

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

DIPLOMSKO DELO

Vid Modic

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM 1. STOPNJE
KEMIJSKO INŽENIRSTVO

Biokatalitski procesi v pretočnih sistemih

DIPLOMSKO DELO

Vid Modic

MENTORICA: prof. dr. Polona Žnidaršič Plazl

Ljubljana, 2019

IZJAVA O AVTORSTVU

diplomskega/magistrskega dela

Spodaj podpisani *Vid Modic* sem avtor diplomskega dela z naslovom: *Biokatalitski procesi v pretočnih sistemih*.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je diplomsko delo rezultat mojega raziskovalnega dela pod mentorstvom *prof. dr. Polone Žnidaršič Plazl*;
- sem poskrbel, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem diplomskem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili;
- se zavedam, da je plagiatorstvo, v katerem so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorski in sorodnih pravicah – uradno prečiščeno besedilo (ZASP-UPB3) (Ur. list RS, št. 16/2007));
- sem poskrbel za slovnično in oblikovno korektnost diplomskega dela;
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela.

V Ljubljani, 2. 9. 2019

Podpis avtorja:

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Poloni Žnidaršič Plazl za pomoč, strokovni nasvet in svetovanje pri izvedbi diplomske naloge.

Biokatalitski procesi v pretočnih sistemih

Povzetek:

Biokataliza je proces pri katerem se za kemijsko pretvorbo snovi uporabljajo biokatalizatorji, ki so lahko kot encimi, izolirani iz celic, grobi encimski pripravki ali celotne celice.

Potrebe industrije po zeleni proizvodnji, čistejših produktih in trajnostem razvoju, so pripeljale do izboljševanja klasičnih procesov ter postavile nove trende za kemično proizvodnjo.

Prenos biokatalitskih procesov v kontinuirno obratovanje prinaša številne prednosti pred proizvodnjo v klasičnih šaržno obratujočih sistemih. Z razvojem novih, boljših in cenejših imobilizacijskih tehnik biokatalizatorjev se pričakuje vedno večja uporaba takšnih sistemov v industrijskem merilu.

Biokatalitske procese lahko izvajamo v različnih tipih reaktorjev. Izbor reaktorja je odvisen od uporabljenega biokatalizatorja, imobilizacijske tehnike ter reakcijskih parametrov.

Pričujoče delo obravnava reaktorje za kontinuirno izvedbo biokatalitskih procesov, pregled imobilizacijskih tehnik ter izbrane primere biokatalitskih procesov v pretočnih sistemih.

Ključne besede: Biokataliza, biokatalizator, imobilizacijske tehnike, kontinuirno obratovanje, pretočni sistemi

Biocatalytic processes in flow systems

Abstract:

Biocatalysis is a process in which biocatalysts are used to achieve chemical conversion of a substance. For this, enzymes isolated from cells, crude enzyme extracts or whole cells are used.

Industry needs for green production, cleaner products and sustainable development have led to the improvement of classic processes and set new trends for chemical production.

The transfer of biocatalytic processes to continuous operation brings many advantages over the production in classic batch systems. With the development of new, better and cheaper immobilization techniques of biocatalysts, it is expected that the use of such systems on an industrial scale will increase.

Biocatalytic processes are carried out in different types of reactors. The choice of reactor depends on the used biocatalyst, the immobilization technique, and the reaction parameters.

The literature refers to continuously operating types of reactors most suited for performing biocatalytic processes, immobilization techniques, and selected examples of biocatalytic processes in continuous systems.

Keywords: Biocatalysis, biocatalyst, immobilization techniques, continuous operation, flow system

Kazalo

1	Uvod	1
2	Namen dela	2
3	Pregled literature	3
3.1	Biokataliza.....	3
3.1.1	Prednosti in slabosti biokatalizatorjev.....	3
3.2	Imobilizacija biokatalizatorjev.....	4
3.2.1	Načini imobilizacije biokatalizatorjev.....	5
3.3	Način izvedbe biokatalitskih procesov.....	8
3.4	Reaktorji za izvedbo biokatalitskih procesov.....	9
3.4.1	Mešalni reaktorji.....	10
3.4.2	Reaktor s fluidiziranim slojem.....	13
3.4.3	Reaktorji s strnjnim slojem.....	14
3.4.4	Reaktorji z ekspandiranim slojem.....	15
3.4.5	Membranski bioreaktorji.....	16
3.4.6	Mikrofluidne naprave za izvajanje biokatalitskih procesov.....	17
3.4.7	Zaključni procesi.....	18
3.5	Primeri prenosa biokatalitskih procesov v pretočni sistem.....	20
3.5.1	Sinteza optično čistih spojin β -amino kislinskega estra.....	20
3.5.2	Pridobivanje akrilamida iz akrilonitrila.....	21
3.5.3	Pridobivanje nikotinamida iz 3-cianopiridina.....	23
3.5.4	Proizvodnja L- alanina z L-aspartat β -dekarboksilazo iz <i>Pseudomonas dacunhae</i>	24
4	Zaključek	26
5	Seznam uporabljenih virov	28

Seznam uporabljenih kratic in simbolov

Kratice

BSTR	šaržni mešalni reaktor (<i>angl.</i> Batch stirred tank reactor)
CEBR	kontinuirni reaktor z ekspaniranim slojem (<i>angl.</i> Continuous expanded bed reactor)
CLEA	navzkrižno vezani encimski agregati (<i>angl.</i> Cross-linked enzyme aggregates)
CLEC	navzkrižno vezani encimski kristali (<i>angl.</i> Cross-linked enzyme crystals)
CFBR	kontinuirni reaktor s fluidiziranim slojem (<i>angl.</i> Continuous fluidized bed reactor)
CPBR	kontinuirni reaktor s strnjenim slojem (<i>angl.</i> Continuous packed bed reactor)
CSTR	pretočni mešalni reaktor (<i>angl.</i> Continuous stirred tank reactor)
FBR	reaktor s fluidiziranim slojem (<i>angl.</i> Fluidized bed reactor)
ISPR	<i>in situ</i> odstranjevanje produkta (<i>angl.</i> <i>In-situ</i> product removal)
PFR	reaktor s čepastim tokom (<i>angl.</i> Plug flow reactor)

Simboli

E	encim
K_M	Michaelis-ova konstanta
N	nosilec
P	produkt
Δ	sprememba

1 Uvod

Biokataliza je doživela razširitev področja uporabe in pomembnosti z razvojem novih molekularnih tehnologij kot so, proteinsko in metabolno inženirstvo in sodobnejših metod imobilizacije. Vendar pa njeno praktično uporabo v nekaterih primerih ovirajo nizka produktivnost in težave pri prenosu v večje merilo. Praktičen in razumen korak za izboljšanje zmogljivosti biokatalizatorjev (encimi in cele celice) je uporaba le-teh v kontinuirno delujočih reaktorjih.^{1,2}

Uporaba biokatalizatorjev predstavlja številne prednosti pred kemičnimi katalizatorji. Prednosti so stereo- in regio- selektivnost, uporaba pri blagih pogojih, biokompatibilnost in biološka razgradljivost produktov in ostankov. Napredek na področju molekularne biologije, encimologije in metabolnega inženiringa omogoča prilagoditev aktivnosti encimov, selektivnosti, in stabilnosti ali celične presnovne poti za potrebe industrije.³

Kontinuirno obratujoči procesi prinašajo prednosti pred šaržno obratujočimi. Prednosti so višji prostorsko-časovni izkoristek, optimizirana poraba energije in potek reakcij v stacionarnem stanju. Tipi reaktorjev za izvajanje biokatalitičnih procesov so različni. Biotransformacija ponavadi poteka v vodnem mediju. Mešanje je lahko modularno in postavljeno v različne točke v reaktorju. V kontinuirno obratujočih biokatalitskih procesih se uporablja imobilizirane biokatalizatorje, ki so vgrajeni v strukturirani pretočni reaktor.⁴

2 Namen dela

Namen diplomskega dela je pregled strokovne literature s področja biokatalitskih procesov v pretočnih sistemih. Najprej sem pregledal literaturo, ki se navezuje na biotransformacije in njihovo uporabo v industriji, ter kakšne prednosti ali pomanjklivosti njihova uporaba predstavlja. Ker je uspešnost biokatalitskih procesov odvisna od stabilnosti in časa uporabe biokatalizatorja je ključnega pomena pregled literature, ki se nanaša na imobilizacijske tehnike biokatalizatorjev in njihove uporabe v različnih reaktorskih sistemih. Kot zadnje sem pregledal in predstavil že uveljavljene primere biokatalitskih procesov v pretočnih sistemih.

3 Pregled literature

3.1 Biokataliza

Biokataliza je uporaba bioloških katalizatorjev kot so encimi ali celice za doseganje kemične pretvorbe snovi. Z razvojem proteinskega in metabolnega inženirstva se je povečalo zanimanje za uporabo biokatalitskih procesov v kemični in farmacevtski industriji, ker prinašajo okolju prijazno alternativo mnogim načinom kemične sinteze. Dokazano je, da uporaba biokatalizatorjev zagotavlja številne ugodne lastnosti, kot so visoka selektivnost, mili operacijski pogoji in malo sinteznih korakov, vendar se pogosto pojavljajo nekatere skupne omejitve, ki ovirajo industrijsko uporabo in gospodarsko izvedljivost mnogih biokatalitskih procesov. Primer omejitve uporabe je toksično ali inhibitorno delovanje substratov in produktov reakcije na biokatalizatorje.^{1,5}

V zadnjih 20 letih je bilo izraženih veliko zadržkov glede biokatalize. Kritike so se nanašale predvsem na: (i) omejeno encimsko specifičnost na substrate; (ii) dostopnost in razpoložljivost encimov; (iii) stabilnost encimskega katalizatorja; (iv) omejenost encimskih reakcij s prostorsko-časovnim izkoristkom; (v) zahtevne substrate dodanimi encimskimi kofaktorji. Vendar z razvojem biokatalizatorjev in procesnih tehnologij te slabosti v veliki meri odpravljamo, kar ponuja ogromen potencial za uporabo.⁶

Področja uporabe biokatalize se razlikujejo med industrijami, ki jih uporabljajo. Glavne industrije so farmacevtska, prehrabena, proizvodnja finih in osnovnih kemikalij, celulozna in papirna industrija, proizvodnja energije ter rudarska industrija.

3.1.1 Prednosti in slabosti biokatalizatorjev

Prednosti biokatalizatorjev:

Največja prednost encimov kot bioloških katalizatorjev je izjemna selektivnost za substrate in s tem povezana čistost produktov. Encimi so ponavadi uporabljeni za povečanje kemične selektivnosti ali regioselektivnosti reakcije. Njihova glavna prednost je razločevanje med enantiomerskimi substrati. Z encimi je možno doseči več kot 99% enantioselektivnost rutinsko, ampak ne v vseh primerih uporabe. Tako visoka selektivnost postane zelo pomembna pri uporabi biokatalizatorjev v sintezi naprednih

farmacevtskih intermediatov, ker regulatorne agencije zahtevajo ločene toksikološke študije za vsako nečistočo v zdravilu, ki zajema več kot 1% produkta.⁶

Dejstvo, da so encimi aktivni pretežno v milih pogojih temperature in pH-ja in največkrat v tekočem mediju, se danes šteje kot prednost. Cilje industrije, kot so trajnostni razvoj, zelena kemija ali okolju prijazna proizvodnja, bi bilo veliko težje doseči brez biokatalizatorjev, ki delujejo pri takšnih pogojih.

Biokatalizatorji so zmožni katalize vedno večjega števila reakcij, kar omogoča pogostejšo uporabo biokatalizatorjev na industrijski skali. Najpogosteje se uporablja biokatalizatorje v povezavi s kemičnimi katalizatorji ali pa so izkoriščeni v mreži reakcij v celici.⁶

Slabosti biokatalizatorjev:

Glavne tri slabosti biokatalizatorjev so: (i) slaba stabilnost biokatalizatorjev v želenem topilu, ker lahko že najmanjša konformacijska sprememba povzroči strm padec encimske aktivnosti; (ii) nestabilnost pri ekstremnih pogojih kot so temperatura, pH in fizikalne sile, kot so kavitacija v črpalkah dvokomponentnih medijev; in (iii) specifične kovalentne interakcije.

Vedno manjši problem predstavlja razpoložljivost biokatalizatorjev, ker biokatalizatorji postajajo komercialno vedno bolj dostopni. Danes je poznanih že več kot 4000 biokatalizatorjev s katerimi je možno katalizirati skoraj vse reakcije. Za prihodnost pa se pričakuje vedno večja razpoložljivost biokatalizatorjev.⁷

Razvoj biokatalitskega procesa zahteva okoli 10 do 20 let, kar je približno enako dolgo kot doba veljavnosti patenta. Z vedno več znanja na področju biotehnologije in biokatalize je pričakovano, da se bo razvojna doba zmanjševala.⁶

3.2 Imobilizacija biokatalizatorjev

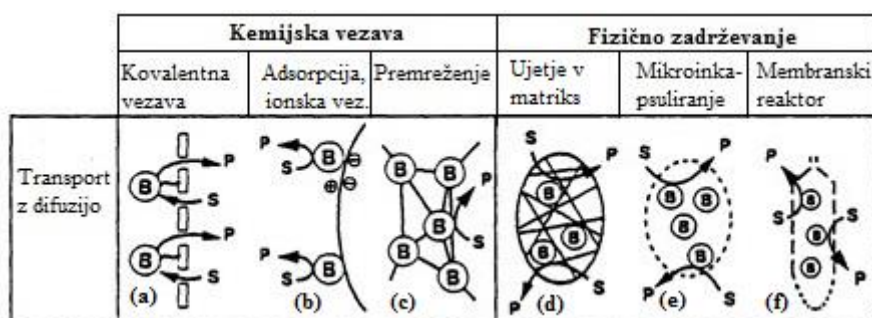
Imobilizacija biokatalizatorjev je prostorsko omejevanje topnega encima ali celih celic v reaktorju. Primarni cilj imobilizacije je olajšati ločevanje biokatalizatorja iz izhodnega toka reaktorja, kar omogoča recikliranje biokatalizatorja. Sekundarni cilj je izboljšati operativno stabilnost sistema. Imobilizacija biokatalizatorjev je proces, ki ima osrednjo vlogo pri delovanju biokatalizatorja. Brez inovativnega razvoja procesov imobilizacije bi se uporaba biokatalize ustavila v šaržnih procesih. Z uporabo imobilizacije pa se

lahko izkoristi celoten potencial biokatalizatorjev, kar omogoča biotransformacije v večji skali.^{6,8}

Poleg tega, da z imobilizacijo dosežemo daljše zadrževanje (bio)-katalizatorjev v reaktorju se imobilizacija pogosto uporablja za doseganje dodatnih namenov, kot sta: (i) stabilizacija encimov, saj je translacijsko gibanje in povečanje prostornine encimov omejeno z imobilizacijo; ali (ii) stabilizacija mikrookolja glede na pH in hidrofobnost.

3.2.1 Načini imobilizacije biokatalizatorjev

Imobilizirane encimske sisteme je mogoče razdeliti glede na način imobilizacije in lastnosti nosilcev (slika 1). Slika 1 predstavlja eno od možnih delitev imobilizacije in ne zajema vseh možnosti. Dodaten način imobilizacije je imobilizacija brez nosilcev, ki na sliki 1 ni predstavljen.

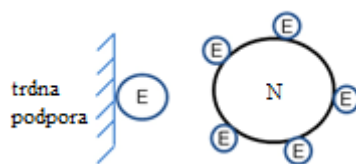


Slika 1: Načini imobilizacije biokatalizatorjev: ⁶

Nosilci biokatalizatorjev so lahko oblikovani in konfigurirani kot filmi, vlakna, planarne površine ali sfere. Površinska morfologija, tj. površinska tekstura in proznost, odločilno vplivata na uporabnost nosilnih materialov. Najpomembnejši so anorganski materiali, kot sta keramika ali steklo, sintetični polimeri, kot sta najlon ali polistiren in polisaharidni materiali, kot so celuloza, agaroz ali dekstran.⁶

3.2.1.1 Adsorpcija

Adsorpcija se nanaša na encime ali cele celice, ki se vežejo na porozno podporo, nosilec, stene ali notranje strukture mikroreaktorjev. Vezani so lahko z fizikalnimi interakcijami, kot so vodikove vezi, van der Waalove sile ali hidrofobne interakcije.

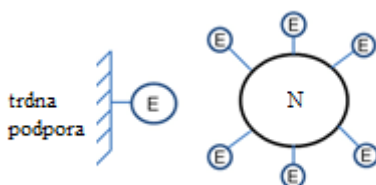


Slika 2: Shematski prikaz encimske imobilizacije z adsorpcijo; (E- encim, N- nosilec)⁶

V primeru adsorpcije je znižanje aktivnosti encima minimalna, če ne pride do konformacijskih sprememb ali prekritja aktivnega mesta encima. Količina proteina, ki ga je mogoče nanesti na nosilec je med 2 in 50 mg proteina na gram nosilca. Velikost nosilca je običajno med 100 in 200 μm . Takšen način vezave encimov se dobro obnese za uporabo v organskih topilih, ker ne pride do desorpcije encima. Desorpcija pomeni, da se encim lahko izloči iz nosilca in s tem pride do kontaminacije produkta. Kjer je možnost desorpcije encima je potrebna ultrafiltracija izhodnega toka kar pa podraži proces.⁸

3.2.1.2 Kovalentna vezava

Pri tem načinu pride do tvorbe kovalentne vezi med encimom in nosilnim materialom. Nosilec je vezan na encim preko funkcionalnih skupin (amino-kislinskih ostankov) encima. Pogostejši načini kovalentne vezave so nastanek peptidne vezi, arilacija, alkilacija in diazo-spajanje.



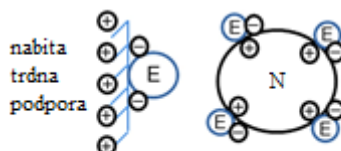
Slika 3: Shematski prikaz imobilizacije encima s kovalentno vezjo; (E- encim, N - nosilec)⁶

Kovalentna imobilizacija vzpostavi trajno vez med encimom in nosilcem, kar omogoči stabilnost terciarne strukture encima. S stabilnostjo strukture encima se odpravi možnost, da bi se encim izločil v reaktorski tok. S kovalentno vezavo se lahko spremeni konformacija encima, kar pripelje do izgube aktivnosti in/ali selektivnosti.⁸

3.2.1.3 Ionska vezava

Ionska vezava je način imobilizacije, pri kateri se izkoristi ionske interakcije med nosilcem in podporo, ki omogočijo vezavo. Prednost uporabe takšnega načina

imobilizacije je, da na trgu obstaja že veliko poceni in hitro dostopnih smol, ki se lahko uporabijo v ta namen. Stabilnost vezave je odvisna od pH in ionske moči reakcijskega topila.



Slika 4: Shematski prikaz encimske imobilizacije z ionsko vezavo;
(E- encim, N - nosilec)⁶

3.2.1.4 Imobilizacija brez nosilcev

Takšna imobilizacija zavzema pripravo netopnih encimov, ki so uporabni v industrijskih bioloških transformacijah. Obstaja več načinov imobilizacije, vključno z navzkrižno vezanimi encimskimi agregati (CLEA), navzkrižno vezanimi encimskimi kristali (CLEC), flokulacijo in agregacijo.

Zamreženi encimski agregati:

Alternativna možnost imobilizacije je agregacija proteinov. Proteini so zmožni agregacije ob prisotnosti soli, ne-ionskih polimerov in organskih topil. Z agregacijo se doseže trajna netopnost proteinov.

Agregacija proteinov je preprosta tehnika imobilizacije, ki lahko združi separacijo in imobilizacijo biokatalizatorja. Je poceni metoda, ker ne uporablja dragih nosilcev in prinese krajši razvojni čas procesa. S takšno metodo imobilizacije dosežemo visoko aktivnost katalizatorja, ker je encimska aktivnost koncentrirana v netopnih agregatih z visoko vsebnostjo proteinov. Takšna metoda tudi stabilizira terciarno strukturo proteinov.⁸

S takšno metodo je možno imobilizirati več encimov skupaj. Imobilizacija kombinacij encimov ima potencial za uporabo v kaskadnih reakcijah. Agregati biokatalizatorja imajo ponavadi premer od 5 - 50 μm lahko pa tudi več. Z uporabo takšne imobilizacije je recikliranje biokatalizatorja enostavno z uporabo filtracije ali pa z magnetno privlačnostjo železa, ki je ujet v agregatih. Encimi, ki imajo malo površinsko aktivnih amino skupin, tvorijo nestabilne agregate. Ena izmed slabosti je tudi, da je za vsak encim potrebno razviti postopek agregacije.⁹

3.3 Način izvedbe biokatalitskih procesov

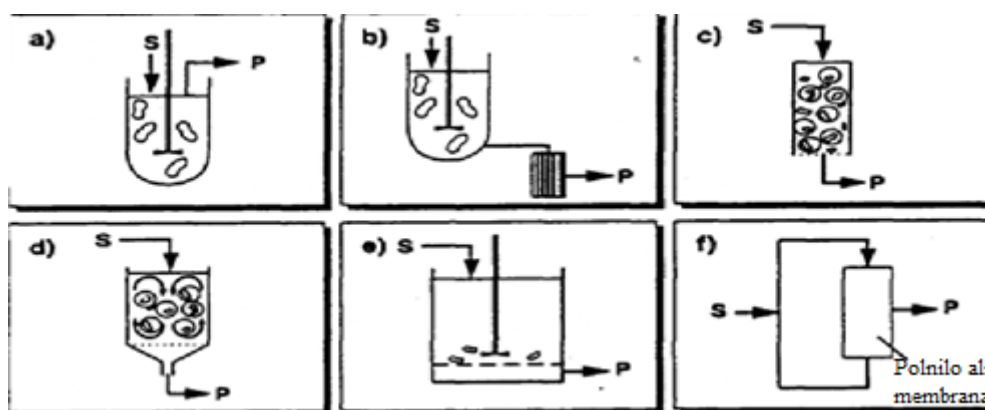
Kemijske procese lahko izvajamo s šaržnim ali kontinuirnim obratovanjem, v biotehnologiji pa obstajajo tudi druge različice kot npr. šaržno obratovanje z dohranjevanjem ter z reciklom biomase. Ključna razlika med prvim in drugim je, da šaržni procesi proizvajajo produkt v omejenih količinah ali serijah, kontinuirni pa neprekinjeno. Razlika je tudi, da kontinuirni proces v večini primerov deluje v stacionarnem stanju, kar pomeni, da se sestava reakcijske mešanice v določeni točki med procesom s časom ne spreminja. Šaržni proces pa je dinamičen. Oba načina delovanja imata več prednosti in slabosti.^{6,8}

Prednosti kontinuirnih procesov pred klasičnimi šaržnimi so: večji prostorski in časovni izkoristek, optimizirana poraba energije, krajši čas nedelovanja reaktorja, npr. zaradi čiščenja, potek reakcije pod bolj stabilnimi pogoji. Pri kontinuirnih procesih pa je potrebna uporaba dražje opreme, katalizatorjev z dolgo življenjsko dobo, avtomatizirane instrumentalne ter procesne tehnike in vključitev kontinuirnih zaključnih oziroma separacijskih procesov za lažje ločevanje nereagiranih reaktantov, intermediatov in stranskih produktov. Posledično so napake ali kontaminacija v kontinuirnem procesu težje sledljive kot v šaržnem procesu.^{4,8}

Razlika med industrijskimi kontinuirnimi procesi v kemični industriji in kontinuirnimi biokatalitskimi procesi je v uporabi biokatalizatorjev za kataliziranje biotransformacij. Biotransformacije ponavadi potekajo v tekočem mediju in sledijo Michaelis-Menten kinetiki. Temperaturno območje delovanja biokatalizatorjev je omejeno. Številni biokatalitski procesi v pretočnih reaktorjih uporabljajo imobilizirane biokatalizatorje. V primeru kontinuirnih procesov z uporabo rastočih mikroorganizmov se populacija mikroorganizmov s časom spreminja. V primeru, ko se uporablja encim kot biokatalizator, pa imobilizacijske metode omogočajo večjo stabilnost in učinkovitost procesa. Zaradi visoke cene čistih encimov za biokatalitske procese se jih v šaržnih sistemih ni veliko uporabljalo. Z razvojem kontinuirnih procesov, ki ponujajo recikliranje biokatalizatorjev, pa se je povečala njihova uporaba. To se odraža v vedno večji uporabi pretočnih sistemov v sodobnih laboratorijih in industriji za proizvodnjo finih kemikalij, zdravil, bioterapevtikov in biogoriv.⁴

3.4 Reaktorji za izvedbo biokatalitskih procesov

Encimski reaktorji so razvrščeni glede na stopnjo pomešanja substrata in raztopine produkta. V reaktorju z idealnim mešanjem je reakcijska mešanica pomešana tako, da so koncentracija, temperatura in pH identični skozi celoten reaktor. Ne glede na način obratovanja (šaržni, šaržni z dodajanjem ali kontinuirni) je v idealnih reaktorjih z mešanjem sestava vsebine reaktorske posode homogena. To pomeni, da je koncentracija katere-koli specije enaka v vseh točkah reaktorja in ni koncentracijskega gradienta v katerem-koli delu reaktorja. Različni tipi reaktorjev, ki se uporabljajo v biokatalizi, so prikazani na sliki 5.



Slika 5: Tipi encimskih reaktorjev; a) mešalni reaktor s šaržnim obratovanjem, b) šaržni-UF reaktor, c) PFR, d) reaktor s fluidiziranim slojem, e) CSTR z zaprtim filtriranjem, f) obtočni reaktor z tangencialnim filtriranjem⁶

Tako kot kemijski se tudi biokatalitski procesi najpreprosteje izvajajo v mešalnih reaktorjih s šaržnim obratovanjem (slika 5a). To je optimalna rešitev za uporabo v laboratoriju in v primeru poceni ali hitro deaktiviranih biokatalizatorjev.

Če se biokatalizator reciklira, in se ohrani način ponovljivih serij, se uporablja šaržni reaktor z kasnejšo ultrafiltracijo (šaržni-UF reaktor; slika 5b). Čas zadrževanja katalizatorja in reaktantov je enak v vseh tipih šaržnih reaktorjev.

Z naraščajočo kompleksnostjo biokatalize v organski sintezi in na večji skali je bil potreben razvoj metod za učinkovito zadrževanje katalizatorja v reakcijskem sistemu. Slika 1 vsebuje pregled možnosti zadrževanja biokatalizatorjev v reaktorju. Vezava encima na trdni nosilec (imobilizacija) je bil začetek tega razvoja. Imobilizirani encimi so vezani večinoma na sferične kroglice namesto na planarne površine, tako da jih je mogoče vnesti v reaktor z nasutjem, ki deluje kot reaktor s čepastim tokom (PFR) (Slika 5c). Neželeni radialni ali aksialni pH ali temperaturni gradienti se lahko preprečijo z

večjo stopnjo pretoka tekoče faze v koloni, tako da se reaktor lahko upravlja kot reaktor s fluidiziranim slojem (FBR) (slika 5d).

Membranski reaktorji omogočajo dodatno možnost za ločevanje biokatalizatorjev od substratov in produktov ter zadrževanje biokatalizatorja v reaktorju. Specifična velikost membranskih por omogoča prehod substratnim ter produktim molekulam vendar ne encimskim. Membranski reaktorji se lahko upravljajo kot kontinuirni mešalni reaktor (CSTR) z zaprtim filtriranjem (slika 5e), kot krožni cevni reaktor ali pa kot obtočni reaktor (slika 5f) s tangencialnim (pretočnim) filtriranjem.

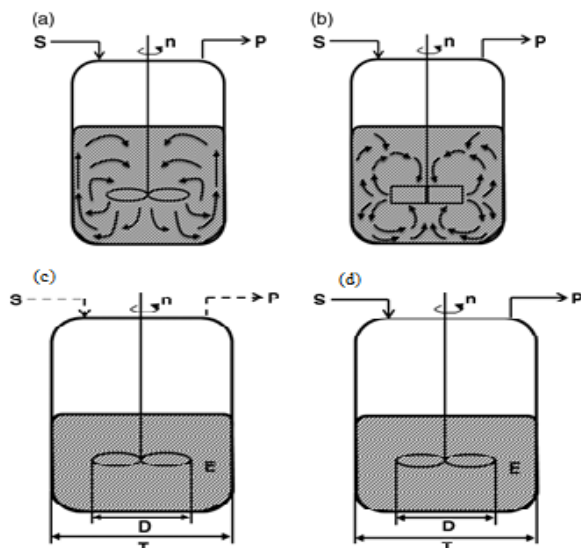
Imobilizacija z kemično vezavo veliko bolj vpliva na aktivnost in stabilnost biokatalizatorjev kot inkapsulacija z membranami, vendar pa sta povečana aktivnost (redko) ali stabilnost (pogosto) pomemben razlog za izbiro kemične vezave pred membranskim zadrževanjem encimov v reaktorju.

Bistvene prednosti membranskih reaktorjev so odsotnost omejitev prenosa snovi tudi pri višjih koncentracijah katalizatorja (v čisti vodni raztopini), lahek prenos v industrijsko merilo s prilagoditvijo razpoložljive površine membrane in preprosto dopolnjevanje encimske aktivnosti v primeru deaktivacije v reaktorju s stalno konverzijo. Poleg tega so filtrati po prehodu skozi membrano običajno brez mikroorganizmov in pirogenov, kar je zelo pomembno za proizvodnjo v farmacevtski industriji.⁶

3.4.1 Mešalni reaktorji

Takšni reaktorji so zelo prilagodljivi, vendar imajo tudi nekatere posebne značilnosti, ki jih je treba upoštevati, kadar se uporabljajo za izvajanje biokatalitskih procesov. Na primer, največja količina imobiliziranega biokatalizatorja je približno 10 vol. % mešalnega reaktorja. Mehanski stres za imobilizirane encime je običajno visok, zlasti pri uporabi večjih količin biokatalizatorja. Ta stres se lahko omeji z manjšanjem hitrosti mešanja in vhodne moči, vendar to povzroči slabše celotno mešanje. Prevelika količina biokatalizatorja lahko povzroči tudi velik problem v zaključnih procesih, kot je filtracija za odstranjevanje biokatalizatorja, ali za recikliranje. Razmerje višine in premera reaktorja prav tako vpliva na mešanje. Visoko razmerje med višino in premerom povzroči slabše mešanje, tako da se običajno uporablja razmerje 1:1. V primerih, ko je potrebno dovajanje slabo topnih plinov (kot je kisik) v reakcijo, se razmerje poveča na 3:1, kar podaljša zadrževalni čas plinaste faze v reaktorju in s tem zagotovi boljše topnost. Reaktorji pogosto vsebujejo mešalne pregrade, ki preprečijo nastanek vrtincev in izboljšajo mešanje. Običajno se uporabljajo štiri mešalne pregrade, katerih dimenzija je približno 1/10 premera mešalnika. Kadar so v mediju prisotne trdne snovi ali pa se uporablja imobiliziran biokatalizator, mora biti hitrost mešanja zadostna, da omogoča dobro suspenzijo delcev. Minimalna hitrost mešanja, ki je potrebna za ohranitev vseh

imobiliziranih delcev v suspenziji, se imenuje mejna hitrosti. Reaktorji lahko uporabljajo več kot eno mešalo (odvisno od velikosti) z razmakom za $2/3T$ ali T , kjer je D/T okoli vrednosti 0,4. Zagotovljena moč mora biti okoli 1-1,4 W/L za reaktorje do volumna 500L. Mešalni reaktorji lahko delujejo šaržno, šaržno z dodajanjem ali kontinuirno.



Slika 6: Shematski prikaz načinov mešanja; (E-imobiliziran encim; S-substrat; P-produkt; D-premer mešala; T-premer reaktorja v rezervoarju; n-število vrtljajev na enoto časa).⁸

Na (slika 6) so prikazani načini mešanja in tipi mešalnih reaktorjev: Mešalni reaktorji z (a) aksialnim in (b) radialnim mešanjem, (c) šaržni mešalni reaktor (BSTTR), (d) pretočni mešalni reaktor (CSTR). Aksialno mešanje se običajno uporablja za reaktorje, kjer se uporabljajo trdni substrati, medtem ko se radialno mešanje uporablja v reaktorjih, kjer sta prisotni dve tekoči fazi. Pri večfaznih sistemih mora biti mešalo v fazi, ki je pod kontinuirnimi pogoji delovanja. Prenos toplote v reaktorju se običajno doseže skozi plašč, ki je nameščen okoli reaktorja. Vzdrževanje pravilne temperature je pomembno v biokatalitskih reakcijah vendar je nadzor redko problem, razen pri encimsko katalizirani polimerizaciji, ki je lahko eksotermna.⁸

3.4.1.1 Mešalni reaktorji s šaržnim obratovanjem

Šaržni reaktorji z mešanjem (BSTRs) so mešalni reaktorji, ki delujejo v šaržnem načinu (slika 6c). Vsi reaktanti (substrati) se napolnijo v reaktor na začetku procesa in pustijo, da zreagirajo. Po končanem procesu se produkt izolira. Dosežena konverzija je funkcija časa delovanja šarže. Teoretično je popolna konverzija dosegljiva.

Ta tip reaktorja se uporablja za kinetično počasne reakcije. Encimske reakcije običajno spadajo v to kategorijo. Reaktor se lahko uporablja šaržno z dodajanjem, kar pomeni, da se nekateri (ali vsi) substrati dodajajo nadzorovano pri konstantni ali spremenljivi stopnji dodajanja.

To je še posebej uporabno za substrate, ki so inhibitorni ali toksični za biokatalizator. Takšna konfiguracija reaktorja omogoča lažje upravljanje z večfaznimi reakcijskimi mešanicami (plin-tekočina, trdno-tekoče ali tekoče-tekoče). Reaktorski tip lahko sprejme vse vrste biokatalizatorja in omogoča enostaven prenos v večje merilo. Pogosto je zaželeno, da se biokatalizator ponovno uporabi v več serijah, zlasti to velja za imobilizirane biokatalizatorje. Vendar se učinkovitost katalizatorja spreminja od serije do serije zaradi postopne izgube aktivnosti. Izguba aktivnosti se lahko kompenzira na več načinov. Ena metoda je, da se vsaki seriji doda svež katalizator. Tak pristop je omejen s količino svežega biokatalizatorja, ki se lahko doda v reaktor. Alternativno lahko reaktor deluje dlje časa, z upoštevanjem padanja aktivnosti katalizatorja kot funkcije časa. Aktivnost lahko povečamo tudi z višanjem obratovalne temperature, kar pa je omejeno s termično stabilnostjo biokatalizatorja in drugih reakcijskih komponent. BSTR je enostavno prilagodljiv industrijskemu obsegu, saj je splošno dostopen. Veliko industrijskih obratov ustrezne kotle že ima na voljo. Za izvajanje biokatalitskih procesov se lahko prilagodijo z minimalnim denarnim vložkom.⁸

3.4.1.2 Pretočni mešalni reaktorji

Pretočni mešalni reaktorji (CSTR) uporabljajo isto vrsto reakcijske posode kot BSTR, vendar delujejo s kontinuirnim dovajanjem reaktantov in odvajanjem produktov (slika 6d). Za idealni reaktor to pomeni delovanje pri izstopni koncentraciji substrata. Neposredna posledica tega je, da popolna konverzija ni dosegljiva, ker mora biti nekaj substrata vedno prisotnega, da se reakcija lahko izvede kontinuirno.

V primerjavi z ekvivalentnim BSTR je CSTR običajno večji zaradi manj ugodne kinetike odvisne od K_M vrednosti encima, ki se uporablja. V primeru slabe konverzije v CSTR, se lahko učinkovitost procesa izboljša z vezavo več CSTR-jev v serije.

Glavne pomanjkljivosti CSTR so, da na splošno deluje z nižjo povprečno reakcijsko hitrostjo kot BSTR, in da v njem ni mogoče doseči popolne konverzije. Drug vidik, ki ga je treba obravnavati zgodaj v procesu razvoja, je metoda recikliranja in ponovne

uporabe katalizatorja, zaradi ekonomske izvedljivost postopka. Kadar uporabimo neimobiliziran biokatalizator, ga je potrebno ločiti od toka produkta in ga reciklirati nazaj v reaktor na način, ki ne inaktivira biokatalizatorja. Kljub temu imobilizirani in neimobilizirani biokatalizatorji sčasoma izgubijo aktivnost. Inaktivaciji biokatalizatorja se je mogoče izogniti na dva načina:

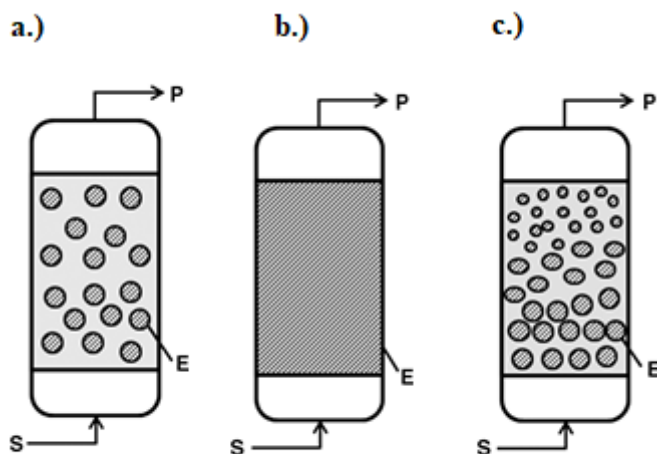
- Z dodajanjem svežega biokatalizatorja v sistem. Pri načrtovanju CSTR se upošteva dodajanje svežega biokatalizatorja, katerega količina je natančno določena.
- Z nižanjem hitrosti vhodnega toka. To omogoča doseganje enake stopnje konverzije. S časom aktivnost biokatalizatorja pada vendar je mogoče z manjšanjem pretoka povečati zadrževalni čas, kar pripelje do konstantne konverzije.⁸

3.4.2 Reaktor s fluidiziranim slojem

V kontinuirnem reaktorju s fluidiziranim slojem (CFBR) (slika 7a) lahko mešanje trdnih komponent dosežemo s poganjanjem plinaste ali tekoče faze skozi trdne ali porozne delce s tako hitrostjo, da postanejo delci fluidizirani. Delci se tako zadržujejo v reaktorju s pomočjo tekočine, ki prehaja skozi sistem. Takšni reaktorji zagotavljajo dobre možnosti za izvajanje večfaznih procesov. Prednost takšnih reaktorjev je možnost visoke obremenitve z biokatalizatorjem, kar v reaktorjih z nasutjem zaradi padca tlaka ni mogoče.

Ker so imobilizirani encimi suspendirani v tekočini, je sistem občutljiv, saj lahko pride do izpiranja encima. Konvencionalni reaktorji uporabljajo trdne delce, suspendirane v plinih, kjer je razlika v gostoti med fazama veliko večja. Zaradi fluidnega obnašanja je ravnanje s trdnimi snovmi preprosto, zato so ti reaktorji primerni tudi za reakcije s trdnimi substrati in produkti, kakor tudi za viskozne substrate in produkte.

Kinetika takšnega reaktorja je podobna kot v CSTR reaktorju. Ob pravilni rabi se bo biokatalizator zadržal v reaktorju brez sita. Kljub temu se lahko majhni delci imobiliziranega biokatalizatorja zlahka odstranijo z tokom, kar zahteva nadaljnjo ultrafiltracijo na izhodu. Izpiranje manjših količin biokatalizatorjev je pričakovano. V takšnih reaktorjih je možna uporaba večjih količin biokatalizatorja kot v ekvivalentnem mešalnem reaktorju. Za upravljanje takšnih reaktorjev je potrebno obsežno znanje in izkušnje, kar je problematično pri prenosu v večje merilo.⁸



Slika 7: Shematski prikaz reaktorjev; (E- imobiliziran encim; S- substrat; P- produkt).⁸

a.) reaktor s fluidiziranim slojem (FBR), b.) kontinuirni reaktor s strnjenim slojem (CPBR) c.) kontinuirni reaktor z ekspanziranim slojem (CEBR).

3.4.3 Reaktorji s strnjenim slojem

Kontinuirno delujoči reaktorji s strnjenim slojem (CPBR) so cevni reaktorji, napolnjeni z delci (bio)-katalizatorja, ki se v reaktorju zadržijo s filtrom. Dotok reaktantov se pogosto črpa skozi dno reaktorja, da se omogoči odstranitev vseh notranjih mehurčkov iz kolone (slika 7b). Material teče skozi kolono pri konstantni hitrosti in vzporedno z osjo kolone, brez povratnega mešanja. Ker je biokatalizator fiksiran v stolpcu, je zadrževalni čas funkcija položaja materiala v koloni. Daljša je kolona, višja je pretvorba. Padec tlaka skozi kolono se poveča sorazmerno z dolžino kolone, kar je omejeno z maksimalno dolžino kolone.

Prostorsko-časovni izkoristek v takšnem reaktorju je visok (do šestkrat večji kot v klasičnem mešalnem reaktorju), ker reaktor vsebuje visoko koncentracijo biokatalizatorja. Kinetični profil je ugoden, ker so potrebni krajši časi zadrževanja kot v ekvivalentnem CSTR. Kinetični profil je identičen kinetičnemu profilu v BSTR, ki nadomešča dimenzijo reakcijskega časa z dolžino reaktorja. Visoka koncentracija biokatalizatorja pomeni, da so reaktorji pri določeni pretvorbi manjši, zato so investicije nižje kot pri CSTR. Poleg tega ni mešanja, ampak so za črpanje reaktantov potrebne črpalke. Imobilizirani delci biokatalizatorja so izpostavljeni manjšemu mehanskemu stresu, saj so delci v koloni mirujoči. Imobilizirani katalizatorji morajo zdržati (velike)

padce tlaka skozi kolono, kar pomeni, da morajo biti togi in ohranjati svojo strukturo pod pritiskom.

Omejitve prenosa snovi so prisotne zaradi odsotnosti mešanja, zato pride v upoštevanje uporaba majhnih delcev, ki povzročajo padec tlaka in je zato potreben kompromis. Zaradi visokega prostorsko-časovnega izkoristka je to mogoče doseči. Brez dobrega distribucijskega sistema na vходу reaktorja obstaja nevarnost tako imenovanega "kanaliziranja" ali "tuneliranja" reakcijskega materiala skozi kolono, kar povzroči odstopanje od čepastega toka in zmanjšanje kinetične zmogljivosti reaktorja.

Idealna velikost delcev imobiliziranih biokatalizatorjev v reaktorjih z nasutim slojem je od 200 do 400 μm , kar zagotovi manjše padce tlaka skozi kolono. Ker je CPBR zaprt sistem, je dodajanje in odstranjevanje materiala med potovanjem reakcijskega medija skozi kolono oteženo. To se običajno reši tako, da se proces razdeli na več zaporedno vezanih CPBR reaktorjev. Povezava z in situ odstranjevanjem produkta (ISPR) je možna preko zunanje zanke, saj je biokatalizator zadržan v reaktorju.

Nadzor pH in temperature je v takšnem reaktorju težji. Sistem za boljši nadzor pH in temperature vsebuje zunanjo zanko, ki je pritrjena na manjšo mešalno posodo, katera omogoča dodajanje kisline ali baze v reakcijsko mešanico. Nihanje pH mora biti minimalno, da ne vpliva na delovanje biokatalizatorja. Kopičenje stranskih produktov v koloni je pogost problem in lahko povzroči zaviranje biokatalizatorja. CPBR-ji niso primerni za večfazne sisteme, saj neenakomerna porazdelitev povzroča različna razmerja med fazami, kanaliziranje in celo blokado kolone. Pri polnjenju reaktorja z biokatalizatorjem je potrebno upoštevati spreminjanje volumna biokatalizatorja (nabrekanje biokatalizatorja). V takšnem reaktorju lahko imobiliziran biokatalizator zavzema 60 vol.% reaktorja, pri čemer ni upoštevanega nabrekanja. Nabrekanje biokatalizatorja lahko povzroči tudi povečanje padca tlaka na koloni.⁸

3.4.4 Reaktorji z ekspandiranim slojem

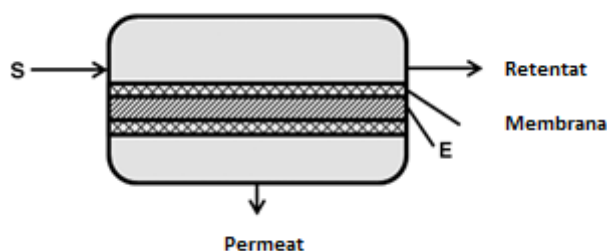
Kontinuirno delujoči reaktorji z ekspandiranim slojem (CEBR) so cevni reaktorji, ki se upravljajo kot reaktorji s fluidiziranim slojem, a pri nižjih viskoznostih. Za vzdrževanje čepastega toka so delci imobiliziranih biokatalizatorjev različnih velikosti in/ali gostote (Slika 7c). Biokatalizatorji se glede na svojo velikost in gostoto razporedijo v reaktorju vzdolž kolone: večji delci so na dnu kolone, manjši delci so na vrhu. Tok tekočine v koloni sledi vtoku. Ker je v koloni med delci biokatalizatorja prostor, se lahko v takšnem reaktorju procesirajo tudi trdni delci za razliko od kontinuirnih reaktorjev s strnjanim slojem. Kar pomeni, da pri uporabi CEBR ni potrebno predhodno filtriranje, za razliko od CPBR.

Za polnilo se lahko uporabijo delci podobnih velikosti in gostote, ki se zadržijo na mestu zaradi magnetnega polja, če so nameščeni okoli železnih nosilcev. Integracija ISPR in drugih postopkov izolacije produktov je možna z uporabo adsorbentov ali absorpcijskih smol v polnilu, skupaj z imobiliziranimi delci. Velikost delcev je med 50 in 400 μm ter gostota med 1,1 in 1,3 g/mL.^{8,10}

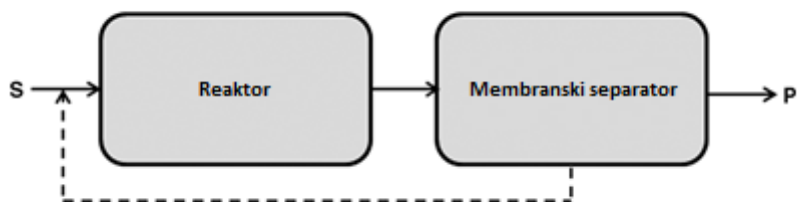
3.4.5 Membranski bioreaktorji

Membranski bioreaktorji (MBR) so našli aplikacije na nešteti področjih, vključno s petrokemično, vodno, prehrabeno in farmacevtsko industrijo. Takšni reaktorji združujejo reakcijske in separacijske procese. Glaven razlog za razvoj takšnih reaktorjev je prihranek stroškov v zaključnih procesih.

Uporaba teh reaktorjev izkorišča dejstvo, da se lahko reakcijski in separacijski procesi združijo. Uporabljajo se v dveh glavnih aplikacijah: (i) kjer membrana deluje kot opora, na kateri je encim imobiliziran (slika 8) in (ii) kjer se membrana uporablja za ločevanje produkta (slika 9). Takšni reaktorji največkrat delujejo kontinuirno.



Slika 8: Shematski diagram reaktorja z membranskim slojem, ki vsebuje imobiliziran katalizator (E- imobiliziran encim; S-substrat).⁸



Slika 9: Shematski prikaz membranskega bioreaktorja (MBR), uporabljenega za ločevanje, (P-produkt; S-substrat).⁸

Takšni reaktorji omogočajo visoke izkoristke in visoko selektivnost, saj osnovni koncept omogoča integrirano ločevanje. Z membrano se prepreči neposredni stik med biokatalizatorjem in inhibitornimi spojinami. S tem se poveča življenska doba biokatalizatorja, izkoristek biokatalizatorja in produktivnost procesa.

Prav tako je mogoče ta sistem integrirati z ISPR. Namen uporabe ISPR (in situ odstranjevanja produkta) metod je intenzifikacija biokatalitičnih procesov. Uporaba takšnih kombiniranih metod pogosto ne preide v industrijsko proizvodnjo, zaradi povečanja kompleksnosti procesa. Prav tako je pogosto težko primerjati kompleksne ISPR procesne možnosti z običajnimi tehnologijami, ki temeljijo na šaržah.^{5,11}

V membranskem bioreaktorju se biokatalizator lahko loči, s čemer se omogoči ponovna uporaba in recikliranje, kar izboljša izkoristek biokatalizatorja. Na podoben način se lahko zadržijo tudi dragi kofaktorji za regeneracijo in recikliranje. Encimi, nameščeni na membranske površine, so včasih bolj stabilni in odporni proti organskim topilom kot raztopljeni. Reaktorji običajno vsebujejo ultra filtracijske membrane s povprečno velikostjo por okoli 0,1 do več mikrometrov. Za učinkovit prehod snovi skozi membrano je potrebno upoštevati velikosti por in reakcijskih komponent (substrat, encimi, kofaktorji, produkti). Za povečevanje procesa je zaželeno, da ostane razmerje med membransko površino in reakcijskim volumnom konstantno.

Kadar se uporabljajo membrane v reakcijski posodi za ločevanje, pride do določene izgube v fleksibilnosti delovanja, saj pogoji, ki so optimalni za reakcijo, niso nujno optimalni za postopek ločevanja. Stroški takšnega sistema so lahko visoki zaradi stroškov zamenjav membran. Na delovanje reaktorja vplivajo elektrostatične in hidrofobne interakcije med biološkimi molekulami ter membrano. Kontaminacija membrane je pogosta težava pri delovanju takšnih reaktorjev, zato so tehnike čiščenja in sterilizacije membran med zaporednimi operacijami ključnega pomena za učinkovitost takšnih reaktorjev.⁸

3.4.6 Mikrofluidne naprave za izvajanje biokatalitskih procesov

Majhna velikost reaktorja (vsaj ena dimenzija pod 1 mm, običajno v območju 50–500 μm) in visoko razmerje med površino in prostornino (običajno 10 000–50 000 m^2/m^3) skupaj z kontinuirnim načinom delovanja, ki ima na primer izboljšano mešanje in energetsko učinkovitost, upravljanje toplote, razširljivost in varnost ter manjšo proizvodnjo odpadkov, so strateške prednosti mikrofluidnih sistemov. Mikrofluidni reaktorji so primer zelo dobrih reaktorjev za izvedbo kontinuirnih procesov.^{3,12}

Biokatalitični procesi v mikrofluidnih sistemih zajemajo široko paleto materialov in sistemov, od preprostih kapilar in cevi do mikrokanalov, monolitov in mikrostrukturiranih reaktorjev z vstavljenim nanomaterialom. Strukture se lahko jedkajo, odlivajo, odlagajo ali gojijo neposredno na mikrokanalnih površinah. Pridelava in procesiranje imobiliziranih encimov in priprava nosilnih struktur v mikroreaktorjih so tehnologije, ki so potrebne za povečanje učinkovite površine v encimskih mikroreaktorjih. Nanovzmeti in drugi nanostrukturirani materiali so tudi ena izmed dobrih možnosti za povečanje učinkovite površine in količine biokatalizatorja v mikroreaktorju. Nekatere najpogostejše vrste encimskih mikroreaktorjev že dokazujejo posebne značilnosti mikrofluidike za biokatalitične procese v homogenih, heterogenih in večfaznih sistemih.^{12,13}

3.4.7 Zaključni procesi

Večina bioprosesov vključuje eno ali več separacijskih metod v zaključnih procesih kot so: adsorpcija, centrifugiranje, kromatografija, kristalizacija, dializa, destilacija, sušenje, izhlapevanje, filtracija, flokulacija, flotacija, homogenizacija, mikrofiltracija, mletje, usedanje in ultrafiltracija. Najbolj uporabljene separacijske metode za separacijo celic in celičnih homogenatov so filtracija, mikrofiltracija, centrifugiranje in precipitacija.

Membranska filtracija se lahko uporablja na različnih stopnjah zaključnih procesov za ločevanje, koncentriranje in čiščenje produktov večjih od 0,6 μm . Uporaba membranske filtracije omogoča odstranjevanje celic in celičnih ostankov, proteinov, virusov in soli. Potrebe po energiji so majhne, ločevanje je mogoče izvesti v aseptičnih pogojih in izpostavljenost močnim kemikalijam ni potrebna. Uporaba je možna v kontinuirnih in šaržnih procesih.

Mikrofiltracija se uporablja za odstranjevanje trdnih delcev, kot so celice in celični ostanki velikosti od 0,2 do 10 μm . Tipične mikrofiltracijske membrane imajo premere por od 0,05 do 5 μm . Mikrofiltracija se lahko izvede v sterilnih pogojih.

Ultrafiltracija se uporablja za odstranjevanje koloidov, velikih molekul, kot so beljakovine in polisaharidi, virusi in inkluzijska telesa iz reakcijske mešanice. Membrane za ultrafiltracijo imajo pore s premerom med 0,001 μm in 0,1 μm .

Centrifugacija je učinkovita metoda za izolacijo celic, ko so celice premajhne za uporabo filtracije. Centrifugiranje je primerno za izolacijo celic kot produkta in za predobdelavo celičnih in zunajceličnih komponent za nadaljnje čiščenje.

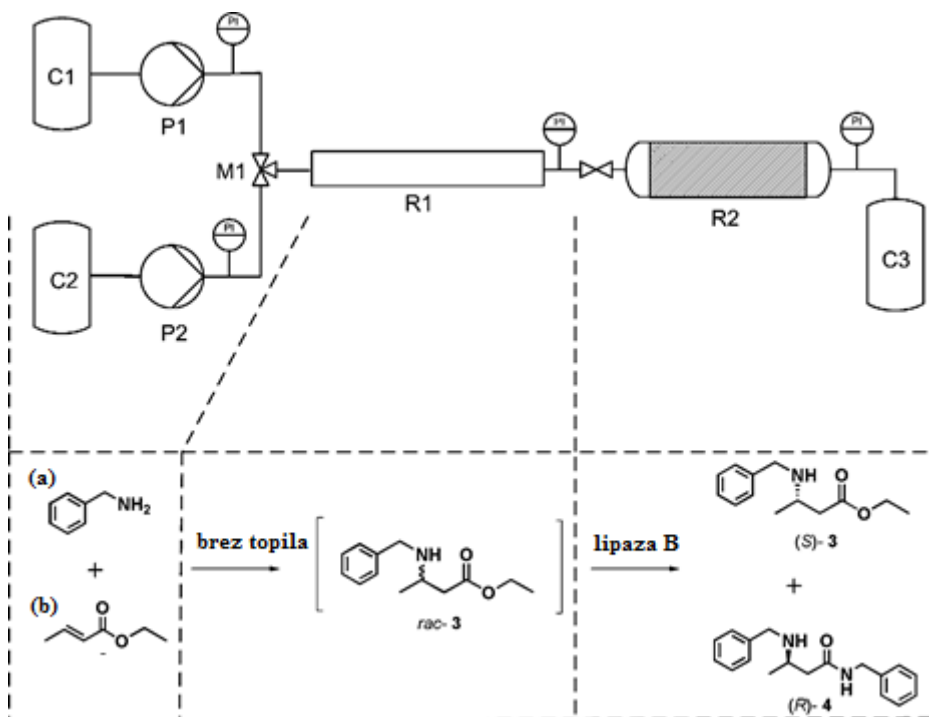
Obarjanje je dobro uveljavljena in široko uporabljena metoda za pridobivanje proteinov iz celični homogenatov in odstranjevanju nečistoč iz procesnih tokov. Obarjanje se doseže z dodajanjem reagentov, ki reagirajo z raztopljeno snovjo, pri čemer nastane netopna snov, ki se izloči kot oborina. Oborino se nato loči s filtracijo, mikrofiltracijo ali centrifugacijo.

Kristalizacija se uporablja za končno čiščenje širokega spektra izdelkov. Številna zdravila in fine biokemične snovi, vključno z antibiotiki, aminokislinami, organskimi kislinami in vitamini se tržijo v obliki kristalov. S kristalizacijo je dosegljiva 99,5 % čistost in s tem nadaljnje čiščenje produkta ni potrebno.¹⁴

3.5 Primeri prenosa biokatalitskih procesov v pretočni sistem

3.5.1 Sinteza optično čistih spojin β -amino kislinskega estra

Reakcija, ki sta jo prvotno predstavila Weiß in Gröger, zavzema termično aza-Michael adicijo benzilamina (slika 10a) ter trans-etil krotonata (trans-ethyl crotonate) (slika 10b) in kasnejšo kinetično resolucijo racemičnega intermedata β -amino kislinskega estra preko aminolize, katalizirano z lipazo B iz kvasovke *Candida antarctica* (CALB), je prikazana na sliki 10. Takšen proces združuje prednosti obratovanja v kontinuirnem reaktorju in uporabo reakcij brez topila.



Slika 10: Shema reakcije za pridobivanje etil (S)-3-(benzilamino) butanoata [(S)-3] in desnosučnega enantiomera [(R)-4] iz racematnega intermedata (rac-3); (a - benzilamin, b - trans-etil krotonat); C1, C2: posodi s substratom, C4: posoda z produktom, R1: cevni reaktor, R2: reaktor s strnjnim slojem.¹⁵

Glavni produkt aza-Michael adicije benzilamina in trans-etil krotonata je racematni intermedat β -amino kislinski eter (rac-3). Poleg glavne reakcije poteka tudi stranska v kateri se z aminolizo rac-3- tvori (R)-4. Proizvodnja v idealnem pretočnem mešalnem reaktorju (CSTR) je naklonjena nastanku končnega produkta v obliki rac-4 kar pomeni, da dobimo manjši dobiček zelenega produkta (S)-3. Povečanje izkoristka je možno

doseči z uporabo pretočnega reaktorja (PFR). Podobno lahko lipaza katalizira aminolizo rac-3 kontinuirno v CSTR ali PFR s strnjenim slojem (PBR). Zaradi kinetike sta takšna reaktorja boljša, ker omogočata večji dobiček želenega kiralnega produkta (S)-3.¹⁵

Za prenos procesa iz šaržnega načina delovanja reaktorja v kontinuirno je potrebno prilagoditi geometrijske parametre reaktorja in uporabiti ustrezno pripravljen biokatalizator. V tem primeru je bil uporabljen borosilikatni stekleni reaktor premera 1 cm, delujoč kot PBR. Za biokatalizator je bil uporabljen heterogeni biokatalizator Novozym 435. Preračunana je bila geometrijska gostota delcev, ki je znašala 430 kg/m^3 , gostota uporabljenega nosilca je znašala 946 kg/m^3 ter poroznost 0,543. Z dobljenimi meritvami je mogoče določiti potrebni zadrževalni čas, ki je odvisen od količine biokatalizatorja in volumetrične količine pretoka. Da je bilo omogočeno zbiranje podatkov o konverziji in enantioselektivnim prebitku na dveh različnih stopnjah konverzije, sta bila zaporedno vezana 2 PBR reaktorja. Reaktorja sta kontinuirno delovala 88 h brez izgube aktivnosti. Z zadrževalnim časom 2,5 h je bila dosežena 55% konverzija z 97% enantiomernim prebitkom (S)-3. S povečanim zadrževalnim časom na 3,7 h je bila dosežena 59% konverzija ter 98% prebitek (S)-3.^{15,16}

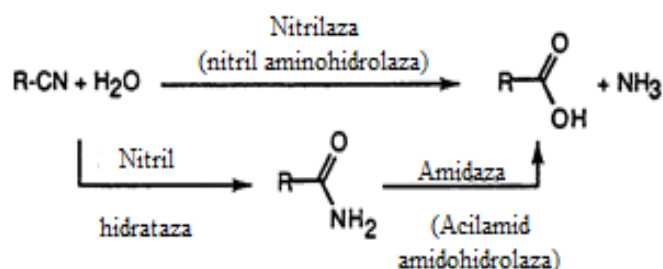
Proces je bil uspešno prenesen v kontinuirno delujoč PBR reaktor. Za kontinuirni proces je bil dosežen prostorsko-časovni dobiček, ki je znašal $128 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Industrijska proizvodnja finih kemikalij je med $0,1$ in $130 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Produktivnost kontinuirnega procesa je primerljiva z industrijsko proizvodnjo finih kemikalij, kar kaže visok potencial za uporabo procesov brez topila na industrijski skali.¹⁵

3.5.2 Pridobivanje akrilamida iz akrilonitrila

Akrilamid se uporablja v proizvodnji polimerov, sintetičnih gum, umetnih vlaken, barv, lepil in kot sredstvo za zaščito pred škodljivci. Leta 2005 je bila svetovna proizvodnja ocenjena na 5 milijonov ton na leto.

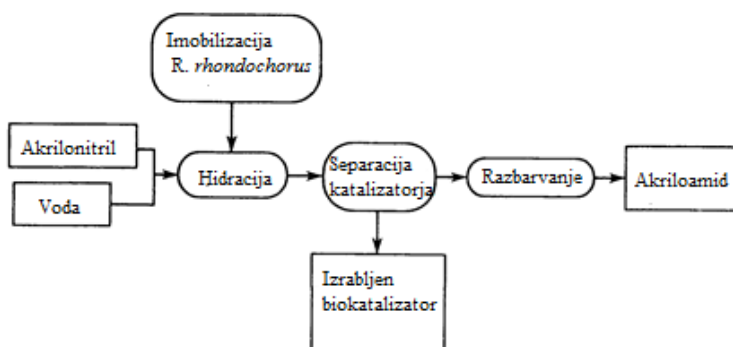
V polimerizaciji akrilamida, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, v poliakrilamid je mogoče doseči visoko stopnjo polimerizacije, če je vstopni tok monomera čist, brez kovin in anionov. Pri konvencionalnem kemijskem procesu pretvorbe akrilonitrila, $\text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$, v akrilamid je potrebno topilo, ki temelji na Cu katalizi. Hideaki Yamada in njegova skupina (Kyoto Univerza) so razvili celo-celični biokatalitski sistem, nepodvajajoče celice *Rhodococcus rhodochrous* J1, kjer nitril hidrataza hidrolizira akrilonitril v

akrilamid. Nitril hidrataze so Fe^{3+} ali Co^{3+} vsebujoče hidrolaze, ki direktno pripeljejo do amidov v nasprotju z nitrilazami, ki nitrilni skupini dodajajo dve molekuli vode in s tem tvorijo karboksilno kislino (slika 11). Nitril hidrataza ne hidrolizira samo akrilonitrila, ampak tudi številne druge aromatske nitrile v njim ustrezne amide.¹⁷

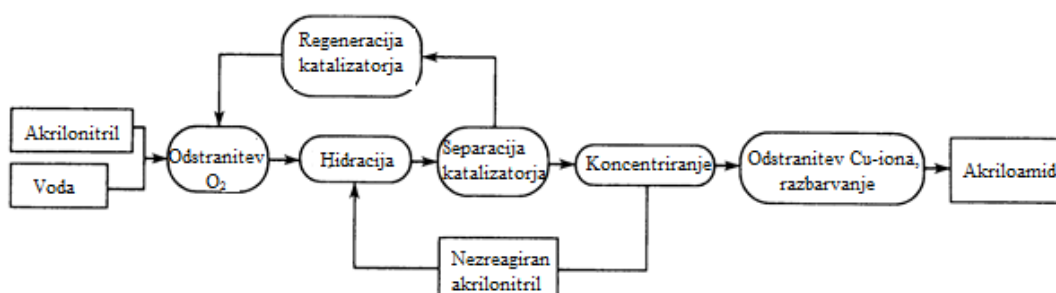


Slika 11: Encimske reakcije s ciano skupino.

a.) Biokataliziran proces:



b.) Cu-kataliziran proces:

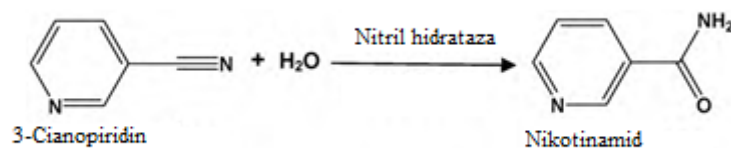


Slika 12: Shema: a.) Biokatalitskega procesa; b.) Cu-kataliziranega procesa.¹⁷

Biokatalitski (slika 12a) proces pridobivanja akriloamida poteka v šaržnem reaktorju z dodajanjem 25-40% akrilonitrila pri 0–10°C do popolne konverzije z izkoristkom procesa >99%, kar kaže na veliko uspešnost procesa v primerjavi z klasičnem kemičnem postopkom.^{6,17}

3.5.3 Pridobivanje nikotinamida iz 3-cianopiridina

Nikotinamid je biološko aktivna oblika vitamina B₃. Nikotinamid se lahko uporablja kot vitamin B₃ v živalski krmi in za preprečevanje in zdravljenje pomanjkanja vitamina B₃ pri ljudeh. Podobno kot hidroliza akrilonitrila z nitril hidratazo je lahko 3-cianopiridin (nikotin nitril) hidroliziran z istim katalizatorjem v nikotinamid (slika 13).¹⁸



Slika 13: Encimska pretvorba 3-Cianopiridina.¹⁸

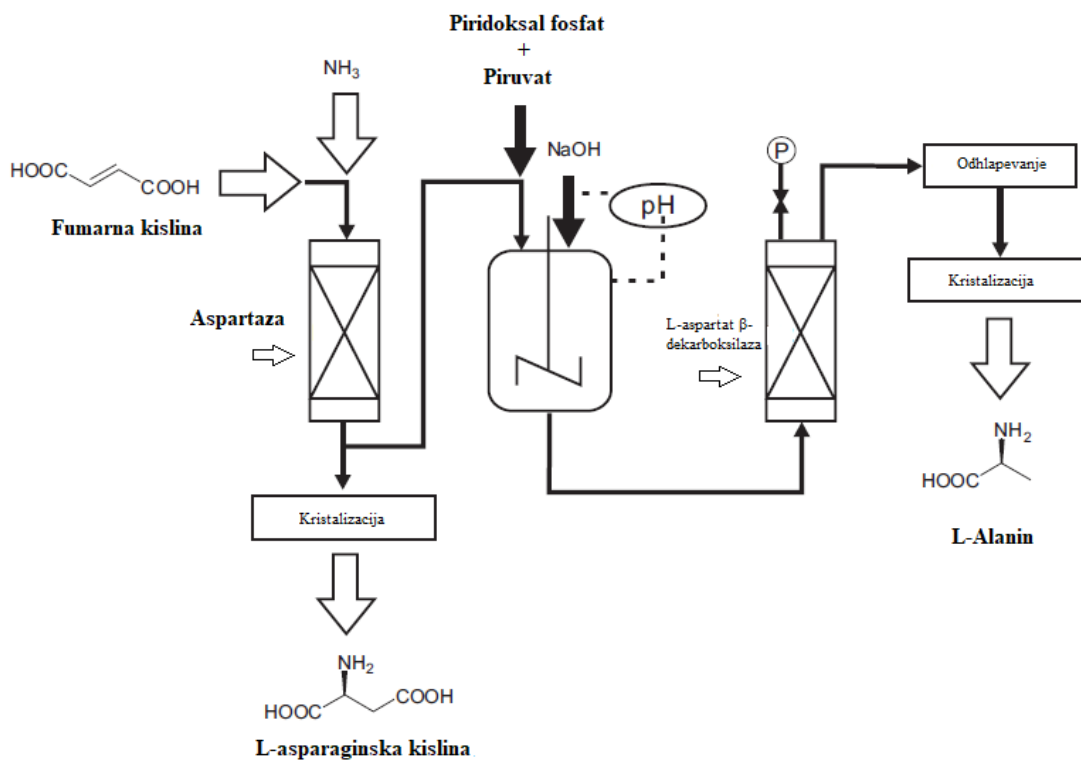
Proces poteka v treh zaporedno vezanih mešalnih reaktorjih, ki obratujejo kontinuirno. Napajalna mešanica vsebuje 10-20 ut.% 3-cianopiridina in je dovajana v nasprotni smeri kot biokatalizator. Encimska hidroliza daje želeni nikotiamid pri >99,3 % selektivnosti. Pri kemijski alkalijski hidrolizi pa nastane 3-5 % nikotinske kisline, ki je neželeni stranski produkt. Biokatalitski kontinuirno delujoč proces tako uspešno tekmuje s kemično hidrolizo.⁶

3.5.4 *Proizvodnja L- alanina z L-aspartat β -dekarboksilazo iz Pseudomonas dacunhae*

Industrijska proizvodnja L-Alanina poteka v šaržnem reaktorju z L-aspartat β -dekarboksilazo iz *Pseudomonas dacunhae* že od leta 1965. L-Alanin se uporablja kot dodatek živilom in letna svetovna proizvodnja znaša 500 ton, d-asparaginska kislina pa se uporablja kot intermediat za proizvodnjo polsintetičnega penicilina apoksicilina.

Za izboljšanje produktivnosti je bil proces prenesen v kontinuirno obratujoč proces leta 1982. Glavni problem kontinuirno obratujočega procesa je bil nastanek ogljikovega dioksida (50 L CO₂ na liter reakcijske mešanice). Posledice takšne količine CO₂ so odstopanje od čepastega toka v reaktorju z nasutim slojem in preskok v pH. Iz tega razloga je bil razvit reaktor z nasutjem, ki je obratoval pri 10 bar.¹⁹

Proces je običajno združen z aspartazno katalizirano sintezo d-asparaginske kisline iz fumarne kisline v dvostopenjski biotransformaciji. Glavni razlog za ločitev v dva reaktorja je različen pH optimum za encime (aspartaza iz *E. coli*: pH 8.5, L-aspartat β -dekarboksilaza: pH 6.0). To je prvi komercialni sistem zaporednih encimskih reakcij z uporabo dveh vrst imobiliziranih mikrobnih celic in je komercialno v uporabi od leta 1988 (slika 14).²⁰



Slika 14: Shema prodobivanja L-alanina z dvema zaporednima encimskima reakcijama.¹⁹

Procesni parametri:

konverzija:	99 %
dobitek:	86 % po zaključnih procesih
reaktorski tip:	PFR
reaktorski volumen:	1 L
zadrževalni čas:	11 h
prostorsko-časovni dobitok:	317 g / (L · d), L-asparaginska kislina 170 g / (L · d), L-alanin
Zaključni proces:	kristalizacija

4 Zaključek

Biokataliza in njena uporaba v različnih proizvodnih sektorjih se je izkazala kot ključna tehnologija pri razvoju okolju prijazne in trajnostne kemije v različnih proizvodnih procesih, kot so proizvodnja zdravil, prehranskih dopolnil in različnih kemikalij.

Prenos biokatalitskih procesov v kontinuirno obratujoče sisteme zviša konkurenčnost v industrijski proizvodnji. Kontinuirni način obratovanja prinese boljši prenos snovi, lažje nadzorovanje sestave reakcijske mešanice in reakcijskih pogojev, možnost kontinuirnega odstranjevanja produkta in manjšo obremenitev biokatalizatorja zaradi odsotnosti mešala. Uporaba kontinuirno obratujočih reaktorjev je predvsem uspešna v kemični in farmacevtski industriji zaradi boljšega nadzora reakcij, doseganja večjih prostorsko-časovnih dobitkov, večje čistosti produktov in večje varnosti procesov.

Na uporabo biokatalizatorjev v industrijskem merilu ključno vpliva učinkovitost imobilizacijskih metod. Biokatalizatorji se uporabljajo v topni obliki ali pa prosto potujejo skozi reaktor preko kanalov. Imobilizacija omogoča lažjo separacijo in ponovno uporabo biokatalizatorja ter lažjo izolacijo produkta. Izločanje biokatalizatorja iz končnega produkta lahko zelo podraži proces zaradi potrebnega čiščenja produkta. Reakcijski parametri lahko pripeljejo do inaktivacije biokatalizatorja, vendar pa jim ustrezna imobilizacijska metoda poviša rezistenco. Zaradi potreb industrije po stabilnih biokatalizatorjih se je pospešil razvoj novih imobilizacijskih metod, materialov za izdelavo nosilcev in podpor.

Separacijski procesi predstavljajo velik delež cene procesa zato številni reaktorski sistemi vsebujejo vezane separacijske mehanizme. Separacija omogoča ponovno recikliranje biokatalizatorjev. Za separacijo se najpogosteje uporabljajo dodatne zanke za ultrafiltracijo, integrirane membrane in in-situ odstranjevanje produkta s katerimi se doseže intenzifikacijo procesa. In-situ odstranjevanje produkta omogoči delovanje procesa pod naravnimi pogoji zaradi selektivnega odstranjevanja produkta.

V prihodnosti pričakujemo vedno večji razvoj na področju reaktorskih tehnologij, materialov, tehnik imobilizacije, biokatalizatorjev in separacijskih procesov in posledično biokatalitskih pretočnih sistemov, ker ponujajo številne rešitve problemov industrijske proizvodnje, katere cilj je intenzifikacija procesov ter visoka selektivnost in velik dobiček kompleksnih reakcij.

Mikroreaktorji so tip reaktorjev, ki omogočajo dober nadzor parametrov, enostavno integracijo separacijskih procesov, lažji prenos v večje merilo in večjo varnost pri izvedbi procesov. So tip reaktorjev, ki je v zadnjih letih prejel največ pozornosti s stališča trajnostnega razvoja in zelene kemije. Izvedba kontinuirnih bioprocessov v mikroreaktorjih ostaja eden od glavnih raziskovalnih področji biotehnologije.

5 Seznam uporabljenih virov

- [1] L. Tamborini, P. Fernandes, F. Paradisi, F. Molinari: Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification. *Trends Biotechnol.* **2018**, 36, 73–88.
- [2] P. Poechlauer, C. Gonzalez, Q. B. Broxterman, B. Yang, D. am Ende, J. Baird, C. Bertsch, R. E. Hannah, P. Dell’Orco, O. Noorman, S. Yee, R. Reintjens, A. Wells, V. Massonneau, in J. Manley: Key Green Engineering Research Areas for Sustainable Manufacturing: A Perspective from Pharmaceutical and Fine Chemicals Manufacturers. *Organic Process Research & Development.* **2011**, 15, 900–911.
- [3] P. Žnidaršič-Plazl: Biotransformations in microflow systems: Bridging the gap between academia and industry. *J. Flow Chem.* **2018**, 7, 1–7.
- [4] N. N. Rao, S. Lütz, K. Würges, D. Minör: Continuous Biocatalytic Processes. *Organic Process Research & Development.* **2009**, 13, 607-616.
- [5] S. Heintz, T. Börner, R. H. Ringborg, G. Rehn, J. M. Woodley, K. V. Gernaey, P. Adlercreutz in M. Nordblad: Development of in situ product removal strategies in biocatalysis applying scaled-down unit operations. *Biotechnol. Bioeng.* **2017**, 114, 600–609.
- [6] A. S. Bommarius in Riebel, B. R: Biocatalysis. Weinheim: Wiley, 2004, str. 1-109.
- [7] S. Jemli, D. Ayadi-Zouari, H. Ben in S. Bejar: Biocatalysts: Application and engineering for industrial purposes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, 36, 246–258.
- [8] J. Whittall, P. W. Sutton, W. Kroutil: Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 3. Chichester: Wiley **2016**, str. 5-35.
- [9] P. Torres-salas, A. Monte-martinez in B. Cutiño-avila: Immobilized biocatalysts : novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Advanced materials.* **2011**, 23, 5275–5282.
- [10] A. Freeman, J. M. Woodley, in M. D. Lilly: In situ product removal as a tool for bioprocessing. *Nat. Biotechnol.* **1993**, 11, 1007–1012.

- [11] J. M. Woodley, M. Bisschops, A. J. J. Straathof in M. Ottens: Perspective future directions for in-situ product removal (ISPR). *Chem Technol Biotechnol.* **2008**, 83, 121-123.
- [12] R. Wohlgemuth, I. Plazl, P. Žnidaršič-Plazl, K. V. Gernaey in J. M. Woodley,: Microscale technology and biocatalytic processes: Opportunities and challenges for synthesis. *Trends Biotechnol.* **2015**, 33, 302–314.
- [13] K. F. Jensen: Flow chemistry-Microreaction technology comes of age. *AIChE journal.* **2017**, 63(3).
- [14] P. M. Doran: Bioprocess engineering principles. Waltham: Elsevier. 2013, str. 445-539
- [15] S. Strompen, M. Weiß, H. Gröger, L. Hilterhaus in A. Liese: Development of a continuously operating process for the enantioselective synthesis of a β -amino acid ester via a solvent-free chemoenzymatic reaction sequence. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 2391–2399.
- [16] S. Strompen, M. Weiß, T. Ingram, I. Smirnova in H. Gro, H: Kinetic Investigation of a Solvent-Free , Chemoenzymatic Reaction Sequence Towards Enantioselective Synthesis of a β -Amino Acid Ester. *Biotech. and Bioeng.* **2012**, 109, 1479–1489.
- [17] H. Yamada, M. Kobayashi: Nitrile Hydratase and its Application to Industrial Production of Acrylamide. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, 60, 1391-1399.
- [18] L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Malandra, L. Martinková, F. Pasquarelli, M. Cantarella: Enzyme and Microbial Technology Application of continuous stirred membrane reactor to 3-cyanopyridine bioconversion using the nitrile hydratase – amidase cascade system of *Microbacterium imperiale*. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, 47, 64–70.
- [19] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey: Industrial Biotransformations. Darmstadt: Wiley. 2006, str. 1-566.
- [20] M. Senuma, O. Otsuki, , N. Sakata, M. Furui, T. Tosa: Industrial Production of D-Aspartic Acid and L-Alanine from DL-Aspartic Acid Using a Pressurized Column Reactor Containing Immobilized *Pseudomonas dacunhae* Cells. *J. Ferment. Technol.* **1989**, 67, 233–237.