

# Biokataliza u kontinuiranim reaktorima

---

Vrbošić, Matija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:492705>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Preddiplomski studij Ekoinženjerstvo**

**Matija Vrbošić**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, 2024.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidat Matija

Vrbošić Predao je izrađen završni rad dana: 12.

rujna 2024. Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 17. rujna  
2024.

---

Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Preddiplomski studij Ekoinženjerstvo

**Matija Vrbošić**

# **Biokataliza u kontinuiranim reaktorima**

**ZAVRŠNI RAD**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ana Vrsalović-Presečki

**Zagreb, 2024.**

## Sažetak

### **Biokataliza u kontinuiranim reaktorima**

U ovom radu prikazana je primjena kontinuiranih reaktora u biokatalitičkim procesima s naglaskom na reakcije katalizirane enzimima. Kontinuirani reaktori predstavljaju održiva i ekonomski isplativa rješenja zahvaljujući mogućnosti višekratne upotrebe enzima putem tehnika imobilizacije. Imobilizacija enzima omogućuje njihovu stabilnost, jednostavno odvajanje od reakcijske smjese i ponovnu upotrebu, čime se smanjuju troškovi i povećava efikasnost.

Rad daje pregled osnovnih tipova kontinuiranih reaktora kao što su reaktori s nasutim slojem katalizatora, membranski reaktori i reaktori s katalizatorima u fluidiziranom sloju. Također su prikazane metode imobilizacije enzima, uključujući adsorpciju, kovalentno vezanje, enkapsulaciju, uklapanje i umrežavanje te se opisuje kako ove metode poboljšavaju stabilnost i učinkovitost enzima.

Prikazani su uspješni primjeri primjene biokatalize u kontinuiranim reaktorima, kao što su proizvodnja uridin difosfat galaktoze, sinteza kiralnih amina i bistrenje soka od naranče. Ovi primjeri pokazuju prednosti kontinuiranih procesa, uključujući smanjenje inhibicije enzima, optimizaciju uvjeta reakcije i povećanu produktivnost.

U okviru rada dana je usporedba kontinuiranih reaktora s tradicionalnim kotlastim reaktorima, ističući veće konverzije, bolju stabilnost enzima i veću ukupnu učinkovitost kontinuiranih procesa.

Ključne riječi: biokataliza, kontinuirani reaktori, imobilizirani enzimi, ekološka održivost, industrijska primjena.

## Summary

### **Biocatalysis in continuous reactors**

In this study, biocatalysis in continuous reactors is presented with a focus on enzyme-catalysed reactions. Continuous reactors offer sustainable and economically viable processes thanks to the possibility of multiple use of enzymes through immobilisation techniques. Enzyme immobilisation provides stability, easy separation from the reaction mixture, and reuse, thereby reducing costs and increasing efficiency.

The study provides an overview of the basic types of continuous reactors, such as packed bed reactors, membrane reactors, and fluidised bed reactors. Methods of enzyme immobilisation, including adsorption, covalent binding, encapsulation, entrapment, and cross-linking, are also presented, describing how these methods improve enzyme stability and efficiency.

Successful examples of the application of biocatalysis in continuous reactors are shown, such as the production of uridine diphosphate galactose, the synthesis of chiral amines, and the clarification of orange juice. These examples demonstrate the advantages of continuous processing, including reduced enzyme inhibition, easier handling of immobilised enzymes, optimisation of reaction conditions, and increased productivity.

The study also compares continuous reactors with traditional batch reactors, highlighting higher conversion rates, better enzyme stability, and higher overall efficiency of continuous processes.

Keywords: biocatalysis, continuous reactors, immobilised enzymes, environmental sustainability, industrial application.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Opći dio .....	2
2.1 Biokataliza.....	2
2.2. Imobilizirani enzimi .....	3
2.2.1. Tehnike imobilizacije enzima .....	6
2.2.1.1. Kovalentno vezanje.....	6
2.2.1.2. Umrežavanje .....	7
2.2.1.3. Adsorpcija .....	8
2.2.1.4. Uklapanje .....	8
2.2.1.5. Enkapsulacija.....	9
2.2.2. Reakcijski medij .....	10
2.3. Kemijski reaktori .....	10
2.3.1. Kontinuirani reaktori.....	11
2.3.2. Uporaba biokatalizatora u kontinuiranim reaktorima .....	12
2.3.3. Reaktor s nasutim slojem katalizatora .....	17
2.3.4. Membranski reaktori .....	20
2.3.5. Reaktor s katalizatorima u fluidiziranom sloju.....	21
2.3.6. Usporedba kontinuiranog i kotlastog reaktora.....	23
3. Zaključak .....	28
4. Literatura.....	29

# 1. Uvod

Danas, kada ekološki problemi predstavljaju jednu od najvećih prepreka s kojima se čovječanstvo suočava, ključno je pronalaženje održivih rješenja. Razvoj ekološki prihvatljivih procesa postao je ključan aspekt koji se nastoji integrirati u industrijske procese. Biokatalizatori su se pokazali kao dobra alternativa tradicionalnim industrijskim procesima koji primjenjuju nerazgradive katalizatore, nudeći brojne prednosti za okoliš i pritom čuvajući ekološku ravnotežu. Uporaba biokatalizatora u kemijskim reakcijama postaje sve značajnija zbog njihove selektivnosti, ekološke prihvatljivosti i učinkovitosti. Biokatalizatori imaju ključnu ulogu u širokom spektru industrijskih procesa, uključujući farmaceutsku, prehrambenu i kemijsku industriju. Kako bi se maksimalno povećala njihova učinkovitost i omogućila njihova višekratna uporaba, kontinuirani reaktori su efikasno procesno rješenje za provođenje katalitičkih reakcija.

U radu će biti dan pregled osnovnih tipova reaktora s kontinuiranim načinom rada, s posebnim fokusom na reakcije katalizirane enzimima. U svrhu povećanja učinkovitosti enzima u kontinuiranim reaktorima, često se koriste tehnike imobilizacije enzima. Imobilizacija enzima omogućuje njihovu višekratnu uporabu, olakšava odvajanje enzima od reakcijske smjese i poboljšava stabilnost enzima. Detaljno će se razmotriti metode imobilizacije uključujući adsorpciju, kovalentno vezanje, enkapsulaciju, uklapanje i umrežavanje. Rad će obuhvatiti i nekoliko uspješnih primjera primjene biokatalize u kontinuiranim reaktorima. Ovi primjeri će pokazati prednosti uporabe imobiliziranih enzima u kontinuiranim procesima te će poslužiti kao pokazatelji budućih smjerova istraživanja i razvoja u području biokatalize. Pružit će se sveobuhvatan pregled ključnih aspekata uporabe biokatalizatora u kontinuiranim reaktorima, od osnovnih principa do konkretnih primjena.



## 2. Opći dio

### 2.1 Biokataliza

Biokataliza se može definirati kao primjena biokatalizatora za postizanje željene pretvorbe u kontroliranim uvjetima u bioreaktoru. Biokatalizatori su tvari, koje nastaju u živoj stanici, a koje potiču brži tijek kemijskih reakcija pritom ne sudjelujući u njima. Biokatalizator može biti pročišćeni enzim, enzimatski kompleks, stanična organela ili cijela stanica.[1] Svaki enzim obično katalizira samo jednu reakciju zbog toga što se na aktivnom mjestu enzima može vezati samo reaktant određene prostorne strukture.[2] Neki enzimi za svoje katalitičko djelovanje zahtijevaju kofaktor koji je neproteinska tvar koja se veže na enzim, tvoreći tako holoenzim koji ima katalitičku funkciju.[3]

U proteklom razdoblju došlo je do eksponencijalnog porasta u proizvodnji visokovrijednih specijalnih kemikalija korištenjem biokatalizatora za kataliziranje višestupanjskih reakcija. Ovo povećanje je rezultat činjenice da enzimi, bilo da su izolirani ili se nalaze unutar cijelih stanica, mogu katalizirati širok raspon reakcija s visokim razinama kemoselektivnosti, regioselektivnosti i stereoselektivnosti.[4]

Biokatalizatori pružaju niz prednosti u usporedbi s tradicionalnim kemijskim reakcijama. Mogu katalizirati reakcije sa selektivnošću i ekološkom prihvatljivošću koju je teško postići klasičnim kemijskim putevima. Oni djeluju u blagim uvjetima pH i temperature, a biokatalitički procesi stvaraju manje nusprodukata od kemijskih procesa, tako da biokataliza ima manji utjecaj na okoliš.[1] Njihova selektivnost, ekološka prihvatljivost, biorazgradivost te proizvodnja iz obnovljivih izvora dodatno ih čine atraktivnima.[5] Značajna prednost biokatalize u okviru ekološke održivosti u usporedbi s klasičnom kemijskom sintezom, je provedba procesa pri blagim procesnim uvjetima (sobna temperatura i atmosferski tlak).[6]

Na primjer, nikotinska kiselina proizvodi se na industrijskoj razini oksidacijom 5-etil-2-metilpiridina u nepovoljnim radnim uvjetima. Reakcija se odvija u izrazito korozivnom okruženju na 190-270 °C, 2-8 MPa, s velikim suviškom dušične kiseline, a kao nusprodukt nastaje dušikov oksid. Kada se metalni katalizator zamijeni biokatalizatorom, nitrilazom, reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi i tlaku, te nema potrebe za velikim količinama kiseline, i ne stvaraju se staklenički plinovi.[6] Napredak u molekularnoj i strukturnoj biologiji

omogućio je široku primjenu enzima. Unatoč mnogim prednostima, biokatalizatori imaju i svoje nedostatke. Mogu biti inhibirani supstratom ili produktom, a proces dobivanja proizvoda uz njihovu upotrebu može biti skup i rezultirati malim količinama proizvoda. Biokatalizatori su manje aktivni u nevodenoj sredini i zahtijevaju strogu kontrolu radnih uvjeta. Visoka cijena i moguća inaktivacija enzima u neoptimalnim uvjetima dodatni su nedostaci.[7]

Vrste enzima koje se najviše istražuju za upotrebu na industrijskoj razini su lipaze, ketoreduktaze i transaminaze.[6] Enzimi se mogu upotrebljavati kao slobodni enzimi ili u obliku imobiliziranih enzima. Imobilizacija enzima se obavlja radi stabilizacije i olakšane višekratne upotrebe, pri čemu se slobodni enzim prevodi u netopljivi oblik korištenjem različitih nosača ili drugih tehnika imobilizacije. Osim što se koriste u pročišćenom obliku, enzimi se također mogu primijeniti u cijelim stanicama mikroorganizama koje mogu biti žive ili nežive.[4]

## **2.2. Imobilizirani enzimi**

Korištenje enzima privlači mnoge industrije i istraživače zbog njihove visoke selektivnosti, specifičnosti i aktivnosti u ekološki prihvatljivim uvjetima.[8] Opća zabrinutost prilikom korištenja biokatalizatora je njegov životni vijek. Na stabilnost enzima utječe nekoliko čimbenika, poput temperature, pH-vrijednosti, surfaktanata itd. Ti čimbenici mogu poremetiti strukturalne interakcije katalizatora.[9] Također, slaba stabilnost enzima povezana s teškim industrijskim uvjetima ograničava njihovu široku primjenu.[8] Iz tehničkih i ekonomskih razloga većina kemijskih procesa kataliziranih enzimima zahtijeva kontinuiranu upotrebu biokatalizatora tijekom dužeg vremenskog razdoblja.[10] Kako bi se poboljšala stabilnost enzima često se provodi postupak imobilizacije. Imobilizacija je provođenje biokatalizatora iz topljivog homogenog u netopljivi heterogeni oblik. Tim postupkom se ograničava prijenos topline i mase te smanjuje pristup destabilizirajućih agensa enzimu.[9]

Pričvršćivanje enzima na odgovarajuću površinu osigurava da ostanu tamo gdje je njihova aktivnost potrebna čime se povećava njihova koncentracija na pravom mjestu i čime se štiti od uništenja.[10] Imobilizacija može poboljšati stabilnost, aktivnost, čistoću, selektivnost i specifičnost enzima (Tablica 1). Također imobilizacijom se može utjecati na smanjenje inhibicija i povećavati otpornost na deaktivirajuće kemikalije ili reakcijske proizvode. Primarni cilj imobilizacije je olakšati odvajanje biokatalizatora od reakcijskog medija i omogućavanje

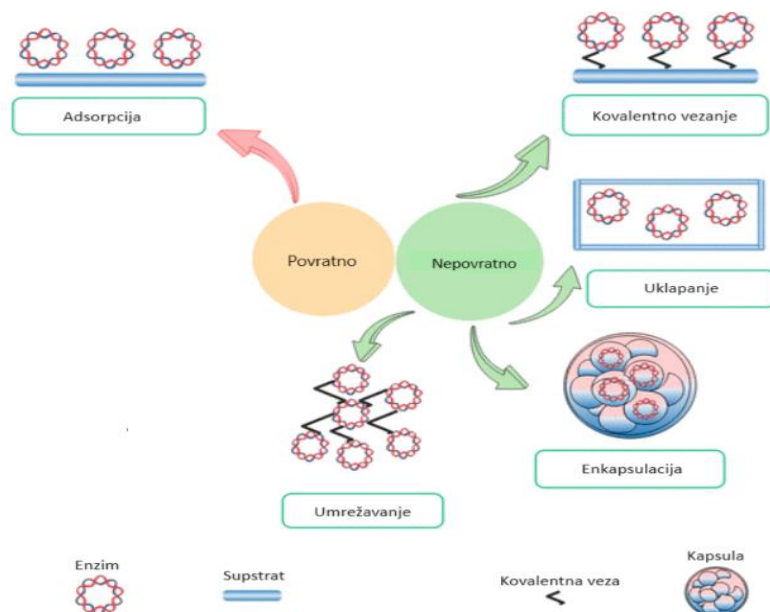
ponovne uporabe biokatalizatora za više ciklusa ili njegovu upotrebu u kontinuiranim procesima. Na taj način biokatalizator postaje prikladan za industrijske procese.[8] Imobilizirani enzimi se mogu koristiti u kemijskim reaktorima za proizvodnju finih kemikalija, u ponovljenim ciklusima reakcija u prehrambenoj industriji i analitičkoj kemiji.[4]

**Tablica 1.** Problemi vezani uz korištenje biokatalizatora i prednosti procesa imobilizacije[11]

Problemi vezani uz korištenje biokatalizatora	Prednosti procesa imobilizacije
Loša stabilnost	Enzimi i potporni materijali se lako oporavljaju
Kratak vijek trajanja	Visoka stabilnost i jednostavnost rukovanja
Visoka osjetljivost na uvjete procesa	Enzimske reakcije mogu se odvijati u ne-vodenim medijima
Lako se inaktiviraju raznim mehanizmima	Poboljšana katalitička aktivnost i mogućnost recikliranja

Imobilizacija enzima može se definirati kao tehnika koja omogućuje ponovnu upotrebu ili kontinuiranu upotrebu biokatalizatora. Najčešće se radi o biokatalizatoru nanesenom na čvrstu podlogu ili zadržavanju biokatalizatora u nekom volumenu npr. pomoću membrane.[12] Materijal od kojeg je načinjena čvrsta podloga i postupci imobilizacije ovise o primjeni. Jednostavnost i ekonomska isplativost ključne su karakteristike tehnika imobilizacije.[4] Kako bi se smanjili investicijski troškovi, industrijski procesi teže jednostavnim metodama imobilizacije, s malo koraka i jeftinim nosačima. Na primjer D-glukoza/ksiloza izomeraza je imobilizirana na jeftinom anorganskom nosaču, bentonitnoj glini, za proizvodnju kukuruznog sirupa s visokim sadržajem fruktoze.[6]

Tehnike imobilizacije enzima mogu se kategorizirati u nekoliko različitih metoda koje se u praksi primjenjuju uz velik broj varijacija. Te metode su adsorpcija, kovalentno vezanje, uklapanje, inkapsulacija i umrežavanje (Slika 1.).[13] Metode imobilizacije igraju važnu ulogu jer omogućuju kombinaciju biokatalize s kontinuiranim procesima.[6]



**Slika 1.** Prikaz metoda imobilizacije.[11]

Funkcionalna svojstva industrijskih enzima mogu se znatno poboljšati korištenjem odgovarajućih postupaka za kontroliranu i usmjerenu imobilizaciju. Na taj način, imobilizacija enzima može postati vrlo snažan alat za poboljšanje svojstava enzima. Osim toga, svojstva enzima mogu se poboljšati i putem fizičke i kemijske modifikacije imobiliziranih derivata. Prilikom imobilizacije ključno je potpuno zadržavanje svih strukturnih i funkcionalnih svojstava imobiliziranih enzima, čak i negativnih.[4] Treba napomenuti da u nekim slučajevima ekonomska isplativost imobilizacije enzima nije uvijek nadoknađena njezinim prednostima, posebno za enzime s izrazito kratkim vijekom trajanja.[6] Neki od nedostataka imobilizacije su niska efikasnost i značajni gubitak aktivnosti enzima tijekom procesa imobilizacije. Kako bi kontinuirana biokataliza imala veće iskorištenje, potrebna su opća rješenja za poboljšanje imobilizacije.[14] U tablici 2. navedeni su primjeri industrijskih proizvoda koji se dobivaju pomoću imobiliziranih enzima.

**Tablica 2.** Glavni proizvodi dobiveni korištenjem imobiliziranih enzima[10]

<i>Enzimi</i>	<i>Proizvod</i>
<i>Izomeraza glukoze</i>	Fruktozni sirup
<i>Aminoacilaza</i>	Proizvodnja amino kiselina
<i>Penicilin acilaza</i>	Polusintetski penicilini
<i>Nitril hidraza</i>	Akrlamid
<i><math>\beta</math>-Galaktozidaza</i>	Hidrolizirana laktoza (sirutka)

## 2.2.1. Tehnike imobilizacije enzima

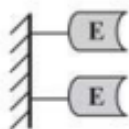
### 2.2.1.1. Kovalentno vezanje

Kovalentno vezanje (Slika 2.) je tehnika imobilizacije enzima koja se postiže povezivanjem enzima s nosačem putem čvrstih veza. Kovalentno vezanje ima veliki broj prednosti poput proizvodnje trajnih enzima i mogućnosti regeneracije enzima za ponovnu upotrebu. Može se povećati stereospecifičnost enzima kao i njihova stabilnost. Na primjer, lipaze koje su kovalentno vezane za glikoksil agarozu pokazale su trostruko poboljšanje u enantioselektivnosti. Primjenom ove metode smanjuje se vjerojatnost curenja enzima odnosno odvajanje enzima od nosača, te se smanjuje mogućnost denaturacije enzima u prisutnosti visokih koncentracija supstrata.[11]

Kovalentno vezanje se odvija aktivacijom nosača dodavanjem reaktivnih molekula.[11] Nosači u ovom postupku mogu biti od organskih i anorganskih materijala. Među organskim materijalima često se koriste hitozan, alginat, smola, kolagen, dekstran, škrob, celuloza, aktivni ugljen, agar, agaroz i hitin. Dok anorganski materijali uključuju hidroksiapatit, željezov oksid, cirkonij, titanij, silicij, srebro, cinkov oksid, glinicu i anorganske gline. Prednosti anorganskih nosača u usporedbi s organskima su bolja kemijska, mehanička i termička otpornost, kao i veća krutost i poroznost.[15] Kao nosači najčešće se koriste hidrofilni polisaharidni polimeri kao što su celuloza, hitozan i agaroz.[11] Takvi nosači su najprikladniji zbog mogućnosti lakog prilagođavanja za specifične primjene, niske cijene, dostupnosti, netoksičnosti, biorazgradivosti, inertnosti kako bi se spriječile nekontrolirane interakcije između enzima i nosača, te hidrofilnosti zbog nestabilnosti katalizatora u hidrofobnim okruženjima.[16] Za aktivaciju nosača su pogodni reagensi funkcionalne skupine aminokiselina, poput karboksilne skupine asparaginske kiseline, hidroksilne skupine treonina, aminoskupine arginina i

sulfhidrilne skupine tiola. Nosači s epoksidnom skupinom koriste se jer reagiraju lako s aminoskupinama enzima pri blagim uvjetima, stvarajući stabilne veze.[11]

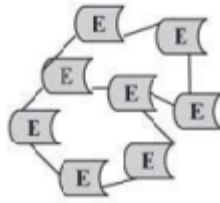
Primjena kovalentnog vezanja ima i neke nedostatke, na primjer, ova tehnika zahtijeva relativno složene korake i dugotrajne inkubacijske periode za pravilnu imobilizaciju. Ponekad je potrebna dodatna modifikacija u strukturi enzima kako bi se povećale mogućnosti enzima za uspješno kovalentno vezanje, a te promjene mogu dovesti do denaturacije enzima. Osim toga, tipično je za nosače vezana samo mala količina imobiliziranih enzima (oko 0,02 g/g nosača), što nije povoljno za široku primjenu u industriji. Moguća je i pojava nekih ograničenja u pokretljivosti enzima koji su pričvršćeni za nosače što rezultira smanjenjem aktivnosti enzima. Ipak, prednosti ove strategije imobilizacije nadmašuju njezine nedostatke, pogotovo jer se postiže povećana stabilnost enzima i mogućnost ponovne uporabe enzima.[11]



**Slika 2.** Imobilizacija kovalentnim vezanjem [10]

### **2.2.1.2. Umrežavanje**

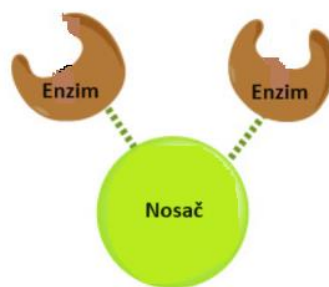
Umrežavanje (Slika 3.) je tehnika u kojoj su enzimi međusobno povezani putem kovalentnih veza bez nosača. Intermolekularno umrežavanje postiže se prisustvom veznih agensa koji se koriste kao mostovi između dviju susjednih molekula enzima. Imobilizacija umrežavanjem omogućuje čvrstu povezanost između enzima, što dovodi do bolje stabilnosti i osigurava značajnu otpornost na organska otapala i visoke temperature, osiguravajući mogućnost recikliranja s optimalnom katalitičkom aktivnošću. Ovaj postupak je vrlo skup jer zahtijeva uporabu enzima u kristaliziranom obliku, što zahtijeva primjenu visoko pročišćenog enzima. Metoda umrežavanja sprej-sušenih enzima također se koristi u nekim industrijskim primjenama, ali njezina upotreba je ograničena jer se mora primijeniti tehnika sušenja raspršivanjem što ireverzibilno deaktivira enzime.[11]



**Slika 3.** Imobilizacija umrežavanjem [10]

### 2.2.1.3. Adsorpcija

Imobilizacija adsorpcijom (Slika 4.) je tehnika povezivanja enzima s nosačem kojom se postiže povratna imobilizacija. Ovom tehnikom se enzim fizički adsorbira na površinu nosioca. Materijali koji se primjenjuju za adsorpciju enzima uključuju ionske izmjenjivače, aluminijске okside i aktivni ugljen. Ova metoda je relativno jeftina i lako se primjenjuje, ali vezne sile koje nastaju između enzima i nosača su slabe (vodikove veze, ionske veze, hidrofobne veze). Uspješna adsorpcija zajamčena je prisutnošću specifičnih aktivnih skupina koje se nalaze na materijalu nosača. One pospješuju interakcije između enzima i nosača. Prednosti imobilizacije enzima adsorpcijom su minimalan broj potrebnih koraka aktivacije, potreba za malom količinom reagensa, niska cijena i laka primjenjivost metode.[11] Nedostatci ove metode su niski prinosi zbog inaktivacije i desorpcije enzima, relativno mala površina za vezanje te izloženost enzima mikrobiološkim kontaminacijama.[17]

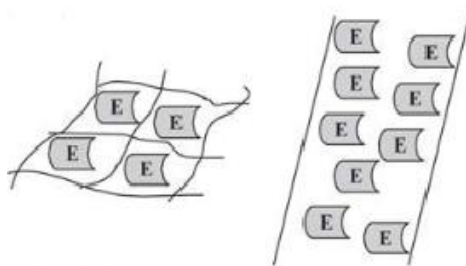


**Slika 4.** Imobilizacija adsorpcijom [18]

### 2.2.1.4. Uklapanje

Uklapanje (Slika 5.) je nepovratna tehnika imobilizacije koja se opisuje kao zadržavanje enzima u mreži vlakana kovalentnim ili nekovalentnim vezama. Također se može opisati kao zadržavanje enzima unutar nosača ili u membranama polimera. Ovom metodom može se

izbjeći curenje enzima kontroliranjem veličine pora polimernog mrežnog sustava koji omogućuje slobodnu difuziju produkta ili supstrata. Gelacija polikationskih ili polianionskih polimera nakon dodavanja polivalentnih kontraiona najčešća je tehnika zadržavanja. Uklapanje ima razne prednosti, uključujući mogućnost imobilizacije velike količine enzima koja se može koristiti u reakciji, niske troškove proizvodnje i poboljšanu mehaničku stabilnost enzima. Također omogućuje modifikaciju enkapsuliranog materijala kako bi se postiglo optimalno mikrookruženje postizanjem optimalnog pH i prikladne polarizacije. Postoji i nekoliko nedostataka ove tehnike imobilizacije. Zadržani enzimi mogu eventualno iscuriti ako su veličine pora nosača velike, a nosač se može oštetiti tijekom procesa.[11]



Slika 5. Imobilizacija uklapanjem [10]

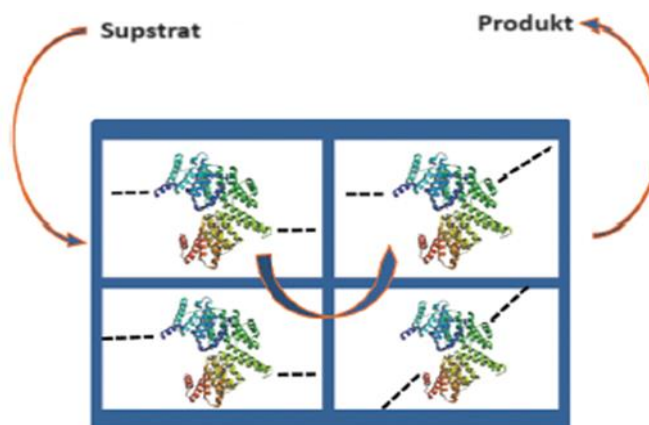
#### 2.2.1.5. *Enkapsulacija*

Enkapsulacija (Slika 6.) uključuje zadržavanje nekoliko biomolekula u različitim polimernim kapsulama. Enzimi i stanice su slobodni u otopinama, ali se nalaze u kontroliranom prostoru. Cilj enkapsulacije je imobilizacija osjetljivih enzima i stanica zarobljenih u malim vezikulama s poroznim membranama. Veliki enzimi ne mogu izaći ili ući u kapsule, ali mali supstrati mogu slobodno prolaziti kroz polupropusne membrane. Enkapsulacijom su biološki sustavi izolirani u finom filmu kako bi se ograničio kontakt biokatalizatora s okolinom što smanjuje njihovu učinkovitost, ali doprinosi dugotrajnijoj stabilnosti biokatalizatora.[11]

Za proizvodnju mikrokapsula veličine od 10 do 100  $\mu\text{m}$  koriste se nosači od različitih materijala (npr. celulozni nitrat i najlon). Razvoj materijala doprinio je poboljšanju ove metode imobilizacije zbog povećanja morfološke stabilnosti nosača i smanjene mogućnosti curenja enzima. Dodatna prednost je i mogućnost koimobilizacije, pri čemu se enzimi mogu imobilizirati u bilo kojoj potrebnoj kombinaciji kako bi odgovarali specifičnim namjenama.



Međutim postoje i ograničenja povezana s ovom tehnikom kao što je problem difuzije koji može uzrokovati pucanje membrane ako dođe do brzog nastajanja produkata reakcije.[11]



Slika 6. Imobilizacija enkapsulacijom[18]

### 2.2.2. Reakcijski medij

Biokatalitičke reakcije mogu se provoditi u vrlo različitim reakcijskim medijima poput vodenih medija, bezvodnih organskih otapala, superkritičnih fluida i ionskih tekućina. Nosioci i postupci imobilizacije značajno ovise o reakcijskom mediju u kojem će se koristiti ili testirati imobilizirani enzim.[4] Kada je topljivost organskih supstrata i proizvoda u vodi preniska biokatalitičke reakcije se moraju provoditi u organskoj fazi. Međutim, zbog deaktivacije enzima organskom fazom, potrebno je primijeniti dvofazni sustav u kojem je enzim u vodenoj fazi, a u organskoj fazi su otopljeni supstrati i proizvodi. Imobilizacijom biokatalizatora na površinu reaktora ili unutar poroznog materijala može se smanjiti njegova deaktivacija u organskoj fazi jer je enzim zaštićen od direktnog kontakta s okolinom. [6]

### 2.3. Kemijski reaktori

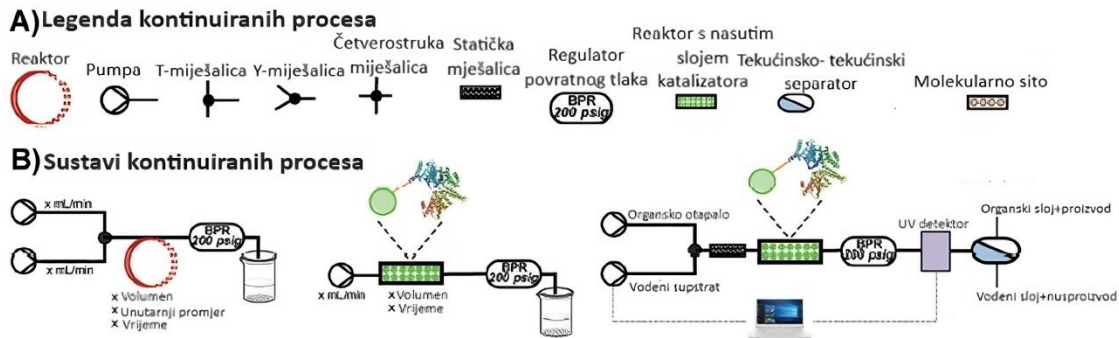
Kemijskim reaktorom se smatra svaki procesni uređaj koji se koristi za provođenje kemijske reakcije u kojoj dolazi do pretvorbe tvari s ciljem dobivanja korisnog produkta. Osnovni tipovi kemijskih reaktora su kotlasti, protočno-kotlasti i cijevni. [14] Osnovna klasifikacija kemijskih reaktora je na zatvorene sustave kod kojih se sva reakcijska smjesa unese na početku reakcije i otvorene sustave kod kojih tijekom reakcije dolazi do izmjene određene količine reakcijske smjese s okolinom. Nadalje, reaktori se mogu klasificirati prema njihovoj vremenskoj zavisnosti parametara i veličini stanja na reaktore u stacionarnom stanju kod kojih su veličine stanja nezavisne o vremenu te na reaktore u nestacionarnom stanju kod kojih su veličine stanja zavisne o vremenu. Unutar reaktora veličine stanja mogu varirati prema položaju ili imati

konstantne vrijednosti. Na temelju tog kriterija svi tipovi reaktora mogu se podijeliti na reaktore s dobrim ili idealnim miješanjem kod kojih su vrijednosti parametara i zavisnih veličina stanja nezavisne o položaju unutar reaktorskog prostora, te reaktore s idealnim strujanjem, kod kojih se veličine stanja mijenjaju unutar reaktorskog prostora.[19]

### **2.3.1. Kontinuirani reaktori**

Kontinuirani reaktori rade tako da se fluid koji sadrži reaktante kontinuirano dovodi u reaktore te se na isti način iz njega odvođe produkti reakcije. Kontinuirani reaktori obično su izrađeni od metala, stakla i plastike. Osnovne vrste kontinuiranih reaktora su: cijevni reaktor, protočno kotlasti reaktor, reaktor s nasutim slojem katalizatora, reaktor s katalizatorima u fluidiziranom sloju i membranski kontinuirani reaktor.[18] Primjeri različitih izvedbi kontinuiranih reaktora su prikazani na slici 7.

Kontinuirani reaktori primjenjuju se u kontinuiranom načinu proizvodnje u kojoj se supstance neprekidno obrađuju kroz niz faza operacija bez prekida. Ovaj način proizvodnje karakterizira stalan tok materijala, održavanje stabilnog stanja procesa s konstantnim uvjetima kao što su temperatura, tlak i brzina protoka, te proizvodnja proizvoda ujednačene kvalitete tijekom cijelog procesa. Smanjeni ekološki utjecaj, poboljšani prijenos topline i mase te visoka energetska učinkovitost samo su neke od prednosti kontinuiranih procesa. Neke od drugih prednosti su: jednostavno povećanje kapaciteta proizvodnje produljenjem vremena reakcije ili uvođenjem serija paralelnih reaktora, smanjeni rizik uzrokovan akumulacijom i skladištenjem opasnih intermedijernih spojeva, smanjena abrazija katalizatora u usporedbi s korištenjem imobiliziranih enzima u uvjetima miješanja, jednostavno postavljanje i praćenje parametara reakcije (temperatura, tlak, protok) što rezultira pouzdanijim i ponovljivim procesima.[14]



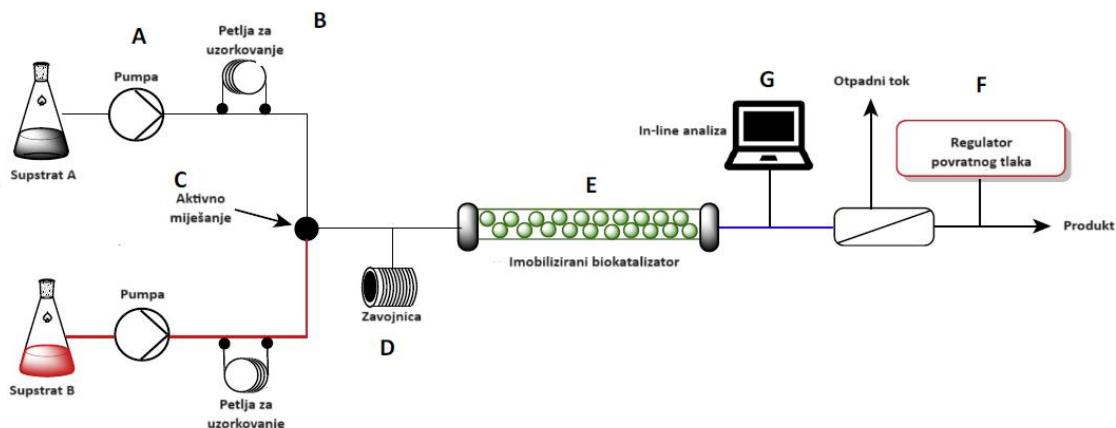
**Slika 7.** Osnove i oprema kontinuiranih sustava. (B) Prvi sustav koristi dvije pumpe za miješanje tekućina prije ulaska u reaktor. Tekućina zatim prolazi kroz reaktor prije izlaska kroz regulator protutlaka u zbirnu tikvicu. Drugi sustav prikazuje jednostavnu kontinuiranu biokatalizu. Otopina supstrata pumpa se kroz reaktor s nasutim slojem katalizatora koji sadrži imobilizirane enzime. Otopina prolazi kroz reaktor kako bi se modificirala prije izlaska u zbirnu tikvicu. U trećem se sustavu organsko otapalo pumpa kroz reaktor s nasutim slojem katalizatora s otopinom supstrata. Organsko otapalo otapa proizvod kako bi ubrzalo enzimsku reakciju, a UV detektor pruža informacije pumpama za nadzor protoka. In-line separator se koristi za odvajanje vodenog sloja od organskog. Teoretski, ovaj pristup može pružiti čisti proizvod u organskom sloju. [18]

### 2.3.2. Uporaba biokatalizatora u kontinuiranim reaktorima

Biokataliza je jedna od najperspektivnijih tehnologija koja omogućava „zelenu“ sintezu kemikalija stoga postoji rastući interes za izvođenje biokatalitičkih reakcija u kontinuiranim reaktorima. Opća prihvaćenost enzimatskih reakcija u industrijskim procesima otežana je zbog visokih cijena enzima, iako treba imati na umu da su oni vrlo aktivni te da je potrebna koncentracija znatno niža u usporedbi s klasičnim kemijskim katalizatorima.[20] Provođenje biokatalize u kontinuiranim procesima ključno je za održivu proizvodnju u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija. Na slici 8. prikazane su glavne komponente biokatalitičkih kontinuiranih reaktora. Tradicionalno se biokataliza provodi u šaržnim reaktorima zbog njihove fleksibilnosti i jednostavnosti. Međutim, provođenje biokatalize u kontinuiranim reaktorima nudi nekoliko prednosti, uključujući poboljšanu produktivnost, bolju kontrolu i veću ekološku održivost.[9] Podatci o ključnim parametrima biokatalitičkih reakcija u kontinuiranim reaktorima dani su u tablici 3.

Dodatne prednosti su: smanjena inhibicija enzima kontinuiranim uklanjanjem produkata, jednostavnija obrada kada se koriste imobilizirani enzimi, uklanjanje produkata „in-situ“, recikliranje neizreagiranih reagensa, optimiranje uvjeta reakcije radi maksimiziranja efikasnosti te integracija s komplementarnim tehnologijama kao što su mikrovalna (poboljšanje

prinosa i smanjenje vremena reakcije transesterifikacije u proizvodnji biodizela[21]) i foto-kemijska (za fotofermentativnu sintezu vodika[22]).[20]



**Slika 8.** Shematski prikaz glavnih komponenti biokatalitičkih kontinuiranih reaktora.

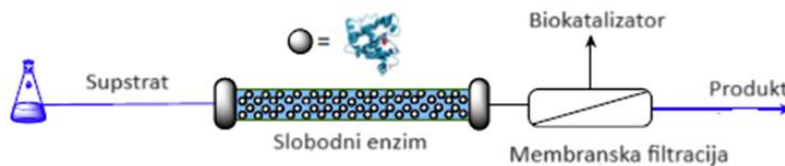
(A) Pumpe: koriste se za isporuku otapala i reagensa pri različitim protocima; uobičajeni tipovi su klipne, peristaltičke, štrcaljke ili zupčaste centrifugalne pumpe. (B) Petlje za uzorkovanje: koriste se za uvođenje malih volumena reagensa. (C) Primarna točka miješanja. (D) Zavojnica: osigurava homogeno miješanje za reakciju. (E) Kontinuirani reaktor: napunjen imobiliziranim biokatalizatorom. (F) Regulator povratnog tlaka: kontrolira tlak sustava. (G) Upravljačka jedinica: in-line analiza, naknadne operacije, itd.[18]

**Tablica 3.** Ključni parametri biokatalitičkih reakcija u kontinuiranim reaktorima[9]

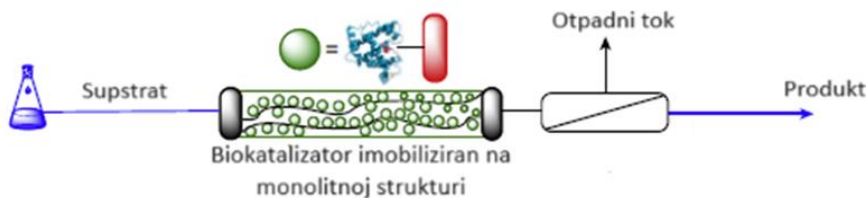
Parametar	Potrebne informacije
Vrijeme reakcije, određeno vremenom potrebnim da reagensi prođu kroz reaktor	Vrijeme zadržavanja ( $\tau$ ); mogu se provesti eksperimenti s obilježivačima kako bi se odredila funkcija distribucije vremena zadržavanja.
Koncentracija supstrata	Koncentracija supstrata koji ulazi u reaktor; stehiometrijski omjeri moraju biti specificirani
Aktivnost biokatalizatora	Količina biokatalizatora korištenog (mg ili g imobiliziranih biokatalizatora) i aktivnost (U) na početku procesa
Veličina reaktora	Dostupan volumen reaktora; dimenzije kanala trebaju biti specificirane kao i prazni volumen (ili ukupna poroznost, tj. omjer praznog volumena/geometrijskog volumena) za reaktore s nasutim slojem katalizatora i monolitne reaktore
Produktivnost reaktora	Prostorno-vremenski prinos normaliziran prema volumenu reaktora
Stabilnost reaktora	Konverzija u različitim vremenskim točkama rada (promatrano pri optimalnom $\tau$ )
Produktivnost biokatalizatora	Količina sintetiziranog produkta po količini korištenog enzima.

Kao biokatalizatori mogu se koristiti izolirani enzimi ili cijele stanice. Reaktori s imobiliziranim enzimima (Slika 10.) i reaktori s slobodnim enzimima (Slika 9.) češće se

upotrebljavaju zbog prednosti koje nude u odnosu na cijele stanice, kao što su veći protok i nedostatak dodatnih barijera između supstrata i katalizatora. Cijele stanice mogu se koristiti u cijevnim reaktorima, ali kako bi se izbjeglo ispiranje tijekom kontinuiranog rada i pojednostavilo recikliranje stanica te separacija produkta trebaju se imobilizirati.[9]



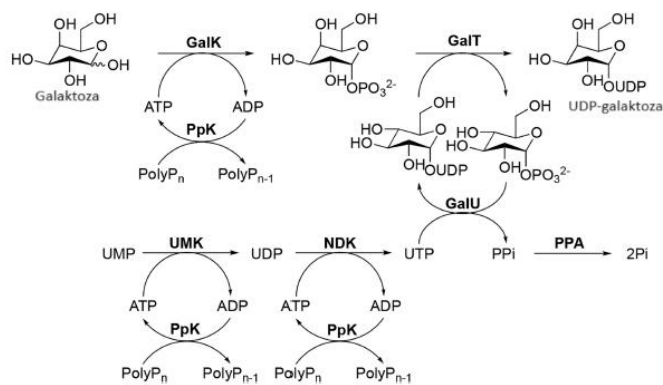
Slika 9. Shema kontinuiranog reaktora sa slobodnim enzimom[9]



Slika 10. Shema kontinuiranog reaktora s imobiliziranim enzimom[9]

Uporaba biokatalizatora trenutno je ograničena na farmaceutsku, finu kemijsku i prehrambenu industriju. Kako bi se biokataliza učinila isplativijom za uporabu u drugim industrijskim primjenama, potrebno je razviti alternative tradicionalnom šaržnom proizvodnom procesu kako bi se smanjila veličina opreme i vrijeme rada. Široko rasprostranjeni i skupi šaržni reaktori koji se koriste u farmaceutskoj industriji nisu dobro prilagođeni za novorazvijene proizvode. [6]

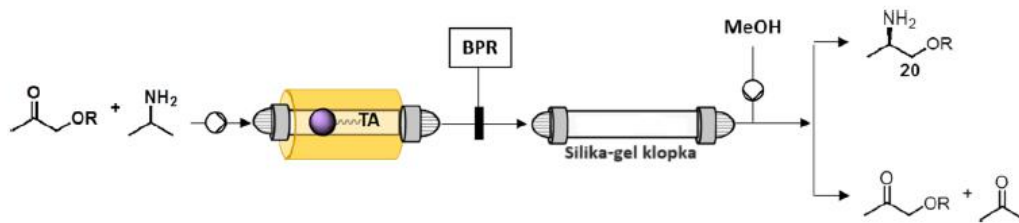
Jedan od prvih biokatalitičkih procesa u kontinuiranom načinu rada s imobiliziranim enzimima je kontinuirana proizvodnja uridin difosfat galaktoze iz galaktoze i uracil monofosfata uz dodatak polifosfata koji se koristi za regeneraciju ATP-a (Slika 11.). Sedam enzima uključenih u biosintezu imobilizirano je putem polihistidina na Ni-NTA agaroznu smolu adsorpcijom. Smola je pakirana u kolonu, a reakcije su izvođene recirkulacijom reakcijske smjese kroz kolonu tijekom 48 sati s ukupnom konverzijom od 50% iz galaktoze u UDP-galaktozu. Enzimi polifosfat kinaza i galaktoza kinaza su nestabilni u otopljenom obliku, a imobilizacija ovih enzima omogućila je povećanje protoka. Izvođenje reakcije u kontinuiranom reaktoru pokazalo je manje smanjenje enzimske aktivnosti u usporedbi s provedenjem iste reakcije u kotlastom reaktoru.[20]



**Slika 11.** Shema sinteze UDP-galaktoze iz galaktoze i uracil monofosfata (UMP). GalK; galaktoza kinaza. GalT; galaktoza 1-fosfat uridiltransferaza. GalU; UDP-glukoza pirofosforilaza. UMK; UMP kinaza. NDK; nukleotid difosfat kinaza. PPA; anorganska pirofosfataza. PpK; polifosfat kinaza.[20]

Paradisi i suradnici napravili su studiju o primjeni biokatalizatora transaminaze iz bakterije *Halmonas elongata* za proizvodnju panela amina u kontinuiranom toku. Enzim je imobiliziran na epoksidnu smolu kovalentnim vezanjem. S izvrsnim konverzijama i ukupnim vremenom reakcije smanjenim na minute u usporedbi sa satima u šaržnim procesima, ovaj sustav predstavlja jedan od najučinkovitijih primjera biokatalize u kontinuiranim reaktorima do sada.[20]

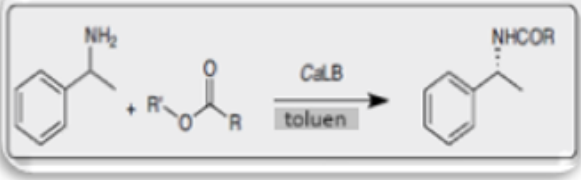
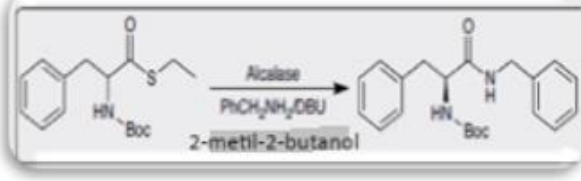
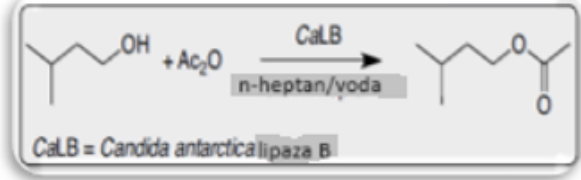
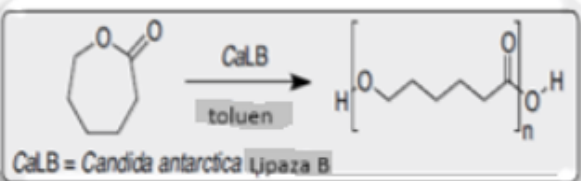
Jamison i suradnici radili su na prvom primjeru imobilizirane transaminaze koja se koristi u kontinuiranom toku za učinkovitu sintezu kiralnih amina na račun izopropilamina (Slika 12.). Cijele stanice *Escherichia coli* koje sadržavaju (R)-selektivnu  $\omega$ -transaminazu bile su imobilizirane adsorpcijom na polimernoj smoli metil akrilata i pakirane u čeličnu kolonu. Kroz kolonu je tekao tert-butil-metil-eter zasićen vodom koja sadrži supstrat i izopropilamin. Postignute su konverzije do 85% s vremenom zadržavanja od 30 minuta. Ovaj sustav ima prednost korištenja imobiliziranih cijelih stanica što omogućuje korištenje enzima ovisnih o kofaktorima u organskoj fazi. Također upotreba cijelih stanica je jeftinija opcija za korištenje u velikim industrijskim procesima. Ipak, korištenje cijelih stanica može rezultirati nižom produktivnošću u usporedbi s izoliranim biokatalizatorima zbog otpora prijenosa mase kroz staničnu membranu.[20]



**Slika 12.** Sinteza amino estera s imobiliziranim stanicama *Escherichia coli* koje sadrže (R)-selektivnu  $\omega$ -transaminazu iz vrste *Arthrobacter*. [20]

Još jedan primjer biokatalize u kontinuiranom reaktoru s imobiliziranim cijelim stanicama je sinteza enantiočistog (5R)-hidroksiheksan-2-ona postignuta uz pomoć imobilizirane bakterije *Lactobacillus kefir*. U kontinuiranom reaktoru cijele stanice su bile imobilizirane adsorpcijom s natrijevim celuloznim sulfatom uz 40% učinkovitosti. Imobilizacijom se smanjila aktivnost biokatalizatora no prelazak sa šaržnog na kontinuirani tok, uz vrijeme zadržavanja od 0.8 sati, povećao je učinkovitost procesa za čak 19 puta. Nakon šest dana rada imobilizirani biokatalizator zadržao je 68% preostale aktivnosti. [18]

**Tablica 4.** Dodatni primjeri biokatalitičkih reakcija u kontinuiranom reaktoru[9]

	<b>Konfiguracija i volumen reaktora</b>	<b>Komentar</b>
	Imobilizirani biokatalizator, reaktor s nasutim slojem katalizatora, 0,82 ml	Produktivnost i prostorno-vremenski prinosi premašuju vrijednosti za šaržne reakcije za faktor 3100 i 40
	Imobilizirani biokatalizator, reaktor s nasutim slojem katalizatora, naizmjenično s kolonama za racemizaciju 0,82 ml	Dinamička kinetička rezolucija; izbjegnute su sporedne reakcije; poboljšana produktivnost i ukupno ubrzanje
 <p>CalB = <i>Candida antarctica</i> lipaza B</p>	Slobodni enzim, mikroreaktor povezan s separatorom 0,50 ml	Visoka produktivnost, režim protoka raspršenih kapljica organske faze/vode s „in situ“ ekstrakcijom produkta i recikliranjem enzima
 <p>CalB = <i>Candida antarctica</i> lipaza B</p>	Imobilizirani biokatalizator, reaktor s nasutim slojem katalizatora, 0,52 ml	Polimerizacija katalizirana enzimima u kontinuiranom načinu; brža proizvodnja produkta u usporedbi s šaržnim reaktorima

### 2.3.3. Reaktor s nasutim slojem katalizatora

Dvije tehnike imobilizacije enzima pokazale su se uspješnim za kontinuiranu biokatalitičku sintezu. Imobilizacija enzima na stjenke reaktora i korištenje širokog spektra potpornih materijala koji vežu enzim na čestice ili monolitne strukture, čime se stvara reaktor sa nasutim slojem katalizatora (Slika 13.).[14] Reaktori s nasutim slojem predstavljaju jedan od najvažnijih tipova reaktora koji se koriste u kemijskoj industriji za proizvodnju osnovnih kemikalija i međuprodukata, kao i za uklanjanje štetnih ili toksičnih kemikalija iz plinskih ili tekućih tokova.[23] Reaktor s nasutim slojem katalizatora (PBR) je tip kemijskog reaktora koji se često koristi u industrijskim procesima za provođenje biokatalitičkih reakcija. Sastoji se od cilindrične posude ispunjene čvrstim slojem katalizatora kroz koji prolaze reaktanti.[14] Jedan od tipova PBR-a koji se koristi u biokatalitičkim reakcijama je PBR s monolitnim slojem. PBR



s monolitnim slojem ispunjen je jednim komadom strukturiranog materijala čime se minimiziraju ograničenja PBR-a posebno stvaranje povratnog tlaka i poroznost koja može premašiti 0,9. Monolitni sloj najčešće je načinjen od keramičkih materijala, tipično monolita silike, jer su površine i čestice silike već istraživane za uporabu u kombinaciji s enzimima. Upotreba silikatnih površina i čestica olakšava primjenu metoda i tehnika korištenih za imobilizaciju enzima i na druge vrste nosača jer jednom kada je protokol imobilizacije razvijen i optimiziran za siliku, može se lakše prilagoditi ili prenijeti na druge materijale bez potrebe za značajnim izmjenama.[6]

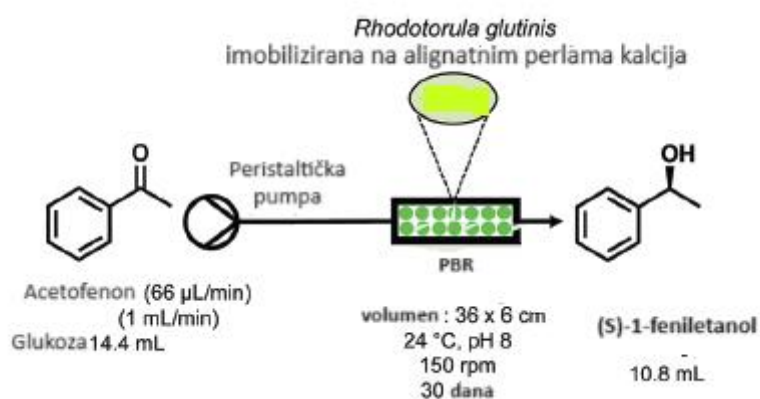
Ipak industrijski primjeri monolitnih bio-reaktora s nasutim slojem su rijetki zbog složenih i skupih procesa izrade „in-situ“. Naime, monolitni stupci uglavnom se koriste u bioindustriji za procese separacije. U zadnjih nekoliko godina interes za monolitne reaktore sa složenijim geometrijama raste zahvaljujući pojavi aditivne proizvodnje u kemijskom inženjerstvu i pojavi 3D tiskanih reaktora.[6]



**Slika 13.** Reaktor s nasutim slojem katalizatora[14]

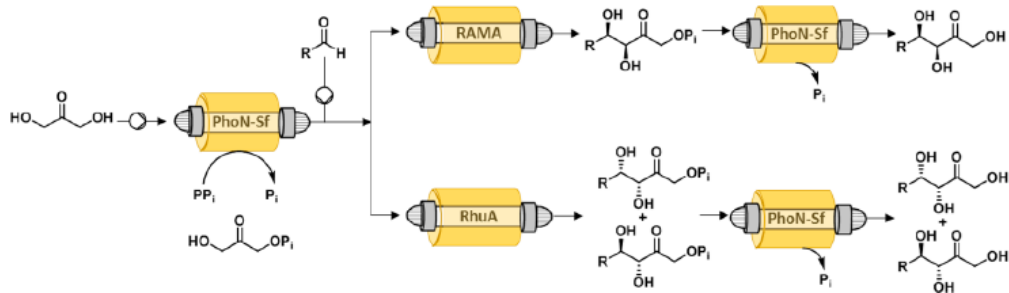
Prednosti PBR-a su brži procesi kao rezultat mogućnosti imobilizacije veće količine biokatalizatora zbog velike specifične površine, dobra toplinska vodljivost zbog čvrstog punila, mogućnost dizajna do industrijskih razmjera uz relativno niske troškove.[24] Tehnička ograničenja reaktora s nasutim slojem katalizatora su veliki povratni tlakovi zbog ograničene poroznosti sloja, loša kontrola miješanja što dovodi do povratnog miješanja i stvaranja mrtve zone te ograničenja difuziji unutar pora čestica. Kako bi se ublažili navedeni nedostaci proučavana su alternativna punjenja, ali na račun visoke specifične površine. Zbog toga se nositelji šupljih mikrosfera koriste kao sredstva za smanjenje učinka povratnog tlaka povećanjem udjela praznina, a za suzbijanje ograničenja difuzije pora koriste se neporozne nanočestice.[6]

Primjer uspješne biokatalize u ovom reaktoru je redukcija acetofenona do (S)-1-feniletanola u kontinuiranom reaktoru s nasutim slojem katalizatora uz imobilizaciju cijelih stanica *Rhodotorula glutinis* na alginatne perle kalcija (Slika 14.). Supstrat je tekao kroz reaktor na sobnoj temperaturi pomoću peristaltičke pumpe, a reakcijska smjesa je izlazila kroz kanal za preljevanje na suprotnoj strani reaktora. U optimalnim uvjetima, (S)-1-feniletanol je dobiven s 75%-tnim prinosom. Sustav kontinuiranog toka radio je 30 dana te se proizvelo 10,8 mL proizvoda.[18]



**Slika 14.** Redukcija acetofenona u (S)-1-feniletanol u reaktoru s nasutim slojem katalizatora uz stanice *Rhodotorula glutinis* imobilizirane na kalcijevom alginatu.[18]

Primjer uspješne biosinteze uz pomoć biokatalizatora u reaktoru s nasutim slojem katalizatora je i proizvodnja analoga kiralnih ugljikohidrata iz dihidroksiacetona i aldehida uz pomoć tri odvojena reaktorska sustava s nasutim slojem katalizatora. (Slika 15.) Proces su proveli Wever i suradnici na slijedeći način: fosforilacijom dihidroksiacetona pomoću kisele fosfataze (PhoN-Sf) kovalentno vezane za epoksi funkcionalizirane nosače dobiven je aktivirani intermedijer. Aldolna kondenzacija intermedijera katalizirana fruktoza-1,6-aldolazom iz zečjeg mišića (RAMA) ili ramnuloza-1-fosfat aldolazom (RhuA) i defosforilacija aldolnog adukta pomoću kisele fosfataze, dala je produkt. Imobilizacija je imala prednost suzbijanja retro-aldolne reakcije cijepanja pa je imobilizirani enzim u kontinuiranom toku povećao učinkovitost stvaranja produkta. Produktivnost procesa pri vremenu zadržavanja od 120 minuta iznosila je do 207 g L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>. [20]



**Slika 15.** Kontinuirana sinteza složenih ugljikohidrata iz dihidroksiacetona[20]

#### 2.3.4. Membranski reaktori

Membranski reaktori su uređaji koji kombiniraju aktivnosti biotransformacije, biosinteze ili biorazgradnje s membranskom filtracijom. U membranskim reaktorima biokatalizatori mogu biti smješteni na membrani, unutar membrane ili vezani na površinu membrane. Ovi reaktori primjenjuju se u industriji za proizvodnju specijalnih kemikalija i u postupku pročišćavanja industrijskih otpadnih voda korištenjem imobiliziranih enzima za učinkovitu razgradnju onečišćenja. Učinkovitost membranskih reaktora u raznim biokatalitičkim procesima nudi značajne prednosti u industrijskim primjenama i upravljanju okolišem.[25]

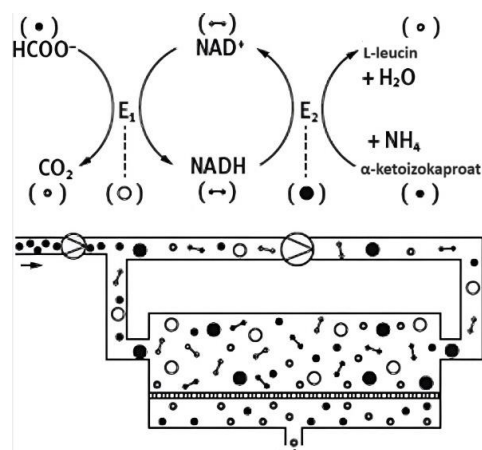
Membranski procesi s imobiliziranim enzimima na površini i/ili u porama uglavnom uključuju reaktore u obliku diska, makroporne materijale i nanovlaknaste membrane kao opciju s većim kapacitetom opterećenja enzima. Jedan od glavnih problema s ovim sustavima je energija potrebna za osiguranje dovoljnog tlaka za protok tekućine kroz membranu. Kao rezultat toga, imaju slične nedostatke kao i PBR. Osim toga, membrane imaju niži kapacitet opterećenja enzimima zbog smanjene površine.[6]

Membrana služi kao barijera za odvajanje proizvoda od biokatalizatora, kao medij za imobilizaciju biokatalizatora, kao medij za stvaranje i održavanje velike međufazne površine po jedinici volumena te kao nosač za inkapsulaciju enzima.[25]

Ako membrana služi samo kao polupropusna barijera postoje dva načina rada ovisno o položaju biokatalizatora u membranskom sustavu. U prvom načinu biokatalizator je suspendiran u reaktoru s miješanjem, a reakcijska smjesa kontinuirano dolazi u kontakt s membranom radi odvajanja proizvoda od biokatalizatora koji se potom vraća nazad u reaktor. Dok je u drugom biokatalizator suspendiran unutar membrane, gdje se odvija biokemijska konverzija. Ako je membrana medij za inkapsulaciju, enzimi ili cijele stanice su zarobljeni unutar polupropusnih

mikro-čestica ili vezikula kao što su liposomi, polimerosomi, koloidosomi, mikrogelovi i polimerne mikrosfere.[25]

Kontinuirani membranski reaktori integriraju jedinstvena svojstva membrana s kontinuiranim procesima kako bi se poboljšala učinkovitost reakcije i odvajanje proizvoda. Prilikom hidrolize glicerida maslačnog ulja korištenjem imobilizirane lipaze unutar reaktora sa šupljim vlaknima kontinuirani membranski reaktori učinkovito koriste membrane aktivirane enzimima kako bi se postigla visoka učinkovitosti pretvorbe. Još jedan značajan eksperiment (Slika 16.) proveli su Wichmann i suradnici koji su proveli kontinuiranu transformaciju  $\alpha$ -ketoizokaproata u L-leucin uz enzim L-leucin dehidrogenazu (E2 na slici 16.), gdje se istovremeno upravlja regeneracijom  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  pomoću formiat dehidrogenaze (E1 na slici 16.), pokazujući sposobnost reaktora da se nosi sa složenim biokonverzijama uz održavanje stabilnosti koncentracije kofaktora.[25]



**Slika 16.** Shema membranskog separacijskog reaktora za kontinuiranu enzimsku sintezu L-leucina iz  $\alpha$ -ketoizokaproata s regeneracijom koenzima ( $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ).[25]

### 2.3.5. Reaktor s katalizatorima u fluidiziranom sloju

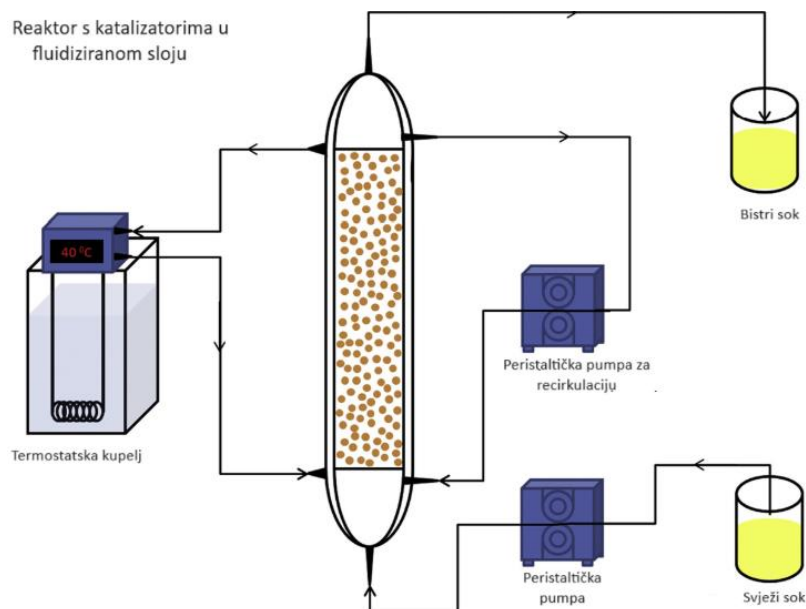
Reaktor s katalizatorima u fluidiziranom sloju (Slika 17.) je verzija reaktora s nasutim slojem katalizatora. Radi u režimu uzlaznog protoka što znači da se otopina supstrata dovodi s dna brzinom dovoljno velikom da podigne čestice. U reaktorima s fluidiziranim slojem, imobilizirani biokatalizator se održava u suspenziji recirkulacijom zraka ili otopine supstrata u sustavu s ulazom na dnu reaktora čime se omogućuje slobodnu cirkulaciju čestica kroz sloj i izbjegava taloženje imobiliziranih enzima na dnu reaktora. Fluidizacija ovisi o prirodi nosioca, dizajnu reaktora, brzini fluidizacije i viskoznosti otopine supstrata. Prednosti reaktora s

katalizatorima u fluidiziranom sloju jesu bolji prijenos mase nego u reaktoru s nasutim slojem katalizatora te mogućnost korištenja širokog raspona veličina čestica. Nedostaci u usporedbi s reaktorom s nasutim slojem katalizatora su niža količina enzima po jedinici volumena reaktora što za posljedicu ima smanjenje ukupne učinkovitosti reaktora i niži stupanj iskorištenja zbog vremena zadržavanja koje je potrebno za fluidizaciju sloja.[8]



**Slika 17.** Reaktor s katalizatorima u fluidiziranom sloju[14]

Studija Dal Magra i suradnika bavila se bistrenjem soka od naranče za potrebe industrijske prerade soka uz korištenje imobiliziranih biokatalizatora u reaktoru s fluidiziranim slojem.(Slika 18.)



**Slika 18.** Operativni shematski prikaz reaktora s fluidiziranim slojem katalizatora[8]

U reaktoru s katalizatorima u fluidiziranom sloju osigurana je pokretnost čestica biokatalizatora čime se sprječava stvaranje mrtvih zona i osigurava ravnomjerna izloženost supstrata biokatalizatoru. Operativna stabilnost procesa može se vidjeti iz toga da se u reaktoru s fluidiziranim slojem održavao kapacitet bistrenja od 60% čak i nakon 71 h kontinuiranog rada.[8] Specifični enzimi korišteni u eksperimentu su dio komercijalnog enzimskog koktela, Novozym 33095, koji je imobiliziran na hitinskim kuglicama aktiviranim glutaraldehydom. Ova enzimska mješavina sadrži nekoliko ključnih biokatalizatora, a to su: pektin lijaza koja katalizira razgradnju pektina (polisaharida prisutnog u staničnim stjenkama biljaka) cijepanjem glikozidnih veza; celulaza kojom se u procesu bistrenja razgrađuju celulozna vlakna koja doprinose mutnoći soka; poligalakturonaza i pektin metil esteraza koji zajedno sudjeluju u hidrolizi pektina. Pektin metil esteraza djeluje uklanjanjem metilne skupine vezane za galakturonsku kiselinu u lancu, pretvarajući pektin u pektinsku kiselinu, a zatim poligalakturonaza katalizira hidrolizu  $\alpha$ -1,4 glikozidne veze između dvije neesterificirane galakturonske kiseline.[8]

Imobilizacija enzima izvedena je korištenjem hitinskih kuglica. Proces imobilizacije uključivao je korištenje glutaraldehyda za umrežavanje enzima na hitinsku podlogu, povećavajući stabilnost i mogućnost ponovne upotrebe enzima. Imobilizirani enzimi sudjeluju u razgradnji pektina koji je odgovoran za mutnoću soka. Korištenje reaktora s fluidiziranim slojem dodatno je olakšalo ovaj proces osiguravajući optimalnu interakciju između soka i imobiliziranih enzima. [8]

Ova studija pokazuje da reaktori s fluidiziranim slojem zbog svoje sposobnosti prijenosa mase i održavanja stabilnosti mogu biti ključni za provedbe biokatalitičkih procesa u industrijske svrhe.[8]

### **2.3.6. Usporedba kontinuiranog i kotlastog reaktora**

Šaržni reaktori rade tako da se svi reaktanti dodaju na početku reakcije, a produkt se uklanja nakon što je reakcija završena. Često se koriste u proizvodnji niskih razmjera, istraživanju i razvoju zbog svoje fleksibilnosti i jednostavnosti. Šaržni procesi općenito rezultiraju proizvodima visoke čistoće. Neke od prednosti su mogućnost korištenja u širokom rasponu reakcija, laka prilagodba različitim procesima, te precizna kontrola nad vremenom reakcije i reakcijskim uvjetima. Dok su nedostaci izazovno uvećanje procesa koje može dovesti do neujednačene kvalitete proizvoda, te značajno vrijeme neaktivnosti između serija za čišćenje i pripremu što dovodi do niže ukupne produktivnosti.[26]

Kontinuirani reaktori uključuju stalno dodavanje reaktanata i simultano uklanjanje proizvoda. Ovi reaktori su posebno korisni za velikoserijske industrijske procese zbog svoje učinkovitosti i konzistentnosti. Prednosti kontinuiranih reaktora su veća produktivnost, lakše uvećanje bez značajnog utjecaja na parametre procesa, te ujednačena i konzistentna kvaliteta proizvoda zbog kontinuiranog toka. Nedostaci su to što su složeni za dizajn i rad jer zahtijevaju sofisticirane sustave kontrole i zato što u usporedbi sa šaržnim reaktorima imaju veće početne troškove postavljanja i opreme.[26] Kontinuirana obrada može ubrzati biotransformacije zbog poboljšanog prijenosa mase što čini industrijsku proizvodnju ekonomski isplativijom uz značajno smanjenje vremena reakcije, s nekoliko sati na nekoliko minuta, i poboljšanje prinosa po jedinici prostora i vremena do 650 puta u usporedbi sa šaržnim procesima.[14]

Usporedba između biokatalitičkih reakcija u šaržnom i kontinuiranom reaktoru nije jednostavna jer su osnovni fizički uvjeti različiti, ipak neki ključni parametri se mogu usporediti.[14] Kako bi mogli usporediti kotlasti i kontinuirani reaktor reakcije u kotlastom reaktoru moraju se provoditi u uvjetima koji što vjernije oponašaju uvjete kontinuiranog toka. Opterećenje enzima, koncentracija, temperatura, tlak i vrijeme trebaju ostati konstantni, inače usporedbe nisu vjerodostojne.[18] Kontinuirani reaktori općenito su manji od kotlastih reaktora, ali u idealnim i optimiranim uvjetima, ovi reaktori mogu proizvesti veću količinu proizvoda u određenom vremenu u usporedbi s kotlastim reaktorom.[14] Male dimenzije reaktora i bolja kontrola procesa čine reakciju učinkovitijom i dovode do smanjenja otpada i energetske potrošnje u kontinuiranom biokatalitičkom procesu u usporedbi s šaržnim procesom. Osim toga, stabilnost biokatalizatora je poboljšana radom u okruženju u kojem se izbjegava intenzivno miješanje.[9] Dodatna prednosti je i izravan prijelaz sustava kontinuiranog toka na industrijsku proizvodnju bez značajnije optimizacije. [14] Lošije performanse u šaržnim procesima mogu se pripisati inhibicijama produkta ili supstrata pri povišenim koncentracijama. Kontinuirani reaktori prevladavaju ovaj izazov stalnim uklanjanjem proizvoda. Prilikom prijelaza s laboratorijske na industrijsku razinu proizvodnje najprije se u obzir uzimaju troškovi, uključujući početna ulaganja, kao i operativne i troškove održavanja. Kada je potrebna relativno niska količina proizvodnje prednost se daje šaržnim reaktorima zbog njihove jednostavnosti i nižih troškova u usporedbi kontinuiranim reaktorom. Nasuprot tome, u prehrambenoj i kemijskoj industriji, gdje je kontinuirana i dugotrajna proizvodnja ključni kriterij, preferiraju se kontinuirani reaktori.[6]

**Tablica 5.** Usporedba šaržnih i kontinuiranih reaktora

Parametar	Šaržni reaktor	Kontinuirani reaktor
<b>Način rada</b>	Svi reaktanti se dodaju na početku; produkt se uklanja nakon završetka reakcije.	Reaktanti se kontinuirano dodaju, a produkti se simultano uklanjaju.
<b>Namjena</b>	Maloserijska proizvodnja, istraživanje i razvoj.	Velikoserijski industrijski procesi.
<b>Čistoća proizvoda</b>	Visoka	Ujednačena
<b>Prednosti</b>	Fleksibilnost, jednostavan dizajn, laka prilagodba različitim procesima, precizna kontrola nad vremenom reakcije i reakcijskim uvjetima.	Veća produktivnost, lakše uvećanje procesa, konzistentna kvaliteta proizvoda, učinkoviti prijenos mase, smanjeni otpad i potrošnja energije.
<b>Nedostatci</b>	Izazovno uvećanje procesa, nekonzistentna kvaliteta proizvoda, značajno vrijeme neaktivnosti između serija za čišćenje i pripremu, niža ukupna produktivnost.	Složeni dizajn i rad, zahtijeva sofisticirane sustave kontrole, veći početni troškovi postavljanja i opreme.

U studiji koju su proveli Matte R. C. i suradnici [27] provedena je sinteza butil butirata u šaržnim i kontinuiranim enzimskim reaktorima uz biokatalizator lipazu iz *Thermomyces lanuginosus* kovalentno imobiliziranu na polimerni nosač Immobead 150. Kontinuirani reaktor u kojem se provodila sinteza bio je reaktor s nasutim slojem katalizatora, a šaržni reaktor korišten u studiji bio je šaržni reaktor s miješanjem. Uvjeti pri kojima se provodila sinteza butil butirata bili su: temperatura od 40 °C, molarni omjer supstrata 3:1 (butanol: butanska kiselina), 40% količine enzima u odnosu na težinu supstrata i 2,5% vode, te heksan kao otapalo. U tim uvjetima, nakon 4 sata reakcije u šaržnom reaktoru postignuta je konverzija od 84%, s izlaznom vrijednosti produkta od 0,27 mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> po gramu supstrata. Prilikom sinteze butil butirata u kontinuiranom reaktoru reaktor s nasutim slojem katalizatora (PBR) postignuta je konverzija od 85% i izlaznom vrijednosti produkta od 1,01 mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> po gramu supstrata pri protoku od 0,02 mL min<sup>-1</sup>. Biokatalizator je pokazao operativnu stabilnost na 40 °C, održavajući 83% svog početnog kapaciteta konverzije nakon 8 ciklusa ponovne upotrebe u šaržnom reaktoru i 63% nakon 30 dana kontinuiranog rada u PBR-u, pri protoku od 0,02 mL min<sup>-1</sup>.

Usporedba kontinuiranog reaktora s nasutim slojem katalizatora (PBR) i šaržnog reaktora s miješanjem pokazala je jasne prednosti kontinuiranog reaktora u sintezi butil butirata (Tablica 6.). Kontinuirani reaktor je postigao neznatno veću konverziju u usporedbi sa šaržnim

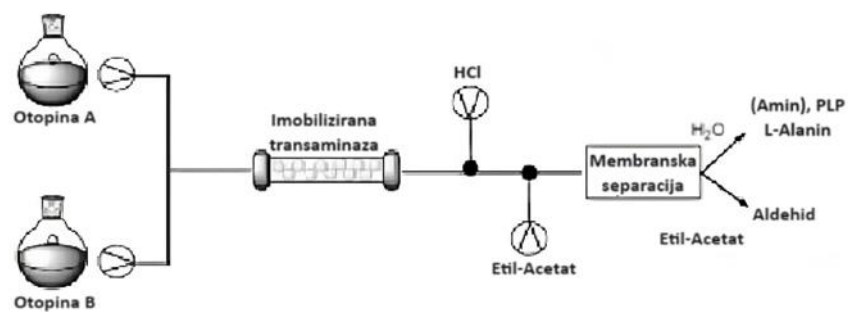


reaktorom, ali je ostvario znatno veću produktivnost od  $1,01 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  po gramu derivata, dok je šaržni reaktor postigao produktivnost od samo  $0,27 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  po gramu derivata. Osim toga, biokatalizator je u PBR-u pokazao bolju dugoročnu stabilnost, zadržavajući 63% svoje početne aktivnosti nakon 30 dana kontinuiranog rada, dok je u šaržnom reaktoru zadržao 83% svoje aktivnosti nakon 8 ciklusa ponovne upotrebe. To sugerira da kontinuirani reaktor ne samo da omogućuje veću produktivnost, već i održava operativnu stabilnost biokatalizatora kroz dulje vremensko razdoblje.[27]

**Tablica 6.** Usporedba izlaznih vrijednosti sinteze butil butirata u šaržnom i kontinuiranom reaktoru[27]

Parametar	Šaržni reaktor	Kontinuirani reaktor
<b>Tip reaktora</b>	Šaržni reaktor s miješanjem	Reaktor s nasutim slojem katalizatora (PBR)
<b>Konverzija</b>	84%	85%
<b>Produktivnost</b>	$0,27 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ po gramu derivata	$1,01 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ po gramu derivata
<b>Operativna stabilnost</b>	83% početne aktivnosti enzima nakon 8 ciklusa ponovne upotrebe	63% početne aktivnosti enzima nakon 30 dana kontinuiranog rada pri protoku od $0,02 \text{ mL min}^{-1}$

Još jedno istraživanje koje se bavilo usporedbom reakcija u kontinuiranim i šaržnim reaktorima bilo je istraživanje koje su proveli Contente i suradnici [28] koji su se bavili konverzijom primarnih aromatskih amina u aldehide kataliziranom imobiliziranom transaminazom. Aromatski aldehidi su važni međuproizvodi u brojnim sintetičkim procesima i imaju istaknutu ulogu u kozmetičkoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Čista transaminaza imobilizirana je kovalentnim vezanjem na epoksi smolu i korištena u reaktoru s nasutim slojem katalizatora. Početna optimizacija uključivala je pretvorbu benzilamina u benzaldehid koristeći 10%-tni dimetil sulfoksid kao ko-otapalo u fosfatnom puferu (50 mM, pH 8,0) na  $37^\circ\text{C}$  i pri atmosferskom tlaku. Potpuna oksidacija supstrata (>99% molarne konverzije) postignuta je unutar 3 minute pri protoku od  $0,3 \text{ mL/min}$ , dok je za isti proces u šaržnom načinu rada bilo potrebno približno 2 sata. Proces je uključivao in-line acidifikaciju praćenu tekućinsko-tekućinskom ekstrakcijom uz korištenje etil acetata (Slika 19.) što je omogućilo izdvajanje čistih aldehida s vremenima zadržavanja od 3-15 minuta, dajući veću produktivnost u usporedbi s ekvivalentnim šaržnim procesima. Provođenje reakcije u kontinuiranom reaktoru dovodi do značajnog smanjenja vremena reakcije i povećane produktivnosti.[28]



**Slika 19.** In-line acidifikacija i ekstrakcija s etil acetatom uz tekućinsko/tekućinski separator za izdvajanje aldehida. Otopina A: 20 mM otopina amina u fosfatnom puferu (50 mM, pH 8,0) s 10% DMSO. Otopina B: 20 mM otopina piruvata koja sadrži 0,1 mM piridoksal-5'-fosfat (PLP). T=37°C, P=atm.[27]

### 3. Zaključak

Biokataliza u kontinuiranim reaktorima predstavlja napredak u procesnoj tehnologiji koji omogućuje učinkovitu, kontroliranu i ekonomičnu proizvodnju različitih biotehnoloških proizvoda. U ovom radu stavljen je naglasak na uporabu imobiliziranih biokatalizatora u takvim procesima. Različite metode imobilizacije, kao što su adsorpcija, kovalentno vezanje, enkapsulacija i umrežavanje, omogućuju poboljšanje katalitičkih svojstava i dugoročne stabilnosti enzima, čineći ih prikladnima za industrijsku primjenu. Korištenje imobiliziranih enzima omogućava višekratnu upotrebu katalizatora, jednostavno odvajanje od reakcijske smjese i značajno povećava stabilnost enzima. Na taj način smanjuju se troškovi i poboljšava učinkovitost procesa.

Vrste kontinuiranih reaktora, kao što su reaktori s nasutim slojem katalizatora, membranski reaktori i reaktori s katalizatorima u fluidiziranom sloju, nude značajne prednosti u odnosu na tradicionalne šaržne reaktore. Kontinuirani reaktori omogućuju veće stope pretvorbe, bolju stabilnost enzima i povećanu produktivnost. Ovi sustavi također olakšavaju optimizaciju reakcijskih uvjeta i smanjuju inhibiciju enzima, što rezultira većom ukupnom učinkovitošću. Primjeri uspješne primjene biokatalize u kontinuiranim reaktorima, kao što su proizvodnja uridin difosfat galaktoze, sinteza kiralnih amina i bistrenje soka od naranče, demonstriraju praktične prednosti ovih sustava. Kontinuirani reaktori omogućuju smanjenje inhibicije enzima kontinuiranim uklanjanjem produkata te olakšavaju recikliranje neizreagiranih reagensa.

Usporedba kontinuiranih i šaržnih reaktora pokazuje da kontinuirani reaktori pružaju veću produktivnost i konzistentnu kvalitetu proizvoda, što ih čini idealnim za velikoserijske industrijske procese. Iako zahtijevaju veća početna ulaganja i složenije sustave kontrole, njihove prednosti u pogledu učinkovitosti i održivosti čine ih superiornim izborom za buduće industrijske primjene biokatalize. Integracija imobiliziranih enzima u kontinuirane reaktore predstavlja značajan korak prema održivijim i ekonomski isplativijim biokatalitičkim procesima.

Buduća istraživanja trebala bi se usmjeriti na daljnje unapređenje tehnika imobilizacije te razvoj novih, efikasnijih nosača za enzime. Također, bilo bi potrebno istražiti mogućnosti povećanja primjene ovih tehnologija kako bi se proširila na širi spektar industrijskih sektora, osiguravajući tako ekološki prihvatljive i ekonomski održive proizvodne procese.

## 4. Literatura

- [1] N. Krieger, W. Steiner and D. Mitchell: Foreword, *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4) 219–221 (2004)
- [2] Findrik, Z.: Studij reakcija kataliziranih oksidazama aminokiselina, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 31-36 (2006)
- [3] Duraković, S.: Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 50-215(1996)
- [4] Bickerstaff G. F., Immobilization of enzymes and cells, Humana Press, 1997
- [5] Torres, S., Castro, G.R., Non – Aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems, *Food Technology and Biotechnology*, 42 (2004) 271-277
- [6] Michaud, Maïté, Guillaume Nonglaton, and Zoé Anxionnaz-Minvielle. "Wall-Immobilized Biocatalyst vs. Packed Bed in Miniaturized Continuous Reactors: Performances and Scale-Up." *ChemBioChem* (2024): e202400086.
- [7] Loughlim, W.A., Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology*, 74 (2000) 50-55
- [8] Dal Magro, L., Pessoa, J. P. S., Klein, M. P., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2021). Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed versus packed-bed reactor. *Catalysis Today*, 362, 184-191.
- [9] Tamborini, L., Fernandes, P., Paradisi, F., & Molinari, F. (2018). Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification. *Trends in biotechnology*, 36(1), 73-88.
- [10] Guisan, Jose M., ed. *Immobilization of enzymes and cells*. Vol. 22. Totowa, NJ: Humana Press, 2006.
- [11] Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196.
- [12] Mahrwald, R., Biocatalysis and Natural Product Synthesis, *Modern Aldol Reactions*, (2004) 201-206
- [13] Cao L., Carrier-bound immobilized enzymes, Wiley-VCH, 2005.
- [14] De Santis, Piera, Lars-Erik Meyer, and Selin Kara. "The rise of continuous flow biocatalysis—fundamentals, very recent developments and future perspectives." *Reaction Chemistry & Engineering* 5.12 (2020): 2155-2184.
- [15] Mohidem, N. A., Mohamad, M., Rashid, M. U., Norizan, M. N., Hamzah, F., & Mat, H. B. (2023). Recent advances in enzyme immobilisation strategies: An overview of techniques and composite carriers. *Journal of Composites Science*, 7(12), 488.

- [16] Zucca, Paolo, Roberto Fernandez-Lafuente, and Enrico Sanjust. "Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization." *Molecules* 21.11 (2016): 1577.
- [17] Jesionowski, Teofil, Jakub Zdarta, and Barbara Krajewska. "Enzyme immobilization by adsorption: a review." *Adsorption* 20 (2014): 801-821.
- [18] Britton, Joshua, Sudipta Majumdar, and Gregory A. Weiss. "Continuous flow biocatalysis." *Chemical Society Reviews* 47.15 (2018): 5891-5918.
- [19] Gomzi Z., *Kemijski reaktori*, Hinus, Zagreb, 2009
- [20] Thompson, M. P., Peñafiel, I., Cosgrove, S. C., & Turner, N. J. (2018). Biocatalysis using immobilized enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals. *Organic process research & development*, 23(1), 9-18.
- [21] Teixeira, Camilo Barroso, Jose Valdo Madeira Junior, and Gabriela Alves Macedo. "Biocatalysis combined with physical technologies for development of a green biodiesel process." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33 (2014): 333-343.
- [22] Chanquia, S. N., Valotta, A., Gruber-Woelfler, H., & Kara, S. (2022). Photobiocatalysis in continuous flow. *Frontiers in Catalysis*, 1, 816538.
- [23] Johns, W. R. "Computer-Aided Chemical Engineering." *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (2000).
- [24] Fogler, H. Scott (2006). *Elements of Chemical Reaction Engineering* (4th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-047394-4
- [25] Vladislavljević, Goran T. "Biocatalytic membrane reactors (BMR)." *Physical Sciences Reviews* 1.1 (2016): 20150015.
- [26] Rocha, Raquel A., Robert E. Speight, and Colin Scott. "Engineering enzyme properties for improved biocatalytic processes in batch and continuous flow." *Organic Process Research & Development* 26.7 (2022): 1914-1924.
- [27] Matte, C. R., Bordinhão, C., Poppe, J. K., Rodrigues, R. C., Hertz, P. F., & Ayub, M. A. (2016). Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 67-75.
- [28] Contente, M. L., Dall'Oglio, F., Tamborini, L., Molinari, F., & Paradisi, F. (2017). Highly efficient oxidation of amines to aldehydes with flow-based biocatalysis. *ChemCatChem*, 9(20), 3843-3848.