

# Primjena biokatalize u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija

---

Pavić, Anamarija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

*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:159:508110>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Anamarija Pavić**

6955/BT

**PRIMJENA BIODOKATALIZE U  
FARMACEUTSKOJ I INDUSTRIJI FINIH  
KEMIKALIJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Odabrana poglavlja zelene kemije

**Mentor:** Doc. dr. sc. *Mojca Čakić Semenčić*

**Zagreb, 2017.**

*Srdačno se zahvaljujem doc. dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na mentorstvu, pomoći, usmjeravanju, savjetima i susretljivosti tijekom izrade završnog rada.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju**

**Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Primjena biokatalize u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija**

***Anamarija Pavić, 0058205196***

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je predstaviti neke od suvremenih metoda pripreme farmaceutskih i proizvoda industrije finih kemikalija koje ne narušavaju ekološku i ekonomsku ravnotežu već se baziraju na principima zelene kemije. Poseban naglasak stavljen je na biokatalizu, odnosno transformaciju tvari, kemijskog ili biološkog podrijetla, primjenom enzima ili cijelih stanica dobivenih iz živih organizama. Različite vrste biokatalizatora učinkovito kataliziraju sintezu različitih kemijskih proizvoda, a njihova visoka selektivnost pritom doprinosi uštedi sirovina, energije i vremena. U radu su opisane prednosti biokatalize u usporedbi s konvencionalnom kemijskom sintezom. Također, dan je pregled nekoliko biokatalitičkih proizvodnih postupaka, poput proizvodnje L-karnitina, hijaluronske i kafeinske kiseline, koji su zamijenili klasičnu kemijsku sintezu.

**Ključne riječi:** biokataliza, ekološka održivost, fine kemikalije, zeleni procesi

**Rad sadrži:** 23 stranice, 12 slika, 4 tablice, 32 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić*

**Datum obrane:** 8. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Chemistry and Biochemistry**

**Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Biotechnology**

**Application of biocatalysts in the pharmaceutical and fine chemicals industry**

***Anamarija Pavić, 0058205196***

**Abstract:** The aim of this thesis was to present some of the modern methods of preparation of pharmaceuticals and fine chemicals, that do not disturb the ecological and economic balance, but are based on the principles of green chemistry. Particular emphasis is placed on biocatalysis, i.e. transformation of chemical or biological compounds, using enzymes or whole cells obtained from living organisms. Different types of biocatalysts effectively catalyze the synthesis of various chemical products, and their high selectivity contributes to significant resources as well as energy and time consumption savings. The thesis describes the advantages of biocatalysis compared with conventional chemical synthesis. Also, several biocatalytic processes, such as L-carnitine, hyaluronic and caffeic acid production, which replaced the classical chemical synthesis are described.

**Keywords:** biocatalysis, ecological sustainability, fine chemicals, green processes

**Thesis contains:** 23 pages, 12 figures, 4 tables, 32 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:** Mojca Čakić Semenčić, Assistant Professor

**Defence date:** September 8<sup>th</sup> 2017

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Zelena kemija .....	2
2.2. Biokataliza .....	7
2.2.1. Prednosti i nedostaci biokatalize nad kemijskom katalizom .....	7
2.2.2. Biotransformacije uz izolirane enzime ili cijele stanice .....	8
2.2.3. Medij za provođenje biokatalize.....	9
2.2.4. Imobilizacija biokatalizatora .....	10
2.2.5. Izvori biokatalizatora .....	11
2.2.6. Klasifikacija biokatalizatora .....	12
2.3. Primjeri primjene biokatalize u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija.....	13
2.3.2. L-karnitin .....	14
2.3.3. <i>N</i> -acetil-D-glukozamin-6-fosfat .....	16
2.3.4. $\alpha$ -D-glukozid kafeinske kiseline.....	17
2.3.5. Kiralni 1,2-aminoalkoholi.....	19
2.3.6. Ostali primjeri proizvodnje.....	20
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	21
<b>4. POPIS LITERATURE</b> .....	22



## 1. UVOD

Tradicionalna kemijska industrija i konvencionalna kemijska priprema prijeko potrebnih proizvoda farmaceutske i industrije finih kemikalija narušile su ekološku ravnotežu i ubrzale procese onečišćenja zraka, vode i zemlje. Zelena kemija, kao pokret za zaštitu okoliša temeljen na znanstvenim i ekonomskim načelima, predstavljen je 1990. u SAD-u. Temeljena na 12 principa, zelena kemija je program za osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih proizvoda i procesa koji reduciraju ili eliminiraju uporabu ili proizvodnju supstancija opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš. Razvoj zelenih procesa danas je vrlo bitan ekološki i ekonomski segment koji se pokušava uvesti u svakodnevnu industrijsku praksu. Zbog korištenja visokospecifičnih biorazgradivih enzima, u blagim reakcijskim uvjetima, biokataliza danas predstavlja najpopularniji oblik zelene sinteze različitih proizvoda, koji pritom ne narušava ekološku ravnotežu. Razvoju biokatalize, i njezinoj primjeni u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, značajno je doprinio razvoj srodnih znanstvenih disciplina poput molekularne biologije i računalnog modeliranja. U ovom radu bit će opisane suvremene metode zelene sinteze, način njihovog provođenja te njihove glavne prednosti i nedostaci. Također, bit će prikazana biokatalitička proizvodnja nekih od proizvoda farmaceutske i industrije finih kemikalija koja je zamijenila konvencionalnu kemijsku sintezu.





## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Zelena kemija

Usporedno s razvojem kemijske industrije, razvijao se i problem njezinih brojnih nusprodukata, njihovog zbrinjavanja i utjecaja na ekološku ravnotežu i zagađenje okoliša. Stoga je Američka agencija za zaštitu okoliša (U.S. EPA) 1990.-tih razvila program Zelene kemije (Slika 1.) i definirala ju kao kemiju koja osmišljava kemijske produkte i procese neškodljive za okoliš te na taj način sprječava nastajanje onečišćenja (Jukić i sur., 2015). Tijekom brojnih stupnjeva industrijske kemijske sinteze različitih proizvoda, uslijed korištenja toksičnih reaktanata i otapala, nastaje otpad štetan za okoliš i ljudsko zdravlje. Kako bi se reduciralo ili potpuno izbjeglo stvaranje opasnog i štetnog otpada, teži se „čišćim“ procesima koji su utemeljeni na Anastasovih i Warnersovih 12 principa zelene kemije danih u Tablici 1. (Anastas i Warner, 1998) i prikazanih na Slici 2.



**Slika 1.** U.S. EPA

**Tablica 1.** 12 principa zelene kemije (Anastas i Warner, 1998)

1. Sprječavanje akumulacije otpada (Prevention)	Bolje je spriječiti nastajanje otpada, nego ga čistiti ili zbrinjavati nakon što je nastao.
2. Iskoristivost atoma (Atom Economy)	Sintetski postupak treba osmisliti tako da se ulazne sirovine potpuno ugrade u proizvod.
3. Manje opasne kemijske sinteze (Less Hazardous Chemical Syntheses)	Sintetske procese, ako je to moguće, treba osmisliti tako da se koriste ili proizvode tvari manje toksične za ljude i okoliš.
4. Odabir sigurnijih kemikalija (Designing Safer Chemicals)	Kemijske proizvode treba osmisliti tako da im je željena djelotvornost postignuta uz minimalnu toksičnost.
5. Sigurnija otapala i pomoćna sredstva (Safer Solvents and Auxiliaries)	Uporabu pomoćnih kemijskih tvari treba izbjeći ili zamijeniti neškodljivim, gdje god je to moguće.
6. Procjena energetske efikasnosti (Design for Energy Efficiency)	Sintetske procese treba provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku tako da bi se energetske zahtjevi sveli na minimum.
7. Upotreba obnovljivih sirovina (Use of Renewable Feedstocks)	Potrebno je upotrebljavati obnovljive sirovine gdje god je to tehnički i ekonomski prihvatljivo.
8. Redukcija proizvodnje derivata (Reduce Derivatives)	Ako je moguće, treba izbjegavati nepotrebna proširenja procesa budući da ona podrazumijevaju upotrebu dodatnih reagensa koji stvaraju otpad.
9. Kataliza (Catalysis)	Katalitički reagensi, selektivni koliko je to moguće, prihvatljiviji su od stehiometrijskih reagensa.
10. Postupci za razgradnju (Design for Degradation)	Kemijski proizvodi, nakon prestanka njihovog djelovanja, moraju imati mogućnost pretvorbe u neškodljive proizvode koji ne zaostaju u prirodi.
11. Pravovremena analiza prevencije zagađenja (Real-time analysis for Pollution Prevention)	Potrebno je primijeniti i razvijati analitičke metode za praćenje kemijskog, proizvodnog procesa s ciljem sprječavanja nastanka opasnih tvari.
12. Minimaliziranje mogućnosti nesretnih slučajeva (Inherently Safer Chemistry for Accident Prevention)	U kemijskim procesima potrebno je smanjiti uporabu tvari koje mogu uzrokovati štetne posljedice (eksplozija, vatra i štetno isparavanje).



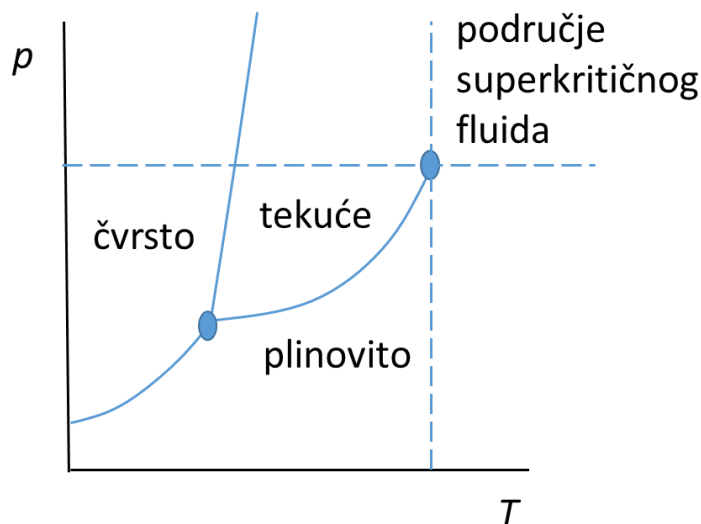
**Slika 2.** 12 principa zelene kemije

Zadatak zelene kemije je osmišljavanje kemijskih procesa i produkata neškodljivih za ljudsko zdravlje i okoliš (Jukić i sur., 2004). Neki od principa zelene kemije uspješno su implementirani u reakcije koje su prethodno generirale veliki broj toksičkih nusprodukata. Primjeri konvencionalnih kemijskih reakcija koje su modificirane korištenjem zelenih principa su: (i) **nitriranje** pomoću koncentrirane dušične i sumporne kiseline pri visokim temperaturama, (ii) **halogeniranje** posredovanjem katalizatora, (iii) **alkiliranje** pri temperaturama višim od 200 °C i povišenom tlaku, (iv) **oksidacija** u tekućoj ili plinskoj fazi, (v) **sulfoniranje**. Zelena kemija očituje se kroz nekoliko dominantnih trendova kao što su (Jukić i sur., 2005):

- (i) kataliza, čiji je primarni cilj zaštita okoliša i ekonomska održivost (Anastas i sur., 2000). Prednosti katalize u usporedbi s klasičnom sintezom su: smanjena potrošnja energije, katalitičke količine reagenasa, smanjena uporaba otapala i povećana selektivnost u cilju dobivanja željenog produkta. Primjena heterogenih katalizatora dobivenih imobilizacijom aktivnih mjesta na poroznim nosačima kao

što su  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Clark 1997; Clark 1996) značajno je povećala selektivnost industrijskih procesa oksidacije

- (ii) upotreba alternativnih i obnovljivih sirovina (biomasa)
- (iii) upotreba alternativnih reakcijskih medija:
  - a) **Voda** je prikladan medij jer je jeftina, netkosična i nezapaljiva alternativa organskim otapalima. Primjeri katalizatora stabilnih u vodi su: lantanov triflat  $\text{La}(\text{OTf})_3$  (Kobayashi i sur., 1998; Xie i sur., 1999), aluminijev klorid  $\text{AlCl}_3$  (Fringuelli i sur., 2001) i indij (Li, 1998).
  - b) **Ionske kapljevine** su odlična alternativa organskim otapalima jer su u čistom stanju pri sobnoj temperaturi neotrovne, nezapaljive, male viskoznosti te gotovo nehlapljive. Ionske kapljevine su soli u tekućoj fazi, odnosno organske soli sa temperaturom tališta nižom od 100 °C.
  - c) **Superkritične tekućine** (Slika 3.) imaju jedinstvena fizikalna svojstva koja ih razlikuju od plinova i tekućina. Superkritični fluid ima svojstvo plina da penetrira u svaku poru kao i svojstvo tekućine da dobro otapa materijale. Zagrijavanjem tekućine u zatvorenom spremniku tlak para raste, smanjuje se gustoća tekuće, a raste plinovite faze. Kada se gustoće izjednače nestaje granična površina između dvije faze i nastaje superkritični fluid. Temperatura pri kojoj više ne dolazi do stvaranja granične površine između dvije faze naziva se kritična temperatura, a tlak para koji odgovara toj temperaturi kritični tlak. Iako je u superkritično stanje moguće prevesti bilo koju tvar, najčešće se upotrebljavaju mediji koji u to stanje prelaze pri relativno blagim uvjetima (Jukić, 2005). Superkritični  $\text{CO}_2$  (31,1 °C, 74 bar) ima sličan otapajući potencijal kao organska otapala. Također, uz dodatak polarnih ko-otapala može se koristiti i u ekstrakciji polarnih spojeva. Brojni su primjeri laboratorijske primjene superkritičnog  $\text{CO}_2$  kao otapala, dok se kao najvažnija industrijska primjena ovog medija može izdvojiti dekofeinizacija kave. U blizu kritičnoj vodi „*near-critical water*“ (250 – 300 °C) uspješno je provedena hidroliza estera benzojeve kiseline (Lesutis, 1990). U posljednje vrijeme, kao alternativa klasičnim otapalima, sve više se istražuje i superkritična voda (374 °C, 220 bar).



**Slika 3.** Superkritične tekućine

- (iv) Alternativni reakcijski uvjeti poput ubrzanja kemijskih reakcija primjenom mikrovalnog zračenja. U elektromagnetskom spektru područje ovog zračenja, valnih duljina od 1 mm do 1 m, smješteno je između radiovalova i infracrvenog zračenja. Energija ovog zračenja ne mijenja strukturu molekula, ali njegova električna komponenta utječe na rotaciju polarnih molekula i odgovorna je za učinak zagrijavanja, a time i ubrzanje kemijskih reakcija. Ozračene molekule pokušavaju slijediti izmjenično električno polje mikrovalnog zračenja, no uslijed kašnjenja dolazi do rasapa elektromagnetske u toplinsku energiju. Kod različitih tipova kemijskih reakcija zagrijavanje mikrovalovima uzrokovalo je znatno skraćanje reakcijskih vremena i iznimnu energetske učinkovitost u odnosu na klasično zagrijavanje.
- (v) Fotokataliza ima primjenu u razgradnji onečišćivača zraka (dušikovi oksidi i hlapljive organske tvari), zemlje i vode. Vezanjem onečišćivača na fotokatalizator ( $\text{TiO}_2$ ), kojim je premazana površina koju se želi očistiti (staklo, keramika), pobuđenog utjecajem solarnog zračenja dolazi do potpune mineralizacije onečišćivača do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  bez nastanka štetnih nusprodukata. Na taj se način može ukloniti i do 90% dušikovih oksida iz zraka, a uspješnost razgradnje ovisi o količini vlage u okolini (Ao i sur., 2003). Fotokataliza našla je primjenu i u pročišćavanju vode za piće dobivene iz morske vode iz koje se uklanjaju potencijalni mutageni, huminske kiseline te pri obradi otpadnih voda u kojima se nalaze pesticidi.

## **2.2. Biokataliza**

Biokataliza je transformacija tvari kemijskog ili biološkog podrijetla primjenom enzima ili cijelih stanica dobivenih iz živih organizama. Enzimi se u reakcijama mogu nalaziti u slobodnom ili imobiliziranom obliku te unutar žive stanice. U biokatalitičkim reakcijama djeluju kao biokatalizatori koji su po definiciji tvari koje ubrzavaju kemijsku reakciju, ali sami se pritom ne mijenjaju i nemaju utjecaj na promjenu standardne Gibbsove energije kemijske reakcije. Primjena biokatalizatora u proizvodnji alkohola i sireva odavno je poznata, a otkrićem strukture i funkcije brojnih proteina, povećana je i njihova primjena u industriji, zbog mogućnosti brze prilagodbe poželjnih svojstava biokatalizatora za određene kemijske procese. Odabranim modifikacijama u proteinskoj strukturi moguće je predvidjeti promjenu u funkciji, imitirajući prirodni proces evolucije u laboratoriju te ponavljati cikluse dok se ne dobije protein sa željenim funkcijama (stabilnost, aktivnost, selektivnost i specifičnost za supstrat). Danas je približno 100 različitih biokatalitičkih procesa implementirano u farmaceutskoj, kemijskoj, prehrambenoj i agronomskoj industriji (Wandrey i sur., 2000).

### **2.2.1. Prednosti i nedostaci biokatalize nad kemijskom katalizom**

Biokatalizatori su po svojoj funkciji i definiciji jednaki običnim katalizatorima, no posjeduju jedinstvene karakteristike koje ih razlikuju od konvencionalnih homogenih i heterogenih katalizatora. Jedna od najznačajnijih prednosti biokatalizatora je visoka selektivnost koja u skladu se načelima Zelene kemije doprinosi minimaliziranju popratnih reakcija, nepotrebnom zaštićivanju funkcijskih skupina te olakšava separaciju, štedi vrijeme, energiju i sirovine. Biokatalizatori pokazuju sve vrste selektivnosti koje se očekuju od učinkovitog katalizatora: (i) kiralnu odnosno stereoselektivnost – ukoliko u kemijskoj reakciji iz početnog supstrata može nastati više stereoizomera u stereoselektivnoj će pretežno nastajati samo jedan, (ii) pozicijsku odnosno regioselektivnost - kojom se reducira broj sintetskih stupnjeva (Rasor i Voss, 2001) i količina nusprodukata (Faber i Patel, 2000) (iii) kemoselektivnost - u reakciju stupa samo jedna od više prisutnih funkcijskih skupina u supstratu čime se također smanjuje broj reakcijskih stupnjeva. Osim prethodno navedenog poželjna svojstva u industriji su i visoka učinkovitost te blagi uvjeti rada. Potencijalni nedostaci biokatalizatora poput smanjene stabilnosti u uvjetima koji nisu fiziološki odnosno optimalni, inhibicija supstratom i produktima te ponekad teška regeneracija, samo su prijelazna zapreka široj upotrebi biokatalize budući da se proteinskim i metaboličkim inženjerstvom karakteristike biokatalizatora mogu prilagoditi prema željenim procesnim

uvjetima. Također, za gotovo svaku organsku reakciju postoji kompatibilna biokatalitička reakcija te mnogi enzimi mogu djelotvorno konvertirati u produkte i neprirodne supstrate. Pregled prednosti i nedostataka biokatalize u odnosu na kemijsku katalizu dan je u Tablici 2. (Faber, 1997).

**Tablica 2.** Prednosti i nedostaci biokatalize nad kemijskom katalizom (Faber, 1997)

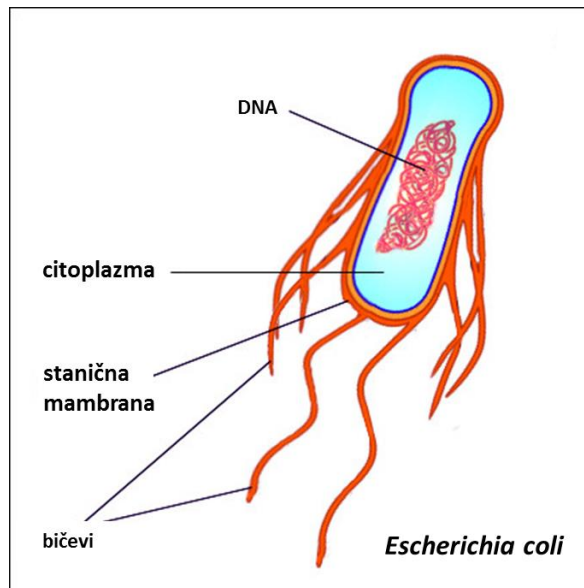
Prednosti	Nedostaci
Veća učinkovitost (potrebne manje koncentracije enzima)	Osjetljivi na inhibiciju supstratom ili produktom
Modifikacijom povećana selektivnost, stabilnost i aktivnost	Otapalo je najčešće voda (visoko vrelište i toplina isparavanja)
Veća selektivnost	Enzimi pronađeni u prirodi dolaze u samo jednom enantiomernom obliku
Blagi uvjeti rada (pH = 5-8, temperatura 20-40 °C)	Ograničeni uvjeti (pri visokim temperaturama i izvan optimalnog pH područja enzimi se denaturiraju)
Ekološki prihvatljivi	Enzimi mogu izazvati alergijske reakcije

### 2.2.2. Biotransformacije uz izolirane enzime ili cijele stanice

Kao biokatalizatori koriste se (i) izolirani enzimi i (ii) cijele stanice.

- (i) **Izolirani enzimi** i pročišćeni enzimi mogu se koristiti u slobodnom obliku ili imobilizirani na čvrsti nosač ili podlogu. Prednosti izoliranih enzima su korištenje jednostavnijih aparatura, veća produktivnost i jednostavnija izolacija produkta (Faber, 1997) te stoga i manji troškovi. Takvi enzimi mogu se proizvoditi i rekombinantnom DNA tehnologijom tako da se DNA sekvenca koja kodira za željeni enzim klonira u vektor i prenese u domaćina (*E. Coli* (Slika 4.) ili *S. Cerevisiae*). Nakon ekspresije gena dobiveni protein se, ovisno o svojim fizikalnim i kemijskim svojstvima, izolira i pročišćava upotrebom standardnih tehnika: elektroforeza, centrifugiranje i kromatografija (gel, ionska, afinitetna). Budući da je aktivnost izoliranih enzima često značajno smanjena u odnosu na stanične uvjete, nakon izolacije enzimi se imobiliziraju čime se postiže njihova stabilizacija.





**Slika 4.** Escherichia coli (Anonimus 1)

- (ii) Za produkciju željenog proizvoda koristi se cijeli mikroorganizam. **Cijele stanice** se koriste kada je neki enzim teško izolirati ili je nestabilan izvan svog prirodnog okoliša. Kataliza se odvija u stanici, a željeni proizvod se iz nje ekstrahira. Iako je prednost upotrebe cijelih stanica korištenje jeftinijih sirovina poput kukuruznog škroba te nije potrebno reciklirati kofaktore jer se kataliza odvija u više stupnjeva, sa sobom nosi niz nedostataka. U prvom redu to je skupa proizvodna oprema te dugotrajnost proizvodnog procesa čija produktivnost naposljetku može biti niska. Također, tijekom rasta stanice nastaju i drugi metabolički produkti od kojih je ponekad teško odvojiti željeni proizvod.

### 2.2.3. Medij za provođenje biokatalize

Prirodni okoliš enzima je vodeni medij. Međutim, kao supstrati u biotransformacijama često se koriste organske molekule netopljive u vodi. Također, zbog viskog vrelišta i entalpije isparavanja voda je prilikom kemijske sinteze, izolacije i pročišćavanja nepoželjan medij. U brojnim je studijama dokazano da enzimi mogu katalizirati reakcije i u organskim otapalima, ali sa smanjenim prinosom produkta u odnosu na vodeni medij. No, razvojem proteinskog inženjerstva i direktnom evolucijom razvijeni su enzimi sa očuvanom aktivnošću u organskom mediju te su optimizirane jednostavne i jeftine tehnike dobivanja aktivnih biokatalitičkih pripravaka za upotrebu u organskim otapalima

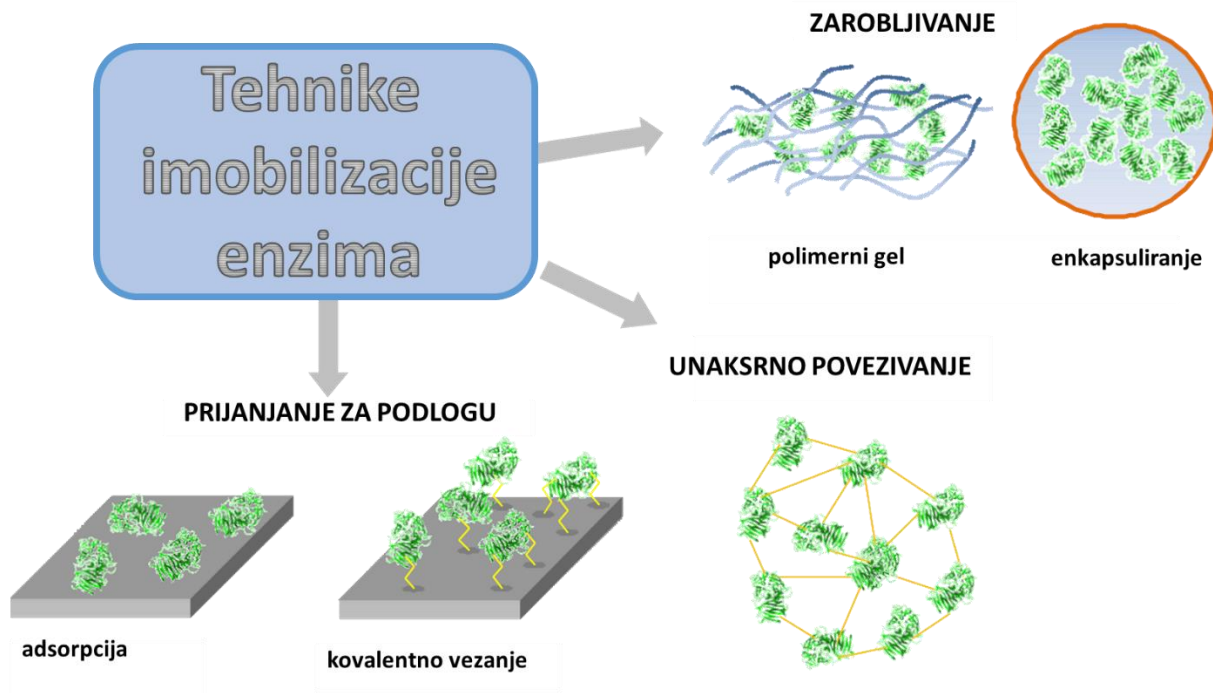
(Schoemaker, 2003). Jedna od tih metoda je liofilizacija vodene otopine biokatalizatora u prisustvu organskih i anorganskih pomoćnih sredstava poput nepuferiranih soli i ciklodekstrina (Lee, 2002). Izolacija i pročišćavanje produkta biokatalize iz reakcijske smjese u kojoj je otapalo organski medij jednostavniji su nego iz vode. Većina organskih otapala su hlapljive tekućine niskog vrelišta što olakšava i skraćuje izolaciju željenog produkta biokatalize, a njegova eventualna kontaminacija mikroorganizmina iz vode je onemogućena.

#### 2.2.4. Imobilizacija biokatalizatora

Kao što je u prethodnom tekstu navedeno, imobilizacijom biokatalizatora (na čvrstoj podlozi poput celuloze, stakla, keramike, metalnih oksida ili zadržavanjem u nekom volumenu pomoću membrane) povećava se njegova stabilnost i olakšava separacija od produkta. Također, imobilizirane katalizatore moguće je višekratno koristiti te se upotrebljavaju u većini industrijskih biokatalitičkih procesa. Metode imobilizacije enzima mogu se podijeliti u pet glavnih skupina čiji je pregled dan u Tablici 3. (Klibanov, 1983).

**Tablica 3.** Metode imobilizacije enzima (Slika 5.) (Klibanov, 1983)

Metoda	Opis
Kovalentno vezanje	Kovalentna veza između aktivnih skupina enzima i funkcionalnih grupa na površini nosača
Adsorpcija	Kao čvrste podloge koriste se ionski izmjenjivači (kationski CM-celuloza i anionski DEAE-celuloza)
Uklapanje u polimerni gel	Enzimi su uklapaju u gel temperaturnim ili kemijski induciranim geliranjem
Intermolekularno povezivanje	Enzimi se povezuju s bifunkcionalnim reagensima poput glutaraldehida i alifatskih diamina
Kapsuliranje	Enzimi su obavijeni polupropusnom membranom od šupljih vlakana, mikrokapsula ili filma, koja dopušta malim molekulama supstrata i produkta da prođu kroz membranu



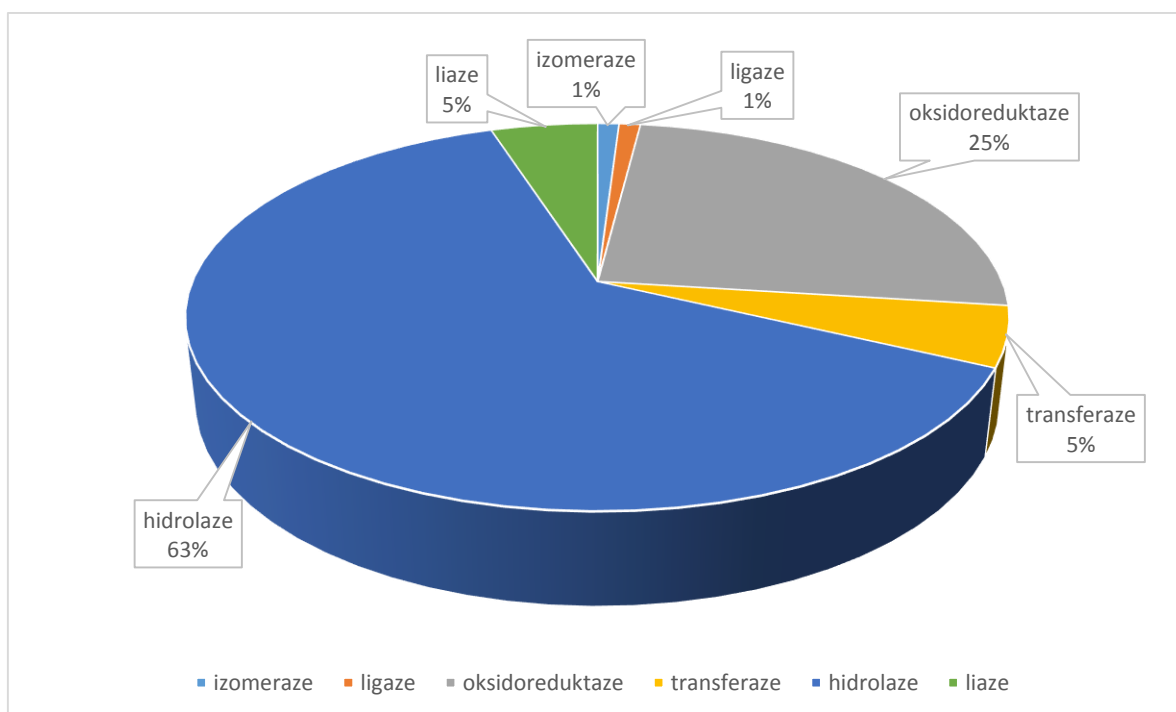
**Slika 5.** Tehnike imobilizacije enzima (Anonimus 2)

### 2.2.5. Izvori biokatalizatora

Zbog ograničenih tehnika kultivacije mikroorganizama, komercijalni enzimi su izolirani samo iz nekih vrsta *Bacillus* i *Pseudomonas* (Dalboge i Lange, 1998). Iako je iznimno velik broj neistraženih mikrobnih vrsta, neke tvrtke rade na razvoju novih tehnika poput višestrukog metagenomičkog kloniranja kako bi se izolirali novi industrijski enzimi. Rekombinantnom DNA tehnologijom se ispituje bioraznolikost i omogućuje ekspresija gena organizama koji ne mogu biti kultivirani i osnova je za metaboličko inženjerstvo koje se koristi za proizvodnju različitih proizvoda poput polimera, ugljikohidrata, organskih otapala, proteina, antibiotika, aminokiselina i organskih kiselina.

### 2.2.6. Klasifikacija biokatalizatora

Prema Internacionalnoj udruzi za biotehnologiju i molekularnu biologiju (IUBMB), enzimi su klasificirani u šest razreda prema tipu reakcije koju provode. Pregled je dan u Tablici 4. Od svih vrsta biokatalizatora u industriji se najčešće upotrebljavaju hidrolaze (~ 63%) koje kataliziraju reakcije dobivanja intermedijera različitih farmaceutskih proizvoda i pesticida. Učestalost korištenja različitih enzimskih vrsta u industriji prikazan je na dijagramu na Slici 6.



**Slika 6.** Primjena enzimskih vrsta u industriji

**Tablica 4.** Vrste biokatalizatora (Faber, 1997)

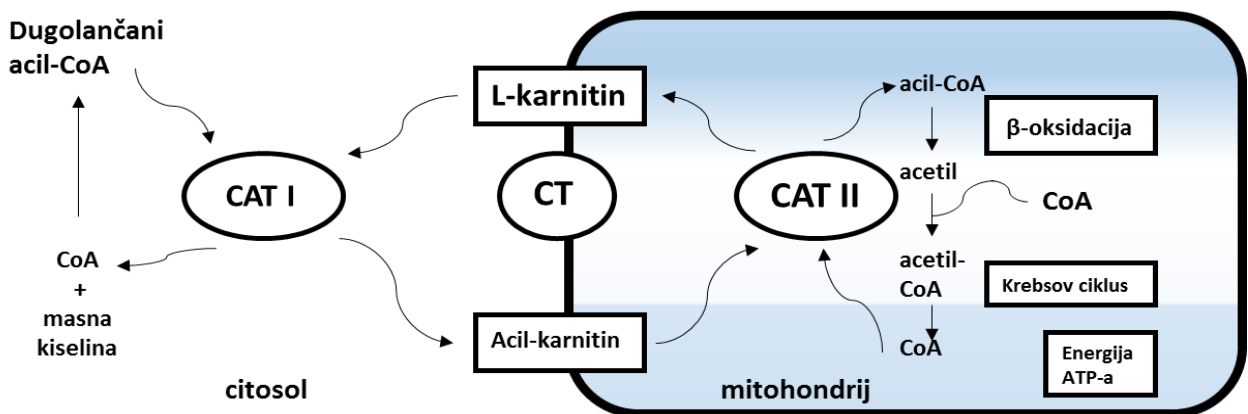
Enzimi	Vrsta reakcije	Predstavници
Oksidoreduktaze	Kataliziraju prijenos vodikovog ili kisikovog atoma ili elektrona s jednog supstrata na drugi	oksidaze, oksigenaze, peroksidaze, dehidrogenaze
Transferaze	Kataliziraju prijenos funkcionalnih grupa (metil, acil, glikozil, alkil, fosfat)	glikoziltransferaze, transketolaze, metiltransferaze, transaminaze
Hidrolaze	Kataliziraju hidrolitičke reakcije (nukleofilna supstitucija vodom)	esteraze, lipaze, proteaze, fosfataze, amidaze
Liaze	Kataliziraju nehidrolitičko odstranjivanje skupina (adicija i eliminacija)	dekarboksilaze, aldolaze, ketolaze, hidrataze, dehidrataze
Izomeraze	Kataliziraju reakcije izomerizacije (racemizacija i epimerizacija)	racemaze, epimeraze, izomeraze
Ligaze	Kataliziraju sintezu različitih vrsta veza uz pomoć ATP-a	sintetaze, karboksilaze

### 2.3. Primjeri primjene biokatalize u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija

Biokataliza je zbog mogućnosti proizvodnje u minimalnom broju koraka, male potrošnje energije i toksičnih reagensa našla primjenu u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija. Osim navedenog, jedna od najvažnijih karakteristika enzima koja se primjenjuje u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija je mogućnost izomerizacije supstrata. Čak i najmanje promjene u strukturi supstrata doprinose značajnoj razlici u njegovoj funkciji. Rezultat katalitičke aktivnosti enzima je razdvajanje racemične smjese uslijed aciliranja ili hidrosiliranja samo jednog enantiomera. Neki od proizvoda koji se na taj način dobivaju prikazani su u sljedećim poglavljima.

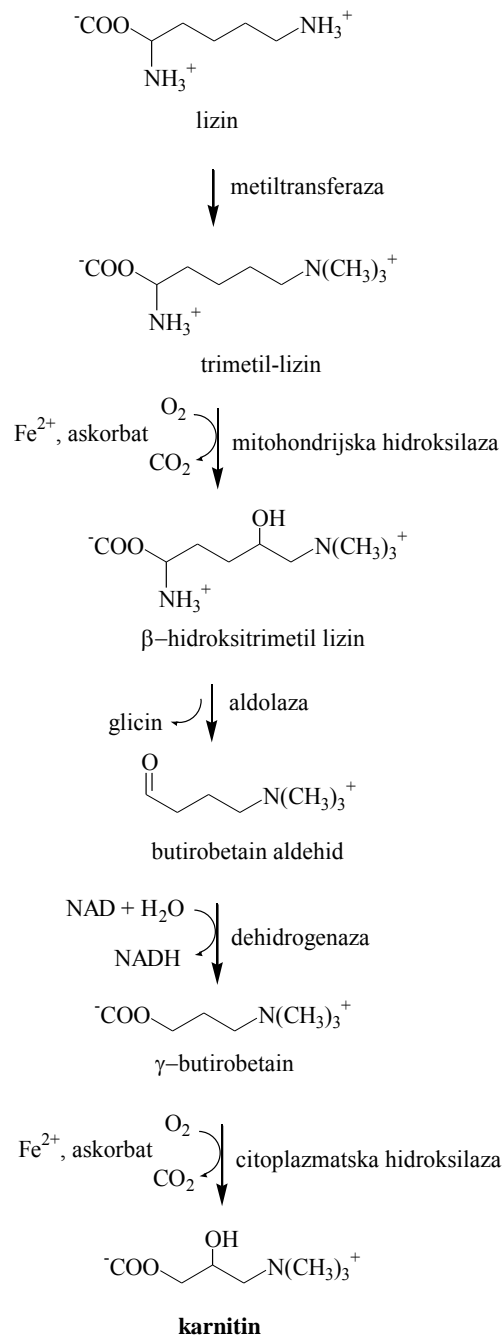
### 2.3.2. L-karnitin

L-karnitin (vitamin B<sub>7</sub>) je kvarterni amonijev spoj biosintetiziran iz aminokiselina lizina i metionina (Bieber, 1988), kemijskog naziva (*R*)-3-hidroksi-4-*N*-trimetilaminobutirat. Prirodno je prisutan u stanicama višestaničnih životinja kao faktor rasta. Metabolički put biosinteze L-karnitina prikazan je u shemi na Slici 8 (Naidu i sur., 2000). Biosinteza započinje metilacijom lizina, nastali trimetil-lizin nizom enzimskih reakcija, kataliziranih hidrolazama i hidrogenazama, biva konvertiran u L-karnitin. Iznimno je važan u prehrani sisavaca jer je odgovoran za prijenos dugolančanih masnih kiselina iz citosola u mitohondrij gdje se one razgrađuju u reakcijama oksidacije lipida (Slika 7.). Upravo zbog toga L-karnitin je koristan za poboljšanje metabolizma masti, redukciju masnog tkiva i povećanje mišićne mase (de Regil i Sandoval, 2013).



**Slika 7.** Shematski prikaz uloge karnitina u metabolizmu dugolančanih masnih kiselina

Dugolančane masne kiseline su u citosolu aktivirane u acil-CoA koji zbog hidrofilne prirode ne može prijeći iz citosola u mitohondrij. Acil-CoA stoga reagira s karnitinom u reakciju kataliziranoj karnitin-palmitoil transferazom I, a nastali acil-karnitin kroz membranu prelazi u matriks mitohondrija. U mitohondriju karnitin-palmitoil transferaza II oslobađa molekulu karnitina od acilne skupine i karnitin se prenosi izvan mitohondrija kako bi mogao ponovno sudjelovati u istom ciklusu.



**Slika 8.** Metabolički put biosinteze karnitina u sisavaca

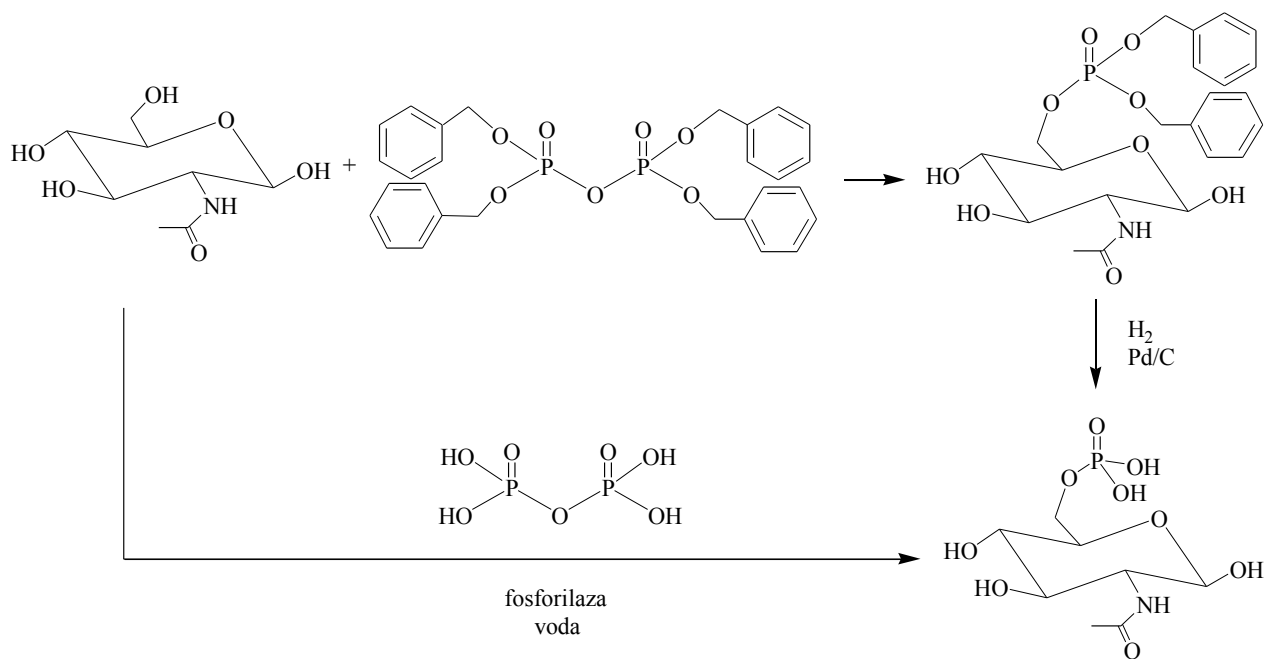
Biološka proizvodnja L-karnitina može se provesti sintezom iz racemičnih smjesa i akiralnih prekursora. Najpoznatiji proizvođač L-karnitina biokatalitičkim postupkom je tvrtka Lonza (Basel, Švicarska) iz koje dolazi 75% svjetske proizvodnje L-karnitina (Naidu i sur., 2000). Postupak biotransformacije provodi se pomoću stanica HK1349. Proizvodne stanice dobivene su izolacijom soja, taksonomski na razini između *Agrobacterium* i *Rhizobium*, HK4 iz tla. Kako bi se spriječila razgradnja L-karnitina, iz HK4 je mutagenезom izvučen mutantski soj HK13 kojemu nedostaje L-karnitin dehidrogenaza. Iz takvog soja je izoliran rezistentni mutant koji

podnosi visoke koncentracije L-karnitina (70 g/L) (Naidu i sur., 2000) i nazvan je HK1349 (Mayer, 1997). Proizvodnja L-karnitina odvija se kontinuirano s reciklacijom biomase što osigurava visoku metaboličku aktivnost. Sam proces započinje dehidrogenacijom  $\gamma$ -butirobetaina u 4-(trimetilamino)-butensku kiselinu, nakon čega slijedi selektivna adicija vode pomoću L-karnitin liaze (de Regil i Sandoval, 2013). Početna koncentracija  $\gamma$ -butirobetaina je 60 g/L uz dodatak glicerola kao izvora ugljika i betaina kao izvora dušika za mikroorganizme. Produktivnost kontinuirane proizvodnje s reciklacijom stanica iznosila je 5,4 g/L h (Naidu i sur., 2000). Međutim, smjesa L-karnitina i zaostalog  $\gamma$ -butirobetaina u reaktoru povećava troškove separacije, stoga se proizvođač priklonio uzgoju s prihranjivanjem supstratom koji omogućuje gotovo potpunu pretvorbu  $\gamma$ -butirobetaina u L-karnitin. Ovakav način proizvodnje dokazano rezultira s 50% manje organskog otpada, 25% manje otpadne vode i 90% manje otpada kojeg je potrebno spaliti te 40% manje troškova separacije (Naidu i sur., 2000). L-karnitin je iznimno važan u farmaceutskoj industriji jer se koristi u medicinske svrhe. Njegov nedostatak u organizmu uzrokuje mišićnu miopatiju, kronično zatajenje bubrega. U medicini se koristi kao zamjenska terapija kod hemodijalize, srčanih bolesti i sindroma nedostatka L-karnitina. Štoviše, L-karnitin štiti i od toksičnih supstanci te sudjeluje u produkciji monoklonskih antitijela.

### **2.3.3. *N*-acetil-D-glukozamin-6-fosfat**

Jedna od najznačajnijih tvrtki za razvoj i osmišljavanje novih proizvoda za kemijsku, kozmetičku i farmaceutsku industriju biokatalitičkim procesima je LibraGen. Njihov pristup zasnovan je na traženju visokoproduktivnih sojeva, kao izvora enzima, u bakterijskoj populaciji i pretvorba istih u proizvodne alate. Taj su princip primijenili u proizvodnji biosintetskog prekursora hijaluronske kiseline, *N*-acetil-D-glukozamin-6-fosfata (NAG-6P). Hijaluronska kiselina odgovorna je za mladenački izgled kože jer povećava njezinu vlažnost i ojačava zaštitnu barijeru. Kemijskim putem, proces njezine pripreme je dugotrajan, skup i ekološki neprihvatljiv iako su prinosi i sama čistoća proizvoda povoljni. U prvom stupnju kemijske proizvodnje, djelovanjem tetrabenzil-pirofosfata, *N*-acetil-D-glukozamin prevodi se u dibenzilirani intermedijer (Nelson i sur., 2003). Potom se hidrogeniranjem međuprodukta, uz paladij na ugljiku kao heterogeni katalizator dobiva konačni produkt. LibraGen je razvila biokatalitički postupak proizvodnje u jednom stupnju. Enzim fosfotransferaza uz ATP kao izvor fosfata katalizira reakciju dobivanja fosforilirane aldoheksoze. Proces je prikazan u shemi na Slici 9.





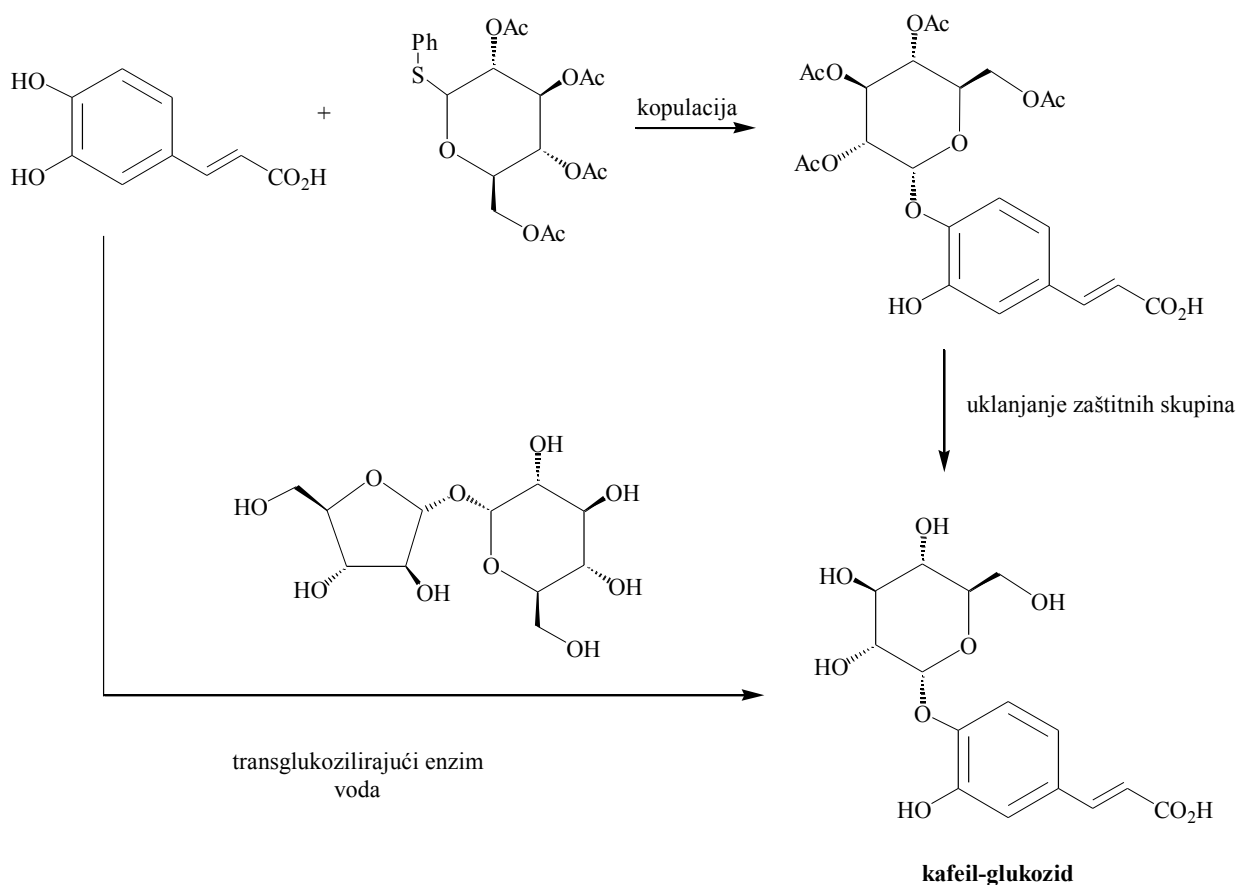
**Slika 9.** Usporedba kemijskog i enzimskog postupka pripreve N-acetil-glukozamin-6-fosfata

Pronalaskom jeftinijih izvora fosfata (pirofosfata) i enzima fosfotransferaze, koji ne umanjuju učinkovitost, tvrtka je povećala ekonomsku iskoristivost i ekološku održivost ove biotransformacije. Također, valja naglasiti kako se biosintetski put odvija u jednom stupnju te je izbjegnut stupanj katalitičkog hidrogeniranja, a time i upotreba organskih otapala i uklanjanje zaostalih količina paladija uz krajnjeg produkta. U enzimski kataliziranom procesu koristi se standardna oprema dok kemijska sinteza koristi skupe aparature za rad pri visokom tlaku.

#### 2.3.4. $\alpha$ -D-glukozid kafeinske kiseline

Još jedan primjer ekonomski isplative i ekološki prihvatljive biokatalitičke proizvodnje u farmaceutskoj industriji je proizvodnja  $\alpha$ -D-glukozida kafeinske kiseline, spoja koji sprječava starenje kože uzrokovano Sunčevim zračenjem. Kemijska proizvodnja odvija se u tri stupnja; u prvom se acetiliranjem zaštićuju hidroksilne skupine glukoze, slijedi kopulacija s kafeinskom kiselinom, a zatim uklanjanje zaštite i pročišćavanje dobivenog produkta. Sama

kovalentna zaštita u prvim stupnjevima povećava masu spoja, a time i produljuje sintezu. Primjenom visokoselektivne biokatalize može se reducirati broj stupnjeva sintetskog procesa što dovodi do njegovog značajnog skraćanja i smanjenja količine otpadnih nusprodukata. Biokataliza se odvija u jednom stupnju uz enzim glikoziltransferazu koji prenosi molekulu šećera iz UDP-glukoze na molekulu akceptora. Nedostatak ovog pristupa je visoka cijena nukleotidnog šećera kojeg je potrebno *in situ* regenerirati. Stoga je već spomenuta tvrtka LibraGen razvila novi, stereo- i regioselektivni pristup, uz transglukozilirajuće enzime koji koriste saharozu kao jeftini izvor glukoze. Enzim prepoznaje kafeinsku kiselinu kao neuobičajeni supstrat i provodi njezinu glukozilaciju pri čemu u jednom stupnju nastaje željeni diastereoizomer koji se lako pročišćava. Sintaza je grafički prikazana u shemi na Slici 10.



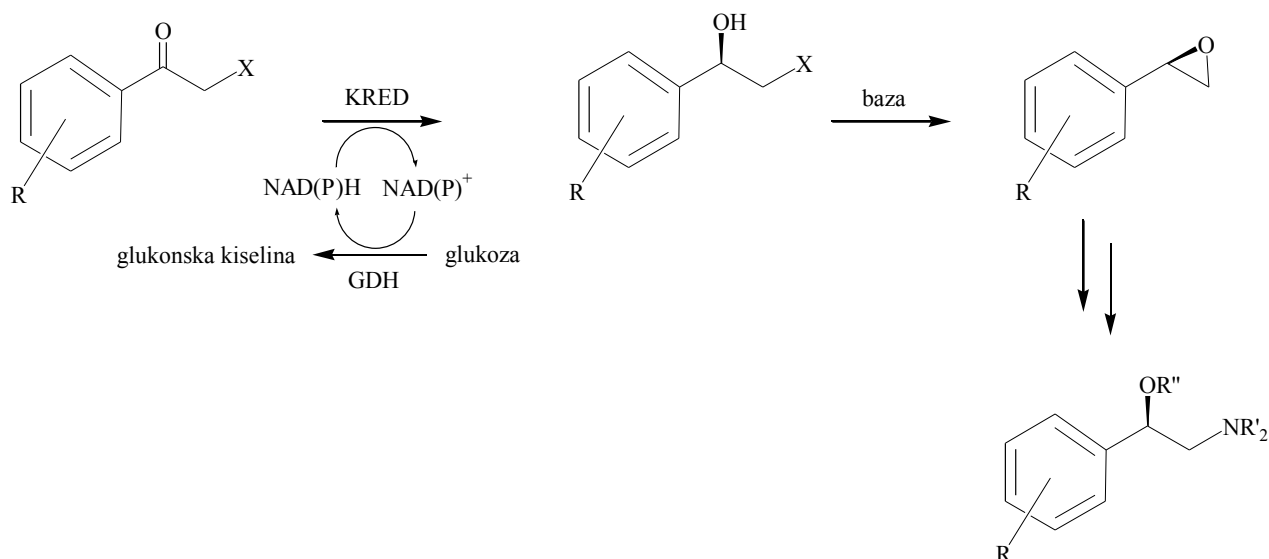
**Slika 10.** Usporedba kovencionalnog kemijskog i enzimskog postupka pripreme glukozida kafeinske kiseline

Visokoselektivni biokatalitički pristup donosi niz prednosti nad kemijskom sintezom poput korištenja jeftine saharoze kao izvora glukoze, izvrsne stereo- i regioselektivnosti čime su

eliminirani stupnjevi koji uključuju zaštitu i deprotekciju hidroksilnih skupina, te korištenje vode kao otapala bez upotrebe štetnih kemikalija. Osim ekonomske i ekološke prihvatljivosti, jednostavno izvođenje samog procesa promiče biokatalitičku sintezu kao primarnu opciju proizvodnje željenog proizvoda.

### 2.3.5. Kiralni 1,2-aminoalkoholi

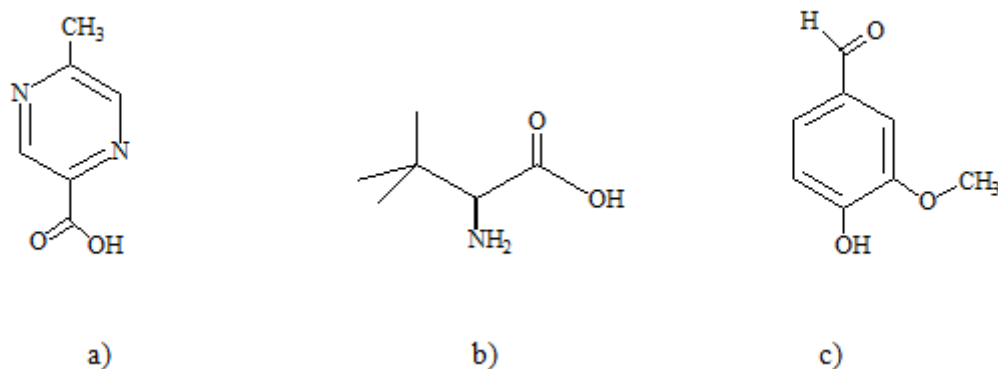
Najpoznatija tvrtka koja biokatalitički proizvodi kiralne sekundarne alkohole pomoću komercijalno dostupnih enzima je Chirotech. Takvim načinom proizvodnje dobiveni su visoki prinosi spojeva velike optičke čistoće. Dan je primjer proizvodnje izomernih sekundarnih alkohola kataliziran ketoreduktazom. Kiralni 1,2-aminoalkoholi koriste se u lijekovima za liječenje astme i respiratornih poremećaja, a dobivaju se povezivanjem optički čistih stiren oksida s amino komponentom (Whittall i Sutton, 2012). Intermedijerna okosnica stiren oksida, iz koje se dobivaju aminoalkoholi, pripravljena je biokatalitičkom asimetričnom redukcijom halogeniranog prekursora nakon čega slijedi zatvaranje epoksidnog prstena kao što je prikazano na Slici 11.



**Slika 11.** Priprava intermedijera aminoalkohola katalizirana keto-reduktazom

### 2.3.6. Ostali primjeri proizvodnje

U farmaceutskoj i industriji finih kemikalija mnogobrojni su primjeri korištenja biokatalize koji su prihvaćeni kao primarni način proizvodnje. Neki od važnijih su biokatalitička proizvodnja vanilina (Slika 12.c), L-*tert*-leucina (Slika 12.b) i 5-metilpirazin-2-karboksilne kiseline (Slika 12.a). Prvi stupanj u biokatalitičkoj proizvodnji vanilina je transformacija glukoze u vanilinsku kiselinu pomoću cijelih stanica rekombinantne *E. coli*. Potom se, pomoću dehidrogenaze izolirane iz *Neurospora crassa*, vanilinska kiselina reducira u aldehid. Biokatalitička proizvodnja ne koristi kancerogeni i neobnovljiv gvajakol koji je prekursor u kemijskoj sintezi vanilina. L-*tert*-leucin je kiralni građevni blok i važan međuprodukt u pripravi mnogih liganda u farmaceutskoj industriji (Bommarius, 2005). U pripravi ovog spoja koriste se cijele stanice rekombinantne *E. coli* u kojoj su eksprimirana dva enzima potrebna za biokatalitički proces, a to su leucin hidrogenaza i formijat dehidrogenaza. Ovi enzimi kataliziraju reduktivno aminiranje i regeneraciju NADH pri čemu se dobiva prinos od 84% u 24 h i čistoća produkta veća od 99% (de Regil i Sandoval, 2013). 5-metilpirazin-2-karboksilna kiselina koristi se u lijekovima za snižavanje krvnog tlaka komercijalnog naziva Glycotrol. Dobiva se iz *p*-ksilenskog analoga 2,5-dimetilpirazina biokatalizom pomoću cijelih stanica *P. putida* ATCC33015 ekspresijom enzima monooksigenaze i dvije dehidrogenaze (Mayer, 1997).



**Slika 12.** Ostali proizvodi dobiveni biokatalitičkom proizvodnjom a) 5-metilpirazin-2-karboksilna kiselina b) L-*tert*-leucin c) vanilin

**ZAKLJUČAK**

### 3. ZAKLJUČAK

Osim izvanredne katalitičke moći i specifičnosti enzima, biokataliza predstavlja ekonomski i ekološki prihvatljiv način korištenja prirodnih resursa. Razvoj bioinformatike, genetičkog inženjerstva, kemije i molekularne biologije doveo je do novih spoznaja i dostignuća u području biokatalize te povećanja učinkovitosti različitih biokatalitičkih procesa u *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Za potrebe industrijskih procesa razvijeni su brojni biokatalizatori koji ispunjavaju sve uvjete koji dobar katalizator mora zadovoljiti: stabilnost, lako izdvajanje iz proizvodnog procesa, mogućnost višekratnog korištenja i mogućnost korištenja u kontinuiranim procesima. Zbog novih spoznaja u području proteinskog i metaboličkog inženjerstva u budućnosti se očekuje mogućnost dizajniranja biokatalizatora koji će ispunjavati sve zahtjeve učinkovitih proizvodnih procesa. U radu je biokataliza istaknuta kao dominantni trend zelene kemije, opisane su vrste biokatalizatora i načini njihove upotrebe. Na odabranim primjerima biokatalitičke proizvodnje spojeva korištenih u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija, objašnjene su prednosti i nedostaci biokatalize pred tradicionalnim kemijskim načinima proizvodnje.

#### 4. POPIS LITERATURE

- Anastas P. T., Bartlett L. B., Kirchoff M. M., Williamson T. C. (2000) *Catalysis Today* **55**: 11
- Anastas P. T., Warner J. C. (1998) *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York. str. 30-58
- Anonimus 1, <http://www.nature-education.org/water-ecoli.html>, pristupljeno 12. srpnja 2017.
- Anonimus 2, <http://www.franciscoploulab.eu/p/research-lines.html>, pristupljeno 12. srpnja 2017.
- Ao C. H., Lee S. C., Mak L. C., Chan L. Y. (2003) *Appl. Catal. B: Environ* **42**: 119
- Bieber L. L. (1988) Carnitine. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 261-283
- Bommarius A. S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. (1995) Synthesis and use of enantiomerically pure *tert*-leucine. *Tetrahedron Asymmetry* **6**: 2851-2888
- Chotani G., Dodge T., Hsu A., Kumar M., LaDuca R., Trimbur D., Weyler W., Sanford K. (2000) The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochem. Biophys. Acta* **1543**: 434-455
- Clark J. H., Macquarrie D. J. (1996) *Chem. Soc. Rev.* **25**: 303
- Clark J. H., Macquarrie D. J. (1997) *Org. Proc. Res. Dev.* **1**: 149
- Dalboge H., Lange L. (1998) Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts. *Trends Biotechnol.* **16**: 265-272
- de Regil R., Sandoval G. (2013) Biocatalysis for Biobased Chemicals. *Biomolecules* **3**: 812-847
- Faber K. (1997) Biotransformations. In *Organic Chemistry: A Textbook*, 3. izd., Springer-Verlag, Berlin Njemačka
- Faber K., Patel R. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 517
- Fringuelli F., Pizzo F., Vaccaro L. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**: 1131
- Johannes T., Simurdiak M. R., Zhao H. (2006) Biocatalysis, *Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Illinois, Urbana, Illinois, USA*. str. 101-110

- Jukić M., Đaković S., Filipović – Kovačević Ž., Kovač V., Vorkapić – Furač J. (2005) Dominantni trendovi „zelene“ kemije, *Kem. Ind.* **54**: 255-272
- Jukić M., Đaković S., Filipović – Kovačević Ž., Vorkapić – Furač J. (2004) „Zelena“ kemija – ekološki prihvatljivi procesi, *Kem. Ind.* **53**: 217-224
- Klibanov A. M. (1983) Immobilized enzymes and cells as practical catalysis. *Science* **219**: 722-727
- Kobayashi S., Nagayama S., Busujima T. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 8287
- Lee M. Y., Dordick J. S. (2002) Enzyme activation for nonaqueous media. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 376-384
- Lesutis H. P., Gläser R., Liotta C. L., Eckert C. A. (1990) *Chem. Commun.* 206
- Li C.-J., u: P. T. Anastas, T. C. Williamson (ur.) (1998) Green Chemistry: Frontiers in Benign Chemical Syntheses and Processes, Vol. 14, *Oxford University Press, New York*. str. 234-251
- Mayer H. P., Kiener A., Imwinkelried R., Shaw N. (1997) Biotransformations for fine chemicals production. *Chimia* **51**: 287-289
- Miyatake K., Yamamoto K., Endo K., Tsuchida E. (1998) *J. Org. Chem.* **63**: 7522
- Nelson T., Rosen J., Bhupathy M., McNamara J., Sowa M., Rush C., Crocker L. (2003) *Org. Synth.* **80**: 219
- Paquette L. A., u: P. T. Anastas, T. C. Williamson (ur.) (1998) Green Chemistry: Frontiers in Benign Chemical Syntheses and Processes, Vol. 15, *Oxford University Press, New York*. str. 250-269
- Rasor J. P., Voss E. (2001) *Applied Catalysis A: General* **221**: 145
- Schoemaker H.E., Mink D., Wubbolts M. G. (2003) Dispelling the myths – biocatalysis in industrial synthesis. *Science* **299**: 1694-1697
- Wandrey C., Liese A., Kihumbu D. (2000) Industrial Biocatalysis: past, present and future, *Organic Process Res. Dev.* **4**: 286-290
- Whittall J., Sutton P. W. (2012) Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2, 1.izd., *John Wiley and sons, Ltd.*
- Xie W., Jin Y., Wang P. G. (1999) *Chemtech.* **29**: 23



## Izjava o izvornosti

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

*Anamarija Ravić*

ime i prezime studenta