



FKITMCMXIX

Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije



# Reaktori i bioreaktori Biokataliza

Izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

# Biokataliza

ili mikroheterogena kataliza je teorija o djelovanju biokatalizatora.

Biokatalizatori su enzimi, organske makromolekule - globularni proteini organizirani u četiri strukturalna nivoa, koji nastaju u živoj stanici.

Djeluju pri blagim uvjetima tlaka i temperature.

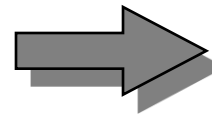
# Biokatalizatori

- *Biokatalizatori su enzimi, proteini posebne prostorne, koja djeluje kao katalizator*
- *Nastaju u živim stanicama*



„Zašto su enzimi tako velike molekule?”

Veličina im je minimalno potrebna da bi se dobila jedinstvena trodimenzionalna struktura

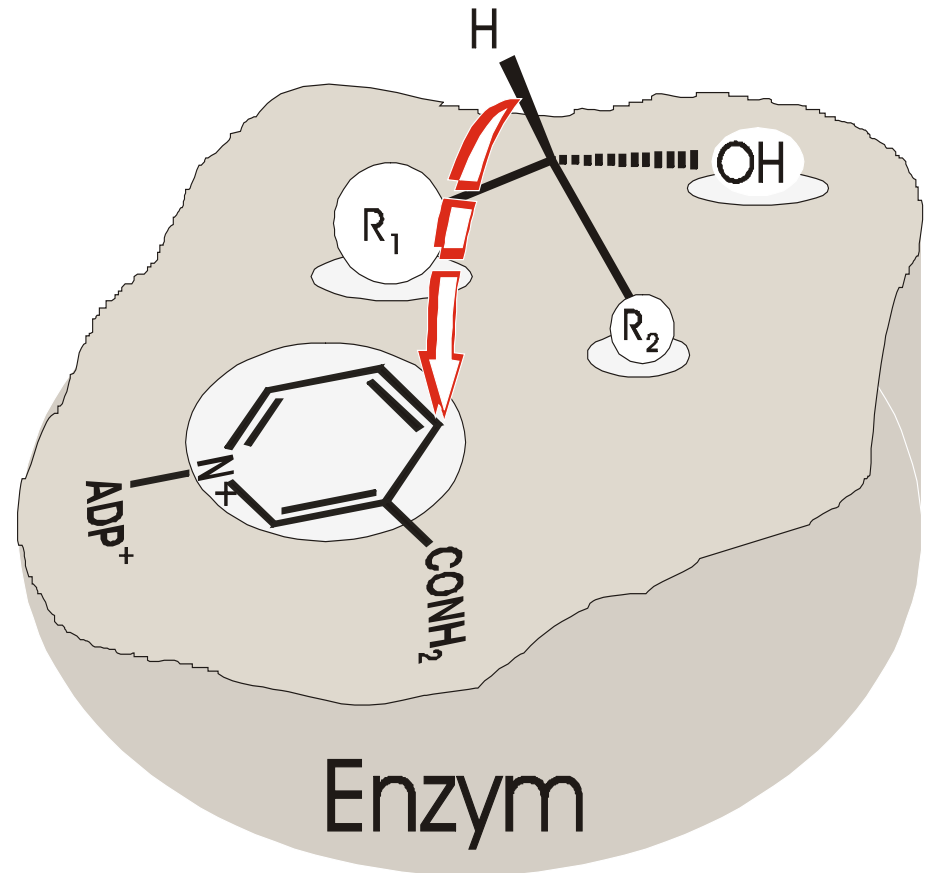


Vjeruje se da postoji oko 25 000 enzima

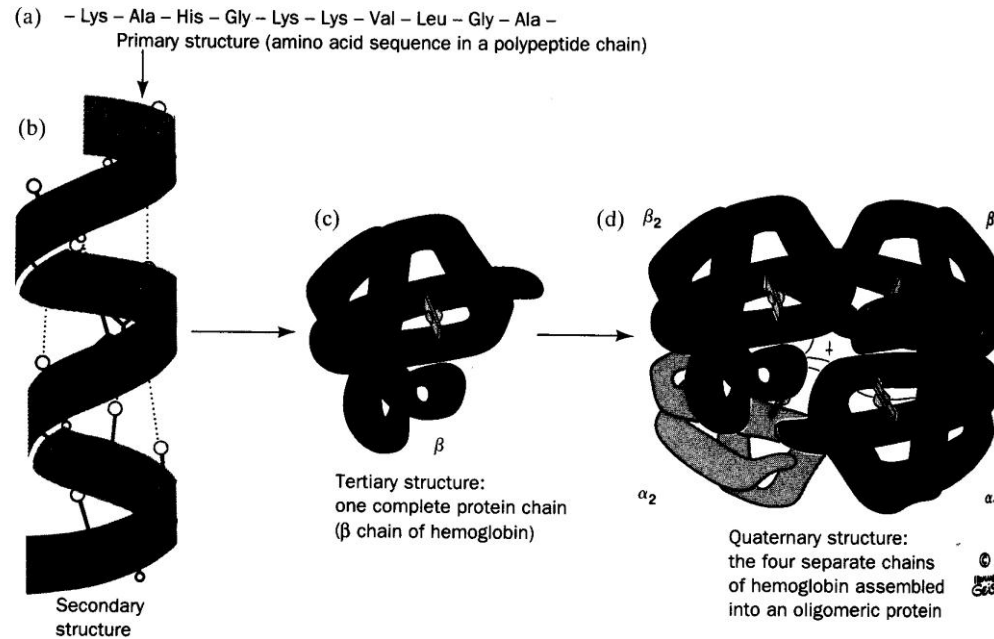
# ‘Three-point-attachment model’

Enzimi su proteini, linearni lanci od preko stotine aminokiselina koji čine jedinstvenu i dobro definiranu trodimenzionalnu strukturu.

Enzim je definiran **jedinstvenim slijedom aminokiselina** koji je definiran DNA kodom organizma (genima) unutar stanica. **Promjenom slijeda aminokiselina se mijenja funkcija enzima.**



# Struktura proteina



**Figure 19.5** The structure of proteins. (a) Primary structure, (b) Secondary structure, (c) Tertiary structure, (d) Quaternary structure. (Figure copyrighted © by Irving Geis.)

**Enzimi su velike proteinske molekule.**

**Proteini sadrže ugljik, vodik i kisik (i sumpor).**

**Prirodni polimeri koji nastaju kondenzacijom monomernih blokova koji čine aminokiseline i organizirani su u četiri strukturalna nivoa.**

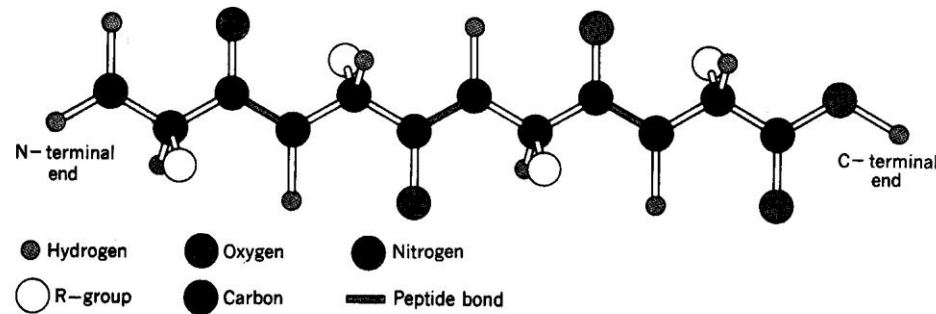
# Primarna struktura

$\alpha$ -aminokiseline povezane peptidnim vezama u **peptidni lanac** – kratki kondenzacijski lanci čija je dimenzija poznata

Niz aminokiselina povezanih određenim redoslijedom – promijenimo li redoslijed, mijenjamo strukturu, pa i funkciju biokatalizatora

Npr. glicin, alanin, fenilalanin...

20 prirodnih aminokiselina



**Figure 19.6** Polypeptide chain containing four amino acids joined by peptide bonds. The end of the molecule with the free amino group is the N-terminal end; the end with the free carboxyl group is the C-terminal end.

# Sekundarna struktura

Peptidni lanci se međusobno savijaju u **spirale (spiralni lanci - uzvojnica)** pri čemu dolazi do formiranja vodikovih veza između karbonilnih i amidnih grupa peptida koji se na taj način stabiliziraju.

C=O i NH skupine su međusobno raspoređene jedna nasuprot drugoj.

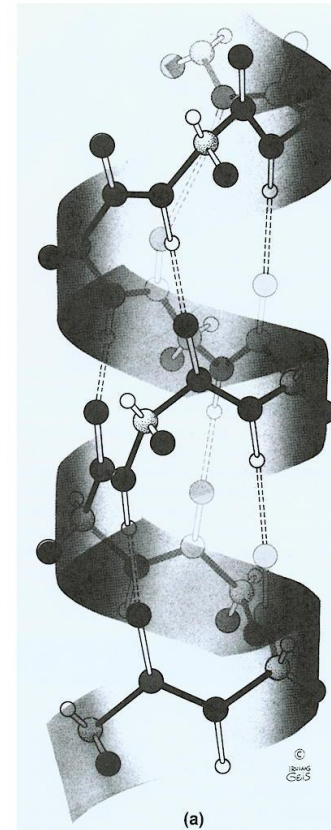
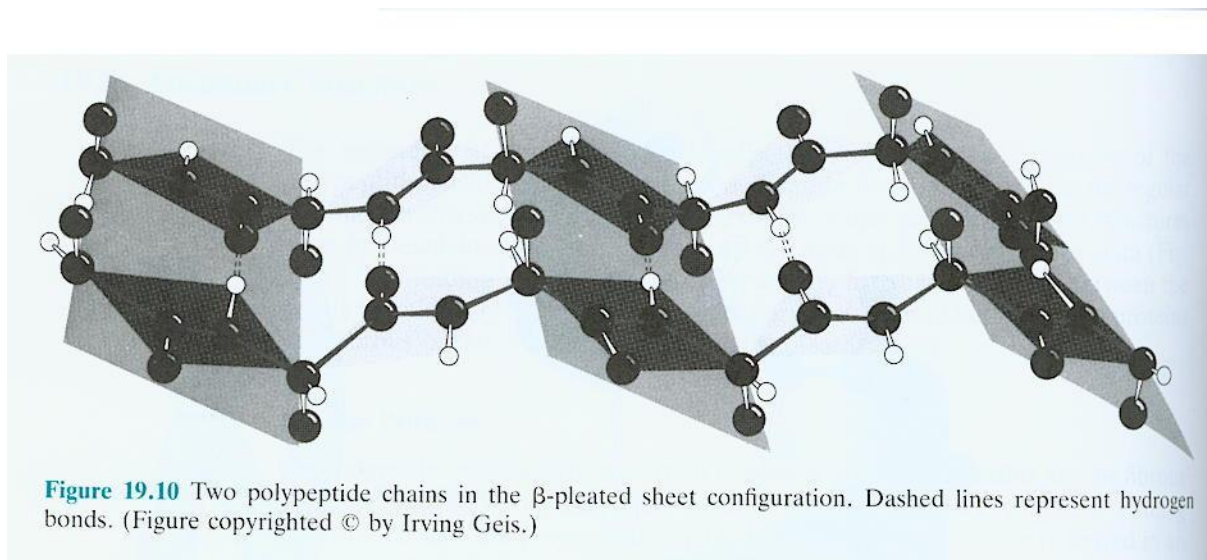


Figure 19.9 (a) Polypeptide chain in an  $\alpha$ -helix configuration. The amino acids are coiled in a manner resembling a circular staircase, with loops held together by hydrogen bonds. (Figure copyrighted © by Irving Geis.)

# Sekundarna struktura

**NABRANA STRUKTURA.** Peptidni lanci se međusobno nabiraju u ravnini pri čemu dolazi do formiranja vodikovih veza između karbonilnih i amidnih grupa peptida koji se na taj način stabiliziraju.



*Nabrana struktura*



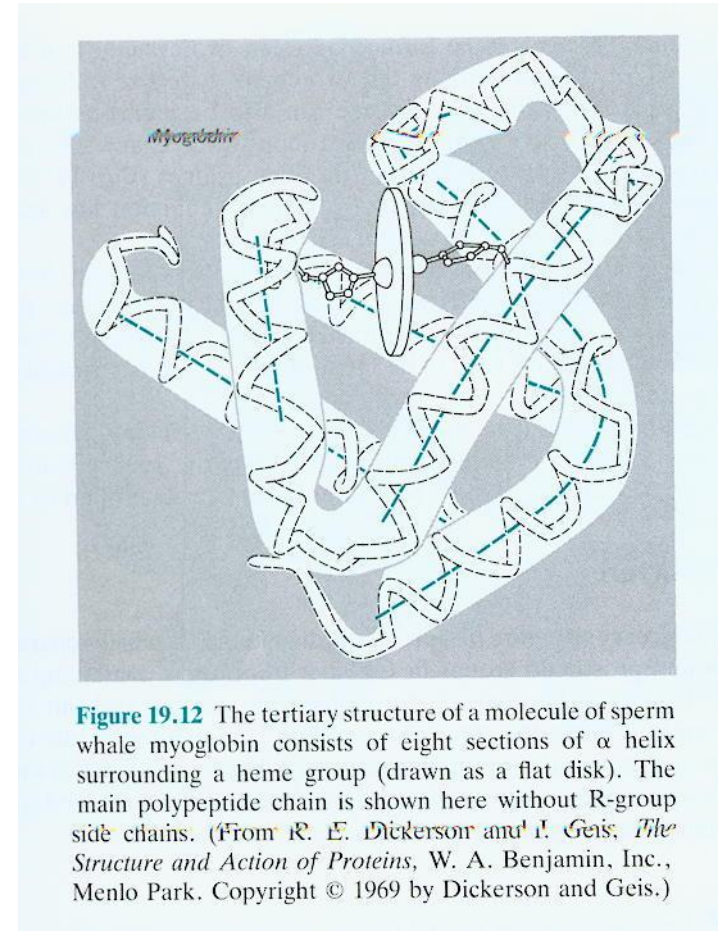
# Tercijarna struktura

## FIBRILNA STRUKTURA

Nastaje daljnjim preklapanjem peptidnih lanaca koji se na taj način stabiliziraju.

Uzvojnice se međusobno povezuju kovalentnim vezama, te se spiralno uvijaju. Od ovakvih se proteinskih vlakana tvore molekularni agregati.

Globularni proteini.

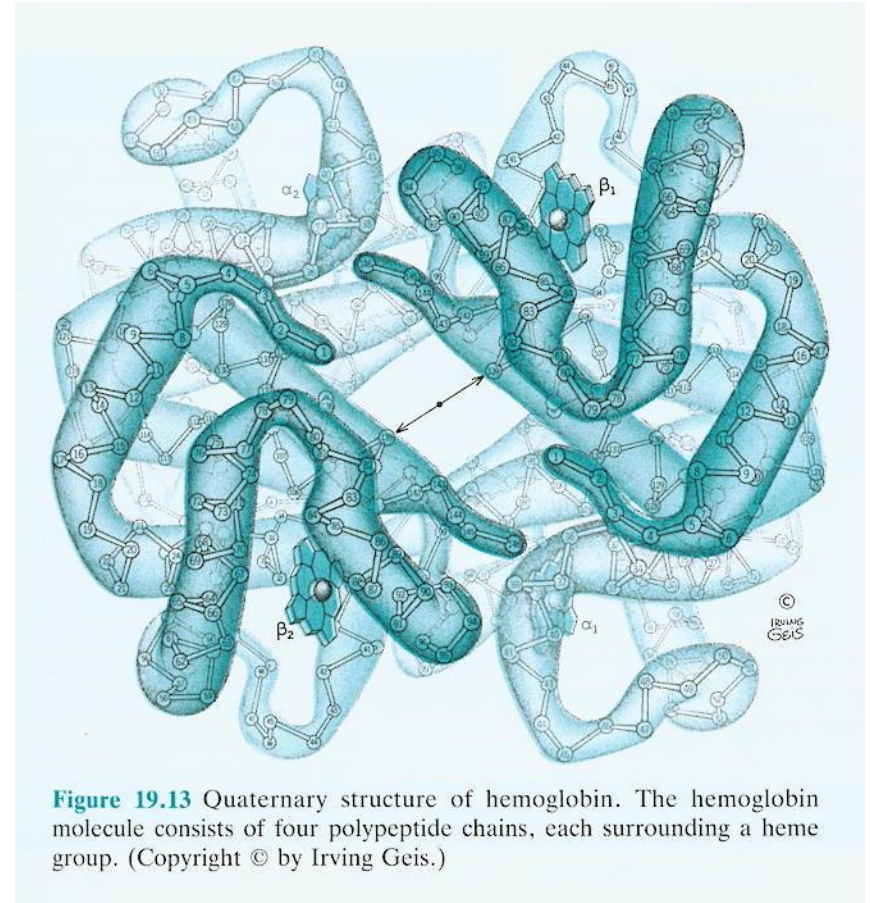


# Kvartarna struktura

Nastaje spajanjem peptidnih lanaca u veće aglomerate i dolazi do formiranja -S-S- veza (disulfidni mostovi) i sekundarnih valencijskih veza koje tu strukturu stabiliziraju.

Globularni proteini.

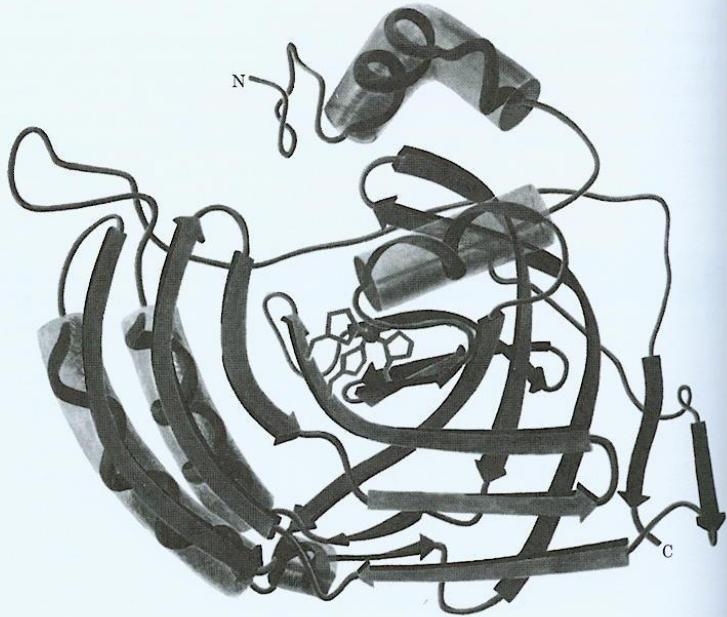
Proteini ovakve strukture čine najbolje katalizatore.



**Figure 19.13** Quaternary structure of hemoglobin. The hemoglobin molecule consists of four polypeptide chains, each surrounding a heme group. (Copyright © by Irving Geis.)

# Struktura biokatalizatora

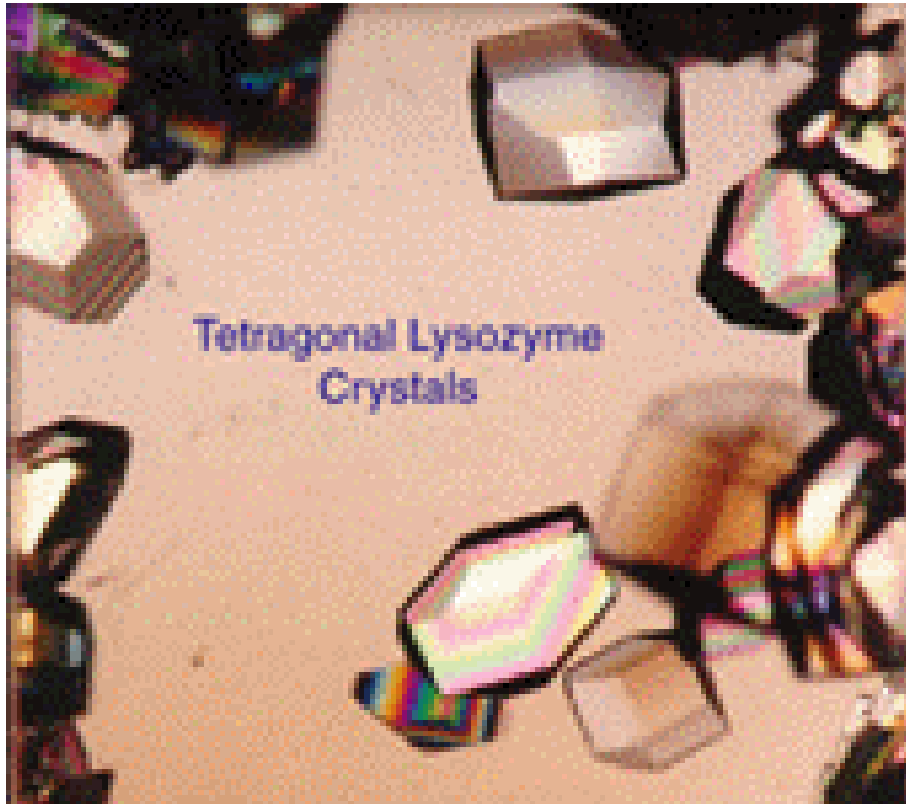
Na osnovu ovih prikaza strukture proteinske molekule može se dati pobliža definicija enzima koja glasi: **Enzimi su globularni proteini nastali u živoj stanici u kojoj kataliziraju biokemijske reakcije vezane za život.**



**Figure 19.11** Model of the enzyme carbonic anhydrase. The  $\alpha$ -helix portions of the molecule are represented by cylinders and the  $\beta$ -pleated sheet by arrows. The ball in the middle is a  $Zn^{2+}$  ion. Reprinted with permission from John Wiley & Sons, Inc. From Voet and Voet, *Biochemistry*, copyright © 1990. (After Kannan, K. K., Liljas, A., Waara, I., Bergsten, P.-C., Lovgren, S., Strandberg, B., Bengtsson, J., Carlbom, U., Friedborg, K., Jarup, L. and Petef, M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **36**, 221 (1971).

- Struktura se prikazuje se modelima proteinske molekule
- Proteinska kemija
- Sekvencioniranje proteina do manjih strukturnih jedinica - omogućuje uvid u strukturu proteina
- Imena enzima prema reakciji koju kataliziraju i imaju nastavak –aza. Tako su npr. enzimi koji sudjeluju u reakcijama oksidacije – oksidaze, redukcije – reduktaze, izomerizacije – izomeraze.

# Struktura biokatalizatora



Kristalna struktura biokatalizatora – razlikovanje proteina.

Prvi aktivni enzim je ekstrahirao Büchner iz žive stanice i pokazao da ovi biokatalizatori mogu zadržati svoje katalitičko djelovanje i izvan žive stanice.

1926 je Sumner uspješno izolirao prvi potpuno čisti enzim i dokazao da je on po strukturi i kemijskom sastavu protein.

Od Sumnerovog je doba do danas otkriveno i dobro poznato oko 1500 enzima.



# Struktura biokatalizatora

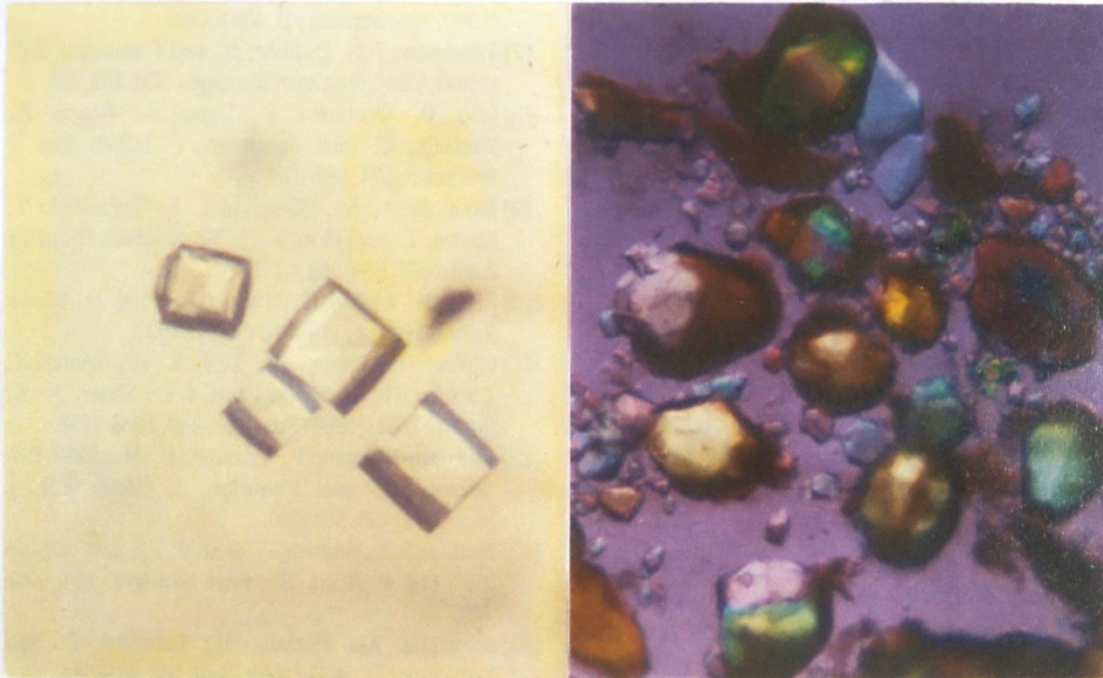


Figure 2: Crystals of type II aldolase.  
a) The apoenzyme from *Bacillus stearothermophilus*.

b) The zinc containing enzyme from *E. coli*.

**Vrlo često se u strukturi proteina nalaze metali koji su neophodni za aktivnost takvog biokatalizatora.**

**Zato i ljudi moraju uzimati u hrani određenu količinu metala u svojoj prehrani (minerali) jer ukoliko enzim treba metal u svojoj strukturi, a nema ga, neće biti aktivan. Takvi enzimi se zovu **metaloenzimi**, a metal **kofaktor**.**

# Struktura biokatalizatora

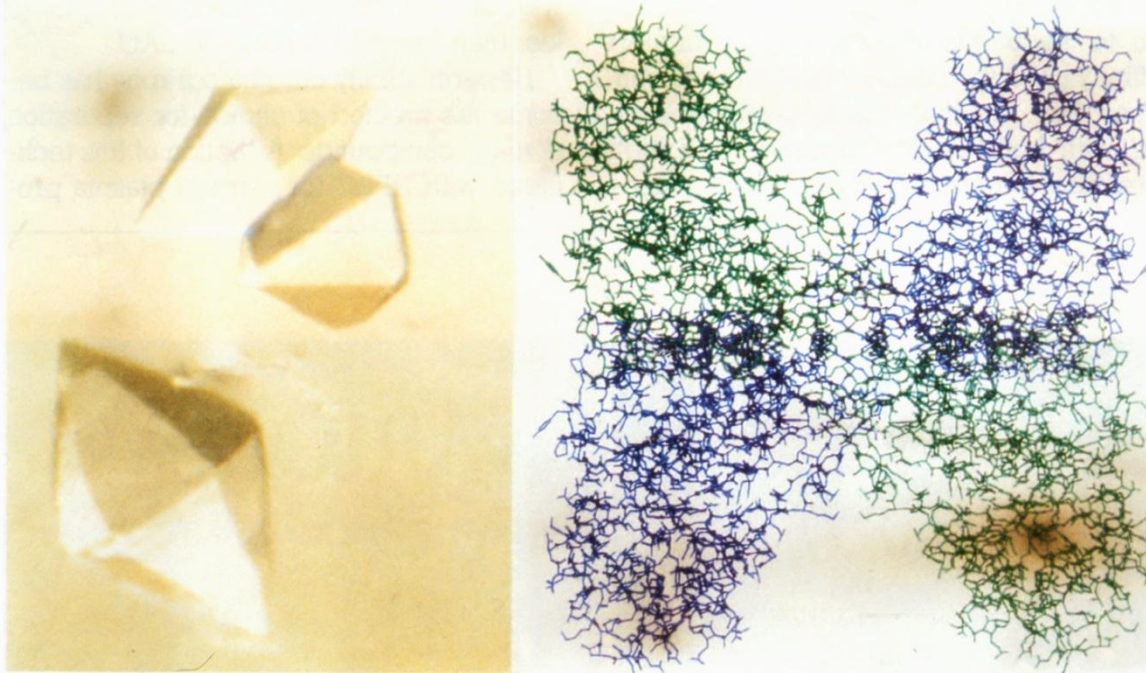
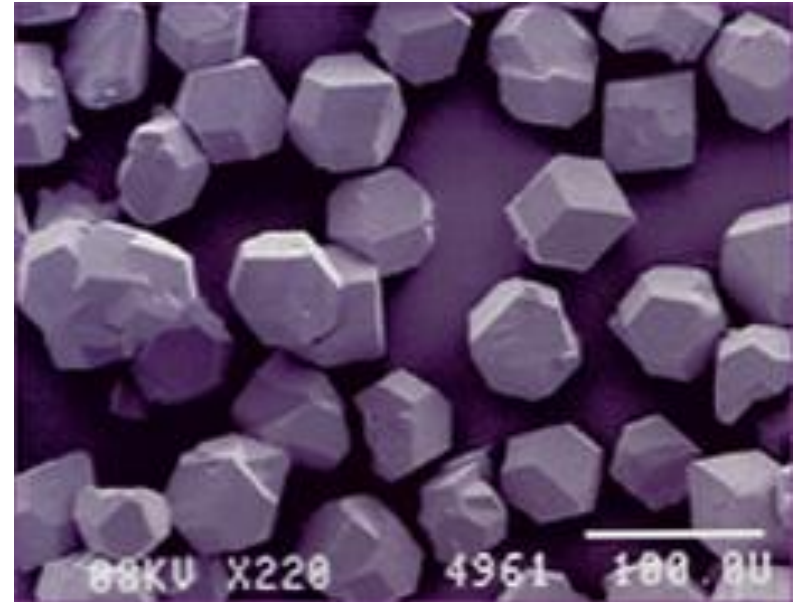
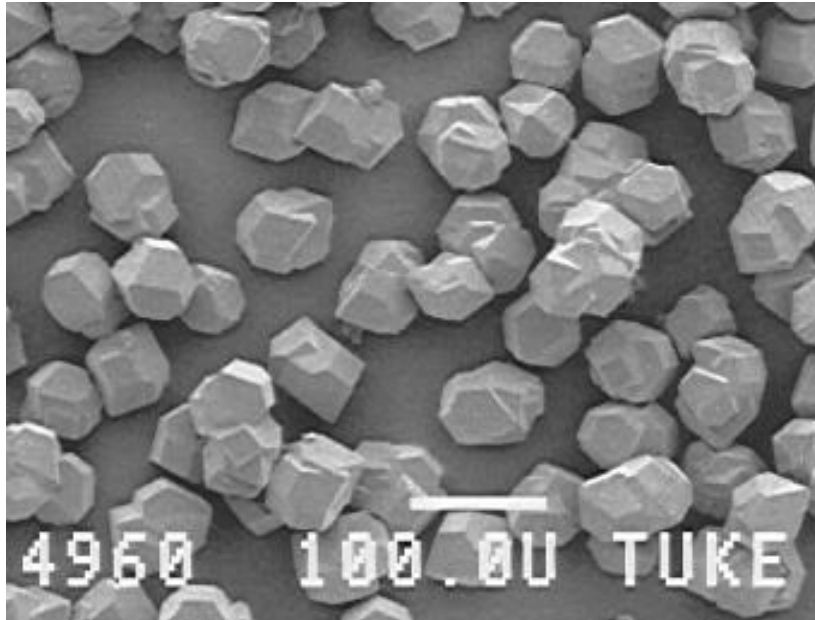


Figure 1: Human aldolase.  
a) Type I Hexagonal crystals grown from ammonium sulphate. The smallest crystal dimension is approximately 0.5mm.

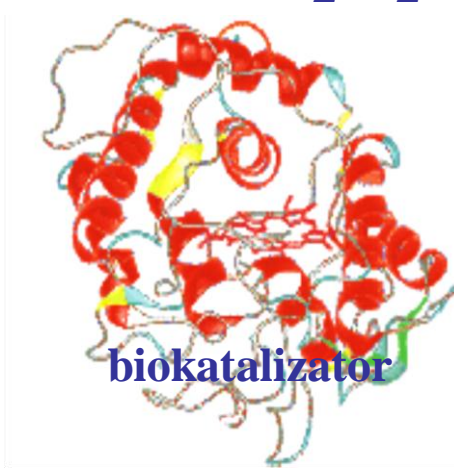
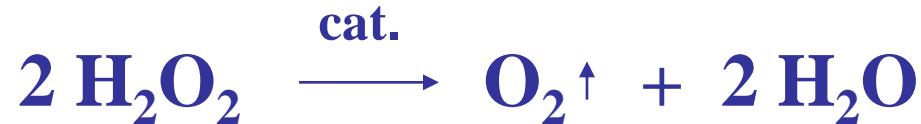
b) The tetrameric human aldolase structure as determined at 3Å resolution. Different colours have been used only to emphasise the subunit boundaries.

# Struktura biokatalizatora



Umreženi kristali glukoza izomeraze slikani elektronskim mikroskopom. Prosječna veličina ovih kristala je 86 nm. Mogu se koristiti kod kiralnih separacija – razdvajanja enantiomera ili kao **imobilizirani** enzimi u reaktoru sa nepokretnim slojem ili u fluidizirajućem sloju. Umreženi enzim je netopljiv, ali zadržava aktivnost .

# Katalitička razgradnja $\text{H}_2\text{O}_2$



catalase [EC 1.11.1.6]  
240 000 g/mol

$\text{MnO}_2$

kemijski katalizator

$\text{MnO}_2$   
87 g/mol

Enzimi su poput drugih katalizatora – kataliziraju određenu reakciju.

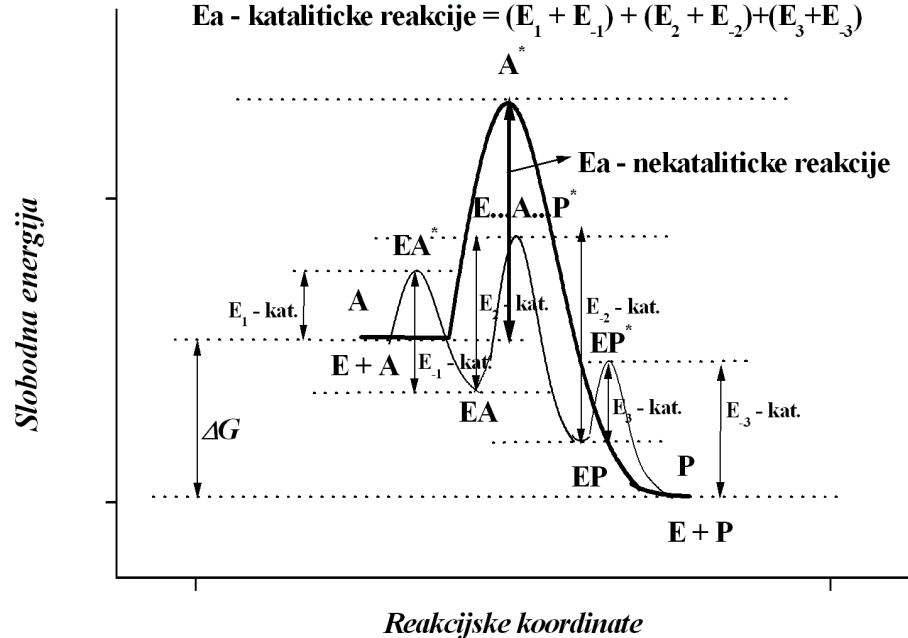
Mehanizam enzimski katalizirane reakcije je često različit od mehanizma nekatalitičke reakcije.



# Teorija biokatalize

$E_a$  - katalitičke reakcije <  $E_a$  nekatalitičke reakcije

$$E_a \text{ - katalitičke reakcije} = (E_1 + E_{-1}) + (E_2 + E_{-2}) + (E_3 + E_{-3})$$

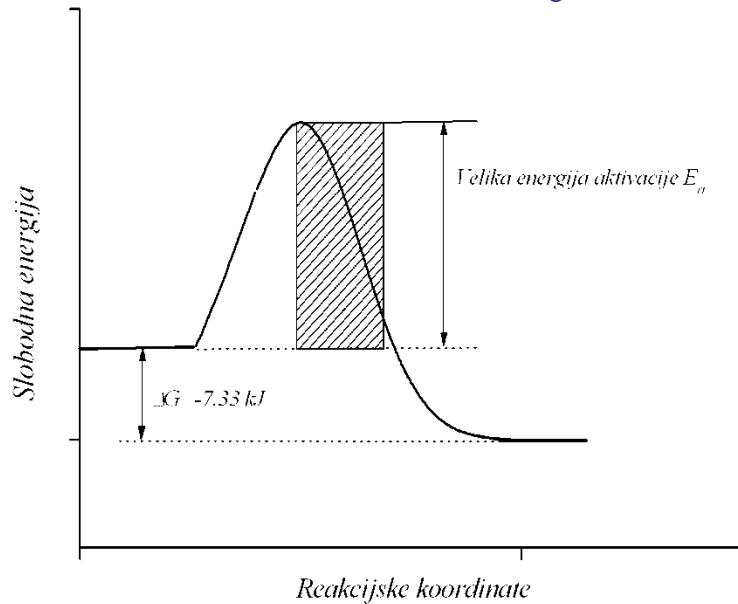


Enzimi ubrzavaju reakciju i do  $10^{20}$  puta. Osnovna teorija o djelovanju biokatalizatora se ne razlikuje od teorije o djelovanju katalizatora. Teorija biokatalize pretpostavlja postojanje **međuspoja enzim-reaktant**. Postojanje ovog spoja je dokazano nizom eksperimentalnih istraživanja kao što su rendgenska analiza, spektroskopija i elektron spin rezonancija. Reaktant se veže na specifični dio proteinske molekule enzima koje se zove **aktivno mjesto**, a koje se sastoji od **veznog dijela** (aktivne grupe aminokiselina preko

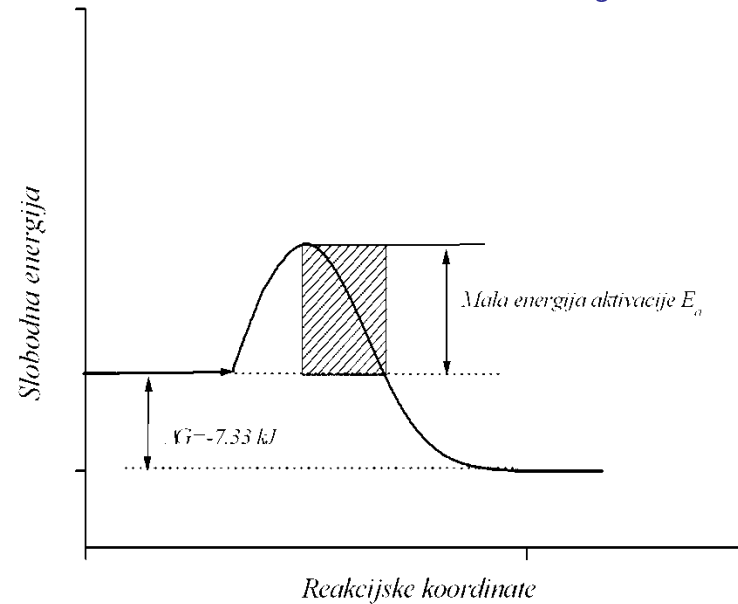
kojih dolazi do vezanja reaktanta na molekulu proteina) i **katalitičkog dijela** (aktivne grupe aminokiselina koje prenose vodik). Da bi se reaktant mogao vezati na aktivno mjesto, prostorna struktura tog dijela proteinske molekule i molekule reaktanta moraju si međusobno odgovarati kao brava i ključ. Nakon nastajanja međuspoja u biokatalizi dolazi do prijelaza protona s molekule reaktanta na molekulu enzima, pa je biokataliza u osnovi kiselobazna kataliza.

# Teorija biokatalize

## Nekatalitička reakcija



## Katalitička reakcija



## Specifičnosti biokatalizatora u odnosu na klasične kemijske katalizatore

Biokatalizatori mogu imati više aktivnih centara.

Selektivni su – pretvorba supstrata određene prostorne strukture u produkt

Neki od njih trebaju kofaktore (metali ili veće organske molekule kao npr.  $\text{NAD}^+$ )

Često su nestabilni izvan prirodnog okruženja

Drugi reakcijski put nego kod nekatalitičke reakcije

# Teorija biokatalize

➤ **Formiranje međukompleksa – prijelaz protona ( $10^8$  x)**

➤ **Utjecaj konfiguracije enzimske molekule**

- **efekt približavanja – dovođenje u blizinu reaktivnih (veznih) grupa i katalitičkog centra**
- **efekt površine – opada polarnost otapala u blizini površine enzima  $\Rightarrow$  desolvatizacija molekula reaktanta (lakše približavanje).**
- **deformacije molekula reaktanta i enzima ( $10^{20}$ ) – molekula reaktanta i protein se prilagođavaju jedan drugom**

# Teorija biokatalize

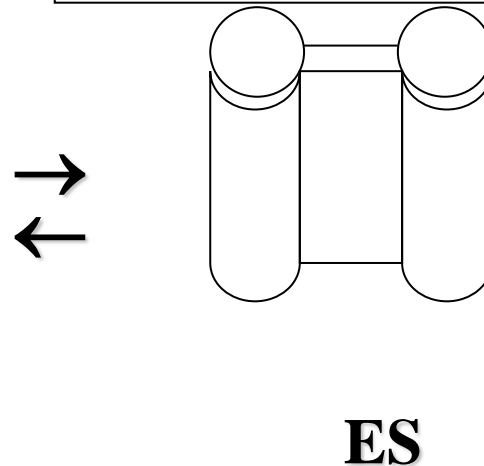
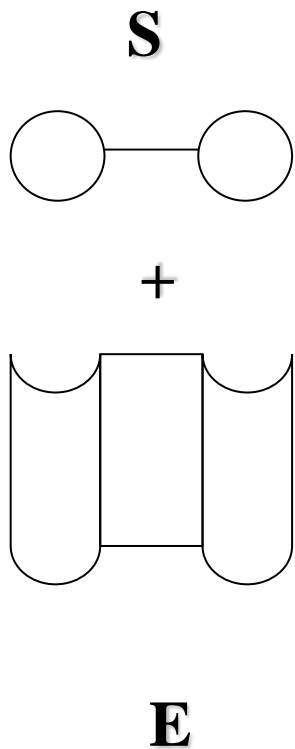
## 1. Teorija brave i ključa – E. Fischer

Promatrao molekule proteina kao kemijsku strukturu

## 2. Teorija prilagođavanja – D. E. Koshland

## 3. Teorija deformacije – W. P. Jencks

Koshland i Jencks proširili Fisherovu teoriju. Zaključili da se molekule proteina mijenjaju u interakciji sa supstratom.

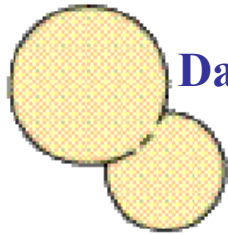


# Biokataliza

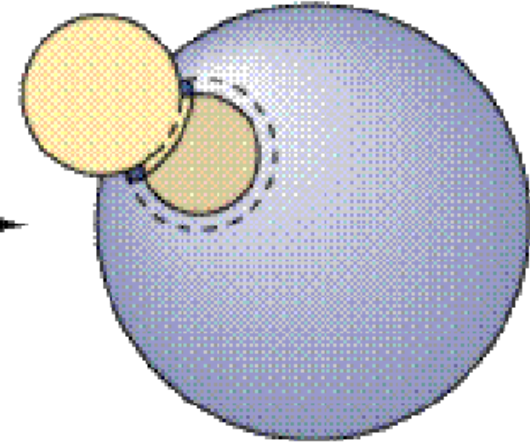
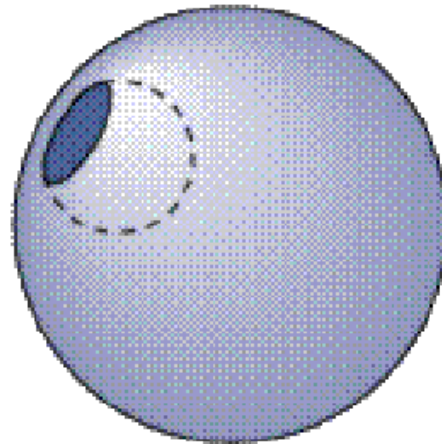
Supstrat

Enzim

Kompleks Enzim-Supstrat



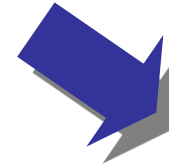
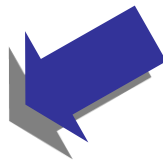
Da bi došlo do reakcije, biokatalizator mora imati afinitet prema supstratu.



Supstrat se veže na aktivno mjesto enzima i pri tome dolazi do promjena u razmještanju elektrona u kemijskim vezama. Te promjene dovode reakcija koje kao posljedicu imaju nastanak produkata. Produkti se oslobađaju s enzima i on je spreman za sljedeći katalitički ciklus. Prema ranom modelu brave i ključa Fischer je 1894. aktivno mjesto na proteinu ima jedinstveni geometrijski oblik koji je komplementaran geometrijskom obliku supstrata, pa tako supstrat odgovara aktivnom mjestu. Iako istraživanja iz 2004 godine potvrđuju ovu teoriju, ovaj model ne može objasniti mnoge eksperimentalne dokaze enzimske biokatalize. Kasnije je Koshland (1958) predložio novu teoriju odnosno proširio Fisherovu s teorijom prilagođavanja ("induced fit") prema kojoj supstrat uzrokuje promjenu u konformaciji enzima nakon što se veže na aktivno mjesto. Na taj se način katalitičke grupe mogu orijentirati na način da olakšaju reakciju. 1969 je Jencks dao svoju teoriju defomacije.

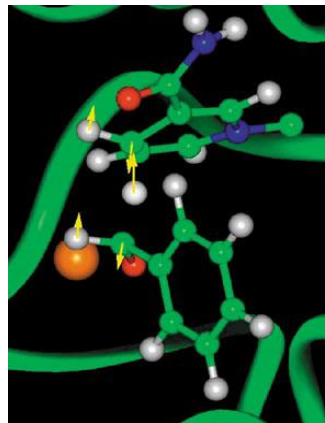
# Teorija biokatalize

## Aktivni Centar 20 aminokiselina



- Vezni  
reaktivni lanci aminokiselina na koje se vežu molekule reaktanata, nastalog prijelaznog kompleksa i molekule produkta

- Katalitički  
grupe aminokiselina koje su uključene u mehanizam biokatalize (prijenos protona) (ionizirajuće grupe:  $\beta$ -karboksilna,  $\gamma$ -karboksilna, hidroksilna, imidazolna itd.)



Simulation shows the benzyl alcoholate substrate transferring a hydride ion from the donor carbon atom to the acceptor carbon on NAD<sup>+</sup>.

# Biokataliza

- ✓ **Biokatalizatori (enzimi) poznati već u Antici (alkoholno vrenje, kiseljenje mlijeka, pravljenje sira).**
- ✓ **1811. god. G.S.C. Kirchoff pokušava objasniti enzimske reakcije i svojstva enzima**
- ✓ **1838. god. je J.J. Berzelius dao tumačenje fermentacije alkohola kao katalitičkog procesa ⇒ Teorija biokatalize (enzimske katalize)**
- ✓ **1878. god. R. Kühne daje fermentima ime “enzyme” od grčke riječi “en-zyme” što znači “u kvascu”**
- ✓ **1894. god. E. Fischer daje teoriju “brave i ključa”**
- ✓ **1897. god. E. Büchner je izolirao prvi aktivni enzim i pokazao da je aktivan i izvan žive stanice**
- ✓ **1968. god. B. Gutte i R. Hirschman su izveli prvu sintezu enzima.**

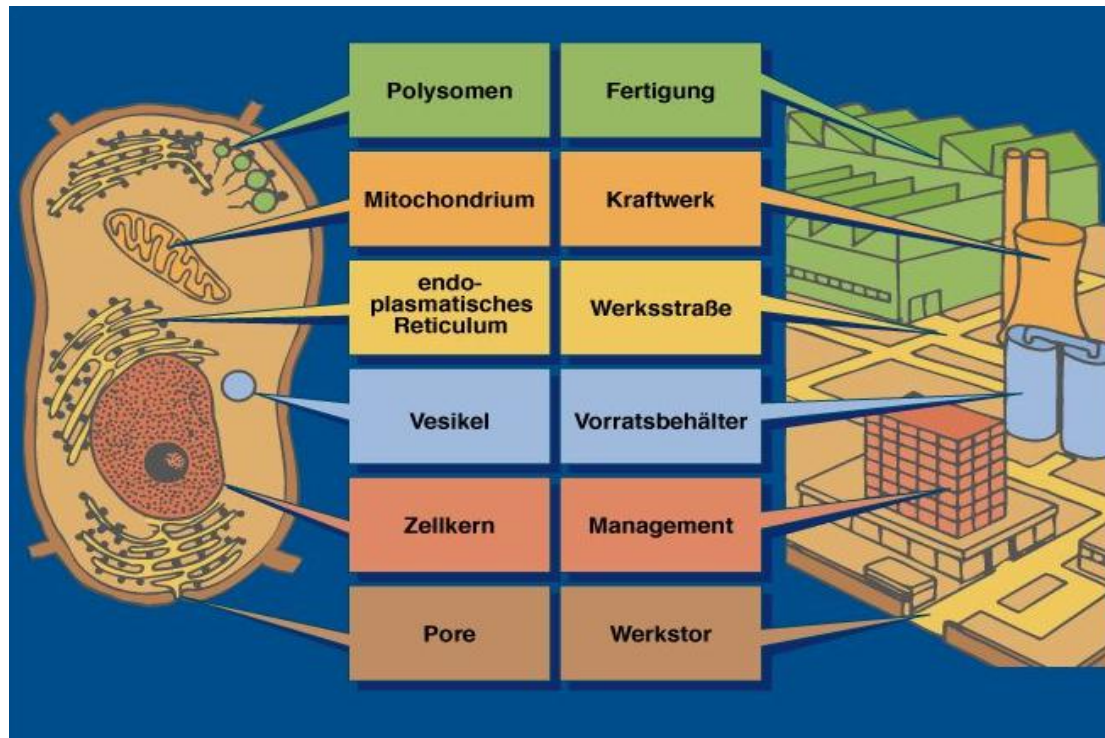
# Kako proizvesti biokatalizatore?

- *Mogu li se sintetizirati ?*      **NE**
- (teorijski je moguće, no iskorištenja u procesu su vrlo niska; Seebach je pokazao vrlo uspješnu sintezu proteina; aktivnost takvog proteina upitna, sinteza nije ekonomski opravdana)
- *Enzime sintetiziraju žive stanice životinja, biljaka ili mikroorganizama, upotrebljavajući gen za sintezu proteina.*
- Enzimi mogu biti intracelularni (unutarstanični) i ekstracelularni (vanstanični)



# Kako proizvesti biokatalizatore?

- Živa stanica je mala tvornica !

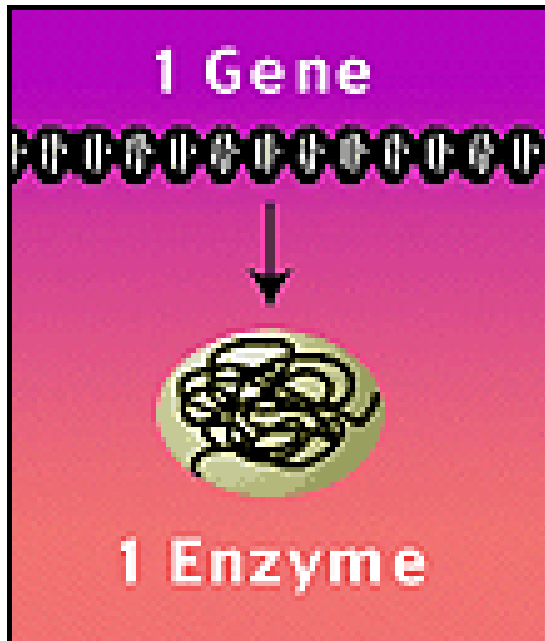


# Kako proizvesti biokatalizatore?

- Jedan gen jedan enzim – teza za koju je dobivena

## Nobelova nagrada

**The One Gene/One Enzyme Hypothesis- Beadle and Tatum's 1941**



Ako gen ključan za proizvodnju jednog enzima prebacimo iz jednog mikroorganizma u drugi, drugi će mikroorganizam početi proizvoditi taj enzim. **GENETIČKO INŽENJERSTVO** – omogućava proizvodnju enzima u većim koncentracijama.

Otkriće je omogućilo i razvoj liječenja genetskih bolesti – ako u stanici nedostaje gen za sintezu pojedinog enzima, tada nedostaje neka biokemijska reakcija u nizu metaboličkih procesa te dolazi do bolesti.

# Koliko enzima možemo dobiti iz stanica?

*Koncentracija enzima u živim stanicama je niska jer su enzimi vrlo aktivni.*

- za 1 g of enzima trebamo:



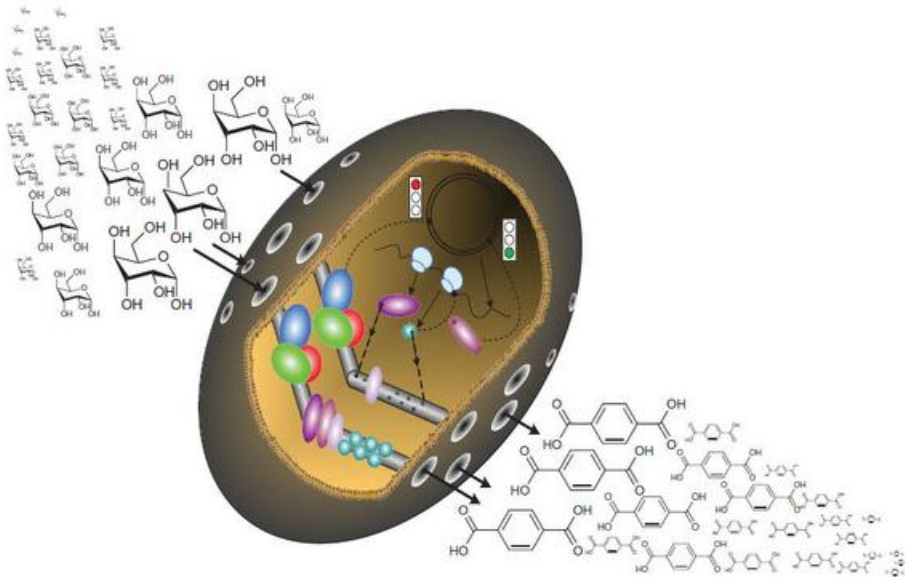
**100 kg biljnog materijala** **10 kg životinjskog tkiva** **1 kg biomase mikroorg.**  
(20 L bioreaktor)

obnovljivi izvori

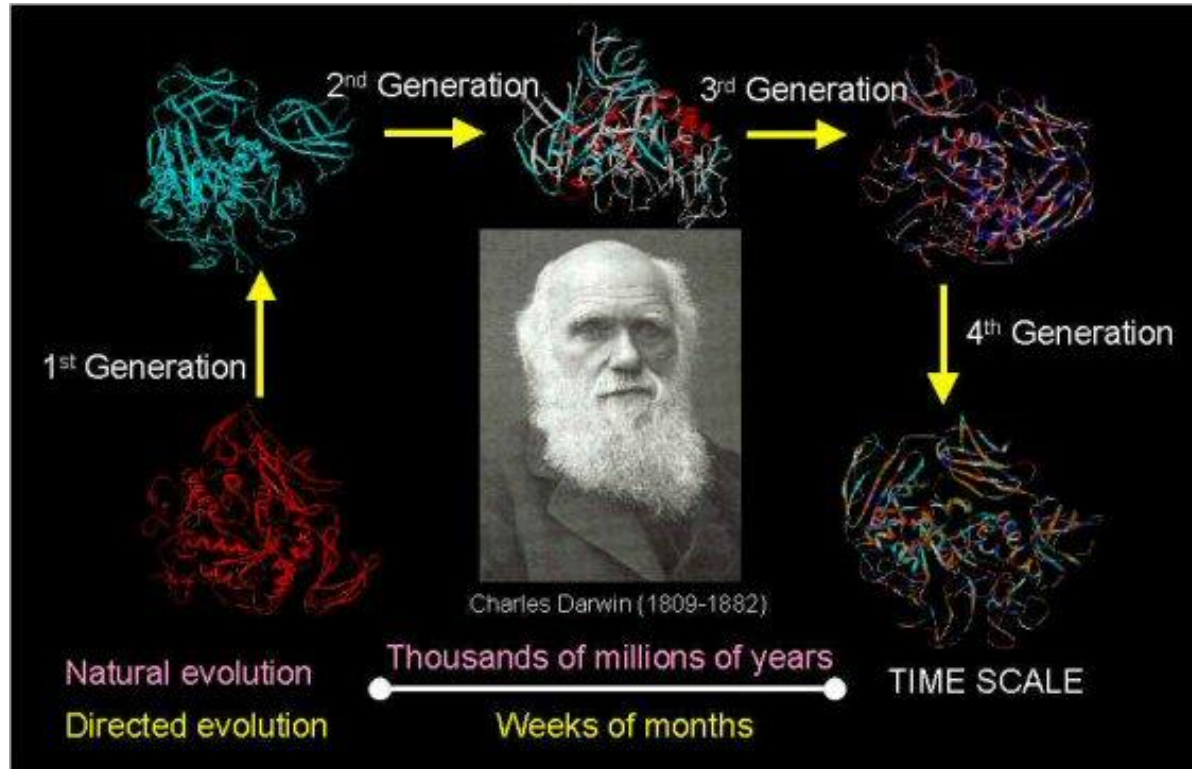
# Biokatalizatori

Rekombinantna DNA tehnika je dramatično promijenila proizvodnju enzima.

- *Moguće je povećati koncentraciju proteina-enzima u stanici i do 30 – 50 % npr. u E. coli*
- *Moguće je poboljšati značajke i svojstva enzima*
- *5-10 godišnji period za klasični razvoj enzima je smanjen na 1-2 godine.*



# Usmjerena evolucija (Directed evolution): Kreiranje biokatalizatora

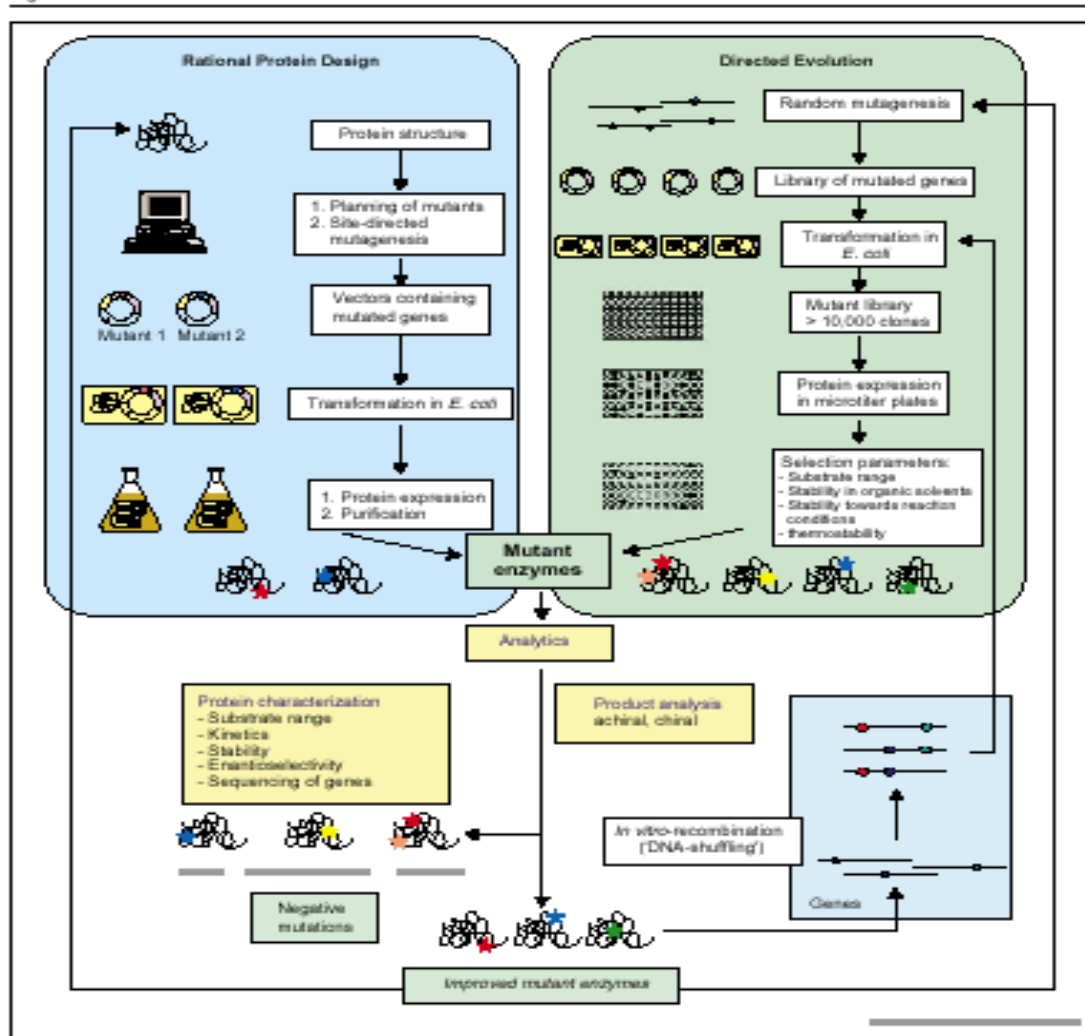


Temelji se na teoriji prirodne evolucije koja kaže da se nakon svake generacije događaju promjene na genima. Genetičari izazivaju namjerno takve promjene u epruveti u određenim uvjetima (kemikalije, zračenje ili sl.) – to se zove **usmjerena ili namjerna evolucija**. Ova se metodologija koristi za nastanak boljih biokatalizatora.



# Usporedba racionalnog dizajna proteina i usmjerene evolucije

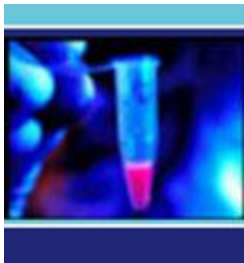
Figure 1



Metoda **racionalnog dizajna proteina** uključuje upoznavanje strukture proteina, njihovu ugradnju u stanicu te uzgoj takvih stanica. Podrazumijeva poznati slijed aminokiselina u proteinu. Novi proteini se dizajniraju kombiniranjem tj. variranjem mogućih sekvenci aminokiselina.

Bornscheuer U.T., Pohl M: „Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design“, *Curr.Opinion in Chem Biol.* 5 (2001) 137.143.

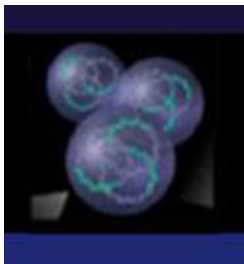
# Poboljšavanje svojstava biokatalizatora



gene isolation



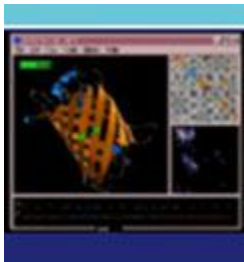
recombination



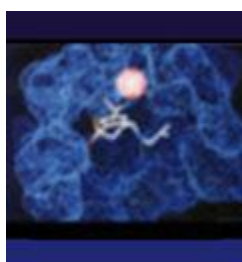
expression



protein analysis



protein design



designed protein

Shematski prikaz dizajna proteina.

Postupak se ponavlja dok se ne dođe do željenog biokatalizatora koji će biti stabilniji, specifičniji, dostupan u dovoljnoj količini i jeftin. Postupak dizajna proteina se radi u laboratoriju na velikim uređajima i velik dio posla je automatiziran.

# Poboljšavanje soja mikroorganizama

Divlji soj mikroorganizama često sadrži nisku koncentraciju enzima

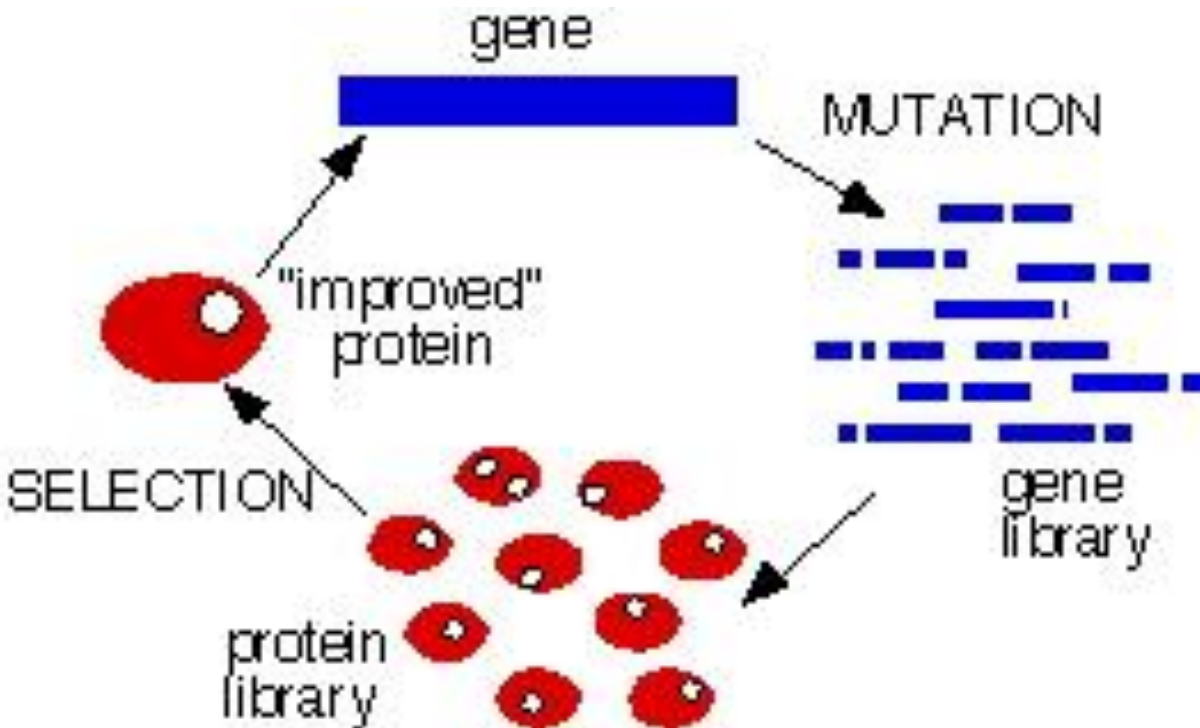
Genetskim inženjerstvom se može stvoriti novi soj rekombinantnih mikroorganizama (koji sadrži višu koncentraciju traženog enzima u stanicama)

- Klonira se strukturalni gen za željeni polipeptid te se unosi u stanicu domaćina kao što je *E. coli* – omogućava se nastajanje visoke koncentracije proteina

- Mikrobiološki proteini koji su ekspresionirani u *E. coli* čine 30 - 50 % ukupnih proteina



# Poboljšavanje svojstava biokatalizatora



Usmjerena evolucija se može provoditi u živoj stanici ili ne mora uopće uključivati stanice (in vitro). Na ovoj slici je prikazano kako to ide in vivo.

Kada nađemo gen, ugradimo ga u stanicu, a stanica mutira u umjetnim uvjetima. Vadimo nove gene, radimo knjižnicu novih gena i gledamo koja od novonastalih stanica može dati najbolji protein od te stanice u novi ciklus.

# Biocatalyst improvement

<b>Genetic Optimization of Enzymes</b>	
<b>Process</b>	<b>Required time</b>
<b>1) Screening for new enzymes from natural sources</b>	<b>more than 300 sources 1 month</b>
<b>2) Biochemical characterization</b>	<b>4 weeks</b>
<b>3) Cloning and expression</b>	<b>unknown sequence 1-3 months</b>
	<b>known DNA-sequence 1 month</b>
<b>4) Genetic optimisation and screening of the variants</b>	<b>5 - 9 months</b>

# Proizvodnja enzima

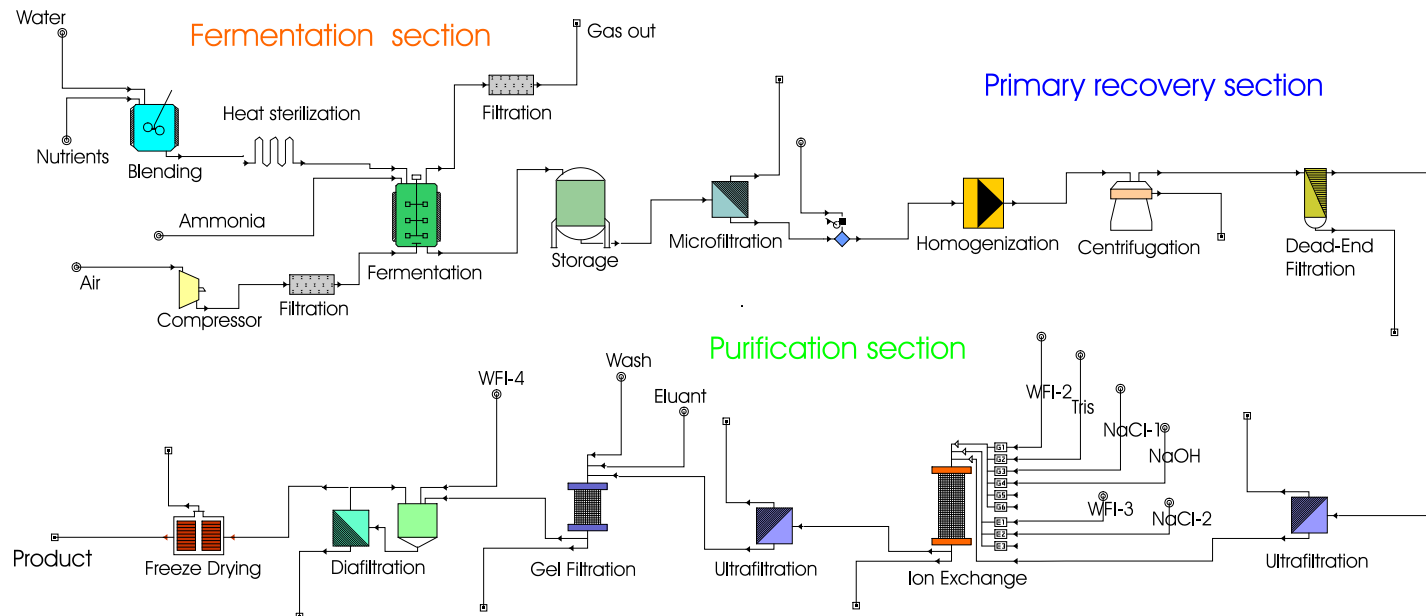
Danska tvrtka Novozyme je jedan od vodećih proizvođača enzima za široku upotrebu.

Na slici su prikazani fermentori u ovoj tvornici.



# Proizvodnja enzima

## ENZYME PRODUCTION FLOW SHEET



Tipična shema proizvodnje enzima. Visokotonažni industrijski proteini obično nisu pročišćeni. Obično se izdvajaju – ugušćuju iz fermentacijske smjese ultrafiltracijom. Enzimi za posebne svrhe moraju biti znatno bolje pročišćeni.

# Proizvodnja enzima

**Alati u proteinskom inženjerstvu**

**Metode:**

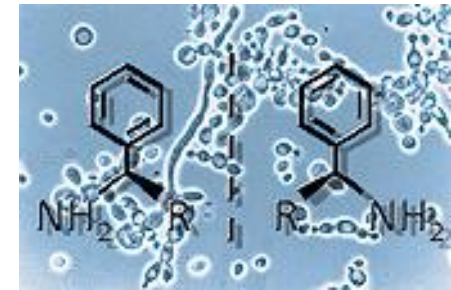
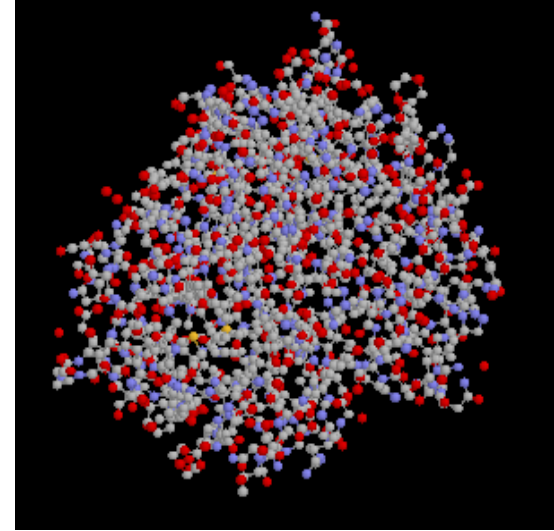
**kristalizacija, kristalografija x-zrakama i NMR za određivanje strukture proteina**

**Kompjuterske tehnike i različiti software-i za modeliranje i simulacije strukture**

**Plazmidi, sustavi ekspresioniranja, ciljana mutageneza, PCR itd za određivanje gena**

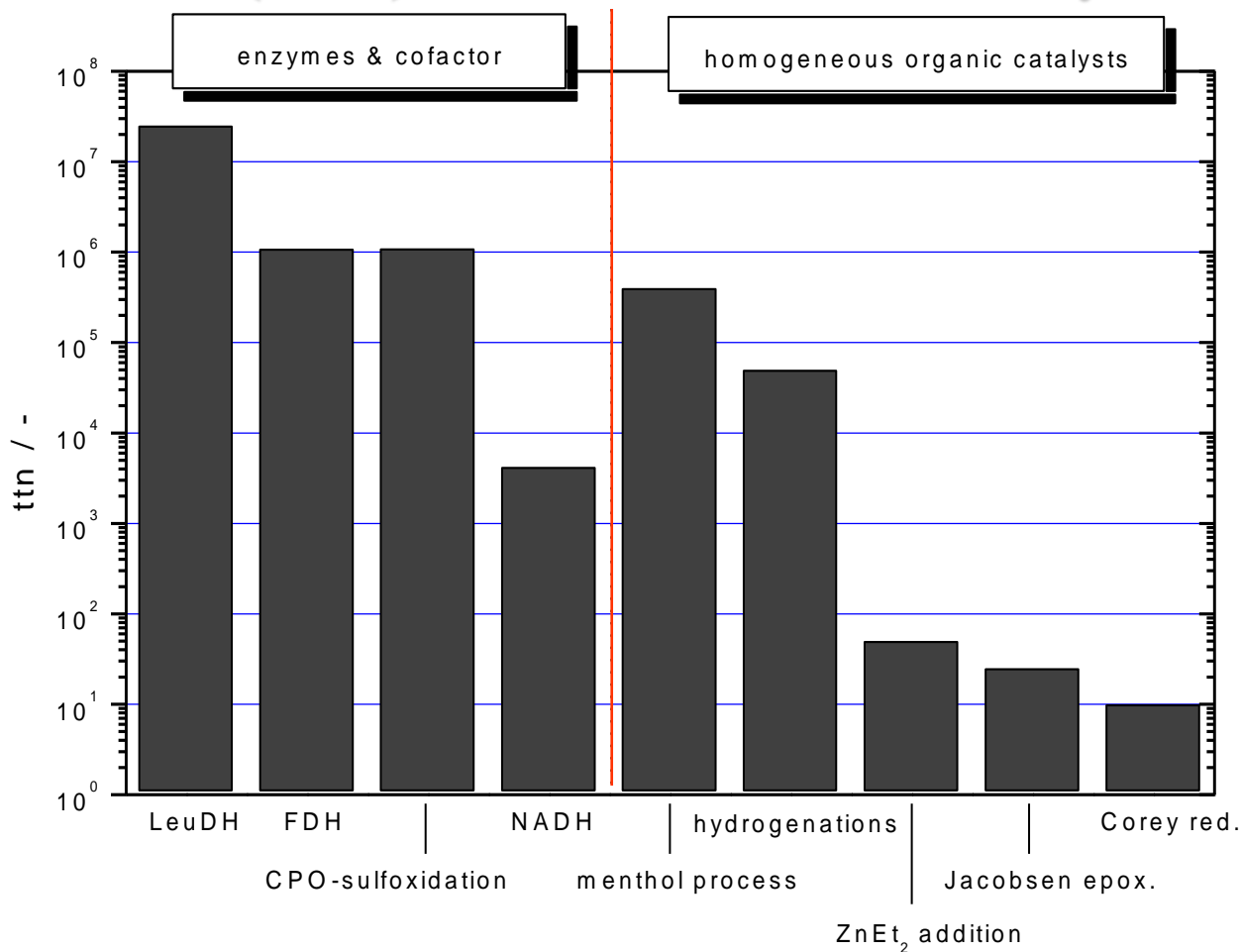
# Biokatalizatori

- **Veoma aktivni**
- **Selektivni-enantioselektivni**
- **Stereospecifični**
- **Proizvedeni iz obnovljivih izvora**
- **Djeluju u blagim uvjetima**
- **Biorazgradljivi su**
- **Enzimski procesi stvaraju malo otpada**
- **Blagi operacijski uvjeti – manje energije, manje sirovine, manje vode, manji broj procesnih stupnjeva**

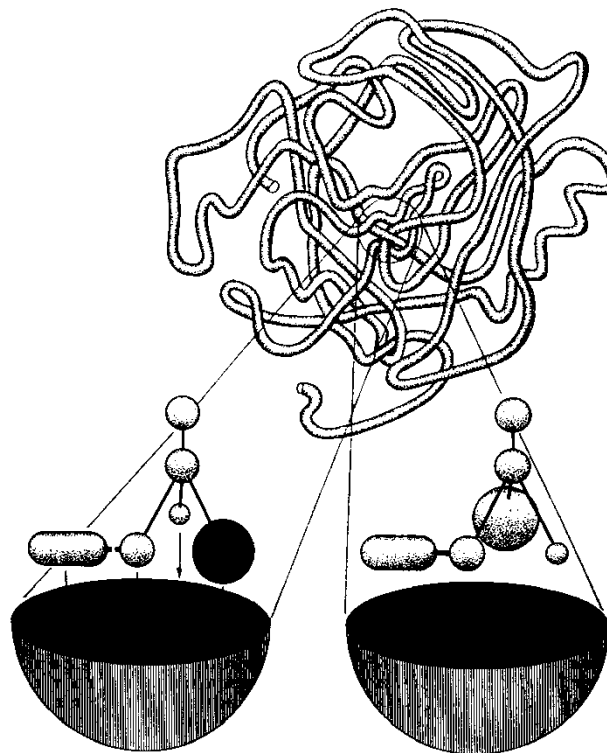
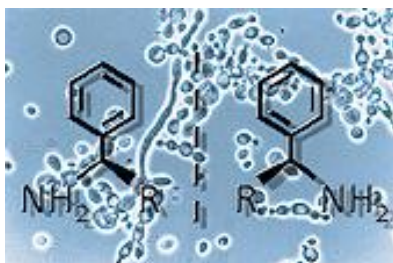
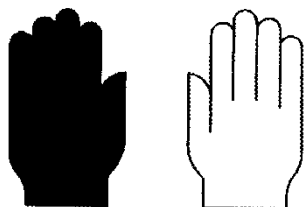
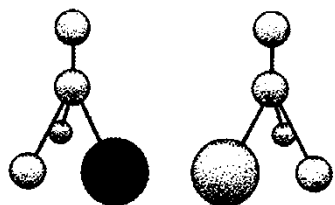


# Total Turnover Number (TTN)

$$\text{total turnover number (TTN)} = \frac{\text{mol product}}{\text{mol catalyst}}$$



# Enantioselektivnost biokatalizatora

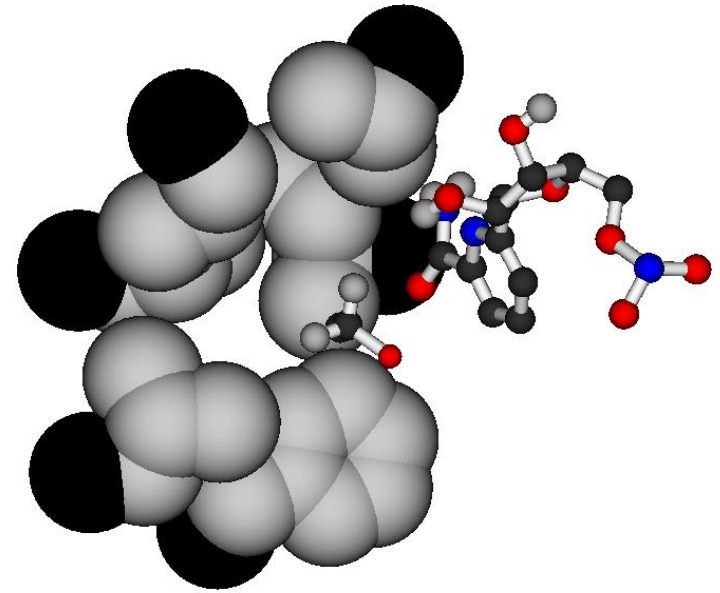
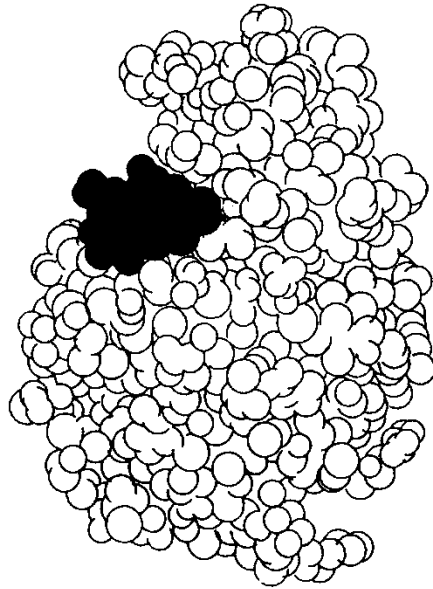
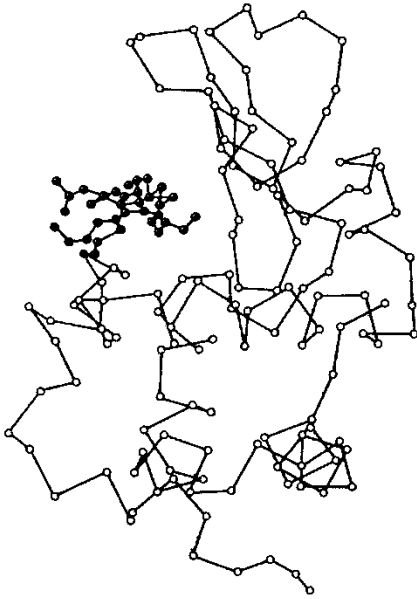


Enzimi su specifični i vrlo aktivni biokatalizatori. Enantioselektivni su. Prihvaćaju jedan oblik molekule: L ili D oblik (R ili S).

U prirodi su enzimi uglavnom prisutni u L obliku, D su uglavnom sintetski. Enantioselektivnost stavlja biokatalizatore u prvi plan. Struktura proteina (enzima) određuje enantioselektivnost.



# Stereospecifičnost biokatalizatora



**Klasični katalizatori nisu stereospecifični.**

**Biokatalizatori razlikuju cis i trans strukture molekula.**

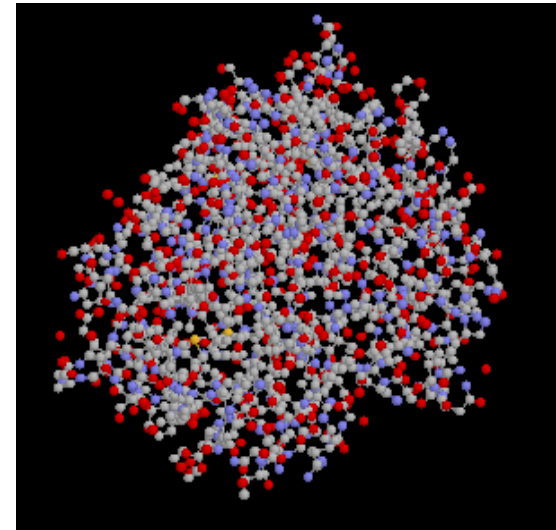
**Stereoizomeri su zanimljive molekule (lijekovi).**

**U farmaceutskoj industriji je važna čistoća produkta.**

# Prihvatljivi za okoliš

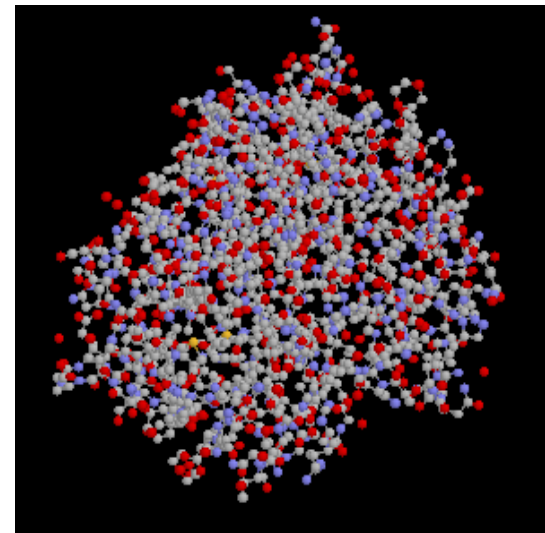
## Environmentally friendly

- Kao proteini, enzimi su potpuno biorazgradljivi.
- Biokatalizatori koje čine enzimi imobilizirani na inertne materijale kao što su silicijevi spojevi ili diatomejska zemlja nisu opasni po okoliš.
- Enzimski procesi stvaraju malo otpada.
- Blagi operacijski uvjeti pri najviše enzimskih procesa zahtijeva manje energije što ima za posljedicu i manje štetnih (greenhouse) plinova u okoliš.



# Prihvatljivi za okoliš

- **Zamijenjuju opasne kemikalije**
- **Smanjuju potrošnju vode**
- **Smanjuju potrošnju energije**
- **Smanjuju potrošnju sirovina**
- **Smanjuju broj procesnih stupnjeva**



# Biokatalizatori su skupi

*Enzimi su skupi ako se cijena izrazi po molu ili kg enzima.*

**Table 1.** Bulk enzyme prices

Enzyme	Approx. price in \$/kg
Lactic dehydrogenase	100,000
Porcine liver esterase	15,000
Penicillin amidase	10,000
Aspartase	10,000
Trypsin	5000
Lipase	5000
Glucose isomerase	500
Detergent protease	250
Glucoamylase	100

J. D. Rozzell (1999) Bioorg. Med. Chem. 2253-2261



# Biokatalizatori su skupi

Cijena se može uporediti s cijenom koštanja novih kemijskih katalizatora

Table 2. Bulk catalyst prices

Catalyst	Approx. price in \$/kg
BINAP	40,000
ChiraPhos	10,000
Platinum	12,000
Sharpless	10,000
Pd(Diphos) <sub>2</sub>	5000
Rh(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl	2000
Jacobsen	1000
Chirald	500
Raney nickel	30

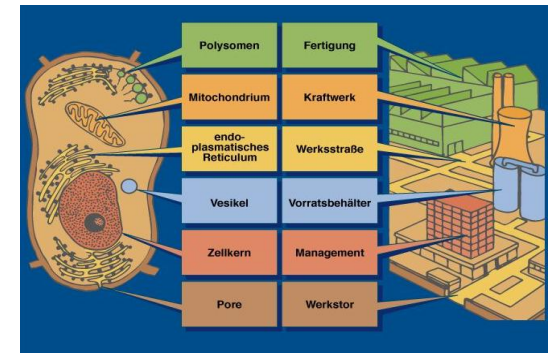
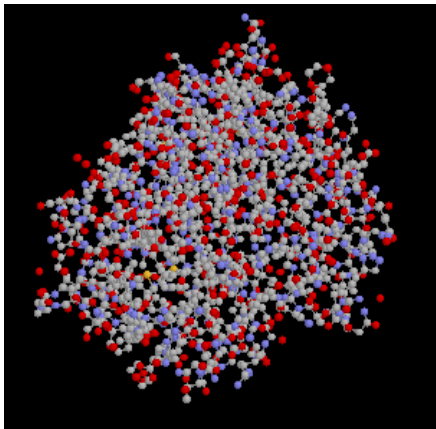
**Kemijski katalizatori koji su pripremljeni posebno za kiralne sinteze su isto skupi, a i nestabilni.**

J. D. Rozzell (1999) Bioorg. Med. Chem. 2253-2261



# Oblici biokatalizatora

- Pročišćeni enzimi
- topljivi
- imobilizirani
- Enzimi u cijelim stanicama (živim ili neživim)
- suspendirane
- imobilizirane



# Otkrića koja su utjecala na primjenu biokatalizatora u industriji

- **izdvajanje enzima iz stanica u velikom mjerilu**
- **imobilizacija enzima**
- **uporaba enzima u nevodnim reakcijskim medijima**
- **rekombinantna DNA tehnologija**

# Zahtjevi za industrijske biokatalizatore

## ⇒ Lako izdvajanje iz reakcijske smjese

Produkt mora biti čist od biokatalizatora

## ⇒ Višekratna upotreba u procesu

Nakon izdvajanja iz reakcijske smjese, biokatalizator se može upotrijebiti u drugom procesu.

## ⇒ Mogućnost kontinuirane provedbe procesa

Kontinuirani procesi ostvaruju dobru i konstantnu kvalitetu produkta, ekonomičniji su

## ⇒ Stabilnost

Omogućava rijedi remont postrojenja i rijedu zamjenu biokatalizatora; zaustavljanje i ponovno pokretanje postrojenja je jako skupo.

# Industrijski biokatalizatori

## ⇒ Imobilizacija enzima

Lako izdvajanje biokatalizatora iz reakcijske otopine,  
bolja stabilnost, netopljiv oblik

## ⇒ Kvantitativno zadržavanje enzima unutar reaktora

Upotreba membrana (skupe).

# Heterogeni biokatalizatori

⇒ **1. Generacije – imobilizirani enzimi**

⇒ **2. Generacije – imobilizirane cijele stanice**

# Heterogeni biokatalizatori

## Imobilizirani enzimi:

Imobilizirani enzimi su enzimi prevedeni u oblik u kojem nisu topljivi u reakcijskom mediju.

### Značajke:

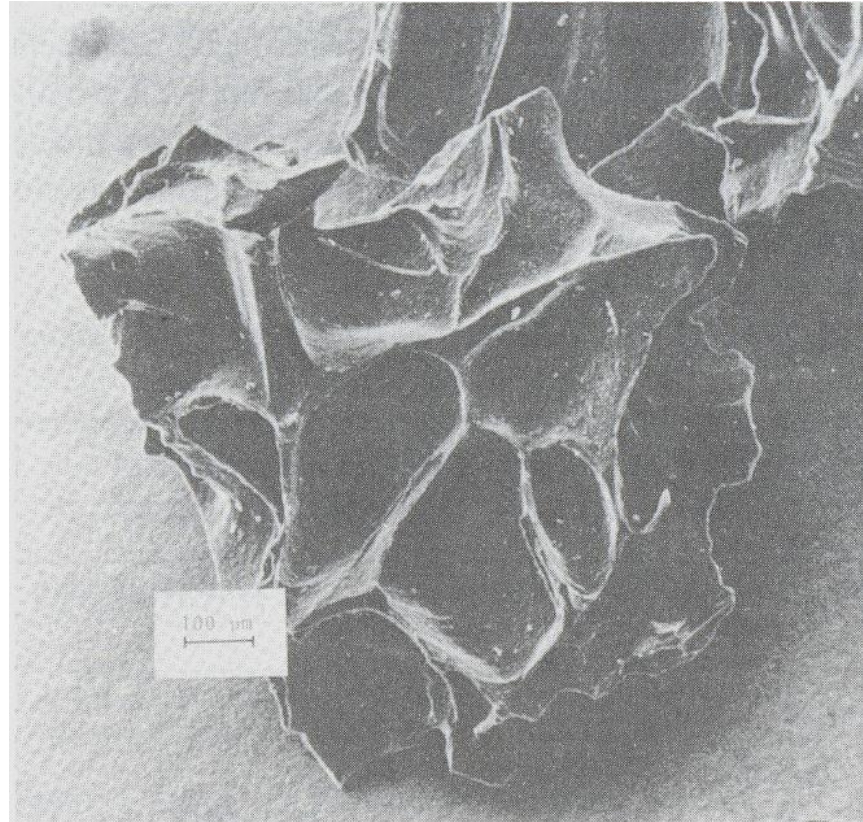
Višekratno korištenje u procesu

Lako se izdvajaju iz reakcijskog medija

Mogu se koristiti u kontinuiranom procesu

Stabilniji

# Heterogeni biokatalizatori



**Imobilizirana glukoza-izomeraza-Sweetzyme  
Umrežavanje s glutaraldehydom**



# Heterogeni biokatalizatori



**Lipaza iz *Candida antarctica* B (CALB),  
imobilizirana na sferične čestice**

# Heterogeni biokatalizatori

## Metode imobilizacije:

1. Fizikalne
2. Kemijske

## Metode odvajanje od okolnog medija:

1. Uklapanje u gel
2. Ultrafiltracijska membrana

## Pitanja za ponavljanje gradiva

1. Što je biokataliza, a što su biokatalizatori? Što su po biokatalizatori po kemijskom sastavu? Kako su povezane strukturne jedinice u molekuli biokatalizatora?
2. Opišite strukturu biokatalizatora po nivoima!
3. Što su to enzimi? Kako enzimi najčešće dobivaju ime? Što su metalo enzimi, a što kofaktor?
4. Objasnite osnove teorije biokatalize! Nabrojite koje teorije poznajete i osnovne razlike među njima.
5. Kako konfiguracija enzimske molekule utječe na biokatalizu? Objasnite efekte do kojih dolazi kod biokatalize!
6. Kako možemo doći do enzima/biokatalizatora? Navedite izvore koji se koriste za dobivanje enzima/biokatalizatora? Koji je izvor najbolji i zašto?
7. Koje otkriće je omogućilo razvoj genetskog inženjerstva i proizvodnju enzima u većem mjerilu? Objasnite!
8. Koje metode se koriste za kreiranje 'boljih biokatalizatora'? Navedite osnovnu razliku među metodama!
9. Nabrojite svojstva biokatalizatora i objasnite njihovo značenje!
10. Nabrojite prednosti biokatalizatora!
11. U kojim se oblicima mogu upotrijebiti biokatalizatori?
12. Koja su otkrića utjecala na upotrebu biokatalizatora u industriji?
13. Nabrojite koje zahtjeve mora ispuniti industrijski biokatalizator?
14. Što je to imobilizacija i kakvi su to imobilizirani enzimi? Koje metode imobilizacije poznajete?