biogoriva, 1.izd., Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

- Rezić T., Filipović J., Šantek B. (2014) Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **9**: 26-36.
- Rezić T., Ivančić Šantek M., Andlar M., Pavlečić M., Šantek B. (2016) Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **11**: 6-17.
- Shen L., Haufe J., Patel M. K. (2009) Product overview and market projection of emerging bio-based plastics, str. 57-73.
- Slocombe S.P., Zhang Q., Ross M., Anderson A., Thomas N.J., Lapresa A., RadMenéndez C., Campbell C.N., Black K.D., Stanley M.S., Day J.G. (2015) Unlocking nature's treasure-chest: screening for oleaginous algae. *Scientific Reports* 9844.
- Steinbüchel A. i Valentin H. E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**: 219-228.
- Šatalić Z. (2017) Znanost o prehrani 1 (interna skripta). Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Šljivac D. i Šimić Z. (2009) Obnovljivi izvori energije: Najvažnije vrste, potencijal i tehnologija. Fakultet elektrotehnike i računarstva, Zagreb.
- Teparić R. (2019) Biokemija 2 (interna skripta). Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Uduman N., Qi Y., Danquah M.K., Forde G.M., Hoadley A. (2010) Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* **2**: 012701.
- Vemuri G., Eiteman M., Altman E. (2002) Succinate production in dualphase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28**: 325-332.
- Vojnović B., Margeta K., Šiljeg M., Cerjan Stefanović Š. i Bokić Lj. (2013) Primjena prirodnih zeolita u zaštiti okoliša. *Sigurnost* **55**: 209-218.
- Yan D., Wang C., Zhou J., Liu Y., Yang M., Xing J. (2014) Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value. *Bioresource Technology* **156**: 232-239.

Zeikus J., Jain M., Elankovan P. (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 545–552.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Marta Salopek

ime i prezime studenta