

# Biokataliza u doba zelene revolucije

L. Glavinić, N. Milčić, Z. Findrik Blažević i M. Sudar\*

Ovo djelo je dano na korištenje pod  
Creative Commons Attribution 4.0  
International License



Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Savska c. 16, HR-10000 Zagreb,

## Sažetak

U dobu zelene revolucije sve više raste svijest o potrebi razvoja održivih alternativa tradicionalnim industrijskim procesima. Gotovo svi industrijski procesi upotrebljavaju katalizatore koji su nerazgradivi i mogu biti štetni za okoliš. S druge strane, biokatalizatori su enzimi – molekule evoluirale u fiziološkom okruženju koje su u potpunosti biorazgradive, a u blagim reakcijskim uvjetima fiziološkog pH, temperature i tlaka okoline pokazuju najveću katalitičku aktivnost i učinkovitost. Biokatalizu ljudi primjenjuju još od starog vijeka u proizvodnji hrane poput sira, kiselog tijesta, piva, vina i octa bez znanja o pozadini procesa koji se odvija, a u posljednjih nekoliko desetljeća porasla je i njezina primjena u industriji, posebice u proizvodnji lijekova i kemikalija. Prepoznate su sve prednosti koje imaju biokatalizatori, poput njihove velike selektivnosti, velike specifičnosti prema supstratu i biorazgradivosti, te postaje sve jasnije da biokataliza može pomoći ispunjenju ciljeva održivog razvoja i implementaciji zelene kemije u industrijske procese s maksimalnim iskorištenjem resursa uz minimalno stvaranje otpada. Iako biokataliza ispunjava gotovo sva načela zelene kemije i potencijal biokatalizatora eksponencijalno raste razvojem inovacija i tehnološkog napretka, posebno u područjima biotehnologije i molekularne biologije, sama prisutnost biokatalizatora u kemijskom procesu ne podrazumijeva održivost procesa. Ekološku prihvatljivost, ali i ekonomsku isplativost, procesa je potrebno dokazati što ranije tijekom njegova razvoja praćenjem raznih procesnih pokazatelja kako bi se uštedjeli i vrijeme i novac.

## Ključne riječi

Biokataliza, enzimi, prirodni katalizatori, zelena kemija, primjena biokatalize u industriji

## 1. Uvod

Biokataliza podrazumijeva upotrebu prirodnih tvari, dobivenih iz bioloških izvora i stanica živih organizama, za ubrzavanje kemijskih reakcija.<sup>1</sup> Bezbrojne kemijske transformacije koje se odvijaju u svakoj živoj stanici omogućene su djelovanjem stotina i tisuća proteina – prirodnih, visokoselektivnih biokatalizatora koji se nazivaju enzimi. Biokataliza omogućuje odvijanje biokemijskih reakcija brzinom prikladnom za održavanje života, zbog čega je od neizmjerne važnosti za opstanak živog svijeta.<sup>2</sup> Biokatalizatori u praksi mogu biti enzimi te mikroorganizmi ili cijele stanice koje sadrže enzime. U ulozi industrijskih biokatalizatora najširu primjenu imaju upravo enzimi, s obzirom na to da predstavljaju katalitički aktivnu komponentu cijelih stanica.<sup>3</sup> Raznolikost potencijalnih enzima za provedbu katalize danas je vrlo velika, a dopunjavaju je katalitičke RNA te antitijela.<sup>4</sup>

Primjena biokatalize, odnosno reakcija kataliziranih enzima datira još od davnina, kad su ljudi enzime upotrebljavali za proizvodnju hrane poput sira te alkoholnih napitaka bez znanja o pozadini procesa.<sup>5,6</sup> Danas o biokatalizi treba razmišljati samo kao o katalizi, jer se može reći da biokataliza predstavlja samo još jedan skup reakcija u svijetu organske kemije koji omogućuje sintezu željenih molekula.<sup>7,8</sup> U svojem djelovanju biokataliza isprepliće i spaja znanja iz područja biokemije, organske kemije, mikrobiologije i molekularne biologije, što je čini pravim primjerom održive interdisciplinarnе grane znanosti i tehnologije.<sup>2</sup>

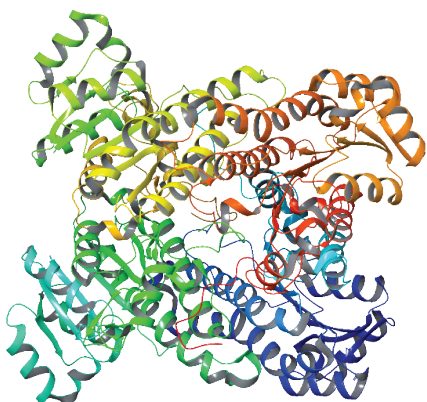
Cilj ovog rada bio je istaknuti važnu ulogu koju enzimi već imaju, ali i mogućnosti koje pružaju kao biokatalizatori u industrijskim procesima. Rad pruža pregled tehnološkog napretka u područjima kao što je molekularna biologija, koja omogućava brže i učinkovitije prilagođavanje biokatalizatora za upotrebu u industriji. Također, navedene su već postojeće primjene enzima u industriji da bi se istaknula njihova važnost. Uz naglasak na prednostima koje biokataliza pruža u industriji, rad ističe i izazove s kojima se susreću stručnjaci u tom području. Ovaj rad pridonosi boljem razumijevanju postojeće situacije primjene enzima u industriji, ističe perspektive tehnološkog napretka u tom području te ukazuje na važnost rješavanja izazova da bi se potaknuo daljnji razvoj industrijskih biokatalitičkih procesa.

### 1.1. Enzimi – prirodni katalizatori

Enzimi su prirodni katalizatori. Po strukturi su bjelančevine ili proteini, a organizirani su u četiri strukturne razine počevši od linearnog lanca aminokiselina. Aktivnost enzima ovisi o njihovoj pravilno složenoj trodimenzionalnoj strukturi (slika 1), a konformacijske promjene do kojih može doći zbog promjene uvjeta u kojima se proteini nalaze mogu dovesti do njihove deaktivacije odnosno denaturacije.<sup>9</sup> Enzimi su biokatalizatori u gotovo svim biokemijskim reakcijama koje se odvijaju unutar živih stanica.<sup>10</sup> Imaju sposobnost sinteze ili razgradnje tvari prema potrebi. Žive stanice sadrže mnoge enzime čija je funkcija provedba brzih kemijskih reakcija u svrhu transformacije molekula. Na primjer, jedna ljudska stanica za obavljanje svih svojih

\* Autor za dopisivanje: doc. dr. sc. Martina Sudar  
E-pošta: [martina.sudar@fkit.unizg.hr](mailto:martina.sudar@fkit.unizg.hr)

funkcija upotrebljava i do 75 tisuća enzima.<sup>11</sup> Enzimi su visokorazvijene biomakromolekule koje u svim živim stanicama služe za izvođenje točno određenog zadatka vrlo učinkovito i vrlo precizno.<sup>1</sup> S obzirom na to da su evoluirali u fiziološkom okruženju, optimalnu katalitičku aktivnost, izvrsnu selektivnost i maksimalnu stabilnost imaju u uvjetima atmosferskog tlaka, sobne temperature i neutralne pH vrijednosti.<sup>12,13</sup> Dobro se otapaju u vodi i smatraju se zelenim katalizatorima.<sup>14</sup>



Slika 1 – 3D struktura enzima halogenhidrin-dehalogenaze (za generiranje strukture upotrijebljen je Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.)

Fig. 1 – 3D structure of the enzyme halohydrin dehalogenase (the structure was generated using Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.)

Navedena svojstva izazivaju interes, ali predstavljaju i prepreku njihovoj industrijskoj primjeni, jer su zbog njih osjetljivi na uvjete drugačije od optimalnih. Visoka temperatura i tlak, granični pH uvjeti, prisutnost organskih otapala i površinski aktivnih tvari čine njihovo katalitičko djelovanje nepouzdanim.<sup>15,16</sup> Topljivost enzima u vodi znači da ih nije jednostavno izdvojiti iz reakcijske smjese i ponovno upotrijebiti, što predstavlja njihov nedostatak.<sup>17</sup> Danas se razvijaju i primjenjuju različite metode i tehnologije da bi sve prednosti enzima bile maksimalno iskorištene, ali i da bi se savladali svi njihovi nedostaci, pa je moguće primijeniti različite metode imobilizacije u svrhu olakšavanja izdvajanja enzima iz reakcijske smjese<sup>12</sup> ili primijeniti rekombinantnu DNA tehnologiju da bi se poboljšala njihova katalitička svojstva. U tablici 1 dan je pregled prednosti i nedostataka enzima kao katalizatora.

Enzimi se prema vrsti katalizirane reakcije dijele u šest glavnih skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije koje zahtijevaju prijenos elektrona ili atoma. Transferaze kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s donorske na akceptorsku molekulu, hidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize, a liaze reakcije adicije ili cijepanje veza. Izomeraze kataliziraju reakcije konverzije jednog izomera u drugi, a ligaze kataliziraju stvaranje kovalentne veze između molekula.<sup>18</sup>

Tablica 1 – Prednosti i nedostaci enzima kao katalizatora

Table 1 – Advantages and disadvantages of enzymes as catalysts

Prednosti <i>Advantages</i>	Nedostaci <i>Disadvantages</i>
Visoka selektivnost, posebno enantio- i regioselektivnost <i>High selectivity, especially enantio- and regioselectivity</i>	Identifikacija i modifikacija enzima potrebnog za specifičnu reakciju je dugotrajan i često skup proces <i>Identification and modification of an enzyme required for a specific reaction is a time-consuming and often expensive process</i>
Velika katalitička aktivnost – ubrzanje reakcija i do $10^{12}$ puta <i>Great catalytic activity – reactions accelerate up to <math>10^{12}</math> times</i>	Podložni deaktivaciji  <i>Susceptible to deactivation</i>
Velika učinkovitost <i>Great efficiency</i>	Često prisutna inhibicija <i>Inhibition often present</i>
Blagi reakcijski uvjeti (pH 5 – 8, atmosferski tlak, 20 – 40 °C) <i>Mild reaction conditions (pH 5–8, atmospheric pressure, 20–40 °C)</i>	Ograničena upotreba jer procesi često zahtijevaju reakcijske uvjete u kojima su enzimi nestabilni <i>Limited use because processes often require reaction conditions in which enzymes are unstable</i>
Biorazgradivost <i>Biodegradability</i>	Proizvodnja enzima je često skupa; podložni su denaturaciji <i>Enzyme production is often expensive; they are susceptible to denaturation</i>

## 1.2. Enzimi i zelena kemija

Rastom svijesti o okolišu postalo je očito da treba mijenjati procesne tradicionalne kemijske sinteze, odnosno kemijsku industriju koja ima značajan utjecaj na okoliš. Iz tog razloga su Anastas i Warner 1998. godine razvili koncept zelene kemije.<sup>19</sup> Iznijeli su 12 načela koja omogućavaju značajan razvoj održive, ali i ekološki prihvatljive kemije, a samim time i kemijske industrije. Usvajanje tih načela predstavlja vrlo velik izazov za kemijsku industriju, jer zahtijeva redizajniranje proizvodnih procesa, što podrazumijeva dodatne troškove s neizvjesnim ishodima.<sup>20</sup> Upravo zbog rastuće potrebe razvoja zelenih alternativa postojećim kemijskim procesima i metodama, kemijska industrija zasigurno će sve češće primjenjivati biokatalizu.<sup>21,22</sup>

U dobu zelene revolucije velika prednost biokatalize nad tradicionalnom kemijskom katalizom je priroda njezina glavnog resursa i najvećeg aduta – enzima. Superiorna selektivnost (regio-, stereo- i enantioselektivnost), velika specifičnost, omogućavanje novih i kraćih sintetskih puteva koji se bez upotrebe enzima ne mogu provesti, aktivnost u blagim reakcijskim uvjetima (fiziološki pH, temperatura i tlak okoline) zbog čega je moguće izbjeći toksične reakcijske reagense,<sup>23–25</sup> samo su neke od prednosti enzima pred kemijskim katalizatorima. Zahvaljujući navedenim svojstvi-

ma enzima, u biokatalitičkim procesima često nastaju manje količine nepoželjnih nusprodukata i problematičnog otpada u odnosu na tradicionalne kemijske sinteze.<sup>26</sup> Sama činjenica da razvoj i upotreba biokatalizatora ne zahtijevaju upotrebu metala koji se prebrzo iscrpljuju iz Zemljine kore stavlja biokatalizu na visoko mjesto poželjnih alternativa za tradicionalne kemijske katalize.<sup>27</sup> U današnje vrijeme upotreba enzima za provedbu održivih procesa postaje sve važnija, a biokataliza predstavlja i jedan od načina za postizanje ciljeva održivog razvoja i implementaciju zelene kemije u industrijske procese s maksimalnim iskorištenjem resursa uz minimalno stvaranje otpada.<sup>28</sup> Još jedna velika prednost enzima je da se dobivaju iz jeftinih obnovljivih izvora te da su biorazgradivi.<sup>29</sup> U usporedbi s tradicional-

nom kemijskom katalizom, biokataliza je u svojoj prirodi održiviji i zeleniji pristup, što potvrđuje i ispunjavanje gotovo svih načela zelene kemije (tablica 2).

Ovdje treba napomenuti da sama prisutnost biokatalizatora u kemijskom procesu ne podrazumijeva održivost procesa.<sup>30</sup> U svrhu određivanja održivosti procesa danas se sve više teži primjeni studija kao što su procjene životnog ciklusa (engl. *Life Cycle Assessment, LCA*)<sup>28</sup> koje u obzir, osim reakcije, uzimaju i podrijetlo supstrata, proizvodnju katalizatora i transport, ali isto tako i isporuku proizvoda i konačno odlaganje. To u praksi znači da se prilikom razvoja bioprocesa treba voditi računa o cijelom procesu, od početka do kraja, da bi se ispunili zahtjevi proizvodnog tržišta.<sup>31</sup>

Tablica 2 – Ispunjavanje načela zelene kemije primjenom biokatalize<sup>32,33</sup>

Table 2 – Fulfillment of the principles of green chemistry using biocatalysis<sup>32,33</sup>

	Načelo zelene kemije <i>Green Chemistry Principle</i>	Način ispunjavanja načela primjenom biokatalize <i>How the principles of green chemistry are fulfilled using biocatalysis</i>
1.	Prevenција otpada <i>Waste prevention</i>	Smanjuje upotrebu organskih otapala te znatno smanjuje nastanak otpada <i>Reduces the use of organic solvents and significantly reduces waste generation</i>
2.	Ekonomija atoma <i>Atom economy</i>	Često je moguće postići bolju ekonomiju atoma jer nastaje manje nusprodukata nego u kemijskim procesima <i>Often possible to achieve better atom economy since fewer by-products are formed than in chemical processes</i>
3.	Manje štetnih materijala <i>Less hazardous materials</i>	Uz eliminaciju organskih otapala, eliminira i uporaba teških metala kao katalizatora, stanice i enzimi su biorazgradivi <i>Elimination of organic solvents and the use of heavy metals as catalysts; cells and enzymes are biodegradable</i>
4.	Sigurniji produkti <i>Safer products</i>	Nema velik utjecaj jer to načelo ovisi o produktima reakcija, ne o samom procesu <i>Has no significant impact because this principle depends on the reaction products, not on the process itself</i>
5.	Sigurnija otapala i pomoćne tvari <i>Safer solvents and auxiliary chemicals</i>	Najčešće se kao otapalo koristi voda <i>Water is often used as a solvent</i>
6.	Energetska učinkovitost <i>Energy efficiency</i>	Blagi reakcijski uvjeti, što zahtjeva manju potrošnju energije <i>Mild reaction conditions which require less energy consumption</i>
7.	Obnovljive sirovine <i>Renewable feedstocks</i>	Enzimi su obnovljivi <i>Enzymes are renewable</i>
8.	Izbjegavanje nepotrebnih procesa derivatizacije <i>Reduced derivatisation</i>	Ne zahtijeva zaštitu funkcionalnih skupina i povezane korake zaštićivanja <i>Protection of the functional groups and related protection steps are not required</i>
9.	Kataliza <i>Catalysis</i>	Enzimi su katalizatori <i>Enzymes are catalysts</i>
10.	Pretvorba produkata u neškodljive nakon prestanka djelovanja <i>Conversion of products into harmless ones after cessation of activity</i>	Nema velik utjecaj jer ovo načelo ovisi o produktima reakcija, ne o samom procesu <i>Has no significant impact because this principle depends on the reaction products, not on the process itself</i>
11.	Analiza procesa u realnom vremenu <i>Real-time analysis</i>	Ovo načelo ovisi o procesu i može se primijeniti u dizajnu biokatalitičkih procesa <i>This principle depends on the process and can be applied in the design of biocatalytic processes</i>
12.	Sigurnija kemija, produkti i procesi <i>Safer chemistry, products, and processes</i>	Blagi reakcijski uvjeti i eliminacija uporabe štetnih organskih otapala za posljedice imaju općenito sigurnije procese <i>Mild reaction conditions and elimination of the use of harmful organic solvents generally result in safer processes</i>

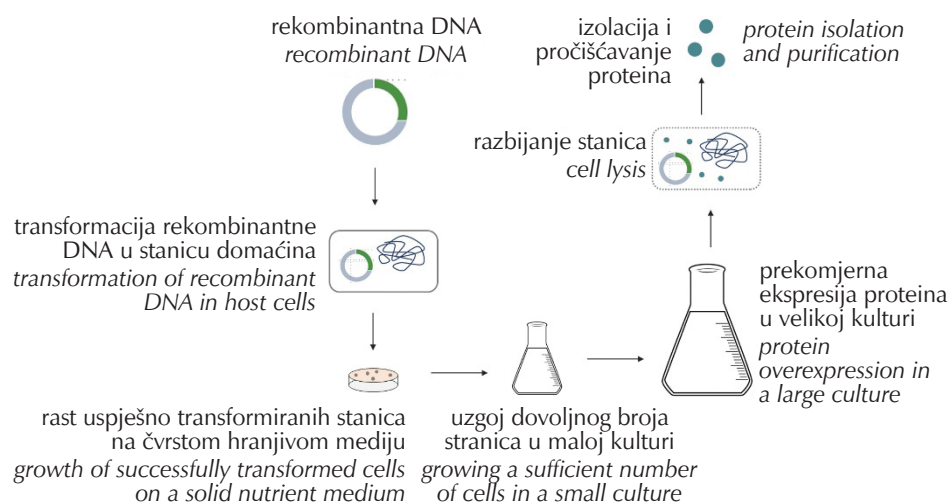
## 2. Molekularna biologija – revolucija za biokatalizu

Uspješna primjena enzima kao industrijskog biokatalizatora zahtijeva ekonomičnu proizvodnju i dostupnost prikladnog enzima koji će imati visoku aktivnost, specifičnost i stabilnost.<sup>34</sup> Zbog osjetljivosti enzima i gubitka ili promjene svojstava i aktivnosti u uvjetima različitim od prirodnih, primjena enzima *in vitro* predstavljala je glavnu prepreku njihovoj široj industrijskoj upotrebi.<sup>35</sup> Revoluciju uporabe enzima omogućio je napredak u područjima biotehnologije i molekularne biologije, posebice sekvencioniranja DNA i RNA, proteinskog inženjerstva, bioinformatike te razvoja rekombinantne DNA tehnologije.<sup>36–38</sup> Zahvaljujući tom napretku, danas je uobičajeno prilagoditi svojstva enzima ciljanim procesima da bi zadovoljili zahtjeve industrijske primjene,<sup>7,39–41</sup> uključujući poboljšanu aktivnost, specifičnost i enantioselektivnost, veću termostabilnost te bolje podnošenje organskih otapala.<sup>34,42</sup> Prema tome, upotreba enzima više ne ovisi toliko o razvoju novih procesa i/ili modifikaciji postojećih. Osim optimiranja enzima za primjenu u industrijskim procesima, navedeni napredak omogućio je i prilagodbu enzima za uporabu u prisutnosti njima neprirodnih supstrata, pa čak i provođenje reakcija koje u prirodi ne postoje.<sup>28,39</sup> Miller i sur.<sup>8</sup> nazvali su to trostrukim partnerstvom, između prirode koja daje "nacrt" za enzimsku katalizu, kemičara koji razmatraju nefiziološke supstrate te proteinskih inženjera koji mogu promijeniti i poboljšati svojstva enzima.

Procjenjuje se da je u prirodi prisutno nekoliko milijuna različitih enzima, od kojih svaki katalizira specifičnu reakciju, ali ih je identificiran i okarakteriziran tek mali broj.<sup>38</sup> Upravo je to jedna od najvećih prepreka s kojom se biokataliza susreće od svojih početaka; identifikacija, ali i modifikacija enzima.<sup>23,32</sup> Iz tog razloga je došlo do razvoja (meta)genomike, sekvencioniranja genoma pojedinačnih organizama koji se nalaze u heterogenoj mikrobnj zajednici i identifikacije pojedinačnih gena i njihovih funkcija.<sup>43</sup> Napredak

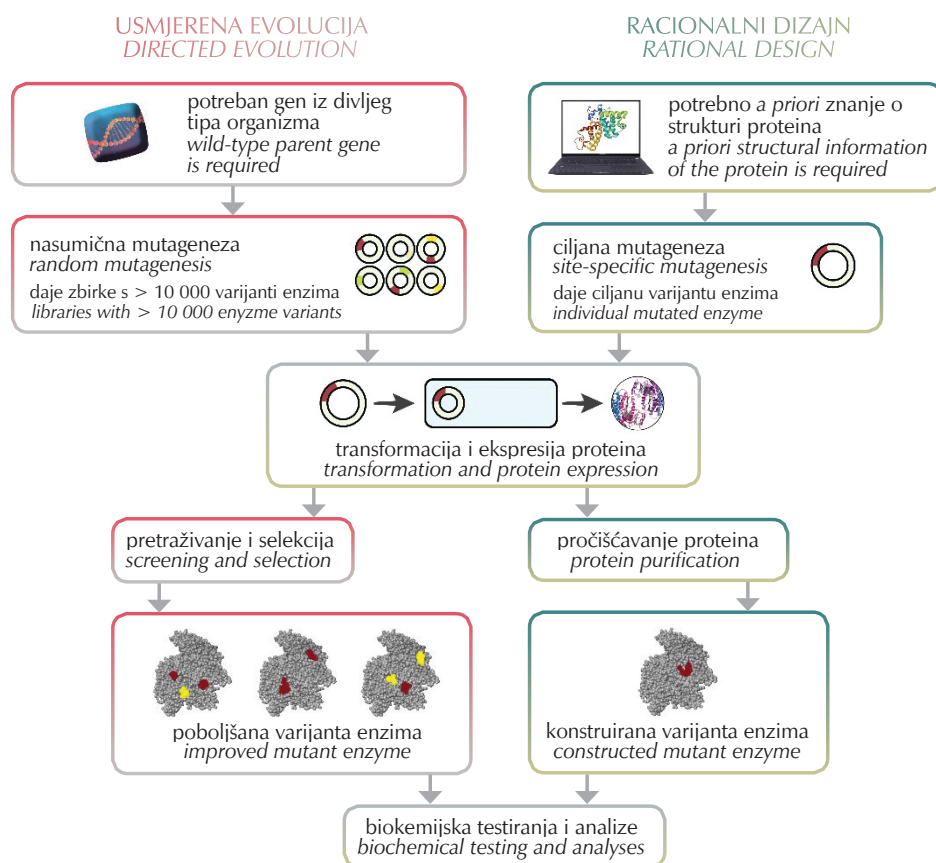
u tehnologiji sekvencioniranja omogućio je eksponencijalno povećanje broja sljedova dostupnih u javnim bazama podataka,<sup>44</sup> a usporedba dostupnih sljedova sa sljedovima enzima poznatih svojstava primjenom računalnih alata omogućuje pronalazak homolognih sljedova koji upućuju na postojanje sličnih svojstava.<sup>45,46</sup> Nakon pronalaska željenog slijeda, metode rekombinantne DNA tehnologije odnosno ekspresija željenih gena u stanicama domaćina (slika 2) kao što je *Escherichia coli* ili *Bacillus subtilis* omogućuju testiranje enzima u laboratoriju. Razdoblje rekombinantne DNA tehnologije započelo je 70-ih godina prošlog stoljeća,<sup>42</sup> a ta tehnologija predstavlja primjenu molekularno-genetičkih metoda koje omogućuju mijenjanje nasljednog materijala stanice – genoma. Omogućuje izolaciju gena iz jednog organizma i njegovu ugradnju u genom drugog organizma koji se uobičajeno naziva stanica domaćin.<sup>47</sup> Vrlo često se kao stanica domaćin upotrebljava bakterija *E. coli*<sup>48</sup> jer je dobro istražena i jednostavno ju je uzgojiti u laboratoriju, te na taj način dobiti veće količine željenog enzima znatno brže i jednostavnije (slika 2). Prvi komercijalni proizvod dobiven primjenom rekombinantne DNA tehnologije bio je ljudski inzulin, davne 1982. godine.<sup>47,48</sup> I u tom slučaju je gen koji kodira ljudski inzulin bio ugrađen u genom nepatogene bakterije *E. coli*, koja je zatim upotrijebljena za proizvodnju ljudskog inzulina. Ista metoda kasnije je primijenjena i za proizvodnju drugih terapijskih proteina, poput interferona, hormona rasta i sl.<sup>47</sup> Razvoj rekombinantne DNA tehnologije omogućio je i povećanje koncentracije željenog enzima u stanicama domaćina jer se provodi prekomjerna ekspresija, što je iznimno važno s obzirom na to da divlji sojevi mikroorganizama proizvode enzime u malim koncentracijama koje nisu industrijski iskoristive.<sup>42</sup>

Drugo područje molekularne biologije, pored rekombinantne DNA tehnologije, koje je znatno utjecalo na sve češću primjenu biokatalize je proteinsko inženjerstvo.<sup>41</sup> Priroda je nepresušan izvor enzima: postojećih, ali još neotkrivenih, no isto tako i novih enzima koji se u priro-



Slika 2 – Transformacija rekombinantne DNA u stanicu domaćina i prekomjerna ekspresija proteina

Fig. 2 – Transformation of recombinant DNA in the host cell and protein overexpression



Slika 3 – Usporedba usmjerene evolucije i racionalnog dizajna proteina  
 Fig. 3 – Comparison of directed evolution and rational protein design

di stalno pojavljuju zbog potrebe razgradnje nepovoljnih komponenata okoline poput antibiotika ili pesticida, ili zbog novih umjetnih tvari prisutnih u okolišu koje pružaju nove izvore hrane.<sup>49</sup> Ti novi enzimi nastaju prirodnim putem, evolucijom – promjenom, umetanjem ili brisanjem ili rekombinacijom aminokiselina u slijedu za pojedini protein. Jedna od metoda proteinskog inženjerstva je usmjerena evolucija koja oponaša prirodnu evoluciju, ali na ubrzan način u laboratoriju<sup>50</sup> te primjenjuje nasumične mutacije slijeda aminokiselina u svrhu poboljšanja funkcije enzima (slika 3).<sup>49</sup> Usmjerena evolucija predstavlja iterativni proces u kojem se ponavlja proces generiranja mutacija, čime se dobiva zbirka varijanti i selekcije onih varijanti koje pokazuju poboljšana svojstva sve dok se ne dobije varijanta s optimalnim svojstvima.<sup>50</sup> Primjenjujući taj pristup, moguće je doći do mutacija koje se ne nalaze u blizini aktivnog mjesta enzima, a mogu imati znatan utjecaj na promjenu svojstava enzima.<sup>8</sup> Velika prednost te metode je da nije potrebno nikakvo znanje o strukturi enzima ili aktivnom mjestu. Osim usmjerene evolucije, za poboljšanje svojstava enzima pa čak i za dizajn novih enzima, moguće je primjenjivati i metodu racionalnog dizajna proteina (slika 3). Za provedbu metode racionalnog dizajna proteina potrebno je poznavati slijed aminokiselina u linearnom lancu, ali i strukturu proteina jer je potrebno utvrditi koje aminokiseline treba promijeniti da bi došlo do promjene željenog svojstva enzima. Metodom usmjerene evolucije dobivaju se nasumične mutacije, dok se racionalni diza-

jnom provodi ciljana mutagenaza.<sup>51</sup> Računalni dizajn enzima moguće je provesti na dva načina, na temelju slijeda aminokiselina i na temelju strukture.<sup>52</sup> Dizajn na temelju slijeda aminokiselina predviđaju se potencijalna mjesta za provedbu mutacija koje će dati nove varijante enzima sa željenim svojstvima.<sup>53,54</sup> Dizajn na temelju strukture provodi se na temelju samo jednog od svojstava enzimske reakcije: reakcijskih koraka kemijske transformacije, procesa vezanja supstrata i otpuštanja produkata ili enzimske konformacijske dinamike, jer je za svako od tih svojstava potreban drugačiji pristup i, posljedično, drugi algoritam.<sup>40</sup>

Razvoj biokatalizatora može se odvijati na dva načina: kroz pronalazak i dizajn.<sup>55</sup> Prvi način podrazumijeva pronalazak novih enzima u prirodi, a drugi modifikaciju poznatih enzima biokemijskim principima uz mogućnost primjene računalnih metoda.<sup>55</sup> Nativni enzimi, oni pronađeni u prirodi, najčešće se ne mogu upotrebljavati u svojem prirodnom obliku u industrijskim procesima, jer kao takvi rijetko mogu postići potrebnu selektivnost, specifičnost, katalitičku učinkovitost i stabilnost.<sup>34,56</sup> Prema tome, često je nakon otkrića novog enzima potrebno primijeniti proteinsko inženjerstvo u svrhu poboljšavanja njegovih svojstava. Osim sad već tradicionalnih, metode usmjerene evolucije i racionalnog dizajna proteina, razvijene su i druge metode modifikacije i dizajna enzima poput dodatka nestandardnih (nekanonskih) aminokiselina koji omogućuje nove funkcije enzima.<sup>55,57</sup> Dizajn i inženjerstvo enzima uz dodatak ne-

standardnih aminokiselina novo je područje biokatalize, koje se brzo razvija.<sup>40</sup> Dodatak takvih, strukturno i funkcionalno različitih, nekanonskih aminokiselina omogućuje postizanje novih i drugačijih konfiguracijskih struktura, što posljedično otvara cijeli niz novih mogućnosti upotrebe i dizajna enzima.<sup>58,59</sup>

Napredak bioinformatike i metoda umjetne inteligencije doveli su i do mogućnosti predviđanja 3D strukture enzima na temelju poznatog slijeda aminokiselina.<sup>28</sup> U tu svrhu primjenjuju se softveri poput AlphaFold 2.<sup>60</sup> Predviđanje 3D strukture enzima na taj način omogućava bolje razumijevanje svojstava enzima, što u konačnici omogućava njihovu modifikaciju na racionalan način. Uz uvjet poznavanja slijeda aminokiselina pojedinog enzima, danas je moguće provesti i internetsku narudžbu sintetskog gena koji će odgovarati željenom proteinu i biti prilagođen za ekspresiju u željenom organizmu (npr. *E. coli* ili *Saccharomyces cerevisiae*).<sup>40,46</sup> Zahvaljujući velikom napretku bioinformatike, evolucije enzima i uvećanja procesa, do novih otkrića se dolazi brže nego ikad prije; sve se brže otkrivaju novi enzimi koje je moguće i prilagoditi za primjenu u kemijskoj sintezi te se, zbog svega toga, može reći da se nalazimo u "zlatnom dobu" biokatalize.<sup>61</sup>

### 3. Primjena enzima u industriji

Najranije primjene enzima datiraju još od starog vijeka kad su se mikroorganizmi upotrebljavali u proizvodnji hrane i pića, uključujući sir, kiselo tijesto, pivo i ocat.<sup>5</sup> Iako izvori enzima mogu biti stanice biljaka, životinja ili mikroorganizama, u počecima su se u industriji uglavnom upotrebljavali sirovi pripravci enzima ekstrahirani iz tkiva biljaka i životinja. Do promjene je došlo sredinom 20. stoljeća zbog razvoja tehnologije fermentacije i industrijske mikrobiologije. Od tad se sve više upotrebljavaju mikrobnii enzimi. Biljni i životinjski enzimi još uvijek imaju neke niše primjene,<sup>1</sup> ali više od 50 % industrijski upotrijebljenih enzima danas proizvode mikrobnii sojevi,<sup>34</sup> što je posljedica jednostavnosti uzgoja mikroorganizama i njihove dostupnosti, ali i razvoja tehnologije rekombinantne DNA.

Tijekom proteklih nekoliko desetljeća primjena enzima proširila se s prehrambene industrije na druge industrije, od kemo-enzimske sinteze kemikalija do proizvodnje novih biogoriva.<sup>34</sup> Danas enzimi imaju široku primjenu u raznim biokemijskim procesnim industrijama, organskim sintezama, proizvodnji kemikalija, medicini i farmaceutskoj industriji te u proizvodnji hrane, kozmetike, tekstila i papira.<sup>13,62</sup> Upotreba enzima u industriji obuhvaća proizvodnju mliječnih proizvoda, hidrolizu škroba, proizvodnju pića (vino, pivo, koncentratii voća), proizvodnju i pročišćavanje tekstila, proizvodnju papira, kozmetike i medicinskih proizvoda, razne kemijske sinteze od kemikalija široke potrošnje, pa sve do finih i farmaceutskih kemikalija te proizvodnju biogoriva i obradu otpadnih voda.<sup>2,28,63,64</sup> Dodatno, enzimi svoju primjenu nalaze i u novorazvijenim industrijskim sektorima, kao što je proizvodnja biosenzora, gdje su od neizmjerne važnosti zbog svoje visoke specifičnosti za ciljane biomarkere.<sup>65</sup> U tablici 3 dan je skraćeni pregled industrija u kojima se enzimi upotrebljavaju te njihove primjene.

Možda najveću važnost danas enzimi imaju u različitim kemijskim sintezama, što uključuje i farmaceutsku industriju, odnosno proizvodnju lijekova. Iako se tradicionalnom kemijskom katalizom postižu visoka iskorištenja, njezina selektivnost nije niti približna selektivnosti koju postižu enzimi.<sup>66</sup> Enzimi pokazuju nekoliko vrsta selektivnosti. Enantioselektivni su, što znači da djeluju samo na jedan enantiomer. Regioselektivni su, što znači da djeluju samo na jedan reakcijski centar u molekuli. Kemoselektivni su, što znači da djeluju samo na jednu funkcionalnu skupinu u molekuli. Upravo su zbog navedenih svojstava enzimi nezamjenjivi u farmaceutskoj industriji, gdje se upotrebljavaju u proizvodnji kiralnih lijekova i spojeva, kao i u sintezi enantiomerno čistih kemikalija.<sup>23,33</sup> Sinteza kiralnih molekula reakcijama kataliziranim enzimima može se smatrati začetnikom interesa farmaceutske industrije za biokatalizu. Različiti enantiomeri mogu imati različito djelovanje, pa je zbog učinkovitosti i sigurnosti liječenja preporučljiva uporaba čistog enantiomera umjesto racemata.<sup>67</sup> Enzimi mogu proizvesti kiralne produkte iz prokiralnih supstrata, a isto tako mogu i razlikovati različite enantiomere, reagirajući samo s jednim oblikom molekule, te su zbog toga vrlo važni za sintezu enantiomerno čistih spojeva. Otprilike 56 % aktivnih farmaceutskih sastojaka su kiralne molekule, pa je iz tog razloga potrebno proizvoditi homokiralne lijekove.<sup>68,69</sup> Blagi reakcijski uvjeti biokatalize uz visoku selektivnost enzima smanjuju ili u potpunosti eliminiraju mogućnosti izomerizacije, racemizacije i epimerizacije kiralnih intermedijara,<sup>56</sup> što enzime čini idealnim katalizatorima u sintezi kiralnih molekula. Upravo je porast potražnje za biofarmaceuticima i širenje farmaceutske industrije pokretač modernog tržišta biokatalize i biokatalizatora, što potvrđuje sve veći broj publikacija i patenata vezanih za biokatalitičke metode upravo u farmaceutskom sektoru.<sup>70</sup>

### 4. Biokemijsko-inženjerski pristup u biokatalizi

Biokataliza se u usporedbi s tradicionalnom kemijskom katalizom smatra zelenom i održivom tehnologijom, ali bez ekonomske isplativosti ne može se očekivati njezina šira primjena u industriji.<sup>33,71</sup> Primjena biokemijskog inženjerstva može predstavljati veliku korist za daljnji razvoj biokatalize. To uključuje primjenu modeliranja,<sup>72,73</sup> metoda za optimiranje procesa,<sup>74–76</sup> a također i primjenu metoda za ekonomsku procjenu procesa još u ranom stadiju razvoja.<sup>77–79</sup> Metodologija koja uključuje modeliranje može se primjenjivati u svrhu definiranja prostora za pronalazak optimalnog rješenja,<sup>80,81</sup> može smanjiti troškove i skratiti vrijeme razvoja s obzirom na to da simulacije mogu povećati razumijevanje procesa,<sup>73,82,83</sup> a može imati i povoljan utjecaj na kvalitetu produkta.<sup>84</sup> Farmaceutska industrija ulaže više novaca u istraživanje i razvoj procesa koji ne budu odobreni nego u uspješne procese;<sup>85</sup> razvoj lijeka koji uspije doći do faze kliničkih istraživanja u prosjeku traje 10 – 15 godina i pri tome se potroši 1 – 2 milijarde dolara, a unatoč tome 90 % ih ne bude odobreno za prodaju,<sup>86,87</sup> što ilustrira važnost potrebe smanjenja troškova i vremena razvoja industrijskih procesa. Iz tog razloga, bilo koja metodologija koja može biti primijenjena za evaluaciju procesnih alternativa i koja može ubrzati razvoj može

Tablica 3 – Enzimi u industriji i njihova primjena<sup>34</sup>Table 3 – Enzymes in industry and their applications<sup>34</sup>

Industrija <i>Industry</i>	Enzimi <i>Enzymes</i>	Primjena <i>Application</i>
Prehrambena <i>Food</i>	Amilaze <i>Amylases</i>	Proizvodnja glukoznog sirupa; pečenje kruha; bistrenje sokova; proizvodnja piva <i>Production of glucose syrup; bread baking; juice clarification; beer production</i>
	Proteaze <i>Proteases</i>	Prerada sireva i mesa; proizvodnja keksa; proizvodnja piva <i>Cheese and meat processing; production of biscuits; beer production</i>
	Pektinaze <i>Pectinases</i>	Proizvodnja voćnih sokova; proizvodnja vina <i>Production of fruit juices; wine production</i>
	Lipaze <i>Lipases</i>	Zrenje sira; pečenje kruha; modifikacija masti u uljima <i>Cheese ripening; bread baking; modification of fats in oils</i>
	Laktaze <i>Lactase</i>	Prerada mliječnih proizvoda s ciljem uklanjanja laktoze <i>Processing of dairy products to remove lactose</i>
Farmaceutska <i>Pharmaceutical</i>	Penicilin-acilaze <i>Penicillin-acylase</i>	Proizvodnja derivata penicilina <i>Production of penicillin derivatives</i>
	Lipaze, nitrilaze, nitril-hidrataze, amidaze, oksidoreduktaze, transaminaze <i>Lipases, nitrilases, nitrile hydratases, amidases, oxidoreductases, transaminases</i>	Proizvodnja optički čistih spojeva kroz kinetičku rezoluciju, dinamičku kinetičku rezoluciju itd. <i>Production of optically pure compounds through kinetic resolution, dynamic kinetic resolution, etc.</i>
Tekstilna <i>Textile</i>	Amilaze <i>Amylases</i>	Uklanjanje škroba iz tkanine <i>Removal of starch from fabric</i>
	Celulaze <i>Cellulases</i>	Pranje traperi, omekšavanje tekstila <i>Washing denim, softening textiles</i>
	Lakaze <i>Laccases</i>	Izbjeljivanje traperi, obrada otpadnih voda <i>Denim bleaching, wastewater treatment</i>
	Peroksidaze <i>Peroxidases</i>	Uklanjanje viška boje <i>Removing excess dye</i>
	Katalaze <i>Catalases</i>	Uklanjanje zaostalog vodikova peroksida <i>Removal of residual hydrogen peroxide</i>
Papirna <i>Paper</i>	Celulaze/hemicelulaze <i>Cellulases/hemicellulases</i>	Poboljšana sposobnost izbjeljivanja <i>Improved bleaching power</i>
	Celulaze <i>Cellulase</i>	Proizvodnja papira <i>Paper production</i>
	Amilaze <i>Amylases</i>	Smanjenje viskoznosti škrobnih premaza <i>Reduction of viscosity of starch coatings</i>
	Lakaze <i>Laccases</i>	Izbjeljivanje, uklanjanje lignina <i>Bleaching, lignin removal</i>
Biorafinerija <i>Biorefinery</i>	Celulaze/hemicelulaze <i>Cellulases/hemicellulases</i>	Razgradnja lignoceluloznih materijala za proizvodnju etanola <i>Degradation of lignocellulosic materials for ethanol production</i>
	Lipaze <i>Lipases</i>	Proizvodnja biodizela <i>Biodiesel production</i>

imati važan učinak. Iako je primjena reakcijskog inženjerstva uobičajena u kemijskoj i naftnoj industriji, njezina veća primjena u farmaceutskoj industriji tek se očekuje.<sup>88</sup> Reakcijsko inženjerstvo već se dugo primjenjuje kao učinkovita i djelotvorna metodologija za razvoj i određivanje veličine reaktora za sintezu vrijednih industrijskih kemikalija kemijskom sintezom.<sup>88</sup> Istu metodologiju moguće je primijeniti i na biokatalitičke reakcije. Iako cjelokupni podatci nisu uvijek dostupni, procjena troškova također bi trebala biti napravljena u ranom stadiju razvoja projekta.<sup>89</sup> Simulacije i model procesa moguće je primjenjivati za analizu i procje-

nu odgovarajućih operacijskih uvjeta u ranoj fazi razvoja, čime je moguće smanjiti broj potrebnih eksperimenata.<sup>90</sup> Cilj optimizacije procesa treba predstavljati kompromis između nekoliko ciljnih funkcija koje uključuju iskorištenje na produktu, volumnu produktivnost, specifičnu produktivnost, koncentraciju produkta, produktivnost enzima itd.,<sup>78</sup> što nije moguće postići bez opsežnog eksperimentalnog rada i primjene modeliranja. Primjenjujući modele, moguće je brže i jeftinije optimizirati reakcije. Primjenom interdisciplinarnog pristupa koji povezuje kemiju, biologiju i inženjerstvo moguće je ubrzati razvoj biokatalize.<sup>91</sup>

Proteinsko i procesno inženjerstvo nude komplementarna rješenja za problem razvoja procesa, te ih je potrebno primjenjivati istodobno.<sup>92,93</sup> Kao što je ranije spomenuto, primjenom proteinskog inženjerstva moguće je znatno poboljšati svojstva enzima, uključujući kinetičke parametre<sup>94</sup> koji u osnovi određuju ishod procesa, a razvojem kinetičkih modela procesa moguće je odrediti usko grlo procesa (engl. *bottleneck*) koje može usmjeriti potrebne modifikacije enzima. Istraživanja prilikom razvoja kinetičkih modela upućuju na moguće inhibicije ili deaktivaciju enzima,<sup>95</sup> a proteinski inženjeri takve informacije mogu iskoristiti za poboljšanje svojstava enzima. Također, kinetički modeli mogu omogućiti podešavanje koncentracije enzima odnosno njihove aktivnosti u stanicama.<sup>96,97</sup> Iako su takva istraživanja tek u začetcima, pokazuju velik potencijal za daljnji razvoj biokatalitičkih procesa i njihovu uspješnu implementaciju u industriju.

#### 4. Zaključak

Biokataliza pokazuje velik potencijal za primjenu u industriji, posebice u kemijskim procesima koji iskorištavaju njihova izvrsna svojstva, poput izvanredne enantio- i regioselektivnosti, velike aktivnosti i učinkovitosti. Najočitiiji razlog za sve češću primjenu biokatalize može se pripisati rastućoj svijesti o potrebi očuvanja okoliša i o iscrpljivanju prirodnih resursa, jer biokataliza ispunjava veliku većinu načela zelene kemije. Među ostalim, omogućuje procese u kojima nastaje manje nusprodukata i, posljedično, otpada, jer su iskorištenja reakcije velika te procese koji se provode u blagim reakcijskim uvjetima, što osigurava smanjenu potrošnju energije. Iako postoje biokatalitički procesi u industrijskim razmjerima, što svjedoči i o ekonomskom i o ekološkom interesu za te procese, biokatalitički procesi još uvijek nisu ispunili svoj puni potencijal. Uspješna primjena enzima kao industrijskog biokatalizatora zahtijeva ekonomičnu proizvodnju i dostupnost prikladnog enzima. Velik problem industrijskih procesa su potrebni uvjeti koji se često znatno razlikuju od optimalnih uvjeta koje enzimi imaju u živim stanicama. Stoga je za postizanje željenih rezultata procesa potrebno posebno odabrati ili čak i modifikirati odabrani biokatalizator te primijeniti reakcijsko inženjerstvo da bi proces bilo moguće optimirati. Primjenom reakcijskog inženjerstva moguće je ubrzati razvoj biokatalitičkih procesa, ali isto tako i usmjeriti potrebne modifikacije enzima te pružiti nužne informacije proteinskim inženjerima za poboljšanje svojstava enzima. Prema tome, da bi se razvoj novih industrijskih biokatalitičkih procesa ubrzao, potrebno je primijeniti interdisciplinarni pristup, a posebice se to odnosi na proteinsko i procesno inženjerstvo koja nude komplementarna rješenja za problem razvoja procesa.

#### Literatura References

1. A. Illanes, L. Wilson, C. Vera, Problem solving in enzyme biocatalysis, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2013.
2. A. Basso, S. Serban, Industrial applications of immobilized enzymes: A review, *Mol. Catal.* **479** (2019) 110607, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.
3. C. C. de Carvalho, Whole cell biocatalysts: Essential workers from Nature to the industry, *Microb. Biotechnol.* **10** (2017) 250–263, doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12363>.
4. C. Walsh, Enabling the chemistry of life, *Nature* **409** (2001) 226–231, doi: <https://doi.org/10.1038/35051697>.
5. Đ. Vasić-Rački, History of industrial biotransformations: Dreams and realities, u Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. (ur.), *Industrial biotransformations*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Njemačka, 2006., str. 1–36.
6. K. Buchholz, U. T. Bornscheuer, Enzyme technology: History and current trends, u Yoshida, T. (ur.), *Applied bioengineering*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Njemačka, 2017, str. 11–46.
7. M. D. Truppo, Biocatalysis in the pharmaceutical industry: The need for speed, *ACS Med. Chem. Lett.* **8** (2017) 476–480, doi: <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.7b00114>.
8. D. C. Miller, S. V. Athavale, F. H. Arnold, Combining chemistry and protein engineering for new-to-nature biocatalysis, *Nat. Synth.* **1** (2022) 18–23, doi: <https://doi.org/10.1038/s44160-021-00008-x>.
9. A. S. Bommarius, M. F. Paye, Stabilizing biocatalysts, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 6534–6565, doi: <https://doi.org/10.1039/c3cs60137d>.
10. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18053> (pristupljeno 15. 7. 2023.).
11. Q. Husain, M. F. Ullah, *Biocatalysis: Enzymatic basics and applications*, Springer, Cham, Švicarska, 2019.
12. R. A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* **42** (2013) 6223–6235, doi: <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
13. M. Bilal, Y. Zhao, T. Rasheed, H. M. N. Iqbal, Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* **120** (2018) 2530–2544, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.025>.
14. M. Bilal, M. Adeel, T. Rasheed, Y. Zhao, H. M. N. Iqbal, Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – a review, *Environ. Int.* **124** (2019) 336–353, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.011>.
15. P. V. Iyer, L. Ananthanarayan, Enzyme stability and stabilization: Aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochem.* **43** (2008) 1019–1032, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>.
16. K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, J. M. Broering, J. F. Chaparro-Riggers, Stability of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11** (2007) 220–225, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.685>.



17. R. A. Sheldon, D. Brady, Green chemistry, biocatalysis, and the chemical industry of the future, *ChemSusChem* **15** (2022) e202102628, doi: <https://doi.org/10.1002/cssc.202102628>.
18. D. Malcolm, W. E. C., *Enzymes*, 2. izd., Academic Press, New York, SAD, 1964.
19. P. Anastas, J. Warner, *Green chemistry: Theory and practice*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1998.
20. A. Illanes, L. Wilson, C. Vera, *Technical biocatalysis*, u: Hall, G. W. M. (ur.), *Modern biocatalysis*. The Royal Society of Chemistry, Croydon, UK, 2018, str. 473–515.
21. S. M. Mennen, C. Alhambra, C. L. Allen, M. Barberis, S. Bertritt, T. A. Brandt, A. D. Campbell, J. Castañón, A. H. Cherney, M. Christensen, D. B. Damon, J. Eugenio de Diego, S. García-Cerrada, P. García-Losada, R. Haro, J. Janey, D. C. Leitch, L. Li, F. Liu, P. C. Lobben, D. W. C. MacMillan, J. Magano, E. McInturff, S. Monfette, R. J. Post, D. Schultz, B. J. Sitter, J. M. Stevens, I. I. Strambeanu, J. Twilton, K. Wang, M. A. Zajac, The evolution of high-throughput experimentation in pharmaceutical development and perspectives on the future, *Org. Process Res. Dev.* **23** (2019) 1213–1242, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00140>.
22. S. Chakrabarty, Y. Wang, J. C. Perkins, A. R. H. Narayan, Scalable biocatalytic C–H oxyfunctionalization reactions, *Chem. Soc. Rev.* **49** (2020) 8137–8155, doi: <https://doi.org/10.1039/d0cs00440e>.
23. S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60** (2021) 88–119, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>.
24. U. Hanefeld, F. Hollmann, C. E. Paul, Biocatalysis making waves in organic chemistry, *Chem. Soc. Rev.* **51** (2022) 594–627, doi: <https://doi.org/10.1039/d1cs00100k>.
25. C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, Power of biocatalysis for organic synthesis, *ACS Cent. Sci.* **7** (2021) 55–71, doi: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01496>.
26. S. Šimić, E. Zukić, L. Schmermund, K. Faber, C. K. Winkler, W. Kroutil, Shortening synthetic routes to small molecule active pharmaceutical ingredients employing biocatalytic methods, *Chem. Rev.* **122** (2022) 1052–1126, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00574>.
27. S. Chakrabarty, E. O. Romero, J. B. Pyser, J. A. Yazarians, A. R. H. Narayan, Chemoenzymatic total synthesis of natural products, *Acc. Chem. Res.* **54** (2021) 1374–1384, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00810>.
28. A. R. Alcántara, P. Dominguez de María, J. A. Littlechild, M. Schurmann, R. A. Sheldon, R. Wohlgemuth, Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry, *ChemSusChem* **15** (2022) e202102709, doi: <https://doi.org/10.1002/cssc.202102709>.
29. T. E. Graedel, *Green chemistry and sustainable development*, u Clark, J. H.; Macquarrie, D. (ur.), *Handbook of green chemistry and technology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 2002, str. 56–61.
30. P. Domínguez de María, Biocatalysis, sustainability, and industrial applications: Show me the metrics, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **31** (2021) 100514, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100514>.
31. L. E. Meyer, M. Hobisch, S. Kara, Process intensification in continuous flow biocatalysis by up and downstream processing strategies, *Curr. Opin. Biotechnol.* **78** (2022) 102835, doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102835>.
32. D. J. Timson, Four challenges for better biocatalysts, *Fermentation* **5** (2019) 39, doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation5020039>.
33. R. A. Sheldon, J. M. Woodley, Role of biocatalysis in sustainable chemistry, *Chem. Rev.* **118** (2018) 801–838, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
34. S. Jemli, D. Ayadi-Zouari, H. B. Hlima, S. Bejar, Biocatalysts: Application and engineering for industrial purposes, *Crit. Rev. Biotechnol.* **36** (2016) 246–258, doi: <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.950550>.
35. E. Erdem, J. M. Woodley, Industrially useful enzymology: Translating biocatalysis from laboratory to process, *Chem Catal.* **2** (2022) 2499–2505, doi: <https://doi.org/10.1016/j.checat.2022.09.037>.
36. D. Yi, T. Bayer, C. P. S. Badenhorst, S. Wu, M. Doerr, M. Hohne, U. T. Bornscheuer, Recent trends in biocatalysis, *Chem. Soc. Rev.* **50** (2021) 8003–8049, doi: <https://doi.org/10.1039/d0cs01575j>.
37. B. Hauer, Embracing nature's catalysts: A viewpoint on the future of biocatalysis, *ACS Catal.* **10** (2020) 8418–8427, doi: <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01708>.
38. B. Wiltschi, T. Cernava, A. Dennig, M. Galindo Casas, M. Geier, S. Gruber, M. Haberbauer, P. Heidinger, E. Herrero Acero, R. Kratzer, C. Luley-Goedl, C. A. Muller, J. Pitzer, D. Ribitsch, M. Sauer, K. Schmolzer, W. Schnitzhofer, C. W. Sensen, J. Soh, K. Steiner, C. K. Winkler, M. Winkler, T. Wriessnegger, Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications, *Biotechnol. Adv.* **40** (2020) 107520, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107520>.
39. S. C. Hammer, A. M. Knight, F. H. Arnold, Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **7** (2017) 23–30, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.06.002>.
40. E. L. Bell, W. Finnigan, S. P. France, A. P. Green, M. A. Hayes, L. J. Hepworth, S. L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K. S. Ryan, N. J. Turner, S. L. Flitsch, Biocatalysis, *Nat. Rev. Methods Primers* **1** (2021) 46, doi: <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>.
41. R. A. Sheldon, D. Brady, Streamlining design, engineering, and applications of enzymes for sustainable biocatalysis, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **9** (2021) 8032–8052, doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01742>.
42. M. T. Reetz, Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013) 12480–12496, doi: <https://doi.org/10.1021/ja405051f>.
43. J. C. Wooley, A. Godzik, I. Friedberg, A primer on metagenomics, *PLoS Comput. Biol.* **6** (2010) e1000667, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>.
44. P. Jacques, M. Béchet, M. Bigan, D. Caly, G. Chataigné, F. Coutte, C. Flahaut, E. Heuson, V. Leclère, D. Lecouturier, V. Phalip, R. Ravallec, P. Dhulster, R. Froidevaux, High-throughput strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **40** (2016) 161–180, doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1690-x>.
45. T. Davids, M. Schmidt, D. Bottcher, U. T. Bornscheuer, Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17** (2013) 215–220, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.022>.
46. R. A. Sheldon, Biocatalysis and biomass conversion: Enabling a circular economy, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **378** (2020) 20190274, doi: <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0274>.
47. B. R. Glick, C. L. Patten, *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*, John Wiley & Sons, Hoboken, SAD, 2022.
48. M. Fakruddin, R. Mohammad Mazumdar, K. S. Bin Mannan, A. Chowdhury, M. N. Hossain, Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of en-

- zymes by recombinant *E. coli*, *ISRN Biotechnol.* **2013** (2013) 590587, doi: <https://doi.org/10.5402/2013/590587>.
49. F. H. Arnold, Directed evolution: Bringing new chemistry to life, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57** (2018) 4143–4148, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201708408>.
50. S. Gargiulo, P. Soumillion, Directed evolution for enzyme development in biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **61** (2021) 107–113, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.11.006>.
51. U. T. Bornscheuer, M. Pohl, Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5** (2001) 137–143, doi: [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00182-4](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00182-4).
52. I. Victorino da Silva Amatto, N. Gonsales da Rosa-Garzon, F. Antonio de Oliveira Simoes, F. Santiago, N. Pereira da Silva Leite, J. Raspante Martins, H. Cabral, Enzyme engineering and its industrial applications, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **69** (2022) 389–409, doi: <https://doi.org/10.1002/bab.2117>.
53. S. M. Marques, J. Planas-Iglesias, J. Damborsky, Web-based tools for computational enzyme design, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **69** (2021) 19–34, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.01.010>.
54. Y. Xu, D. Verma, R. P. Sheridan, A. Liaw, J. Ma, N. M. Marshall, J. McIntosh, E. C. Sherer, V. Svetnik, J. M. Johnston, Deep dive into machine learning models for protein engineering, *J. Chem. Inf. Model.* **60** (2020) 2773–2790, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00073>.
55. B. A. Sandoval, T. K. Hyster, Emerging strategies for expanding the toolbox of enzymes in biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **55** (2020) 45–51, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.12.006>.
56. B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, Recent progress in industrial biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15** (2011) 187–193, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.019>.
57. Y. Ravikumar, S. P. Nadarajan, T. Hyeon Yoo, C. S. Lee, H. Yun, Incorporating unnatural amino acids to engineer biocatalysts for industrial bioprocess applications, *Biotechnol. J.* **10** (2015) 1862–1876, doi: <https://doi.org/10.1002/biot.201500153>.
58. Y. Won, A. D. Pagar, M. D. Patil, P. E. Dawson, H. Yun, Recent advances in enzyme engineering through incorporation of unnatural amino acids, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **24** (2019) 592–604, doi: <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0163-x>.
59. J. Zhao, A. J. Burke, A. P. Green, Enzymes with noncanonical amino acids, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **55** (2020) 136–144, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.01.006>.
60. J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Zidek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature* **596** (2021) 583–589, doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
61. N. J. Turner, R. Kumar, Editorial overview: Biocatalysis and biotransformation: The golden age of biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **43** (2018) A1–A3, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.02.012>.
62. J. M. Choi, S. S. Han, H. S. Kim, Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnol. Adv.* **33** (2015) 1443–1454, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>.
63. O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang, Industrial enzyme applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002) 345–351, doi: [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00328-2).
64. J. Chapman, A. Ismail, C. Dinu, Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks, *Catalysts* **8** (2018) 238, doi: <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.
65. Y. R. Maghraby, R. M. El-Shabasy, A. H. Ibrahim, H. M. E. Azzazy, Enzyme immobilization technologies and industrial applications, *ACS Omega* **8** (2023) 5184–5196, doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>.
66. Y. Cao, X. Li, J. Ge, Enzyme catalyst engineering toward the integration of biocatalysis and chemocatalysis, *Trends Biotechnol.* **39** (2021) 1173–1183, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.002>.
67. J. Ceramella, D. Iacopetta, A. Franchini, M. De Luca, C. Saturnino, I. Andreu, M. S. Sinicropi, A. Catalano, A look at the importance of chirality in drug activity: Some significative examples, *Appl. Sci.* **12** (2022) 10909, doi: <https://doi.org/10.3390/app122110909>.
68. A. Calcaterra, I. D'Acquarica, The market of chiral drugs: Chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147** (2018) 323–340, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.008>.
69. M. Singh, S. Sethi, R. Bhushan, Liquid chromatographic methods for separation, determination, and bioassay of enantiomers of etodolac: A review, *J. Sep. Sci.* **43** (2020) 18–30, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201900649>.
70. G. Rossino, M. S. Robescu, E. Licastro, C. Tedesco, I. Martello, L. Maffei, G. Vincenti, T. Bavaro, S. Collina, Biocatalysis: A smart and green tool for the preparation of chiral drugs, *Chirality* **34** (2022) 1403–1418, doi: <https://doi.org/10.1002/chir.23498>.
71. R. A. Sheldon, Metrics of green chemistry and sustainability: Past, present, and future, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **6** (2017) 32–48, doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03505>.
72. N. Al-Haque, P. A. Santacoloma, W. Neto, P. Tufvesson, R. Gani, J. M. Woodley, A robust methodology for kinetic model parameter estimation for biocatalytic reactions, *Biotechnol. Prog.* **28** (2012) 1186–1196, doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.1588>.
73. Đ. Vasić-Rački, Z. Findrik, A. Vrsalović Presečki, Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91** (2011) 845–856, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3414-0>.
74. M. Braun, H. Link, L. Liu, R. D. Schmid, D. Weuster-Botz, Biocatalytic process optimization based on mechanistic modeling of cholic acid oxidation with cofactor regeneration, *Biotechnol Bioeng* **108** (2011) 1307–1317, doi: <https://doi.org/10.1002/bit.23047>.
75. Z. Findrik, G. Nemeth, L. Gubicza, K. Belafi-Bako, D. Vasic-Racki, Evaluation of factors influencing the enantioselective enzymatic esterification of lactic acid in ionic liquid, *Bioprocess Biosyst Eng* **35** (2012) 625–635, doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0645-5>.
76. Z. Findrik, M. Poljanac, Đ. Vasić-Rački, Modelling and optimization of the (R)-(+)-3,4-dihydroxyphenyllactic acid production catalyzed with D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus leishmannii* using genetic algorithm, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **19** (2005) 351–358.
77. P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes, *Org. Process Res. Dev.* **15** (2011) 266–274, doi: <https://doi.org/10.1021/op1002165>.
78. P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, N. A. Haque, K. V. Gernaey, J. M. Woodley, Advances in the process development of bio-

- catalytic processes, *Org. Process Res. Dev.* **17** (2013) 1233–1238, doi: <https://doi.org/10.1021/op4001675>.
79. M. Sudar, I. Dejanović, M. Müller, Đ. Vasić-Rački, Z. Findrik Blažević, Application of chemical engineering methodology in process development: A case study of MenD-catalyzed synthesis of 6-cyano-4-oxohexanoic acid, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32** (2019) 501–510, doi: <https://doi.org/10.15255/cabeq.2018.1393>.
80. M. Černik, M. Sudar, R. Roldan, K. Hernandez, T. Parella, P. Clapés, S. Charnock, Đ. Vasić-Rački, Z. Findrik Blažević, Model-based optimization of the enzymatic aldol addition of propanal to formaldehyde: A first step towards enzymatic synthesis of 3-hydroxybutyric acid, *Chem. Eng. Res. Des.* **150** (2019) 140–152, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.06.025>.
81. M. Černik, M. Sudar, K. Hernández, S. Charnock, Đ. Vasić-Rački, P. Clapés, Z. Findrik Blažević, Cascade enzymatic synthesis of L-homoserine – Mathematical modelling as a tool for process optimisation and design, *React. Chem. Eng.* **5** (2020) 747–759, doi: <https://doi.org/10.1039/c9re00453j>.
82. M. Sudar, Đ. Vasić-Rački, M. Müller, A. Walter, Z. F. Blažević, Mathematical model of the MenD-catalyzed 1,4-addition (stetter reaction) of alpha-ketoglutaric acid to acrylonitrile, *J. Biotechnol.* **268** (2018) 71–80, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.013>.
83. N. Milčić, M. Sudar, I. Dokli, M. Majerić Elenkov, Z. Findrik Blažević, Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of enantiopure fluorinated building blocks: Bottlenecks found and explained by applying a reaction engineering approach, *React. Chem. Eng.* **8** (2023) 673–686, doi: <https://doi.org/10.1039/d2re00461e>.
84. A. Román-Martínez, J. M. Woodley, R. Gani, Design of novel integrated pharmaceutical processes, u Reklaitis, G. V.; Seymour, C.; Garcia-Munoz, S. (ur.), *Comprehensive quality by design for pharmaceutical product development and manufacture*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, SAD, 2017, str. 71–93.
85. D. P. Petrides, A. Koulouris, P. T. Lagonikos, The role of process simulation in pharmaceutical process development and product commercialization, *Pharm. Eng.* **22** (2002) 56–65.
86. H. Dowden, J. Munro, Trends in clinical success rates and therapeutic focus, *Nat. Rev. Drug Discov.* **18** (2019) 495–496, doi: <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00074-z>.
87. I. V. Hinkson, B. Madej, E. A. Stahlberg, Accelerating therapeutics for opportunities in medicine: A paradigm shift in drug discovery, *Front. Pharmacol.* **11** (2020) 770, doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00770>.
88. R. H. Ringborg, J. M. Woodley, The application of reaction engineering to biocatalysis, *React. Chem. Eng.* **1** (2016) 10–22, doi: <https://doi.org/10.1039/c5re00045a>.
89. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, 5. izd.; Wiley-Interscience, Hoboken, SAD, 2004.
90. N. Wagner, A. Bosshart, S. Wahler, J. Failmezger, S. Panke, M. Bechtold, Model-based cost optimization of a reaction–separation integrated process for the enzymatic production of the rare sugar d-psicose at elevated temperatures, *Chem. Eng. Sci.* **137** (2015) 423–435, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.05.058>.
91. S. Heiden, F. Eiden, J. M. Woodley, A. Schmid, Chembiotec – linking chemistry, biology and engineering, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **103** (2014) 1, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.011>.
92. J. M. Woodley, Integrating protein engineering with process design for biocatalysis, *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **376** (2018) 20170062, doi: <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0062>.
93. J. M. Woodley, Ensuring the sustainability of biocatalysis, *ChemSusChem* **15** (2022) e202102683, doi: <https://doi.org/10.1002/cssc.202102683>.
94. M. E. B. Smith, B. H. Chen, E. G. Hibbert, U. Kaulmann, K. Smithies, J. L. Galman, F. Baganz, P. A. Dalby, H. C. Hailles, G. J. Lye, J. M. Ward, J. M. Woodley, M. Micheletti, A multidisciplinary approach toward the rapid and preparative-scale biocatalytic synthesis of chiral amino alcohols: A concise transketolase- $\omega$ -transaminase-mediated synthesis of (2S,3S)-2-aminopentane-1,3-diol, *Org. Process Res. Dev.* **14** (2010) 99–107, doi: <https://doi.org/10.1021/op900190y>.
95. M. Sudar, Z. Findrik Blažević, Enzyme cascade kinetic modelling, u Kara, S.; Rudroff, F. (ur.), *Enzyme cascade design and modelling*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 2021., str. 91–108.
96. S. Milker, M. J. Fink, N. Oberleitner, A. K. Ressmann, U. T. Bornscheuer, M. D. Mihovilovic, F. Rudroff, Kinetic modeling of an enzymatic redox cascade in vivo reveals bottlenecks caused by cofactors, *ChemCatChem* **9** (2017) 3420–3427, doi: <https://doi.org/10.1002/cctc.201700573>.
97. L. Rios-Solis, P. Morris, C. Grant, A. O. O. Odeleye, H. C. Hailles, J. M. Ward, P. A. Dalby, F. Baganz, G. J. Lye, Modelling and optimisation of the one-pot, multi-enzymatic synthesis of chiral amino-alcohols based on microscale kinetic parameter determination, *Chem. Eng. Sci.* **122** (2015) 360–372, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.09.046>.

## SUMMARY

### Biocatalysis in the Age of the Green Revolution

*Laura Glavinić, Nevena Milčić, Zvezdana Findrik Blažević, and Martina Sudar\**

In the era of the Green Revolution, awareness of the necessity to develop more sustainable alternatives to traditional industrial processes is growing. Nearly all industrial processes utilise catalysts that are nondegradable and potentially harmful to the environment. On the other hand, biocatalysts are enzymes – molecules evolved in a physiological environment – that are entirely biodegradable. Under mild reaction conditions such as physiological pH, room temperature, and pressure, they exhibit their highest catalytic activity and efficiency. Biocatalysis has been utilised since ancient times in the production of food items such as cheese, sourdough, beer, wine, and vinegar, without the knowledge of the background of the process. Over the last few decades, its industrial application has also increased, especially in the production of medicines and chemicals. All the advantages of biocatalysts, such as their high selectivity, high specificity toward substrates, and biodegradability, have been acknowledged. It is becoming increasingly evident that biocatalysis represents one of the key means to accomplish Sustainable Development Goals and to implement green chemistry in industrial processes, maximising the use of resources while minimising waste generation. Even though biocatalysis aligns with almost all green chemistry principles, and the potential of biocatalysts is experiencing exponential growth through the evolution of innovations and technological advancements, the mere presence of a biocatalyst in a chemical process does not imply sustainability of the process. The environmental acceptability, as well as the economic viability of the process need to be demonstrated as early as possible in its development by monitoring various metrics to save both time and money.

#### Keywords

*Biocatalysis, enzymes, natural catalysts, green chemistry, application of biocatalysis in industry*

*University of Zagreb Faculty of Chemical  
Engineering and Technology, Savska c. 16,  
HR-10 000 Zagreb, Croatia*

*Review  
Received August 24, 2023  
Accepted October 7, 2023*