

# Industrijska primjena enzima u proizvodnji finih kemikalija iz šećernih komponenti obnovljivih izvora energije

---

Šarić, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:939163>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Barbara Šarić**

0058215537

**Industrijska primjena enzima u proizvodnji finih  
kemikalija iz šećernih komponenti obnovljivih izvora  
energije**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Zagreb, 2023.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Industrijska primjena enzima u proizvodnji finih kemikalija iz šećernih komponenti obnovljivih izvora energije

Barbara Šarić, 0058215537

### Sažetak:

Enzimi oksidoreduktaze i izomeraze se koriste za industrijsku proizvodnju finih kemikalija kao što su rijetki šećeri, aminošećeri, askorbinska kiselina i druge šećerne kiseline te alkoholi. Uz enzime kao biokatalizatori se koriste i cijele stanice. Unaprjeđivanjem biotehnoloških procesa prema kružnoj ekonomiji šećerne komponente iz obnovljivih izvora energije, iz agrikulture, i nusproizvodi agroindustrije će i dalje biti glavni supstrati za proizvodnju finih kemikalija. Navedeni šećerni alkoholi, aminošećeri i šećerne kiseline koriste se u farmaceutskoj industriji, industriji polimera i u prehrambenoj industriji. Enzimskim i metaboličkim inženjerstvom konstruiraju se biokatalizatori za industrijsku primjenu koji su termostabilniji i imaju bolju toleranciju na okolišne uvjete. Iako je proizvodnja unaprijeđena, i dalje ekološki aspekti zbrinjavanja otpada predstavljaju vodeći problem industrije.

**Ključne riječi:** enzimi, oksidoreduktaze, šećerne kiseline, alkoholi, aminošećeri

**Rad sadrži:** 27 stranica, 6 slika, 2 tablice, 33 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

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Datum obrane:** 1. rujan 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical engineering  
Laboratory for the technology of antibiotics, enzymes, probiotics and starter cultures

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### Industrial application of enzymes in the production of fine chemicals from sugar components of a renewable energy source

Barbara Šarić, 0058215537

#### Abstract:

Oxidoreductase and isomerase enzymes are used for the industrial production of fine chemicals such as rare sugars, amino sugars, ascorbic acid and other sugar acids, and alcohols. In addition to enzymes, whole cells are also used as biocatalysts. By improving biotechnological processes towards a circular economy, sugar components from renewable energy sources, from agriculture, and by-products of agro-industry will continue to be the main substrates for the production of fine chemicals. The mentioned sugar alcohols, amino sugars and sugar acids are used in the pharmaceutical industry, the polymer industry and in the food industry. Using enzyme and metabolic engineering, biocatalysts for industrial use are constructed that are more thermostable and have better tolerance to environmental conditions. Although production has been improved, the environmental aspects of waste disposal are still the leading problem of the industry.

**Keywords:** enzymes, oxidoreductase, sugar acids, alcohols, amino sugars

**Thesis contains:** 27 pages, 6 figures, 2 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Blaženka Kos, PhD, Full professor

**Thesis defended:** September 1, 2023.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2. Šećeri.....	2
2.1 Rijetki šećeri.....	2
2.1.1 Sinteza rijetkih šećera enzimskim reakcijama .....	3
2.1.1.2 Cijele stanice katalizatori.....	7
2.1.2 Šećerni alkoholi.....	9
2.1.2.1 Ksilitol.....	9
2.1.2.2 Manitol.....	11
2.1.2.3 Sorbitol.....	12
2.1.2.4 Eritritol.....	13
2.1.3 Šećerne kiseline.....	14
2.1.3.1 D-glukonska kiselina.....	15
2.1.3.2 D-ksilonska kiselina.....	17
2.1.3.3 L-arabinska kiselina.....	18
2.1.3.4 D-saharinska kiselina.....	18
2.1.3.5 Druge šećerne kiseline.....	18
2.1.4 Aminošećeri.....	20
2.1.4.1 Enzimska sinteza aminošećera.....	20
2.1.4.2 Metaboličko inženjerstvo u proizvodnji aminošećera.....	21
2.1.5 Šećerni esteri .....	21
2.1.5.1 Esterifikacija.....	21
2.1.5.2 Glikozidacija.....	22
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	23
<b>4. POPIS LITERATURE</b> .....	24

## 1. UVOD

Tehnologija se mora učiniti praktičnom za industrijsku primjenu tako da se više ne fokusira samo na profit, već i na ekološke aspekte proizvodnje, te zato istraživači moraju dalje razvijati slijedeće aspekte: konstruiranje efikasnijih biokatalitičkih i metabolitičkih puteva u radnim mikroorganizmima da bi se proizveli korisni proizvodi od biootpada. Kako su glavne slabe točke bioproizvodnje visoka cijena (priprema biokatalizatora i cijena proizvodnje u većem mjerilu) i relativno mali prinosi produkta, važno je da se razvije tehnologija koja će nadvladati ove probleme. Razvijaju se i koriste različite i ekonomičnije bioreakcije kako bi se moglo lakše proizvoditi u većem mjerilu. Što je proizvod vrijedniji veće su šanse da se enzimskim i metaboličkim inženjerstvom razvije proces prihvatljiv za proizvodnju u velikom mjerilu. Jedan od glavnih ciljeva je da se konstruiraju biokatalizatori koji su termostabilni i imaju bolju toleranciju na vanjske uvjete. Ovaj problem se može riješiti enzimskim inženjerstvom odnosno usmjerenom evolucijom i racionalnim dizajnom. Jedan primjer takvog dizajna je p20 koji koristi D-glukozu kao nativni supstrat te racionalnim dizajnom može biti modificiran tako da koristi L-arabinozu što rezultira novom enzimskom varijantom koja se može koristiti zajedno sa ksilozom reduktazom i formijat dehidrogenazom i katalizirati reakciju konverzije L-arabinoze (0.1\$/g) u L-ribulozu (995\$/g) sa 100 %-tnim prinosom. Enzimskim inženjerstvom modificiran enzim može biti tolerantniji prema visokim temperaturama i organskim otapalima te to može smanjiti cijenu biokatalizatora jer biokatalizator tako postiže duži životni vijek, a primjenom imobilizacije se još produžava životni vijek i postiže bolja ekonomičnost industrijskog procesa. U sljedećem desetljeću, uzimajući u obzir sve lošiju klimatsku situaciju, bit će puno novih pravila. U 2020. EU je postavila nova pravila koja će vrijediti do 2030. koja se direktno odnose na 5 sektora; 1.energiju i industriju 2.transport i agrokulturu 3.zemlju i šume 4. energiju i 5.obnovljivu energiju. EU također planira sistematski prijelaz na ekonomiju sa malo CO<sub>2</sub>. Stoga je cilj ovog rada obraditi novorazvijene biotehnološke procese proizvodnje rijetkih šećera, alkohola, šećernih kiselina i aminošećera primjenom enzima ili stanica mikroorganizama za provođenje biotransformacije supstrata, prvenstveno iz obnovljivih izvora sirovina, te poštujući načela kružnog (cirkularnog) gospodarstva.

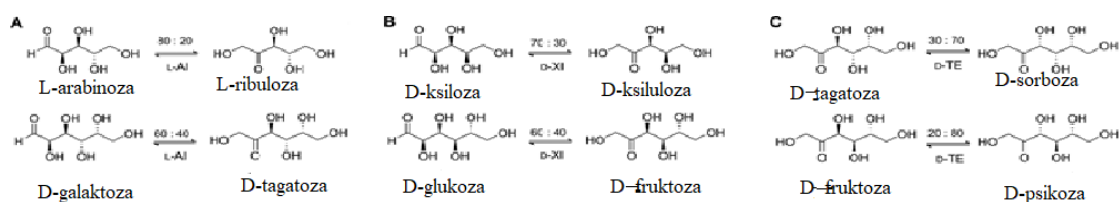
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2. Šećeri

Šećeri sudjeluju kao supstrati u kemijskim transformacijama, a fermentativni mikrobn organizmi poput kvasca ih koriste za proizvodnju etanola. No ekonomski zanimljivija konverzija bi bila transformacija monomernih šećera poput glukoze, ksiloze, galaktoze, arabinoze i manoze u rijetke šećere ili šećerne derivate koji su komponente lijekova. Lignocelulozni hidrolizat se sastoji od glukoze i ksiloze kao glavnih monosaharidnih sastojaka, u kojem glukoza čini 30-50 %, a ksiloza oko 20 %. Galaktoza, arabinosa i manosa čine mali udio suhe lignocelulozne biomase. Zbog visoke topljivosti šećera u vodenim medijima, klasična kemijska sinteza šećera nije česta metoda jer se takve komponente ne mogu dobro otopiti u organskim otapalima. Šećerni derivati imaju različitu biološku aktivnost zato što sadrže raznovrsne stereospecifične strukture koje mogu doći u interakciju sa različitim ciljanim receptorima ili enzimima i pokrenuti kaskadu bioloških reakcija. Šećerne biotransformacije putem enzimskih reakcija su vrlo važne zbog toga što enzimi selektivno kataliziraju željene reakcije u vodenom i hidrofobnom okolišu gdje se šećeri mogu otopiti.[1]

#### 2.1 Rijetki šećeri

Izomeri, epimeri i derivati poznatih prirodnih monosaharida se koriste kao rijetki šećeri. Rijetki šećeri imaju raznovrsnu upotrebu, od aditiva hrani do aktivnih farmaceutskih sastojaka. Iako se rijetki šećeri mogu naći kao monosaharidi u prirodi, oni su tamo prisutni u malim količinama. Njihove funkcije su uglavnom vezane uz pentoza fosfatni put i metabolizam ugljikohidrata. Putevi biosinteze rijetkih šećera se mogu naći u svim živim organizmima i enzimi koji sintetiziraju rijetke šećere, a istraživani su i proučavani više od pola stoljeća. Na primjer, izomerizaciju D-galaktoze u D-tagatozu u bakterijama provodi enzim L-arabinoza izomeraza, dok je izomerizacija D-ksiloze u D-ksilulozu katalizirana D-ksiloza izomerazom. Konverzija D-tagatoze u D-sorbozu je katalizirana D-ketoheksoza 3-epimerazom dok je epimerizacija D-ribuloze 5-fosfata u D-ksilulozu 5-fosfat katalizirana D-ribuloza 5-fosfat 3-epimerazom u kvascima i nekim stanicama sisavaca, interkonverzija između D-riboze 5 fosfata i D-ribuloze 5-fosfata. (Slika 1.). [2]



**Slika 1.** Različite reakcije katalizirane izomerazama (A) L-arabinoza izomeraza (B) D-ksiloza izomeraza (C) tagatoza 3-epimeraza. Omjer produkata i reaktanata za jednakost svake reakcije je prikazan na danim jednadžbama. [3]

### 2.1.1 Sinteza rijetkih šećera enzimskim reakcijama

#### Primjena izomeraze

U mikrobnim biosintetskim putevima su otkriveni raznovrsni enzimi koji proizvode rijetke šećere. Velika količina tih enzima može koristiti više različitih šećera kao supstrat. Na primjer, L-arabinoza izomeraza može katalizirati reakciju izomerizacije D-galaktoze u D-tagatozu kao i konverziju L-arabinoze u L-ribulozu. D-ksiloza izomeraza katalizira izomerizaciju između D-ksiluloze i D-fruktoze. D-tagatoza 3-epimeraza katalizira epimerizaciju D-tagatoze u D-sorbitoza i D-fruktozu u D-psikoza. Međutim, korištenje samo izomeraza za proizvodnju rijetkih šećera često dovodi do problema niskog prinosa proizvodnje zato što su reakcije reverzibilne i to onemogućava apsolutnu pretvorbu. Kako su u navedenim reakcijama prisutne velike količine supstrata upravo zato tada nije moguća apsolutna konverzija odnosno pretvorba supstrata u produkt. Istraživano je nekoliko reakcijskih prototipa za razvijanje kaskadne reakcije konverzije sa nekoliko koraka za učinkovitu konverziju monosaharidnih derivata iz lignocelulozne stočne hrane u rijetke šećere. Jednu od obećavajućih pristupa za strategiju izomera je razvio prof. Ken Izumori i njegova grupa 2002. godine [4] Ova strategija sastoji se od 4 tipa enzima uključujući ketoza 3-epimerazu (Kease), aldoza izomerazu (Alase), poliol dehidrogenazu (PoDH) i aldoza reduktazu (Arase), koje se koriste za pretvorbu aldoza u ketoze (Slika 2.). Ketoza 3-epimeraza katalizira ketoza C-3 epimerizaciju između epimernih ketoza gdje aldoza izomeraza katalizira aldoza-ketoza izomerizaciju. Oksidacija/redukcija aldoza/ketoze da prinos bude odgovarajuć heksitolima je kataliziran sa PoDH, gdje Arase katalizira zamjenu između lijevih i desnih šećera. Kombinacija ovih enzima omogućava katalizu međupretvorbe između aldoketoze i njihovih odgovarajućih šećernih oblika. Koristeći



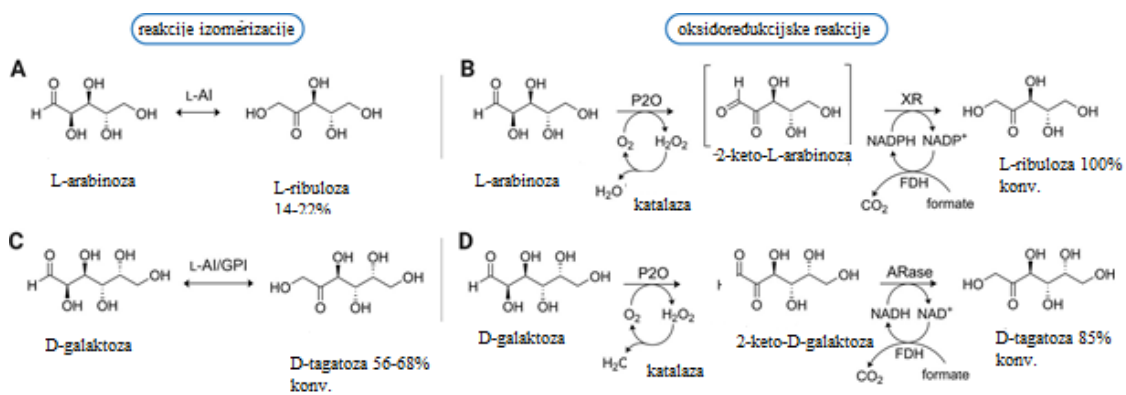
ovu metodu sve pentoze i heksoze mogu biti prevedene u lijeve i desne šećere. Na primjer prof. Izumori je osmislio pristup proizvodnji L-glukoze koristeći 6 koraka biotransformacije sa puno D-glukoze kao početnog supstrata. Prvi korak je izomerizacija D-glukoze u D-fruktozu sa D-ksiluloza izomerazom sa slijedećim korakom epimerizacije da se dobije D-psikoza sa D-tagatoza 3-epimerazom. Treći korak je redukcija D-psikoze da se dobije smjesa L-alitola sa PoDH. U slijedećem koraku se koristi PoDH za oksidaciju samo L-alitola da se dobije L-psikoza koja se može dalje epimerizirati da se dobije L-fruktoza sa D-tagatoza 3-epimerazom. Posljednji korak u izomerizaciji L-fruktoze do L-glukoze je koristeći L-ramnoza izomerazu. Ključni korak biotransformacije je epimerizacija s D-tagatoza 3-epimerazom za pretvorbu dvije ketoheksoze specifičnom redukcijom s PoDH tako da konačni produkt bude odgovarajući heksitol. Nekoliko rijetkih monosaharida i poliola su također proizvedeni na temelju ove strategije. L-riboza, potencijalni početni materijal u kojem je L-ribuloza prvo proizvedena iz L-arabinoze sa L-arabinoza izomerazom i nakon toga pretvorena u L-ribozu sa manoz-6-fosfatom. Ovakav proces može dati prinos konverzije od 23.6 % i produktivnost od 39 g/Lh. U slijedećem primjeru tri enzima uključujući D-ksiluloza izomerazu, D-tagatoza 3-epimerazu i L-arabinoza izomerazu se mogu koristiti za dobivanje rijetkog šećera D-arabinoze iz jeftine D-ksiluloze. Kaskadna reakcija započinje izomerizacijom D-ksiluloze da se dobije D-ksiluloza sa D-ksiluloza izomerazom. Epimerizacija između D-ksiluloze u D-ribulozu se može katalizirati sa D-tagatoza 3-epimerazom i dobivena D-ribuloza se može pretvoriti u D-arabinozu sa D-arabinoza izomerazom istovremeno u istoj reakcijskoj smjesi. Maksimalna konverzija D-ksiluloze u D-arabinozu se može postići unutar 12 sati s 40 %-tnim prinosom. Kako je postojanost D-arabinoze u prirodi vrlo rijetka, a njena proizvodnja kemijskim putem zahtjeva mnogo koraka, razvoj proizvodnje D-arabinoze iz D-ksiluloze je vrlo važan za buduće enzimske tehnologije u proizvodnji vrijednih komponenti. Alternativno, novije izomeraze su istražene i koriste se za reakcije izomerizacije. L-ramnoza izomeraza katalizira reakciju L-ramnoze u L-ramnulozu što je bila nepoznata biokonverzija između rijetkih šećera. Enzim pokazuje mogućnost da koristi razne šećere kao supstrate poput biotransformacije L-manoze u D-ribozu. Nedavno celobioza 2-epimeraza je pokazala mogućnost sinteze D-taloze iz D-galaktoze u jednom koraku. Međutim, specifična aktivnost ove reakcije je jako mala tako da je neophodna daljnja optimizacija enzimskim inženjerstvom da bi se poboljšala industrijska proizvodnja. Napredak u enzimskom inženjerstvu se koristi kako bi se pronašli novi metabolički putevi za sintezu rijetkih šećera. [5] Yeom i sur. [6] su metodama genetičkog inženjerstva kreirali varijante izomeraza uključujući ribozu-5-fosfat izomerazu (RPI) i glukoza-6-fosfat izomerazu (GPI) koristeći točno određenu

mutagenazu za podešavanje njihove aktivnosti prema monosaharidima koji se rijetko nađu u prirodi. Tri varijante mutirane izomeraze RPI-R133D, MPI-R192N i GPI-T85Q su pokazale aktivnost prema D-riboza izomerazi i L-riboza izomerazi i L-taloza izomerazi. Ove mutirane izomeraze ne mogu više koristiti njihove prirodne supstrate, fosforilirane šećere što je ukazalo na to da se aktivnost šećerne izomeraze može promijeniti prema novim supstratima. Enzimsko inženjerstvo se koristi da se poboljša termostabilnost, poboljša pH tolerancija prema kiselim uvjetima ili da se poveća reaktivnost prema novim supstratima. Rezultati još nisu zadovoljavajući, tako da se provode daljnja istraživanja izomeraza usmjerena na stabilne enzime iz termofilnih mikroorganizama. Izomerizacijske reakcije zahtjevaju da enzimi budu termostabilni za povećanje brzine enzimske reakcije povećanjem reakcijske temperature. Primjeri toga su enzimska konverzija D-galaktoze u D-tagatozu sa imobiliziranim termostabilnom L-arabinoza izomerazom u reaktoru. Imobilizirana L-arabinoza izomeraza pokazuje veći raspon radnog pH i može se koristiti na većim temperaturama, a upravo taj imobilizirani enzim je pokazao veću stabilnost u uvjetima niskog pH i visoke temperature.[7]

#### Korištenje šećernih reduktaza i oksidaza

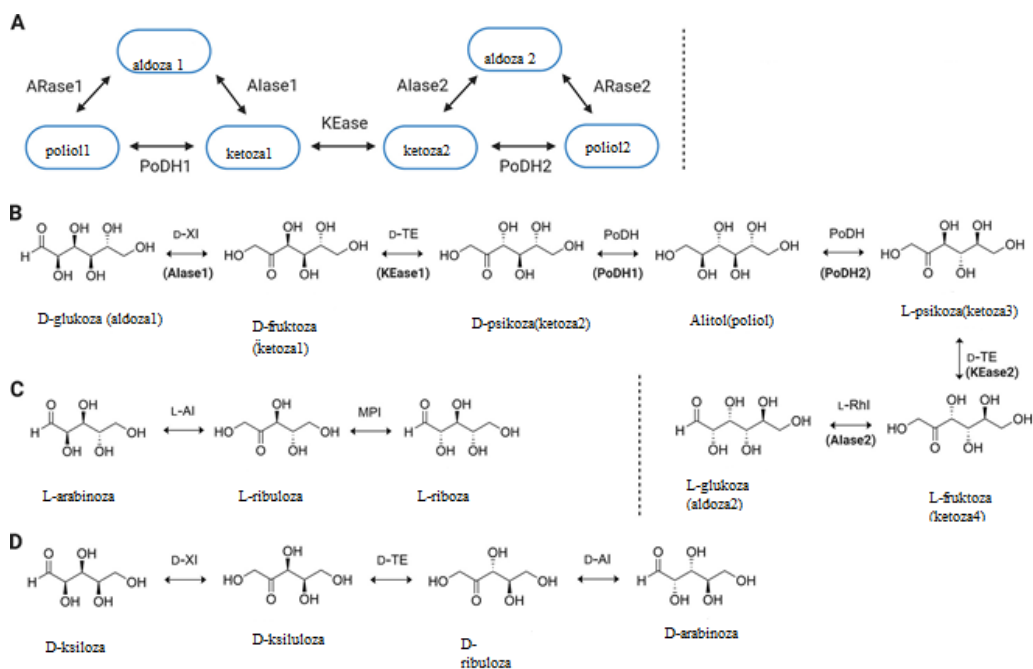
Izomerizacija šećera se može postići korištenjem još jednog pristupa mjesno specifične oksidacije i redukcije umjesto izomerizacije u svrhu povećanja efikasnosti izomeraze. Na primjer, iako proizvodnja vrijedne L-ribuloze može biti izvedena pomoću jednog koraka izomerizacije sa L-arabinoza izomerazom samo se mali prinos može dobiti ovakvom metodom. *In vitro* proizvodnja L-ribuloze iz L-arabinoze sa L-arabinoza izomerazom daje prinos proizvoda od oko 14-19 % i taj prinos može biti povećan do 22 % sa imobilizacijskim metodama na visokim temperaturama. Da bi se riješili ovog problema nova metoda konverzije se razvila tako da se odvija pomoću oksidacije/redukcije. Reakcija piranoza 2-oksidaze se koristi da se oksidacijom/redukcijom u jednom koraku dobije L-ribuloza iz L-arabinoze tako da se prvo odvija oksidacija L-arabinoze na C-2 poziciji pa onda redukcijom na C-1 poziciji s ksiloza reduktazom. Da bi se ostvarila veća efikasnost supstrata enzim mora biti modificiran. Sa ovim novim pristupima enzimska kaskada može katalizirati 100 % konverziju L-arabinoze u L-ribulozu sa prinosom od 0.3 g/L u manje od 7 sati. Sinteza D-tagatoze iz jeftine D-galaktoze je još jedan primjer korištenja oksidacijsko/redukcijских reakcija umjesto izomerizacije. Prvi korak je oksidacija šećera sa efikasnosti od 60 % no konačni prinos nakon redukcije iznosi 30 %. Mali prinos je rezultat nespecifične redukcije. Daljnjim razvojem se može zamijeniti kemijska reakcija redukcije. Posljednji korak oksidacije je potpun te je završni prinos nakon enzimske reakcije iznosio 85 % sa produktivnošću od 0.99 g/Lh. Međutim detektirana je velika količina

nusprodukata zbog sve u svemu spore reakcije. Kasnije se enzim piranoza dehidrogenaza koristio za korak oksidacije galaktoze. Iako šećerne izomeraze imaju veliki raspon supstrata koji mogu koristiti njihova korist je ograničena zbog termodinamičke ravnoteže. Nepotpuna konverzija šećera može uzrokovati poskupljenje i komplikacije procesa pročišćavanja zbog toga što šećerni supstrati i produkti imaju slična fizikalna svojstva što ih čini teškima za razdvajanje. Sukladno s time korištenje oksidoreduktaza zahtjeva skuplje kosupstrate.(Slika 3.).[8]



(A) proizvodnja L-ribuloze iz L-arabinoze koristeći izomerazu i (B) koristeći oksidoreduktazu. (C) proizvodnja D-tagatoze u D-galaktozu koristeći izomerazu i (D) oksidoreduktazu

**Slika 2.** Usporedba izomeraze i oksidoreduktaze za proizvodnju rijetkih šećera.[9]

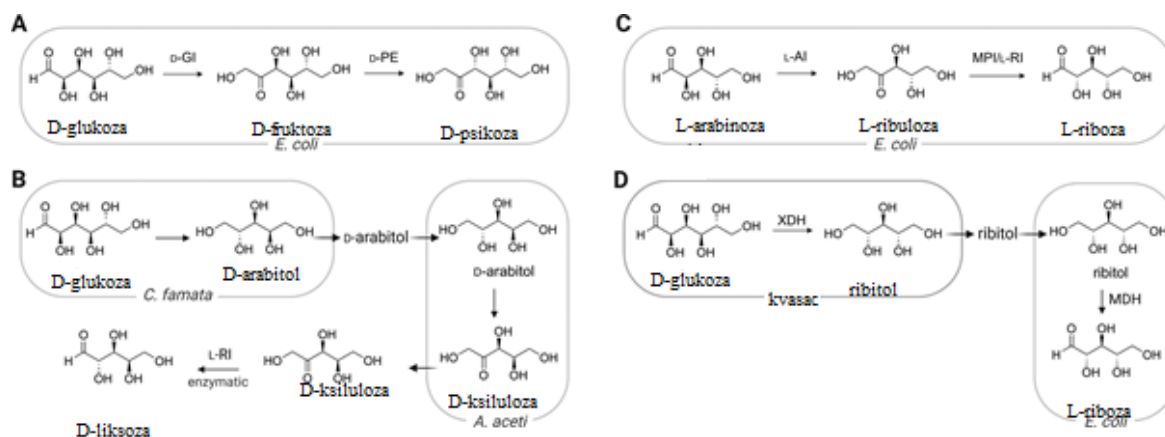


**Slika 3.** Multienzimska kaskada reakcija izomeraza i oksidoreduktaza za proizvodnju rijetkih šećera. [10]

### 2.1.1.2 Cijele stanice kao katalizatori

Unatoč tome što se enzimi koriste za sintezu rijetkih šećera u jednoj reakciji cijena proizvodnje enzima i pročišćavanja je i dalje visoka te to ne čini ovaj proces proizvodnje ekonomičnim. Da bi se omogućila proizvodnja u industrijskom mjerilu korištenje cijelih stanica kao biokatalizatora se sve više istražuje da bi se iskoristile imobilizirane stanice za sintezu rijetkih šećera. Sa razvojem u metaboličkom inženjerstvu i sintetskoj biologiji bakterije poput *E.coli* ili eukariota poput kvasca *Saccharomyces cerevisiae* se više koristi nego *E.coli* zato što prisutnost endotoksina u *E.coli* umanjuje njeno korištenje u prehrambenoj industriji. Na temelju izomerazne metode, nekoliko biotransformacija rijetkih šećera se istražuju za korištenje stanica kao biokatalizatora. D-aluloza, ne kaloričan zaslađivač koji se koristi u pacijenata sa dijabetesom se može proizvesti od D-glukoze sa inženjerski modificiranim stanicama *E.coli*. D-glukoza se može kovertirati u D-fruktozu sa D-glukoza izomerazom prije nego što je D-fruktoza epimirizirana u D-psikoza s reakcijom D-psikoza 3-epimerazom (Slika 4.). Konačni produkt je dobiven s prinosom od 17.8 % i proizvodnjom od 89.1 g/L. D-glukoza se može koristiti za mikrobiološku proizvodnju D-liksoze koja je prekursor u sintezi anititumorskih i imunostimulacijskih stanica kroz tri koraka sa dvije fermentacijske šarže i enzimskom pretvorbom. U još jednom pristupu proizvodnje provedena je direktna konverzija ribitola do L-

riboze koristeći *E. coli* koja pojačano eksprimira manitol dehidrogenazu. Kako je ribitol skup i nema praktičnu primjenu kao početni materijal za industriju, koriste se stanice kvasca koje povećano ekspimiraju ksitol dehidrogenazu koja konvertira D-glukoze u ribitol. Imobilizacija enzima kao cijelih stanica koje se koriste kao biokatalizatori je također pokazala termodinamička ograničenja dok je istovremeno povećana enzimsku stabilnost. Na primjer, ekspresija L-arabinoza izomeraze u sporulirajućim stanicama može rezultirati zarobljivanjem enzima u periplazmatskom prostoru vanjskog sloja u membrani spore. Zarobljeni enzim je imao povećanu otpornost na okolišni stres tolerirajući veliki raspon pH u uvjetima od 3 do 10 i funkcionirao je dobro na temperaturama do 95 °C. Nedavno je taj enzim povećano ekspimiran u citoplazmi Gram-pozitivnih bakterija da bi mogao biti korišten kao biokatalizator za kataliziranje izomerizacije D-galaktoze u D-tagatozu. Cijele stanice koje su inkapsulirane sa L-arabinoza izomeraznom aktivnošću su pokazale bolju enzimsku aktivnost i stabilnost, do konverzijskog prinosa od 85 % unutar 48 sati u šaržnom procesu na 50 °C. Iako ovi uvjeti daju gotovo kompletnu konverziju, ostatak supstrata i dalje predstavlja izazov u pročišćavanju finalnog proizvoda. Tagatoza i galaktoza imaju slična fizikalna svojstva, kao što je njihova struktura i topljivost u vodenom mediju, proces pročišćavanja zahtjeva ekstrakciju i izolaciju za obnavljanje aktivnosti tagatoze i njeno izdvajanje iz proizvodne smjese. Iako je proizvodnja rijetkih šećera koristeći mikrobne sojeve ekonomski vrlo privlačan proces sinteze za korištenje u različitim sektorima industrije, iskorištenje ovih stanica može biti komplicirano zato što većina monosaharidnih lignoceluloznih supstrata se također može koristiti za rast stanica i za metaboličke funkcije sa nativnim metaboličkim putevima u izvornim stanicama. D-glukoza se može iskoristiti glikolizom za stanični metabolizam. Kada se ksiloza ili arabinoza koriste kao supstrat njihov prinos u stanicama je često inhibiran prisustvom glukoze u rastućem mediju zbog niskog afiniteta stanica za ove supstrate. Uz to što izravno konzumiraju supstrate svojim metaboličkim putevima, intermedijeri u proizvodnji rijetkih šećera kao što su L-ribuloza ili D-ksiluloza se također mogu koristiti i u drugim metaboličkim putevima. Još uvijek danas postoji prepreka kako bi se uspjele osposobiti cijele stanice kao biokatalizatori da budu kompatibilne sa proizvodnjom rijetkih šećera za komercijalnu primjenu. [11]



Kratice D-GI: D-glukoza izomeraza ; D-PE: D-psikoza 3-epimeraza; L-RI: L-riboza izomeraza; L-AI: L-arabinoza izomeraza; MPI:manoza 6-fosfat izomeraza XDH:ksilitol dehidrogenaza ; MDH: manitol dehidrogenaza

**Slika 4.** Proizvodnja rijetkih šećera koristeći mikroorganizme. (A) Proizvodnja D-psikoze iz D-glukoze. (B) Tri stupanjski proces proizvodnje D-liksoze iz D-glukoze kroz dvije fermentacijske šarže i enzimskom konverzijom (C) Proizvodnja L-riboze iz L-arabinoze. (D) Proizvodnja L-riboze iz D-glukoze dvostupanjskom fermentacijom.[12]

## 2.1.2 Šećerni alkoholi

Šećerni alkoholi poput ksilitola, manitola, sorbitola i eritritola se većinom dobivaju od monosaharida koji se koriste kao niskokalorični zaslađivači u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Slika 5.). Šećerni alkoholi se mogu koristiti kao početni prekursori za transformaciju ukemikalije. Specifično ksilitol i sorbitol imaju potencijal za korištenje kao osnova za proizvodnju raznih finih kemikalija kao što je vitamin C.[13]

### 2.1.2.1 Ksilitol

Ksilitol se široko koristi kao alternativni zaslađivač zato što ima sličnu slatkoću kao saharoza, samo s manje kalorija. Također može se koristiti kao farmaceutski proizvod koji daje slatkoću bez da uzrokuje karijes zato što ima aktivnost koja djeluje protiv formiranja dentalnog plaka. Metaboličko inženjerstvo i mikrobna fermentacija se dugo istražuju da se dobije ekonomična platforma za proizvodnju ksilitola. Prirodnim putem može se proizvesti fermentacijom ksiloze – iskorištenjem kvasca kao što su *Pichia stipitis* i *Candida* sp. Redukcija ksiloze u ksilitol se može katalizirati ksiloza reduktazom u prvom koraku metabolizma ksiloze. *Candida* sp. se najviše istražuje kao najveći proizvođač ksilitola. Problem s proizvodnjom ksilitola iz kvasaca

je to što se pentozna fosfatna put smatra slabom točkom u fermentacijskom putu ksilitola kod kvasaca. Stoga je konstruiran ksilitol dehidrogenaza mutant *Candida tropicalis* da se ksilitol pojačano akumulira. Ovako modificiran soj može proizvesti ksilitol s prinosom od 0,97 g/g glukoze sa produktivnošću od 3.23 g/Lh. Međutim rast stanica *Candida sp.* je znatno reprimiran u podlozi gdje je glukoza izvor ugljika. Korištenje *Candida sp.* u prehrambenoj industriji je problematično zbog njenih patogenih svojstava. Za proizvodnju hrane i lijekova koristi se *S.cerevisiae*. Rekombinirani *S.cerevisiae* može proizvoditi ksilitol. Također se razvijaju alternativni bakterijski sojevi domaćini poput bakterija mliječne kiseline (BMK) koje imaju GRAS( generally recognized as safe ) status. Međutim, one nisu u mogućnosti koristiti ksilozu i zato zahtijevaju inkorporaciju ksiloza sustava. Na primjer, *Lactococcus lactis* se koristi u proizvodnji hrane i mliječnih proizvoda te je on modificiran za povećanu ekspresiju ksiloza transportera i ksiloza reduktaze iz kvasca. Ovaj modificiran soj je proizveo ksilitol iz ksiloze uz produktivnost od 2.72 g/Lh unutar 20 minuta. Također se istražuje *E. coli* kao potencijalni domaćin za proizvodnju ksilitola. U *E.coli* ksiloza se prvo izomerizira u ksilulozu sa ksiloza reduktazom i onda reducira do ksilouloza-5-fosfata sa ksiluloza kinazom. *E.coli* se primarno genetički modificira za povećanu ekspresiju ksiloza reduktaze za proizvodnju ksilitola i blokiranje metabolizma ksiloze s prekidom ekspresije ksiloza reduktaze i ksiloza kinaze. Put za fosforilaciju ksilitola je blokiran prekidanjem fosfofenolpiruvat-ovisnog fruktoza fosfotransferaznog sustava što omogućava daljnje povećavanje potrošnje ksiloze i to 0.6 g/Lh. Time se postiže cjelokupna produktivnost od 1.40 g/Lh nakon 107 h šaržne fermentacije. Da bi se ponovno iskoristile mikrobalne stanice šaržnim procesom ili produljenom fermentacijom tijekom kontinuirane proizvodnje, istražuje se imobilizacija stanica. *S.cerevisiae* koji ekspresira ksiloza reduktazu te se koristi u bioreaktoru za proizvodnju ksilitola iz ksiloze. Najveća produktivnost od 5.88 g/Lh je upravo tako i postignuta. Prilikom testa stabilnosti imobilizirane stanice su zadržale oko 50 % izvorne aktivnosti nakon 15 dana kontinuirane fermentacije. U zadnje vrijeme se istražuje još jedan pristup imobilizacije stanica *E. coli* te se u tom procesu stabilnost imobiliziranih stanica određivala na temelju 10 šarži (Tablica 1). Nakon recikliranja 3 šarže, stanice su održale 100 % početne aktivnosti i 76.4 % njihove aktivnosti je održano nakon 10 šarži i recikliranja. Imobilizirane stanice su naknadno istraživane za konverziju ksiloze iz reakcijske smjese (XML) do ksilitola, pošto bi ovo bio pristup za korištenje tvorničkog otpada za proizvodnju vrijednih proizvoda. Rezultati su pokazali da XML pri koncentraciji od 50 g/L može konvertirati ksilitol sa 100 %-tnim prinosom i produktivnošću od 9.1 g/Lh.[14]

**Tablica 1.** Proizvodnja ksilitola genetičkim inženjerstvom modificiranim mikroorganizmima

Supstrati	Mikroorganizam	Genetička manipulacija <sup>α</sup>	Vrsta stanice	Prinos (g <sub>produkt</sub> /g <sub>supstrat</sub> )	Produktivnost (g <sub>produkt</sub> /Lh)
Glukoza, ksiloza	<i>C. tropicalis</i>	ΔXYL2	Slobodne stanice	0.97	3.23
Ksiloza	<i>S. cerevisiae</i>	XYL1 <sup>+</sup> ,ACS1 <sup>+</sup> ,ZWF1 <sup>+</sup>	Slobodne stanice	1.00	4.27
Glukoza, ksiloza	<i>S. cerevisiae</i>	XYL1 <sup>+</sup>	Imobilizirane	0.32	5.80
ksiloza	<i>L. lactis</i>	XYL1 <sup>+</sup> ,xylT <sup>+</sup>	Slobodne stanice	1.00	2.72
Glukoza, ksiloza	<i>E. coli</i>	XR <sup>+</sup> ,ΔxylA,ΔxylB	Slobodne stanice	1,0	1.40
ksiloza	<i>E. coli</i>	XR <sup>+</sup> ,GDH <sup>+</sup>	Slobodne stanice	1.00	6.37
ksiloza	<i>E. coli</i>	XR <sup>+</sup> ,GDH <sup>+</sup>	Imobilizirane	1.00	9.10

α označava heterolognu ekspresiju gena(+), Δ označava deleciju gena. Promijenjeni geni; XYL2:ksilitol dehidrogenaza; XYL1/XR:ksiloza reduktaza; ACS1: acetil-CoAsintetaza; ZWF1: glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; xylT:transporter ksiloze; xylA: ksiloza izomeraza; xylB: ksiluloza kinaza; GDH: glukoza dehidrogenaza.[15]

### 2.1.2.2 Manitol

Manitol je važan sastojak prehrambene i farmaceutske industrije. U prehrambenoj industriji on se koristi kao niskokaloričan zaslađivač i može produljiti vijek trajanja prehrambenih proizvoda. Manitol se također može koristiti kao punilo u farmaceutskim proizvodima da se doda volumen i stabilizira proizvod. U prirodnim metaboličkim putevima manitol se može proizvesti iz glukoze od gljiva ili iz fruktoze sa kvascima, tako da su biokatalizatori cijele stanice, vrlo učinkovite u proizvodnji manitola. U mikrobom metabolizmu glukoze, fruktoza-6-fosfat se reducira u manitol-1-fosfat sa manitol-1-fosfat dehidrogenazom i sukladno s tim defosforilira da se dobije manitol sa manitol-1-fosfatazom. Pristup metaboličkog inženjerstva za proizvodnju manitola se najviše fokusira na poboljšanje prinosa produkata u mikroba koji mogu prirodno proizvesti manitol iz glukoze i da inkorporiraju heterologne gene u domaćine koji ne mogu prirodnim putem proizvesti manitol. BAK (bakterije mliječne kiseline) se intenzivno istražuju kao sojevi domaćini za proizvodnju manitola zbog svoje sigurnosti i velike potražnje u prehrambenoj industriji. Pristup genetičkog inženjerstva se bazira na reduciranju



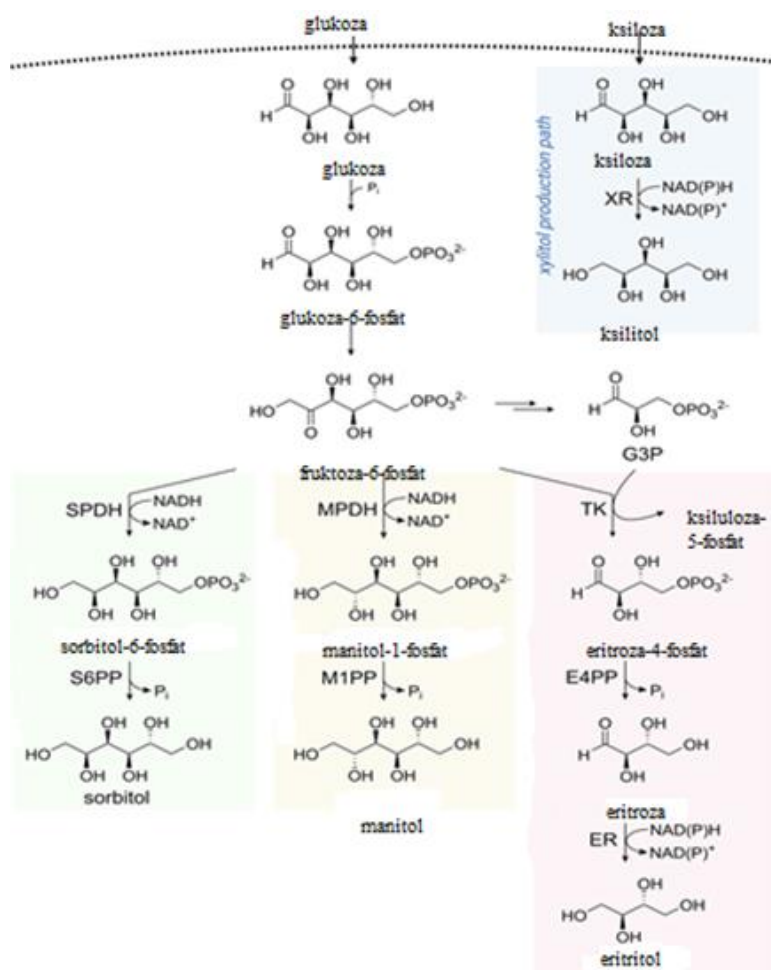
proizvodnje mliječne kiseline i pronalasku efikasne konverzije fruktoza-6-fosfata u manitol. *L.lactis* soj koji ne proizvodi laktoza dehidrogenazu je konstruiran i modificiran tako da vrši povećanu ekspresiju dvaju enzima : manitol-1-fosfat dehidrogenaze i manitol-1-fosfataze. Genetički modificirani sojevi su postigli maksimalnu proizvodnju manitola iz glukoze od 39 mol/mol. Još jedan primjer korištenja cijelih stanica kao biokatalizatora je proizvodnja manitola iz glukoze s pomoću *E.coli*. D-glukoza izomeraza katalizira konverziju glukoze u fruktozu, dok manitol dehidrogenaza katalizira redukciju fruktoze u manitol, FDH povećava NADH regeneraciju unutar stanica. Rezultati iz cijelih stanica kao biokatalizatora su pokazali da proizvodnja manitola iz glukoze daje prinos od 0.42 g/g. Još jedan pristup je razvijanje mutiranih sojeva kvasaca *Candida magnoliae* koji pokazuje veći udio konverzije glukoze nego divlji tip. Koristeći fermentaciju od dva koraka u koje je prvi korak aerobni rast koristeći glukozu kao izvor ugljika i drugi korak anaerobna konverzija fruktoze u manitol. Proizvodnja manitola je dosegla prinos od 81 % konverzijom i produktivnošću od 4 g/Lh. Ova fermentacija od dva koraka se sastoji od faze rasta i faze proizvodnje što omogućava proizvodnju manitola iz kvasca i najbolji je sustav za proizvodnju manitola pomoću kvasca.[16]

### 2.1.2.3 Sorbitol

Sorbitol se koristi u kemijskoj i prehrambenoj industriji kao prekursor u sintezi L-askorbinske kiseline ili za sintezu vitamina C još od 1933. godine. Osim korištenja u prehrambenoj industriji također se koristi za sintezu polimera kao što su izosorbid i propilen glikol. U prirodnim putevima dva enzima, sorbitol-6-fosfat dehidrogenaza i sorbitol-6-fosfat se koriste u sintezi sorbitola iz fruktoza-6-fosfata. Iako ovaj način proizvodnje sorbitola (okvirno 700 000 tona godišnje) redukcijom glukoze sa vodikom, razvija se sve veći interes za korištenje biokatalizatora kao bolji pristup proizvodnji. *Zymomonas mobilis* može proizvoditi sorbitol i D-glukonsku kiselinu iz saharoze ili mješavine glukoze i fruktoze. Biosinteza sorbitola u ovom soju je katalizirana sa NADP-vezanom glukoza-fruktoza oksidoreduktazom. Enzim katalizira „ping-pong“ mehanizam reakcije gdje se glukoza prvo konvertira u glukonolakton i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i onda se fruktoza reducira sa NADPH iz sorbitola. Tako soj uvijek kao nusproizvod ima glukonolakton i sorbitol. Najveći prinos sorbitola je postignut šaržnim uzgojem *Z. mobilis* ATCC 29191. Mikroorganizmi su sposobni vršiti konverziju glukoze i fruktoze is ekvimolarnog odnosa glukonske kiseline i sorbitola sa prinosom 91 % oba produkta. Konačna koncentracija proizvodnje sorbitola je bila 300 g/L s pomoću BMK.[17]

#### 2.1.2.4 Eritritol

Za razliku od drugih alkohola, eritritol se sastoji od 4 ugljika, a mogu ga proizvoditi iz glukoze kvasci, BMK i drugi mikroorganizmi pentoza fosfatnim putem iz eritroza-4-fosfata i eritroze kao intermedijara. Eritritol se prirodno može proizvesti sa osmotskim kvascima uključujući *Candida magnoliae*, *Yarrowia lipolytica* i bakteriju *Leuconostoc oenos*. Bioproizvodnja eritritola iz lignoceluloznih šećera se najviše oslanja na izolaciju mikroorganizama koji mogu proizvoditi eritritol sa velikim prinosom. *Trichosporonoides megachiliensis* i *Pseudozyma tsukubaensis* se koriste za komercijalnu proizvodnju eritritola sa visokim prinosom i produktivnošću *T. megachiliensis* mutant je npr. otporan na UV zračenje. Specifična enzimska aktivnost u pentoza fosfatnom putu i specifično eritroza reduktaze i transketolaze je veća nego u citratnom ciklusu, što je određivano u lizatima tijekom kultivacije. Industrijska proizvodnja eritritola iz glukoze se istražuje u fermentorima od 100 000 L i rezultat je proizvodnja eritritola koja je dosegla 0.47 g/h, sa produktivnošću od 2 g/Lh. Za proizvodnju eritritola se također koristi soj *P.tsukubaensis*. [18]



Kratice ;XR:ksilozna reduktaza; G3P:gliceraldehyd-3-fosfat; SPDH:sorbitol-6-fosfat dehidrogenaza; S6PP:sorbitol-6-fosfataza; MPDH:manitol-1-fosfat dehidrogenaza; M1PP:manitol-1-fosfat; TK:transketolaza; E4PP:eritroza-4-fosfat; ER: eritroza reduktaza

**Slika 5.** Prikaz konverzije glukoze i ksiloze u različite šećerne alkohole.[19]

### 2.1.3 Šećerne kiseline

Šećerne kiseline zajedno sa alkoholima su česti produkti prirodnih fermentacijskih procesa. Šećerne kiseline se općenito definiraju kao jedno ili dvooksidacijski produkti aldoznih šećera često deriviranih iz lignoceluloznih monosaharida. Mogu se klasificirati u 3 tipa ovisno o funkciji kiselinske skupine.

Aldonske kiseline se dobiju oksidacijom aldehydne grupe na C-1 poziciji da se formira karboksilna kiselina, gdje je uronska kiselina derivat oksidacije terminalne hidroksilne skupine. Ove šećerne kiseline su važne komponente koje se koriste u hrani, kozmetici i farmaceutskoj industriji. Također, njihova biokompatibilnost i postojanje aktivne funkcionalne skupine čine ih kompatibilnim za korištenje u proizvodnji biogoriva. Na primjer D-glukonska kiselina i D-ksiolinska kiselina su monomeri koji omogućavaju polimerizacijsku reakciju i pripremu biopolimera koji se koriste kao poliamidi i poliersteri.[20]

#### 2.1.3.1 D-glukonska kiselina

Glukonska kiselina ili glukonat je jedna od industrijski važnih kiselina za primjenu u prehrambenim aditivima, monomerima, za biorazgradive polimere i proizvodnju cementa. Glukoza se može oksidirati oksidoreduktazama da se dobije glukonolakton koji se spontano hidrolizira vodom ili enzimski kataliziranim reakcijama glukonolaktonaze da se dobije glukonska kiselina. Enzimi koji oksidiraju glukozu se mogu podijeliti u dvije grupe, glukozna oksidaza i glukozna dehidrogenaza ovisno o njihovom elektron akceptoru. Glukozna oksidaza je flavoprotein koji sadrži koenzim flavin adenin dinukleotid (FAD). Katalizira oksidaciju glukoze u glukonolakton koristeći molekularni kisik kao elektronakceptor. Prostetička skupina (FAD) se reducira u FADH<sub>2</sub>. FAD se regenerira oksidacijom FADH<sub>2</sub> molekulskim kisikom. Vodikov peroksid je nusproizvod ove reakcije. S druge strane glukozna dehidrogenaza koristi elektron akceptore (ne kisik) za oksidaciju glukoze. Glukozna dehidrogenaze se klasificiraju u 3 podgrupe ovisno o kojoj se vrsti elektron medijatora radi uključujući nikotinamid, adenin dinukleotid pirolokinolin kinon ili FAD. Za razliku od NAD(P)<sup>+</sup> koji se slabo veže na enzime i koristi se kao supstrat da primi elektrone od glukoze, pirolokinolin kinon (PQQ) i FAD su vezani za enzime i koriste se kao kofaktori za prijenos elektrona. Na primjer PQQ ovisna glukozna dehidrogenaza koja se nalazi u *Gluconobacter* sp. katalizira oksidaciju glukoze sa odgovarajućom redukcijom ubikinona u unikintol. Godišnja proizvodnja glukonske kiseline je procijenjena na oko 100 000 tona i najviše se proizvodni biotehnoškim procesom. Ta komponenta se komercijalno proizvodi sa mikrobima koji posjeduju glukozna dehidrogenazu ili glukozna oksidazu aktivnost kao *Aspergillus niger* ili *Gluconobacter oxidans*. *Aspergillus* vrste se najviše koriste zbog velike ekspresije glukozna oksidaze. Glukozna oksidaza u *A. niger* se eksprimira u 2 oblika: jedan je lociran u stanici, a jedan se ispušta u ekstracelularni prostor. Prisutnost tog enzima na dvije lokacije povećava proizvodnju glukonske kiseline zato što glukonolakton može hidrolizirati glukonsku kiselinu spontanom hidrolizom sa ekstracelularnom vodom. Industrijska proizvodnja glukonske kiseline s pomoću *A. niger* se

provodi šaržnim procesom zato što bi se u kontinuiranom procesu razvio filamentozni micelij te bi se smanjila aktivnost glukoza oksidaze. Na primjer, najveći prinos glukonske kiseline pri šaržnom procesu je postignut održavanjem optimalnih uvjeta rasta micelija tijekom submerzne fermentacije. Fermentacijski medij se sastoji od velikog udjela glukoze (330 g/L) i koristi se za biokonverziju od 1.5 sati što rezultira prinosom od 1.05 g/g i rezultira prinosom glukonske kiseline od 1.05 g/g i produktivnošću od 12.09 g/Lh. Razvijene je također kontinuirana fermentacija sa boljim prijenosom mase i disperzijom micelija. Najveća postignuta produktivnost je 31.05 g/Lh i prinosom od 0.98 g glukonata. Međutim, primijećeno je nekoliko mana korištenja *A.niger* kao što su npr. velika osjetljivost prema spojevima prisutnim u lignoceluloznim hidrolizatima kao što su slabe kiseline i fenolni spojevi. Ovi spojevi se mogu koristiti kao inhibitori i *A.niger* proizvodi velike fungalne pelete koji onemogućuju prijenos kisika do stanice. *G.oxidans* se koristi za proizvodnju glukonske kiseline zato što oksidira monosaharide da se dobiju kiseline i ketoni. Za razliku od glukoza oksidaze koju eksprimira *A.niger* postoje dva sustava dobivanja velike aktivnosti glukoze dehidrogenaze u *G.oxidans*, jedan je dodavanje topljivog  $NADP^+$  koji je lokaliziran na citoplazmatskoj membrani. Povećana ekspresija membranski vezane glukoza dehidrogenaze u *G.oxidans* povećava prinos glukonata 70 % u usporedbi sa divljim sojem. Nedavno je uspješno provedena šaržna fermentacija *G.oxidans* sa agrikulturnim otpadom. Soj *G.oxidans* DSM 2003. iskorišten je za proizvodnju glukonske kiseline iz otpada krumpira hidrolizom sa sveukupnim prinosom od 0.95 g produkta i produktivnošću od 4.07 g/Lh. Veliki su interesi u ekspresiji glukoza oksidirajućeg enzima u drugim bakterijskim sojevima koji se koriste u biotehnološkoj industriji kao što su *E.coli* i kvascu *S.cerevisiae*. Prekomjerna ekspresija glukoza oksidaze i dehidrogenaze u *E.coli* je sve više istraživana ali rezultat je pokazao da je više od 60 % rekombinantnih proteina neaktivno. Industrijska proizvodnja glukonske kiseline provodi se mikrobnom fermentacijom koristeći *Aspergillus* ili *Gluconobacter* vrste.[21]

#### 2.1.3.2 D-ksilonska kiselina

Ksilonska kiselina/ksilonat je raznovrsna platforma kemikalija koje imaju razne primjene. Može se koristiti kao prekursor za polimere. Prirodno, visoko vrijednosni koncentrat ksilonata imaju bakterije npr. *G.oxidans* i *P.putida*, ali zahtijevaju kompleksnu hranjivu podlogu i uvjete kao niski pH i preciznu kontrolu rasta stanica da se održi biokonverzija. Genetička modifikacija *S.cerevisiae* za proizvodnju ksilonke kiseline se može postići inkorporacijom gena za proizvodnju enzima ksiloza dehidrogenaze i ksilonolaktone. Nakon što je ksiloza transportirana u kvasac može biti oksidirana u oblik ksilonolaktone s ksiloza dehidrogenazom i tada slijedi

hidroliza u ksilonu kiselinu s ksilonolaktonom. Genetičkim inženjerstvom modificiran *S.cerevisiae* može konvertirati ksilozu u oblik ksilonata s konverzijskim prinosom od 0.88 g/g i produktivnošću od 0.44 g/Lh. Sličan pristup inkorporacije ksilonatskog biosintetskog puta s disrupcijom ksiloze u ksilonat u metaboličkom putu uključuje inaktivaciju ksiloze izomeraze i ksilonat dehidrataze da se spriječi izomerizacija ksiloze u ksilulozu. Kranji rezultat je bio 108.2 g/L D-ksilonata i može dati prinos 1.09 g ksilonat/g ksiloze sa specifičnom produktivnošću od 1.80 g/Lh. Izolirani enzimi korišteni su za izradu enzimske kaskade. Ksiloza dehidrogenaza katalizira konverziju ksiloze u ksilonolakton gdje se alkohol dehidrogenaza (ADH) koristi za redukciju aldehida u alkohol sa simultanom regeneracijom NADH u NAD<sup>+</sup> koji se koristi u reakcijama sa ksilol dehidrogenazom. Reakcije su održavane na pH 8 i ravnoteža reakcije je pomaknuta prema ksilonatu zato što se proizvedeni lakton može spontano hidrolizirati pri alkilnom pH. Pročišćeni ksilonat se može održati nakon enzimske filtracije i uklanjanja alkohola. Ova biokatalitička kaskada za proizvodnju ksilonata se bazira na korištenju ksiloza dehidrogenaze i NAD<sup>+</sup> regeneracije pri alkilnom pH za veći prinos i lakše pročišćavanje ksilonata.[22]

#### 2.1.3.3 L-arabonska kiselina

Arabonat je epimer 4-C atoma D-ksilonata i ima sličnu primjenu za sintezu polimera. Međutim, može se koristiti kao lijek za tretiranje bubrežnog kamenca. Istraživanja oksidacijskih produkata L-arabionze su pokazala veće iskorištenje od D-glukoze i D-ksiloze zbog niskog sadržaja u otpadu. Metaboličko inženjerstvo *S.cerevisiae* je istraživano za cijele stanice kao biokatalizatore da proizvode arbonat iz arabinoze oksidacijom L-arabinoze iz L-arabinske kiseline sa arabinoza dehidrogenazom kao katalizatorom koja koristi NAD(P)<sup>+</sup> kao kosupstrat ili elektron akceptor. Dobro karakterizirana arabinoza dehidrogenaza se sastoji od enzima koji se nalaze u bakterijama poput *Rhizobium* i *Azospirillum brasiliense*. Kako *S.cerevisiae* može konzumirati L-arabinozu vrlo polako, rekombinantnim inženjerstvom za ekspresiju arabinoze su modificirani drugi putevi sinteze. Galaktoza permeaza i arabinoza dehidrogenaza iz bakterije *Rhizobium leguminosarum* se pojačano ekprimira da može oksidirati L-arabinoza u L-arbonat. Inženjerski modificiran soj kvasca daje produktivnost od 18 g/L arbonata u kulturi sa prinosom od 86 % i produktivnošću od 0.25 g/Lh. Kasnije se metabolički inženjerski modificirana *E.coli* koristila za proizvodnju L-arbonata. Za razliku od metaboličkog puta kvasaca, *E.coli* ima transportne sustave za pentoze Arabinoza dehidrogenaza se eksprimira iz *Azospirillum brasiliense* u *E.coli* da se omogući transformacija za promjenu arabinoze u arbonat. Rezultirajući genetički modificiran soj je pokazao produktivnost od 43.9 g/L arbonata sa

produktivnošću od 1.22 g/Lh i prinosom od 99 %. Uz oksidaciju L-arabinoze arabinoza dehidrogenaza ima aktivnost prema galaktozi. Enzim može katalizirati oksidaciju galaktoze do galaktonaza sa kompatibilnom stopom oksidacije arabinoze. Proizvodnja L-arabonata biotehnološkim procesima i dalje zahtjeva poboljšanja enzimskih reakcija koje trebaju zadovoljiti industrijsku proizvodnju.[23]

#### 2.1.3.4 Saharinska kiselina

Saharinska kiselina i njeni derivati se najviše koriste kao prehrambeni dodatci, lijekovi, detergentski korozijski inhibitori i biorazgradivi materijali. Iako se mogu sintetizirati kemijskim putem oksidacijom D-glukoze, reakcija je nepovoljna pa se nastoji razviti biotehnološka industrijska proizvodnja. *S.cerevisiae* se može koristiti za proizvodnju glukarata saokspresijom 4 ključna enzima uključujući mioinozitol-1-fosfat sintazu (MIPS), inozitol-1-monofosfatazu (IMPaza) i mioinozitol oksigenazu (UDH). Sa šaržnom fermentacijom u 5-L bioreaktorima, biokonverzija glukoze do saharinske kiseline može biti postignuta s prinosom od 0.20 g/g i produktivnošću od 0.03 g/Lh. Biosintetski put za proizvodnju saharinske kiseline iz *E.coli* koristeći glukozu je ustanovljen povećanom ekspresijom 4 glavna enzima u *S.cerevisiae*. Međutim, potrebno je daljnje unaprijeđenje proizvodnje da bi se zadovoljile industrijske potrebe.[24]

#### 2.1.3.5 Druge šećerne kiseline

Druge šećerne kiseline se mogu dobiti biotransformacijom drugih monosaharida uključujući D-galaktonsku kiselinu koja je oksidirani proizvod D-galaktoze. Koristi se kao prekursor za izradu poliestera, farmaceutskih intermedijara i kao materijal za izradu kozmetike. Galaktonska kiselina se može proizvoditi pomoću radnog organizma *E.coli* sa povećanom ekspresijom galaktoza dehidrogenaze. Šaržna fermentacija s inženjerski modificiranim sojem *E.coli* daje galaktonsku kiselinu sa prinosom od 88 % gdje je prilikom konverzije galaktoze prosječna produktivnost 0.24 g/Lh u 5 L bioreaktorima. Proizvodnja ovih kiseline za sad pokazuje mali prinos i moguća je samo u malom mjerilu. Glavni izazovi u proizvodnji šećernih kiseline iz neglukoznih supstrata su mali prinos iz lignoceluloznih sirovina u usporedbi s ksilozom i glukozom. (Tablica 2.). [25]

**Tablica 2.** Proizvodnja šećernih kiselina sa cijelim stanicama, biokatalizatorima i enzimskim kaskadama.[26]

vrsta kiseline	šećerne kiseline	supstrat	biokatalizator	ključni enzim <sup>a/</sup> genetička manipulacija	Prinos (g <sub>produkt</sub> /g <sub>supstrat</sub> )	Produktivnost (g <sub>produkt</sub> /Lh)
aldonska kiselina	D-glukonska kislina	D-glukoza	<i>A.niger</i>	GOx	1.00	21.09
aldonska kislina	D-glukonska kislina	D-glukoza	<i>A.niger</i>	GOx	0.98	31.05
aldonska kislina	D-glukonska kislina	D-glukoza	<i>G.oxidans</i>	GDH	0.95	4.07
aldonska kislina	D-ksilonska kiselina	D-ksiloza	<i>S.cerevisiae</i>	xylB <sup>+</sup> , xylC <sup>+</sup>	0.88	0.44
aldonska kislina	D-ksilonska kiselina	D-ksiloza	<i>E.coli</i>	xylB <sup>+</sup> , xylC <sup>+</sup> , ΔyjhG, ΔyagF, ΔxylA	1.09	1.8
aldonska kislina	D-ksilonska kiselina	D-ksiloza	enzimska kaskada	XYD, ADH	0.95	15.66
aldonska kislina	L-arabonska kiselina	L-arabinoza	<i>S.cerevisiae</i>	Aradh <sup>+</sup> , GAL2 <sup>+</sup>	0.86	0.25
aldonska kislina	L-arabonska kiselina	L-arabinoza	<i>E.coli</i>	Aradh <sup>+</sup> , ΔaraA	0.99	1.22
aldonska kislina	D-galaktonska kiselina	D-galaktoza	<i>E.coli</i>	Gld <sup>+</sup>	0.88	0.24
uronska kiselina	D-glukuronska kiselina	D-glukoza	<i>E.coli</i>	ino1 <sup>+</sup> , suhB <sup>+</sup> , miox <sup>+</sup>	0.03	0.24
uronska kiselina	D-saharinska kiselina	D-glukoza	<i>S.cerevisiae</i>	ino1 <sup>+</sup> , miox <sup>+</sup> , udh <sup>+</sup>	0.20	0.03
uronska kiselina	D-saharinska kiselina	D-glukoza	<i>E.coli</i>	ino1 <sup>+</sup> , suhb <sup>+</sup> , miox <sup>+</sup> , udh <sup>+</sup> , ΔzvH, Δpgi, ΔuxaC, ΔgudD	0.46	0.03

Kratice: <sup>a</sup> enzimi su GOx:glukoza oksidaza; GDH:glukoza dehidrogenaza; XYD:ksiloza dehidrogenaza; ADH: alkohol dehidrogenaza. <sup>b</sup> označuje heterolognu ekspresiju (+) ili deleciju (Δ) gena koji kodiraju za ključne enzime. xylB: ksiloza dehidrogenaza; xylC:ksilonolakton dehidrogenaza ; yjhG/yagF:ksilonat dehidrataza; xylA:ksiloza izomeraza; aradh:arabinoza dehidrogenaza; GAL2:galaktoza permeaza; araA: arabinoza izomeraza; gld:galaktoza dehidrogenaza; ino1: myo-inositol-1-fosfat sintaza; suhB: inositol 1-monofosfataza; miox: myo-inositol oksigenaza; udh: uronat dehidrogenaza; zwf: glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; pgi: fosfogluukoza izomeraza; uxaC:uronat izomeraza; gudD: glukarat dehidrataza



#### 2.1.4 Aminošećeri

Aminošećeri su važni dio mnogih prirodnih biomikromolekula kao što su glikoproteini i lipopolisaharidi. Najčešći se aminošećeri u prirodi mogu naći kao derivati heksoza poput 2-amino-2-deoksi-D-glukoamin i 3-amino-3-deoksi-D-glukoza. Glukozaamin je važan za sintezu drugog najprisutnijeg polisaharida nakon celuloze. Uklanjanje bilo koje amino grupe u monosaharidne strukture značajno mijenja njihovu strukturu i biološke funkcije. Na primjer, prirodno proizvedeni aminošećeri mogu služiti kao prekursori za sintezu nekoliko antibiotika. U *Streptomyces* vrstama, antibiotik kanamicin A se sintetizira iz kanozamina (3-deoksi-3-amino-D-glukoza). Također zahvaljujući svojim biološkim aktivnostim aminošećeri se mogu koristiti kao posebne kemikalije. Ovi šećeri se koriste za sintezu glikoproteina koji imaju vrlo korisna terapijska i biološka svojstva. Aminošećeri, posebno D-glukozaamin, se mogu koristiti kao aminošećerni katalizatori.[27]

##### 2.1.4.1 Enzimski katalizirana sinteza aminošećera

U biološkim sustavima aminošećeri se sintetiziraju sa enzimima u stereospecifičnim reakcijama. Aminacija se katalizira piridoksal-fosfat ovisnom aminotransferazom ili kofaktor ovisnom transferazom. Amino grupa se prenosi sa L-glutamina ili L-glutamata (donori amino skupine) na keto skupinu šećera fosfata ili šećernih nukleotida. Primjer kofaktor ovisne aminotranferaze je L-glutamin-D-fruktoza-6-fosfat aminotranferaza koja katalizira transaminaciju iz L-glutamina u D-fruktoza-6-fosfat i L-glutamat. Ove enzimski katalizirane aminacije su regioselektivne, što ih čini privlačnim biokatalizatorima. Nedavno, enzimski kaskada za regiospecifične reakcije koristi kombinaciju oksidacije i transaminacije da se upotpuni dvostupanjski korak za sintezu amino ugljikohidrata. Prvi korak je oksidacija galaktoze koristeći galaktoza oksidazu iz *Fusarium graminearum* ili piranoza dehidrogenazu iz *Agaricus bisporus* iz ketoheksoza intermedijara dok se drugi korak katalizira ω-transaminazom iz *Chromobacterium violaceum* da se dobije bolji prinos aminošećera. Reakcije transaminacije se mogu koristiti da se ugradi amino grupa na drugačija mjesta u šećeru. Najveći prinos aminošećera dobije se pri proizvodnji galaktoze sa oko 67 %.[28]

#### 2.1.4.2 Metaboličko inženjerstvo za proizvodnju aminošećera

Iako se proizvodnja najčešćih aminošećera poput glukozoamina može postići proizvodnjom enzima iz *E.coli*. Čest domaćin u biotehnološkoj proizvodnji uz *E. coli* je *Bacillus subtilis* koji je genetičkim inženjerstvom modificiran za proizvodnju aminošećera iz glukoze. Na primjer glukozoamin se naglo degradira u *E.coli* i njegova degradacija inhibira rast stanica.[29]

#### 2.1.5 Esterifikacija šećera

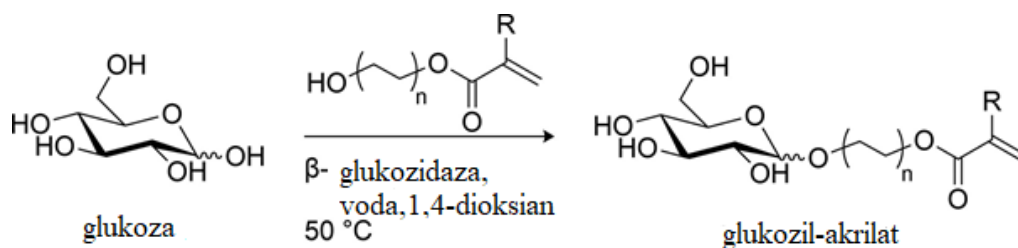
Derivati šećera dobiveni esterifikacijom su postali vrlo privlačni zato što imaju mnoga svojstva koji ih čine posebnim polimerima i materijalima. Inkorporacija šećernih derivata u tradicionalne polimere poput poliamida i poliestera se može koristiti za proizvodnju biorazgradivih i biokompatibilnih polimera. Derivati se mogu sintetizirati esterifikacijom ili transesterifikacijom mono- ili disaharida sa različitim donorima acilne skupine, uključujući masne kiseline, fenolnu kiselinu i sintetske monomere. Česti šećeri, kao su aldonska kiselina, aladarinska kiselina i aminošećeri, se koriste kao supstrati za esterifikaciju i proizvodnju derivata sa novim svojstvima. Neki od tih derivata pokazuju terapijska svojstva i potencijalna anitumorska i antimikrobna svojstva, i mogu se koristiti kao aditivi u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.[30]

##### 2.1.5.1 Esterifikacija

Lipaza je vrlo poznat i učinkovit katalizator koji se koristi u enantioselektivnim esterifikacijskim reakcijama. Može se koristiti za sintezu estera iz glukozilnog palmitata iz glukoze i destilata palmitinske kiseline. Zbog toga što su oba supstrata u suvišku i direktni derivati iz agrokulturnih sinteza glukozilnog palmitata što je dobar primjer industrijske primjene biokatalizatora. Komercijalno dostupna imobilizirana lipaza B iz *Candida antarctica* se koristi kao biokatalizator za kataliziranje esterifikacije glukoze i palmitinske kiseline na 40 °C u acetonu. Nakon 74 sata reakcija rezultira dobivanjem 6-O-palmitoil- $\alpha$ -D-glukopiranoze sa 76 % prinosom konverzije glukoze. Ovaj ester i njegovi derivati se mogu koristiti kao sastojci hrane, dijelovi detergenta i kozmetike. Esteraze ferulinske kiseline mogu katalizirati izravnu esterifikaciju prirodne fenolne kiseline.[31]

### 2.1.5.2 Glikozilacija

Kako sinteza glukozil-akrilinskih monomera nije učinkovita zbog niske kompatibilnosti tih šećera i njihovih produkata sa organskim otapalima, nedavni pristup je uspostavljen koristeći  $\beta$ -glukozidazu kao alternativni enzim za sintezu glukozidaza-akrilata (Slika 6.). Reakcijske komponente su istraživane u svrhu povećavanja topljivosti glukoze i zadrže aktivnost glukozidaze. Optimizirani uvjeti su održavani kontroliranjem udjela akrilata i vode. Optimalni uvjeti su održani tako da je voda/akrilat/1,4-dioksian omjer iznosio 13:80:7% (v/v) i reakcija se izvodi pri 50 °C da se održi glikolizidacija glukoze sa različitim akrilnim monomerima koristeći  $\beta$ -glukozidazu. Visoki prinos u ovim uvjetima dobije se nakon 24 sata. Glukozilakrilatni monomeri su uspješno kopolimerizirani sa različitim monomerima u vodi i DMF-u (dimetilformamid). Proizvedeni monomeri se mogu koristiti kao sustav za proizvodnju lijekova.[32]



**Slika 6.** Metakrilacija katalizirana sa *CALB* – lipaza B iz *Candida antarctica*. [33]

### 3. ZAKLJUČAK

1. Korištenje enzimskih reakcija za selektivne biotransformacije i procese proizvodnje i pročišćavanja finih kemikalija je i dalje zahtjevno, posebno s aspekta ekonomičnosti bioprocasa i iskorištavanja otpada po principima kružnog (reciklažnog) gospodarstva.
2. Mikrobne i enzimske biotransformacije se uspješno koriste za industrijsku proizvodnju finih kemikalija kao što su rijetki šećeri, aminošećeri, askorbinska kiselina i druge šećerne kiseline te alkoholi. Sa još više znanja o enzimim i staničnom metabolizmu, kao i razvojem i primjenom tehnika metaboličkog inženjerstva, i dalje će se raditi na razvoju i industrijskoj primjeni inženjerski modificiranih stanica kojima će ostvarivati veći prinosi proizvoda.
3. Napretkom prema kružnoj ekonomiji bit će unaprijeđeni biotehnološki procesi prerade šećernih komponenata iz obnovljivih izvora energije, iz agrikulture, i nusproizvoda agroindustrije, koji će i dalje biti glavni supstrati za proizvodnju finih kemikalija.

## 4. POPIS LITERATURE

- [1] Lane, S.; Dong, J.; Jin, Y.-S. Value-Added Biotransformation of Cellulosic Sugars by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2018, 260, 380–394. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852418305169?via%3Dihub>
- [2] Dickens, F.; Williamson, D. H. Pentose Phosphate Isomerase and Epimerase from Animal Tissues. *Biochem. J.* 1956, 64, 567. <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/64/3/567/50231/Pentose-phosphate-isomerase-and-epimerase-from?redirectedFrom=fulltext>
- [3] Itoh, H.; Okaya, H.; Khan, A. R.; Tajima, S.; Hayakawa, S.; Izumori, K. Purification and Characterization of D-Tagatose 3- Epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1994, 58, 2168–2171. <https://academic.oup.com/bbb/article-abstract/58/12/2168/5951034?redirectedFrom=fulltext>
- [4] Izumori, K. Bioproduction Strategies for Rare Hexose Sugars. *Naturwissenschaften* 2002, 89, 120–124. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00114-002-0297-z>
- [5] Yeom, S.-J.; Ji, J.-H.; Yoon, R.-Y.; Oh, D.-K. L-Ribulose Production from L-Arabinose by an L-Arabinose Isomerase Mutant from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Biotechnol. Lett.* 2008, 30, 1789–1793. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-008-9746-x>
- [6] Yeom, S.-J.; Kim, Y.-S.; Oh, D.-K. Development of Novel Sugar Isomerases by Optimization of Active Sites in Phosphosugar Isomerases for Monosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79, 982–988. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01867-09>
- [7] de Sousa, M.; Silva Gurgel, B.; Pessela, B. C.; Goncalves, L. R. ,B. Preparation of CLEAs and Magnetic CLEAs of a Recombinant LArabinose Isomerase for D-Tagatose Synthesis. *Enzyme Microb. Technol.* 2020, 138, 109566. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022920300594?via%3Dihub>
- [8] Chuaboon, L.; Wongnate, T.; Punthong, P.; Kiattisewee, C.; Lawan, N.; Hsu, C.-Y.; Lin, C.-H.; Bornscheuer, U. T.; Chaiyen, P. One-Pot Bioconversion of L-Arabinose to L-Ribulose in an Enzymatic Cascade. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2019, 58, 2428–2432. <https://onlinelibrary.wiley.com/author-ed-by/Lin/Chun%E2%80%90Hung>
- [9] Ahmed, Z.; Sasahara, H.; Bhuiyan, S. H.; Saiki, T.; Shimonishi, T.; Takada, G.; Izumori, K. Production of D-Lyxose from D-Glucose by Microbial and Enzymatic Reactions. *J. Biosci.*

Bioeng.1999,88,676–678.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172300871005?via%3Dihub>

[10] Silveira, M.; Jonas, R. The Biotechnological Production of Sorbitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59, 400–408. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-002-1046-0>

[11] Choe, H.; Joo, J. C.; Cho, D. H.; Kim, M. H.; Lee, S. H.; Jung, K. D.; Kim, Y. H. Efficient CO<sub>2</sub>-Reducing Activity of NAD Dependent Formate Dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for Formate Production from CO<sub>2</sub> Gas. *PLoS One* 2014, 9, No. e103111. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103111>

[12] Chuaboon, L.; Wongnate, T.; Punthong, P.; Kiattisewee, C.; Lawan, N.; Hsu, C.-Y.; Lin, C.-H.; Bornscheuer, U. T.; Chaiyen, P. One-Pot Bioconversion of L-Arabinose to L-Ribulose in an Enzymatic Cascade. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2019, 58, 2428–2432. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201814219>

[13] Manas, M. G.; Campos, J.; Sharninghausen, L. S.; Lin, E.; Crabtree, R. H. Selective Catalytic Oxidation of Sugar Alcohols to Lactic Acid. *Green Chem.* 2015, 17, 594–600. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/GC/C4GC01694G>

[14] Nyssölä, A.; Pihlajaniemi, A.; Palva, A.; von Weymarn, N.; Leisola, M. Production of Xylitol from D-Xylose by Recombinant *Lactococcus lactis*. *J. Biotechnol.* 2005, 118, 55–66. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165605001306?via%3Dihub>

[15] Jin, L.-Q.; Xu, W.; Yang, B.; Liu, Z.-Q.; Zheng, Y.-G. Efficient Biosynthesis of Xylitol from Xylose by Coexpression of Xylose Reductase and Glucose Dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019, 187, 1143–1157. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-018-2878-0>

[16] von Weymarn, N.; Hujanen, M.; Leisola, M. Production of DMannitol by Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *Process Biochem.* 2002, 37, 1207–1213. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0032959201003399?via%3Dihub>

[17] Zhang, J.; Li, J.-b.; Wu, S.-B.; Liu, Y. Advances in the Catalytic Production and Utilization of Sorbitol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013, 52, 11799–11815. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie4011854?ref=PDF>

- [18] Park, Y.-C.; Oh, E. J.; Jo, J.-H.; Jin, Y.-S.; Seo, J.-H. Recent Advances in Biological Production of Sugar Alcohols. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016, 37, 105–113. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166915001573?via%3Dihub>
- [19] Park, Y.-C.; Oh, E. J.; Jo, J.-H.; Jin, Y.-S.; Seo, J.-H. Recent Advances in Biological Production of Sugar Alcohols. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016, 37, 105–113. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166915001573?via%3Dihub>
- [20] de Lederkremer, R. M.; Marino, C. Acids and Other Products of Oxidation of Sugars. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2003, 58, 199–306. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065231803580052?via%3Dihub>
- [21] Sriwaiyaphram, K.; Punthong, P.; Sucharitakul, J.; Wongnate, T. Structure and Function Relationships of Sugar Oxidases and Their Potential Use in Biocatalysis. In *The Enzymes*; Academic Press, 2020; pp 193–230. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511316303476?via%3Dihub>
- [22] Sriwaiyaphram, K.; Punthong, P.; Sucharitakul, J.; Wongnate, T. Structure and Function Relationships of Sugar Oxidases and Their Potential Use in Biocatalysis. In *The Enzymes*; Academic Press, 2020; pp 193–230. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511316303476?via%3Dihub>
- [23] Aro-Kärkkäinen, N.; Toivari, M.; Maaheimo, H.; Ylilauri, M.; Pentikäinen, O. T.; Andberg, M.; Oja, M.; Penttilä, M.; Wiebe, M. G.; Ruohonen, L.; et al. L-Arabinose/D-Galactose 1-Dehydrogenase of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Characterised and Applied for Bioconversion of L-Arabinose to L-Arabinonate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98, 9653–9665. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-014-6039-2>
- [24] Dilworth, M. J.; Arwas, R.; McKay, I. A.; Saroso, S.; Glenn, A. R. Pentose Metabolism in *Rhizobium leguminosarum* MNF300 and in Cowpea *Rhizobium* NGR234. *Microbiology* 1986, 132, 2733–2742. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-132-10-2733>
- [25] omero Zaliz, C. L.; Varela, O. Facile Synthesis of a DGalactono-1,6-Lactone Derivative, a Precursor of a Copolyester. *Carbohydr. Res.* 2006, 341, 2973–2977. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621506004733?via%3Dihub>

- [26] Galbis, J. A.; Garcia-Martin, M. d. G.; de Paz, M. V.; Galbis, E. Synthetic Polymers from Sugar-Based Monomers. *Chem. Rev.* 2016, 116, 1600–1636. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.5b00242?ref=PDF>
- [27] Bhagavan, N. V. Simple Carbohydrates. In *Medical Biochemistry*, 4th ed.; Academic Press, 2002; pp133–151. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621516303147?via%3Dihub>
- [28] Aumala, V.; Mollerup, F.; Jurak, E.; Blume, F.; Karppi, J.; Koistinen, A. E.; Schuiten, E.; Voß, M.; Bornscheuer, U.; Deska, J.; Master, E. R.; et al. Biocatalytic Production of Amino Carbohydrates through Oxidoreductase and Transaminase Cascades. *ChemSusChem* 2019, 12, 848–857. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cssc.201802580>
- [29] Ma, Q.; Gao, X. Categories and Biomanufacturing Methods of Glucosamine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103, 7883–7889. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10084-x>
- [30] Chaiyaso, T.; H-kittikun, A.; Zimmermann, W. Biocatalytic Acylation of Carbohydrates with Fatty Acids from Palm Fatty Acid Distillates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33, 338. <https://academic.oup.com/jimb/article/33/5/338/5940482>
- [31] Oliveira, D. M.; Mota, T. R.; Oliva, B.; Segato, F.; Marchiosi, R.; Ferrarese-Filho, O.; Faulds, C. B.; dos Santos, W. D. FeruloylEsterases: Biocatalysts to Overcome Biomass Recalcitrance and for the Production of Bioactive Compounds. *Bioresour. Technol.* 2019, 278, 408–423. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416506001085?via%3Dihub>
- [32] Tsuchiyama, M.; Sakamoto, T.; Fujita, T.; Murata, S.; Kawasaki, H. Esterification of Ferulic Acid with Polyols Using a Ferulic Acid Esterase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 2006, 1760, 1071–1079. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241930077X?via%3Dihub>
- [33] Kloosterman, W. M. J.; Roest, S.; Priatna, S. R.; Stavila, E.; Loos, K. Chemo-Enzymatic Synthesis Route to Poly(GlucosylAcrylates) Using Glucosidase from Almonds. *Green Chem.* 2014, 16, 1837–1846. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/GC/C3GC41115J>



## Izjava o izvornosti

Ja Barbara Šarić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Handwritten signature of Barbara Šarić in blue ink.

---

Vlastoručni potpis