



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

BIOKATALYYSI ORGAANISESSA SYNTEESISISSÄ

Jere Ahola

PROSESSITEKNIIKAN TUTKINTO-OHJELMA

Kandidaatintyö

Huhtikuu 2022

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	3
1 JOHDANTO	4
2 BOKATALYTYTTIEN KÄYTTÖ TEOLLISUUDESSA	5
2.1 Selektiivisyys	6
2.2 Reaktio-olosuhteet.....	7
2.3 Immobilisointi	9
3 ORGAANISEN SYNTEESIN REAKTIOT: C-C SIDOSTEN ENTSYMAATTINEN MUODOSTUMINEN	12
3.1 Lyaasit.....	12
3.2 Oksidoreduktaasit.....	17
4 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	20
5 LÄHDELUETTELO.....	21

TIIVISTELMÄ

Biokatalyyysi orgaanisessa synteesissä

Jere Ahola

Oulun yliopisto, prosessitekniikan tutkinto-ohjelma

Kandidaatintyö 2022, 24 s

Työn ohjaaja yliopistolla: Johanna Panula-Perälä

Tässä kirjallisuuskatsauksessa perehdytään biokatalyyttien käyttöön orgaanisessa synteesissä ja erityisesti havainnollistetaan C-C-sidosten entsyymattista muodostumista. Lisäksi työssä käydään läpi biokatalyyttien käyttöä teollisessa mittakaavassa ja kuinka erilaiset entsyymattiset reaktiot on optimoitu toimimaan halutulla tavalla, jotta saadaan kustannustehokas teollisuuteen valmis biokatalyyttinen prosessi.

Biokatalyyseistä on tullut vakiintunut vaihtoehto perinteisille kemiallisille prosesseille. Entsyymien korkea selektiivisyys sekä niiden kyky katalysoida reaktioita miedoissa olosuhteissa, ovat kannustaneet niiden käyttöönottoon teollisuudessa. Monia biokatalyyttisiä prosesseja on toteutettu useilla kemian-, lääke-, maatalous- ja elintarviketeollisuuden aloilla. Entsyymien erilaiset immobilisointimenetelmät tuovat myös useita etuja niiden käyttöön teollisuudessa, jotka pääasiassa liittyvät entsyymien parempaan talteenottoon ja kierrätykseen.

Hiili-hiili sidosten muodostuminen orgaanisen synteesin keinoin on avainasemassa orgaanisessa synteesissä ja aktiiviset C-C sidosten entsyymattiseen muodostumiseen liittyvät biokatalyytit ovat olleet kiinnostuksen kohteena jo kauan. Tässä tutkielmassa perehdytään erityisesti lyaasien ja oksidoreduktaasien käyttöön C-C-sidosten muodostumisessa, sekä havainnollistetaan niiden toimintamekanismeja sekä ominaisuuksia. Tuloksista voidaan huomata, että selektiivisyydeltään biokatalyytit ja erityisesti C-C-sidosten muodostumiseen osallistuvat entsyymit ovat erinomaisia, mutta laajemman teollisuuskäytön hidasteena on kuitenkin niiden vaihteleva stabiilisuus ja kapea valikoima käyttövalmiita biokatalyyttejä.

1 JOHDANTO

Verrattuna perinteisiin synteettisiin menetelmiin, biokatalyyssi tarjoaa useita mahdollisia etuja, joita ovat esimerkiksi parempi selektiivisyys, pienemmät ympäristöhaitat ja alhaisemmat kustannukset. Yhdessä nämä hyödyt voivat tuottaa kestävämpiä tuotantoprosesseja monilla aloilla lääkaineista biopolttoaineisiin. Tässä kirjallisuuskatsauksessa havainnollistetaan erityisesti hiili-hiili (C-C) sidosten muodostumista, jota voidaan katalysoida erilaisilla entsyymeillä.

Biokatalyyseistä on tullut tärkeä strategia korkean selektiivisyyden omaavien kemikaalien teolliseen tuotantoon ja sitä pidetään myös kestäväenä vaihtoehtona normaaleille kemiallisille prosesseille. Teollisuuskäyttöön tarkoitetuilla biokatalyyteillä on oltava korkean selektiivisyyden lisäksi hyvät talteenotto- ja uudelleenkäyttömahdollisuudet, joihin immobilisointi tarjoaa hyvän ratkaisun. Prosessisuunnittelussa on myös otettava huomioon erilaiset mahdolliset reaktorityypit ja reaktio-olosuhteet, joiden optimoinnin avulla biokatalyyseistä saadaan hyvä vaihtoehto teollisuusmittakaavassa tuotettavien erilaisten kemikaalien valmistukseen.

Hiili-hiili sidosten luominen on orgaanisen synteessin avainreaktio kunkin orgaanisen molekyylin hiilirangan muodostamiseksi. Viime vuosikymmeninä on tehty monia tutkimuksia sellaisten menetelmien kehittämiseksi, jotka mahdollistavat hiili-hiili sidosten muodostumisen korkealla saannolla sekä kemo-, regio- ja stereoselektiivisellä tavalla. Tärkeimmät biokatalyyttiset reitit C-C-sidosten muodostumiseen perustuvat lyaasien ja oksidoreduktaasien käyttöön. Tähän työhön on valittu käsiteltäväksi entsyymejä, jotka ovat olleet lähiaikoina kehityksessä ja joilla on hyvä kemo-, regio- ja stereoselektiivisyyden hallinta.

2 BOKATALYTTIEN KÄYTTÖ TEOLLISUUDESSA

Huges & Lewisin mukaan biokatalyyssillä tarkoitetaan entsyymien käyttöä puhdistetussa muodossaan, solun osana tai kokonaisena soluna substraatin muuntamiseksi halutuksi tuotteeksi. Louis Pasteur tuotti ensimmäisen esimerkin nykyaikaisesta biokatalyyssistä vuonna 1858 osoittamalla raseemisen viinihapon muodostumisen fermentoimalla useilla mikro-organismeilla, mukaan lukien yleisessä käytössä olevalla *Penicillium glaucum*-homeella. Näissä kokeissa (+) -viinihappo kulutettiin loppuun paljon nopeammin kuin (-) -viinihappo, mikä mahdollisti jälkimmäisen eristämisen. 1800-luvun loppupuolella Emil Fischer muodosti entsyymikatalyyssin ”lukko ja avain”-mallin ja Buchner osoitti, että soluttomat uutteen pystyivät katalysoimaan käymisprosesseja. (Fischer, E. 1894) Tämä ratkaiseva kehitys johti nopeasti lisääntyvään biokatalyyssin sovellusten määrään 1900-luvulla. (Hughes, G. Lewis, J. 2018)

Entsyymit koostuvat lineaarisista polypeptidiketjuista (proteiineista), joissa on noin 300 alfa-I-aminohappoa (Tiessen, A ym. 2012). Tämä vaihtelee huomattavasti, koska esimerkiksi 4-oksalokrotonaattitautomeraasi on vain 62 aminohappoa pitkä, kun taas rasvahapposyntaasi on 2461 aminohappoa pitkä. Tyypillisesti vain harvat näistä aminohapoista suorittavat katalyyttisiä toimintoja missä tahansa proteiinissa, kun taas muut 99 % ovat usein rakenteellisia tai sääteleviä. (Ribeiro, A ym. 2018) Rakeenteelliset aminohapot kohdistavat katalyyttiset aminohapot katalyyttisen mekanismin mahdollistamiseksi. (Sheldon, R ym. 2020)

Elintarvike-, juoma-, pesuaine-, tekstiili-, nahka- ja paperiteollisuus ovat ylivoimaisesti merkittävimpiä entsyymien kaupallisia käyttäjiä. Joissakin tapauksissa entsyymejä esiintyy lopputuotteissa, kuten esimerkiksi proteaasit pesuaineissa. Muissa tapauksissa, kuten tekstiili-, nahka- ja paperi- ja selluteollisuudessa entsyymejä käytetään valmistuksen apuaineina. Elintarviketeollisuudessa entsyymejä käytetään suurissa määrin leivonnassa sekä rasvojen ja öljyjen valmistuksessa. Lisäksi viinin, oluen ja muiden juomien valmistajat käyttävät suuria määriä entsyymejä. Esimerkiksi korkeafruktoosipitoisen maissisiirapin entsyymattinen tuotanto on yksi suurimmista tällä hetkellä käytetyistä teollisista biokatalyyttisistä prosesseista. Alhaisten kustannuksen lisäksi näitä entsyymejä on optimoitu useiden vuosien ajan stabiilisuuden, katalyyttisen

aktiivisuuden ja joissakin tapauksissa immobilisoinnin suhteen. (Goswami, A. Stewart, J. 2016. S.34–36)

Monet teolliset entsyymit myydään seoksina, koska lisäpuhdistus nostaisi kustannuksia. Pääsääntöisesti, elleivät epäpuhtaudet aiheuta vaikeuksia, niiden annetaan jäädä entsyymiseokseen, ellei niitä voida poistaa erittäin taloudellisesti. Joissakin tapauksissa saman entsyymin hieman erilaisia muotoja sisältyy seokseen. Nämä variantit voivat poiketa hieman kineettisiltä ominaisuuksiltaan tai stabiilisuudeltaan, mutta ne eivät yleensä aiheuta vaikeuksia orgaanisen synteessin sovelluksissa. Synteettiset sovellukset voivat olla paljon haastavimpia, kun läsnä on useita entsyymejä, joilla on erilaiset substraatti- ja/tai stereoselektiivisyydet. Tämä on erityisen tärkeää, jos entsyymiseoksen koostumus vaihtelee ajan ja/tai lähteen mukaan. Lopuksi on myös huomattava, että kaupalliset entsyymiseokset sisältävät usein myös muita tuottoisännän proteiineja, prosessoinnin apuaineita ja täyteaineita. (Goswami, A. Stewart, J. 2016. S.34–36)

Suurelta osin in silico metagenomiikan ja suunnatun evoluution seurauksena biokatalyyttistä on kehittynyt kustannustehokas ja laajasti sovellettava tekniikka, joka on onnistuneesti integroitu orgaaniseen synteesiin (Sheldon, R ym. 2020).

2.1 Selektiivisyys

Biologian ja prosessitekniikan viimeaikainen kehitys on antanut työkalut uusiin tekniikoihin, jotka mahdollistavat entsyymi- ja mikrobikatalyyttien integroinnin monivaiheiseen teolliseen orgaaniseen synteesiin. Tämä edistyminen mahdollistaa biokatalyyttien ainutlaatuisen stereo- ja regioselektiivisyyden hyödyntämisen vaikeissa kemiallisissa transformaatioissa, kuten hiili-hiili-sidoksen asymmetristä muodostumista (Gary, J ym. 2002).

Biokatalyyttisillä reaktioilla voi olla erittäin korkea selektiivisyys kaikilta osin. Kun molekyylissä on samankaltaisia reaktiivisia funktionaalisia ryhmiä, entsyymit katalysoivat usein vain yhtä reaktiota, jättäen muut huomioimatta. Esimerkiksi nitrilihydrataasit katalysoivat nitriliryhmän osittaisen hydrolyysin, jolloin saadaan primaarinen amidi pilkkomatta samassa molekyylissä olevaa esteriosaa tai hydrolysoimalla amidituotetta edelleen. Tätä ominaisuutta kutsutaan

kemoselektiivisyydeksi. Regioselektiivisyys on toinen hyödyllinen ominaisuus, jonka monet entsyymit omaavat. Tämä tarkoittaa yhden funktionaalisen ryhmän transformaatiota samalla, kun muut identtiset tai lähes identtiset osat molekyylin eri osissa jäävät huomioimatta. Esimerkiksi triglyseridin kolmen esterin joukosta monet lipaasit hydrolysoivat vain yhden osan eivätkä katalysoi diesterituotteen jatkohydrolyysiä. (Goswami, A. Stewart, J. 2016. S.3)

Ainoastaan yhdellä tavallisesti proteiineissa esiintyvistä aminohapoista ei ole kiraalista keskusta ja tästä syystä entsyymit ovat luonnostaan epäsymmetrisiä katalyyttejä. Entsyymien epäsymmetrinen luonne johtaa enantioselektiivisyyteen, kun biokatalyytit muuntavat prokiraalisen lähtöaineen yhdeksi tuote-enantiomeeriksi, esimerkiksi ketonien tai imiiniin pelkistysreaktioissa. Sama epäsymmetrinen luonne saa biokatalyytit myös transformoimaan ensisijaisesti vain yhtä lähtöaineen stereoisomeeriä, joka sisältää diastereomeerien tai enantiomeerien seoksen. (Goswami, A. Stewart, J. 2016. S.3)

2.2 Reaktio-olosuhteet

Entsyymit ovat kehittyneet toimimaan parhaiten olosuhteissa, jotka vallitsevat niille ominaisissa elinympäristöissä. Tämä tarkoittaa yleensä lämpötiloja 20–40°C välillä, lähes neutraaleja pH-arvoja ja vettä liuottimena. Tällaiset olosuhteet ovat erityisen sopivia herkille lähtöaineille ja/tai tuotteille, mikä tekee entsyymeistä sopivia käytettäväksi tällaisten lähtöaineiden/tuotteiden katalyyssissä. On kuitenkin huomattava, että jotkin entsyymit ovat kehittyneet toimimaan äärimmäisissä olosuhteissa. Esimerkiksi termofiiliset bakteerit, jotka menestyvät yli 100°C:n lämpötiloissa, ovat olleet arvokkaita entsyymien lähteitä, joilla on paljon tavallista korkeampi lämpöstabiilisuus. Lisäksi solujen ulkopuolelle eritettävät entsyymit ovat yleensä stabiilimpia, koska niiden toimintaympäristö on vähemmän ennustettavissa ja suurilta osin kontrolloimaton. Tämä lämpöstabiilisuuden monimuotoisuus sallii usein sellaisen reaktiolämpötilan valinnan, joka tasapainottaa hyvät reaktionopeudet entsyymien stabiilisuuden kanssa ja maksimoi myös kokonaissaannon. (Goswami, A. Stewart, J. 2016. S.4–5)

Luonnossa suurin osa entsyymikatalysoiduista reaktioista tapahtuu vesipitoisessa ympäristössä, ja siksi useissa biokatalyyysin sovelluksissa käytetään myös vettä

liuottimena. Tämä on usein hyödyllistä prosessin kestävyuden maksimoimiseksi ja lisäksi entsyymit ovat yleensä vakaampia vedessä. Veden käyttöön liuottimena on kuitenkin omat haittansa. Vesi on reagenssi hydrolyytisissä prosesseissa, ja sen konsentraatio on minimoitava, kun tällaisia reaktioita suoritetaan päinvastaisesti tasapainon siirtämiseksi. Toinen ongelma, joka liittyy näihin olosuhteisiin, on se, että monilla synteettisen mielenkiinnon kohteena olevilla lähtöaineilla ja tuotteilla on rajalliset liukoisuudet veteen. Tämä edellyttää joko laimennettujen liuosten käyttöä, mikä alentaa saantoa ja tuottaa myös suuria määriä puhdistettavaa jätevettä tai orgaanisten liuottimien käyttöä veden lisäaineina tai korvaavina aineina. (Goswami, A. Stewart, J. 2016. S.4–5)

Entsyymireaktorit toimivat pääosin panos- tai jatkuvatoimisesti (Kumar, R ym. 1996). Panosreaktoreissa, joissa entsyymit (yleensä hydrolaasit) on liuotettu vesipitoiseen reaktioväliaineeseen, on sen laajasta käytöstä huolimatta useita haittoja. Tämä siksi, koska entsyymit ovat huonosti stabiileja ja vaikeasti talteen otettavissa sellaisissa järjestelmissä, mikä johtaa alhaiseen tuottavuuteen. (Ballesteros, A ym. 1998)

Useita reaktorikokoonpanoja on ehdotettu ja käytetty entsyymikatalysoitujen reaktioiden suorittamiseen. Panosreaktoreissa reaktio liukoisilla entsyymeillä suoritetaan pääasiassa sekoitussäiliöreaktoreissa, jotka on varustettu sekoituselementeillä ja järjestelmillä lämpötilan ja pH:n säätöön. Sekoitussäiliöreaktoreissa voidaan käyttää myös Immobilisoituja entsyymejä. Säiliöön on integroitu järjestelmä, joka mahdollistaa biokatalyytin säilyttämisen tuotteen talteenoton jälkeen jokaisesta erästä. Eniten käytetty järjestelmä on reaktorin pohjassa oleva ruostumattomasta teräksestä valmistettu seula, mutta muitakin vaihtoehtoja on olemassa. Kierrätyspanosreaktoreissa entsyymi pakataan kapean pedin muodossa, jonka läpi reaktioväliaine kiertää siihen asti, kunnes haluttu konversio saavutetaan. (Sudhakaran, V ym. 1992) Jatkuvatoimisille reaktoreille vaihtoehtoja on useampi: Eniten käytetään pakattu peti-reaktoreita (Marrazzo, WN ym. 1975), joissa substraattivirta kulkee reaktoriin pakatun immobilisoidun entsyymipedin läpi ja sekoitussäiliöreaktoreita, joissa entsyymi pidetään reaktorissa sopivalla seulalla tai otetaan talteen suodatuksella tai sentriufugilla, jonka jälkeen se kierrätetään takaisin reaktoriin. (Vasquez-Bahena, J ym. 2004) Vaihtoehtona näille on laajennettu- tai leijupetireaktori, jossa entsyymipartikkelit pysyvät reaktorissa painovoiman vaikutuksesta. (Illanes A. Altamirano C. 2008. S.206–207)

2.3 Immobilisointi

Viime vuosina entsyymien käyttö orgaanisessa kemiassa on yleistynyt tutkimuslaboratorioissa (Rodrigues, R ym. 2012). Toistaiseksi kuitenkin vain harvaa tutkimuskirjallisuudessa raportoiduista monista biokatalyyttisistä prosesseista on sovellettu tuotantomittakaavassa. Yksi syy tähän on entsyymien usein alhainen stabiilisuus sekä vaikeudet niiden talteenotossa ja uudelleenkäytössä. (Bommarius, A. Paye, M. 2013) Immobilisointi tarjoaa hyvän ratkaisun näihin ongelmiin. Entsyymien immobilisointiin on etsitty tehokkaita menetelmiä ja se tarjoaa useita potentiaalisia parannuksia. Näitä ovat esimerkiksi entsyymien helpompi käsittely, minimoitu proteiinin kontaminaatio lopputuotteessa, tehokas entsyymien talteenotto ja kierrätys, parantunut entsyymistabiilisuus, alhainen allergeenisuus ja korkeampi tuottavuus ja siten alhaisemmat kustannukset (Gutarra, M ym. 2016. S.99). Lisäksi yksi käytännön ongelmista entsyymeissä on, että niiden talteenotto vesipitoisista väliaineista on haastavaa, ja siksi niitä käytetään kertakäyttöisenä. Mahdollinen ratkaisu ongelmaan on immobilisoida entsyymi muuntamalla se heterogeeniseksi kiinteäksi katalyytiksi, joka voidaan helposti ottaa talteen vesipitoisesta väliaineesta ja käyttää uudelleen. Tämä vähentää merkittävästi entsyymikustannuksia tuotekiloa kohden ja hiilijalanjälkeä, jotka yhdessä lisää kilpailukykyä ja kestävyyttä (Sheldon, R ym. 2020).

Illanes & Altamiranon mukaan huono stabiilisuus on yleensä rajoittava tekijä missä tahansa entsyymiprosessissa, joten entsyymien stabilointi reaktorin käytön aikana on tärkeää ottaa huomioon. Lisäksi entsyymien stabilointia koskevien monien strategioiden joukossa entsyymien immobilisointi on tärkeintä. Immobilisoituja entsyymejä voidaan käyttää panosprosesseissa, joissa entsyymi otetaan talteen käytettäväksi seuraavissa erissä, kunnes entsyymien inaktivaatio tekee sen hyödyttömäksi, jolloin se korvataan. Tämän seurauksena spesifinen tuottavuus kasvaa ja bioreaktorin suunnittelusta tulee erityisen tärkeä osa tietyn prosessin erityistarpeiden saavuttamiseksi. (Illanes A. Altamirano C. 2008. S.205) Entsyymien immobilisoimiseksi on olemassa neljä päämenetelmää: fyysinen adsorptio, suljenta, kovalenttinen sitoutuminen ja kantajavapaa immobilisointi. (Mohamad, R ym. 2015)

Fyysisessä adsorptiossa entsyymi kiinnitetään kantajan pinnalle heikoilla vuorovaikutuksilla, kuten van der Waalsin voimalla, sähköstaattisella voimalla tai hydrofobisilla vuorovaikutuksilla ja vetysidoksilla. Adsorptio vaatii yleensä kantajan liuottamisen entsyymiliuokseen ja inkuboinnin, jotta fyysinen adsorptio voi tapahtua. Toinen tapa on antaa entsyymiliuoksen kuivua elektrodipinnoille ja huuhdella pois entsyymit, jotka eivät ole adsorboituneet. (Mohamad, R ym. 2015) Yleensä entsyymien immobilisointi fyysisen adsorptiotekniikan avulla on melko yksinkertaista, ja sillä voi olla korkeampi kaupallinen potentiaali verrattuna muihin menetelmiin sen yksinkertaisuuden, alhaisen hinnan ja korkean entsyymiaktiivisuuden säilyttämisen vuoksi. (Huang L, Cheng ZM. 2008)

Suljenta määritellään peruuttamattomaksi entsyymien immobilisointimenetelmäksi, jossa entsyymit ovat kiinni tukimateriaalissa tai kuitujen sisällä, joko materiaalin ristikkorakenteessa tai polymeerikalvoissa, mikä sallii substraatin ja tuotteiden läpäisemisen, mutta säilyttää entsyymin. Sitoutumista kuvataan myös entsyymin fyysiseksi rajoittamiseksi suljetussa tilassa tai verkossa. Sitoutuminen voi tyypillisesti parantaa mekaanista stabiilisuutta ja minimoida entsyymien huuhtoutumisen. Menetelmä mahdollistaa kapselointimateriaalin muokkaamisen ja optimaalisen mikroympäristön luomisen entsyymille. Tämän menetelmän käyttö on melko rajoitettua, koska sillä on taipumus aiheuttaa substraatin tai analyytin massansiirtorajoituksia entsyymin aktiiviseen kohtaan. Muita haittoja ovat entsyymivuodon mahdollisuus, jota voi tapahtua, kun tukimatriisin huokokset ovat liian suuria, deaktivoituminen immobilisoinnin aikana, alhainen kuormituskyky ja tukimateriaalin hankaus käytön aikana. (Mohamad, R ym. 2015)

Cross-linking on toinen peruuttamaton menetelmä entsyymien immobilisoimiseksi, joka ei vaadi tukea estämään entsyymihäviötä substraattiliuokseen. Menetelmää kutsutaan myös kantajattomaksi immobilisoinniksi, jossa entsyymi toimii omana kantajana ja saadaan käytännöllisesti katsoen puhdas entsyymi eliminoimalla kantajiin liittyvät edut ja haitat. Teknisesti cross-linking suoritetaan muodostamalla molekyylien välisiä ristisidoksia entsyymimolekyylien välille bi- tai monifunktionaalisten reagenssien avulla. Yleisimmin käytetty silloitusreagenssi on glutaraldehydi, koska se on taloudellinen ja helposti saatavissa. Silloittamiseen voi liittyä sekä Schiff-emäksen muodostuminen ja

Michael- tyypin 1,4-lisäystä α , β -tyydyttymättömiin aldehydiosiin. Tarkka silloitustapa on pH-riippuvainen. (Mohamad, R ym. 2015)

Kovalenttinen sitoutuminen on yksi laajimmin käytetyistä irreversiibelin entsyymien immobilisoinnin menetelmistä. Funktionaalinen ryhmä, joka osallistuu entsyymien sitoutumiseen, sisältää yleensä sitoutumisen lysiinin, kysteiinin sekä asparahiini- ja glutamiinihapon sivuketjujen kautta. Kovalenttisesti sitoutuneen entsyymien aktiivisuus riippuu kantajamateriaalin koosta ja muodosta, kytkentämenetelmän luonteesta, kantajamateriaalin koostumuksesta ja olosuhteista kytkennän aikana. Entsyymien ja kantajan välisen kovalenttisen sitoutumisen kannalta entsyymien sitoutumisen suunta on ratkaiseva tekijä, joka määrää sen stabiilisuuden. (Mohamad, R ym. 2015)

Yksi näkyvimmistä kovalenttisen sitoutumisen esimerkeistä, joka havainnollistaa immobilisoinnin etuja tehokkaalle ja hyvin skaalautuvalle biotransformaatiolle, on penisiliiniamidaasin katalysoima hydrolyyttinen pilkkominen penisiliini G-sivuketjussa, joka muodostaa teollisesti tärkeän 6-aminopenisillaanin hapon. Tätä useiden puolisynteettisten antibioottien keskeistä välituotetta valmistetaan yli 10 000 tonnin vuotuisella tuotantomäärällä. (Harald, G. 2016. S.50–51)

3 ORGAANISEN SYNTEESIN REAKTIOT: C-C SIDOSTEN ENTSYMAATTINEN MUODOSTUMINEN

Molekyylibiologiassa ja laskennallisessa biologiassa tapahtuneet kehitysaskeleet mahdollistavat parannettujen entsyymien kehittämisen ja tunnistamisen. Tästä syystä biokatalyyysi onkin jatkuvasti enemmän osana orgaanisten molekyylien synteesissä. (Schmidt, N. Eger, E. Kroutil, W. 2016) Tässä kappaleessa käydään läpi muutamia erittäin aktiivisia C-C sidosten entsyymaattiseen muodostumiseen liittyviä biokatalyyttejä, joiden kemo-, regio- ja stereoselektiivisyys on tiukasti hallinnassa.

Hiili-hiili (C-C) -sidosten muodostuminen on keskeinen reaktio orgaanisessa synteesissä jokaisen orgaanisen molekyylin hiilirungon muodostamiseksi. Yhdistämällä pienempiä alarakenteita saadaan aikaan monimutkaisempia molekyyliä. Tärkeimmät biokatalyyttiset reitit C-C-sidosten muodostumiselle perustuvat lyaasien, kuten aldolaasien, hydroksinitriililyaasien, bentsaldehydien, pyruvaattidekarboksylaasin tai oksidoreduktaasien, kuten lakkaasien ja peroksidaasien käyttöön. Nämä entsyymit katalysoivat sidoksen muodostumista ja hajoamista muilla kuin hydrolyysi tai hapetus-pelkistys-reaktioilla. (Souza, R ym. 2017)

3.1 Lyaasit

Lyaasit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat sidoksen muodostumista ja hajoamista muilla tavoin kuin hydrolyysillä tai hapetus-pelkistys-reaktioilla. Tällaiset entsyymit ovat erityisiä siinä mielessä, että ne tarvitsevat vain yhden substraatin reaktioon yhdessä suunnassa, mutta kaksi substraattia käänteiseen reaktioon. Lyaasit luokitellaan EC 4:ksi, ja lyaaseilla on seitsemän alaluokkaa, joihin entsyymi luokitellaan reaktioon liittyvän sidostyyppin mukaan. (McDonald, A ym. 2009)

L-DOPA (3,4-dihydroksi-L-fenyylalaniini) on tärkeä farmaseuttinen aine Parkinsonin taudin hoidossa ja sen kysyntä kasvaa väestön ikääntyessä. Sitä voidaan valmistaa kasviuutolla, kemiallisella synteesillä ja bioteknologisilla reiteillä. Kasviuuttoa on vaikea teollistaa suuressa mittakaavassa materiaalirajoitusten, korkeiden kustannusten ja alhaisen tuottavuuden vuoksi. Kemiallinen synteesi sisältää kahdeksan reaktiovaihetta ja

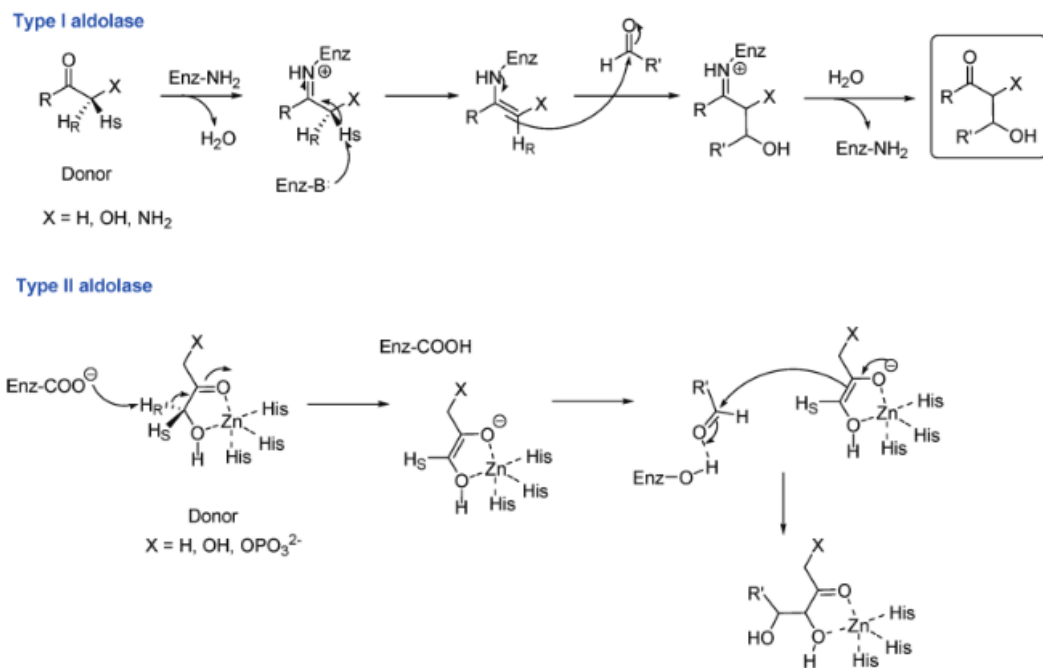
on myös tästä johtuen hankala valmistaa teollisesti kannattavasti. Tästä syystä bioteknisiä reittejä pidetään ekologisesti houkuttelevana valintana, erityisesti biologisen fermentoinnin ja kokosolukatalyyysin menetelmillä. Tyrosiinifenolilyaasia (TPL) on sovellettu L-DOPA:n tuotantoon kokosolukatalyyysimenetelmällä. TPL katalysoi l-tyrosiinin β -eliminaatiota pyruvaatiksi, fenoliksi ja ammoniumiksi ja kun fenoli korvataan katekolilla, muodostuu L-DOPAA. Entsyymi tarvitsee kofaktoriksi pyridoksaali-5'-fosfaatin (PLP). Katalysoitava reaktio on reversiibeli. TPL-entsyymejä, joilla on korkea katalyyttinen aktiivisuus, on raportoitu useista mikrobeista, mukaan lukien *Citrobacter freundii*, *Erwinia herbicola* ja *Fusobacterium nucleatum*. (Zeng, W ym. 2019)

Zeng ym. 2019 paransi *E. herbicolasta* peräisin olevaa natiivia TPL:ää ohjatun evoluution ja korkean suorituskyvyn seulontamenetelien avulla kehittääkseen tehokkaampaa TPL-entsyymiä L-DOPA-synteesiin. Tutkimuksessa entsyymien evoluutio ja korkean suorituskyvyn seulontamenetelmät integroitiin mutatoituneiden TPL:ien seulomiseen, joilla on hyvä suorituskyky L-DOPA:n synteesiä varten. Tähän käytettiin *Erwinia herbicolasta* peräisin olevaa natiivia TPL:ää ja kokosolukatalyyysissä parannetun Eh-TPL entsyymien sisältävää *E. coli* BL21(DE3) -mikrobia. Viiden litran bioreaktorissa saatiin 69,1 g/l L-DOPAA fed-batch menetelmää hyödyntäen. (Zeng, W ym. 2019)

Aldolireaktio on yksi tehokkaimmista menetelmistä C-C-sidosten rakentamiseen. Tämä reaktio on myös kriittinen aineenvaihdunnan yhteydessä, koska se on tärkein biokemiallinen prosessi luonnollisten hiilihydraattien muodostamiseen. Parannettuja aldolireaktion variantteja on kehitetty viime vuosikymmeninä. Reaktion erinomainen stereokemian hallinta voidaan saavuttaa sekä kemiallisin että entsyymaattisin keinoin. (Brovetto, M ym. 2011)

Aldolaasit ovat lyaaseihin kuuluvia entsyymejä, joita esiintyy hiilihydraattien, ketohappojen ja aminohappojen biosynteesireiteillä sekä hiilihydraattien erilaisissa katabolisissa reiteissä. Yli 40 aldolaasia on tunnettu, joista suurin osa katalysoi ketonin stereoselektiivistä aldoliadditiota aldehydiksi. Mekaanisesti aldolaasit voidaan jakaa kahteen tyyppiin riippuen siitä, millaisen mekanismin kautta ne toimivat (Kuva 1). Tyypin 1 aldolaasit aktivoivat molekyyliuovuttajan muodostamalla Schiff-emäksen

välituotteeksi. Aktiivisessa kohdassa olevan lysiniähteen ϵ -NH₂-ryhmä muodostaa imiinin luovuttajan kanssa. Tämä aktivoitu luovuttaja kiinnittyy sitten stereoselektiivisesti vastaanottaja-aldehydiin, muodostamalla enamiinin. Tyypin 2 aldolaasit sisältävät Zn²⁺ kofaktorin aktiivisessa kohdassa. Tämä siirtymämetalli-ioni ohjataan kolmeen histidiiniin typpiin, mikä tukee nukleofilin aktivaatiota muodostamalla kelaation karbonyyli- ja α -hydroksiryhmän kanssa substraattiluovuttajassa. Tämä mahdollistaa pro-R (H_R)-protonin irtoamisen, jolloin syntyy enediolaatti (enediolate), joka kykenee reagoimaan luovuttajan kanssa. Tyypin 1 aldolaaseja esiintyy pääasiassa eläimissä ja korkeammassa kasveissa, kun taas tyypin 2 aldolaaseja esiintyy mikro-organismeissa ja ne ovat yleensä stabiilimpia. (Brovetto, M ym. 2011)

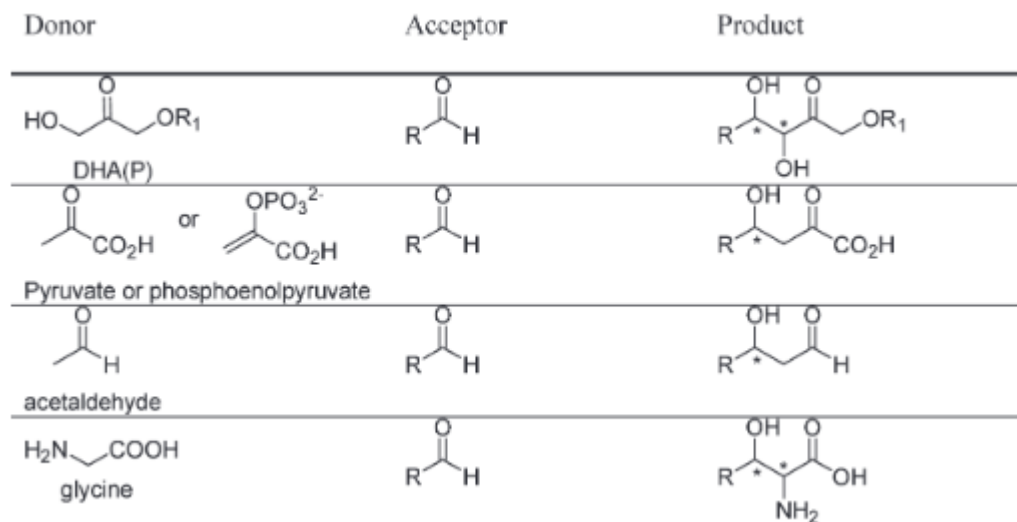


Kuva 1. Tyypin I ja II aldolaasien mekanismi. (Kuva julkaisijan luvalla julkaisusta: Brovetto, M ym. 2011. Copyright 2011 American Chemical Society)

Toiminnallisesti aldolaasit voidaan jakaa neljään ryhmään entsyymin hyväksymän luovuttajasubstraatin rakenteen mukaan (Taulukko 1). Ensimmäinen ryhmä käyttää dihydroksiasetonifosfaattia (DHAP) luovuttajana ketoosi-1-fosfaatin muodostamiseksi

reaktiossa aldehydin kanssa. Toinen ryhmä käyttää pyruvaattia tai fosfoenolipyruvaattia, jolloin saadaan 3-deoksi-2-ketohappoja. Kolmas ryhmä käyttää asetaldehydiä 2-deoksialdehydien saamiseksi. Lopuksi neljäs ryhmä käyttää glysiiniä luovuttajana, mikä johtaa β -hydroksi- α -aminohappoihin. (Brovetto, M ym. 2011)

Taulukko 1. Aldolaasien neljä ryhmää niiden luovuttajasubstraatin mukaan. (Taulukko julkaisijan luvalla julkaisusta: Brovetto, M ym. 2011. Copyright 2011 American Chemical Society)



Toiseen ja kolmanteen ryhmään kuuluvat aldolaasit tuottavat α -metyleenikarbonyyliyhdisteitä ja siten yhden stereokeskuksen. Toisaalta ensimmäiseen ja neljänteen ryhmään kuuluvat aldolaasit muodostavat α -substituoituja karbonyyliyhdisteitä, jotka sisältävät kaksi vierekkäistä kiraalista keskusta muodostuneessa C-C-sidoksessa. Nämä entsyymit hyväksyvät yleensä laajan valikoiman vastaanottajasubstraatteja, mutta niillä on tiukat vaatimukset luovuttajasubstraateille. Yleensä stereoselektiivisyyttä säätelee entsyymi, eikä se riipu substraatin rakenteesta, mikä tuottaa hyvin ennustettavia tuotteita. (Brovetto, M ym. 2011)

Dihydroksiasetonifosfaatti- (DHAP) ja dihydroksiasetoni- (DHA) riippuvaiset aldolaasit sisältävät useita entsyymejä, jotka hyväksyvät laajan valikoiman substraatteja. Joidenkin tunnettujen DHAP-riippuvaisten reaktioiden in vivo-katalysoimat synteettisesti

kiinnostavat reaktiot on esitetty alla olevassa taulukossa (Taulukko 2). Nämä DHAP-riippuvaiset aldolaasit ovat tähän mennessä tutkituimpia ja kiinnostavimpia vaihtoehtoja, erityisesti polyoksigenoitujen yhdisteiden asymmetriseen synteesiin. Käytettäessä DHAP-riippuvaisia aldolaaseja katalysoituun C-C-sidoksen muodostukseen, syntyy kaksi uutta stereokeskusta. Tämän seurauksena voidaan saada neljä erilaista stereoisomeeriä. Eri aldolaaseja, jotka katalysoivat kunkin stereoisomeerin muodostumista on kaupallisesti saatavilla. (Brovetto, M ym. 2011)

Taulukko 2. Dihydroksiasetonifosfaatista riippuvat aldolaasit. (Taulukko julkaisijan luvalla julkaisusta: Brovetto, M ym. 2011. Copyright 2011 American Chemical Society)

Natural acceptor	Enzyme	Product
<p>D-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P)</p>	Fructose 1,6-biphosphate (FBP) aldolase (FruA, EC 4.1.2.13)	<p>D-fructose 1,6-biphosphate (FBP)</p>
<p>(S)-lactaldehyde</p>	L-Fuculose 1-phosphate (Fuc 1-P) aldolase (FucA, EC 4.1.2.17)	<p>L-fuculose 1-phosphate (Fuc 1-P)</p>
<p>(S)-lactaldehyde</p>	L-Rhamnulose 1-phosphate (Rha 1-P) aldolase (RhuA, EC 4.1.2.19)	<p>L-rhamnulose 1-phosphate (Rha 1-P)</p>
<p>D-glyceraldehyde 3-phosphate (G3P)</p>	Tagatose 1,6-diphosphate (TDP) aldolase (TagA, EC 4.1.2.40)	<p>D-tagatose 1,6-diphosphate (TDP)</p>

FBP-aldolaasi on DHAP-ryhmän eniten käytetty entsyymi. Se katalysoi in vivo D-glyseraldehydi-3-fosfaatin (G3P) ja DHAP:n aldolilisäystä, jolloin saadaan D-fruktoosi-1,6-bifosfaattia (FBP). Tämä reaktio siirtyy voimakkaasti synteesiä kohti ($K = 10^4 \text{ M}^{-1}$) standardiolosuhteissa, minkä seurauksena sillä on vahva riippuvuus reagoivien aineiden konsentraatioista. Sekä tyypin 1 että tyypin 2 mekanismeilla toimivia entsyymejä on eristetty erilaisista prokaryoottisista ja eukaryoottisista lähteistä, ja siten FBP aldolaasi on yleinen glykolyttinen entsyymi, jolla on ratkaiseva rooli glykolyysissä, glukoneogeenisissä ja fruktoosiaineenvaihdunnassa. Kanin lihaksesta eristettyä tyypin 1 FBP-aldolaasia (RAMA) ja hiivasta sekä bakteereista eristettävää tyypin 2 aldolaasia

käytetään eniten orgaanisessa synteessissä niiden hyvästä kaupallisesta saatavuudesta johtuen. (Brovetto, M ym. 2011)

Hydroksinitriililyaasit (HNL) ovat myös kiinnostava esimerkki aldolaaseista. Entsyymit katalysoivat syaanihydriinien palautuvaa muodostumista HCN:stä ja aldehydeistä tai ketoneista. Manteleista saatu HNL oli ensimmäinen eristetty ja karakterisoitu hydroksinitriililyaasi, jota on siitä lähtien käytetty enantiomeerisesti rikastettujen R-syaanihydriinien valmistamiseen aromaattisista ja alifaattisista aldehydeistä. Ensimmäinen S-selektiivinen hydroksinitriililyaasi havaittiin vuonna 1960 hirssitaimissa. Nykyään saatavilla on laajasti sekä R-, että S-selektiivisiä hydroksinitriililyaaseja. (Fesko, K. Gruber-Khadjawi, M. 2013)

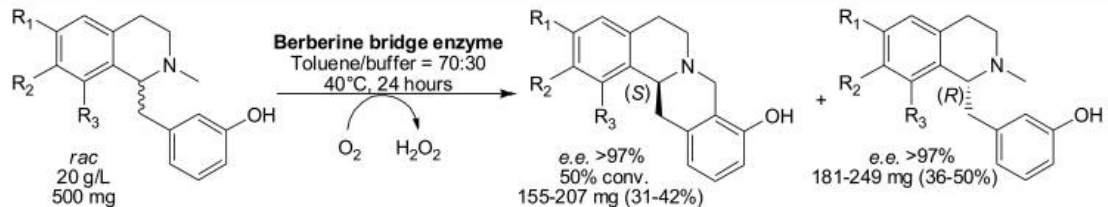
Ruusukasvien hydroksinitriililyaasin luonnollinen substraatti on R-mantelonitriili. R-HNL-entsyymiä käytetään synteessissä katalyyttinä syaanihydriinien synteisiin alifaattisista, tyydyttämättömistä, aromaattisista ja heteroaromaattisista aldehydeistä ja ketoneista. Kirjodurrasta saatu HNL (SbHNL) oli ensimmäinen S-selektiivinen HNL, jota käytettiin orgaanisessa liuotimessa S-syaanihydriinien valmistukseen. Entsyymien luonnollinen substraatti on S-4-hydroksimandelonitriili. Sen isoin haittapuoli on kuitenkin rajallinen substraattitoleranssi (Fesko, K. Gruber-Khadjawi, M. 2013). Hydroksinitriililyaasit ovat nousseet esille potentiaalisina biokatalyytteinä erilaisten kiraalisten yhdisteiden synteisiin, joille löytyy sovelluksia farmaseuttisissa, maatalouskemiallisissa ja kosmeettisissa formulaatioissa. Viime vuosien aikana on tehty paljon kehitysaskelia kemiallisten ja biologisten katalyyttien tutkimiseksi, jotka olisivat hyödyllisiä asymmetrisen syanohydriinin tuotannossa (Brovetto, M ym. 2011)

3.2 Oksidoreduktaasit

Oksidoreduktaasit ovat entsyymejä, joita harvemmin käytetään C-C-sidosten muodostamiseen, lukuun ottamatta lakkaaseja ja peroksidaaseja; kumpikaan näistä kahdesta entsyymistä ei kuitenkaan ohjaa todellista C-C-sidoksen muodostumisreaktiota, vaan ne välittävät vain reaktiivisen lajin muodostumista. Tästä huolimatta, uusia hapetus-pelkistysreaktioon osallistuvia entsyymejä, kuten berberiinin siltaentsyymiä (BBE-like

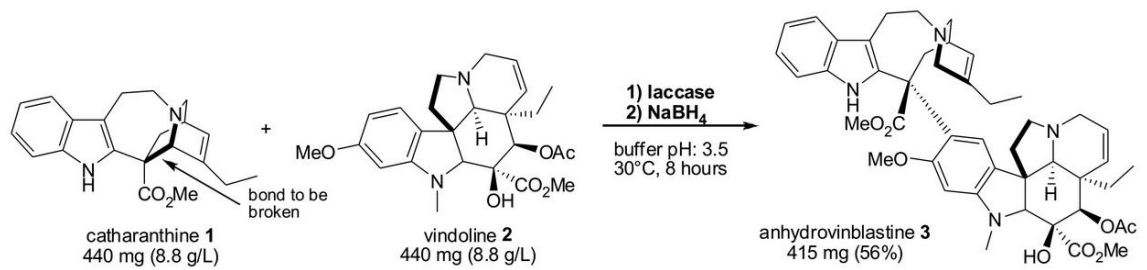
enzymes (BBE) on hyödynnetty synteettisiin tarkoituksiin, ja uusia hapetuspelkistysreaktioita C-C-sidosmuodostuksille on tunnistettu. (Resch, V ym. 2011)

BBE osallistuu bentsofenantridiinialkaloidien biosynteesiin unikkokasveissa. Se katalysoi molekyyllisisäistä oksidatiivista C-C-sidoksen muodostumista fenoliosan ja N-metyyliryhmän välillä käyttäen happea. Perusteellisimmin tutkittu BBE-entsyymi on peräisin *Eschscholzia californica* -kasvista (kaliforniantuliunikko), jota voidaan tuottaa huomattavia määriä *Pichia pastoris* hiivalla. Vuodesta 2011 lähtien BBE:tä on käytetty uusien optisesti puhtaiden (r)-bentsyyli-isokinoliinien ja (s)-berbiinijohdannaisten valmistukseen (Kuva 3). (Resch, V ym. 2011)



Kuva 3. Oksidatiivinen C-C-sidoksen muodostuminen käyttämällä berberiinisiltaentsyymiä (BBE) (Kuva julkaisusta: Resch, V ym. 2011. Copyright 2011 Elsevier Ltd. CC BY-NC-ND 3.0)

Lakkaasit ovat monikuparioksideaseja (multicopper oxidases), jotka katalysoivat erilaisten O-substituoitujen ja N-substituoitujen areenien hapettumista. Niitä käytetään usein C-C-sidosten muodostamiseen polymeroinnin, oligomerisaation tai dimerisaation aikaansaamiseksi. Lakkaasit hapettavat esimerkiksi fenolit vastaaviksi erittäin reaktiivisiksi fenoksiradikaaleiksi, jotka voivat sitten käydä läpi erilaisia jatkoreaktioita, kuten C-C-sidoksen tai kinonin muodostumisen. Lakkaasireaktio yksinään ei ole stereoselektiivinen. Siitä huolimatta mielenkiintoinen lakkaasin välittämä transformaatio on kompleksisen bisindoliialkaloidi anhydrovinblastiinin (3) synteesi indolijohdannaisten katarantiinin (1) ja vindoliinin (2) oksidatiivinen yhdistäminen ja sitä seurannut NaBH₄-pelkistyminen (Kuva 4). (Resch, V ym. 2011)



Kuva 4. Oksidatiivinen C-C-sidoksen muodostuminen lakkaasin avulla (Kuva julkaisusta: Resch, V ym. 2011. Copyright 2011 Elsevier Ltd. CC BY-NC-ND 3.0)

Tuote voitiin eristää 50 %:n saannolla optisesti puhtaassa muodossa. Reaktio edellyttää C-C-sidoksen katkaisua kvaternaarisen ja tertiäärisen hiilikeskuksen välillä katarantiinissä, minkä jälkeen C-C-sidos muodostuu kvaternaariseen hiiliatomiin. Lisäksi tämä on yksi harvinainen esimerkki, jossa hapetettavassa molekyylissä ei ole fenolialkoholia vaan sekundäärinen amiini. NaBH₄:n oletetaan tarvittavan iminiumryhmän pelkistämiseen. Anhydrovinblastiinin synteesi on vähemmän vakiintunut biokatalyyysin sovelluksiin, mutta sen merkitys ja tuntemus on viime aikoina kasvanut. (Resch, V ym. 2011)

4 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Biokatalyyysin käyttö on kasvanut merkittävästi, ja se on nyt vakiintunut tärkeäksi osaksi modernia orgaanista synteesiä. Entsyymien kemo-, regio ja stereoselektiivisyyttä arvostetaan nykyään laajalti, ja biokatalyyttisiä lähestymistapoja arvioidaan säännöllisesti synteettisten reittien suunnittelussa. Erityisesti entsyymaattiset vaihtoehdot kiraalisten alkoholien, happojen ja esterien tuottamiseksi ovat erittäin tutkittuja ja laajasti käytettyjä tekniikoita, mukaan lukien joitain esimerkkejä teollisessa mittakaavassa. Katalyyttisten hyötysuhteiden ja selektiivisyyksien lisäksi biokatalyyysi voi myös olla avainasemassa kemiallisten prosessien kestävyuden lisäämisessä. Biokatalyyysi sisältää monia samoja haasteita orgaanisten kemiallisten prosessien osalta, jotka kaikki ovat kemianteollisuudelle jo tuttuja. Tavoitteena on kehittää lisää käyttökelpoisia biokatalyyttejä, joita voidaan hyödyntää orgaanisessa synteessissä.

C-C-sidosten muodostaminen on tehokas strategia monimutkaisten yhdisteiden rakentamiseen yksinkertaisista synteettisistä molekyyleistä. Vaikka C-C-sidosten luomiseen on kehitetty monia menetelmiä, uusien C-C-sidosten stereoselektiivinen muodostaminen on edelleen haasteellista. Biokatalyyttien selektiivisyydet ovat korkeammat, verrattuna kemiallisiin katalyytteihin, joten biokatalyytit ovat erinomaisia vaihtoehtoja stereoselektiiviseen C-C-sidoksen muodostukseen. C-C-sidosten biokatalyyttisen muodostumisen hyödyntämistä rajoittaa kuitenkin siihen soveltuvien uusien entsyymien kapea valikoima, joka puolestaan hidastaa niiden soveltamista teollisuudessa. Tästä johtuen uusien C-C-sidoksen muodostusreaktioita katalysoivien entsyymien löytäminen on välttämätöntä laajemman biokatalyyysin käytön kannalta.

5 LÄHDELUETTELO

Ballesteros A, Plou F, Iborra ym. 1998. Stability and stabilization of biocatalysts. Elsevier, Amsterdam. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01343-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01343-8)

Bommarius, A. Paye, M. 2013. Stabilizing biocatalysts. Chemical Society Reviews. 42(15), S. 6534–6565. <https://doi.org/10.1039/C3CS60137D>

Brovetto, M. Gaménara, D. Mendéz, P. Seoane, G. 2011. C-C Bond-Forming Lyases in Organic Synthesis. Chemical Reviews, 111(7), S.4346–4406. <https://doi.org/10.1021/cr100299p>

C.H. Wong, G.M. Whitesides. 1994. Tetrahedron Organic Chemistry Series. Chapter 4 – C-C Bond Formation. S.195–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-035941-0.50011-2>

Fesko, K. Gruber-Khadjawi, M. 2013. Biocatalytic Methods for C-C Bond Formation. ChemCatChem, 5(6), S.1248–1272. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200709>

Fischer, E. 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27(3), S.2985–2993. <https://doi.org/10.1002/cber.18940270364>

Gary J. Paul, A. Dalby, M. John, M. 2002. Better Biocatalytic Processes Faster: New Tools for the implementation of Biocatalysis in Organic Synthesis. Organic Process Research & Development, 6(4), S.434–440. <https://doi.org/10.1021/op025542a>

Goswami, A. Stewart, J. 2016. Chapter 1 – Introduction, Typer of Reactions, and Sources of Biocatalysts. Teoksessa: Goswami, A. Stewart, J. 2016. Organic Synthesis Using Biocatalysis. Amsterdam: Elsevier, 2016. S.3–5. <https://www.sciencedirect.com/book/9780124115187/organic-synthesis-using-biocatalysis>

Goswami, A. Stewart, J. 2016. Chapter 1 – Introduction, Typer of Reactions, and Sources of Biocatalysts. Teoksessa: Goswami, A. Stewart, J. 2016. Organic Synthesis Using

Biocatalysis. Amsterdam: Elsevier, 2016. S.34–36.

<https://www.sciencedirect.com/book/9780124115187/organic-synthesis-using-biocatalysis>

Gutarra, M. Miranda, L, Souza, R. 2016. Chapter 4 - Enzyme Immobilization for Organic Synthesis. Teoksessa: Goswami, A. Stewart, J. 2016. Organic Synthesis Using Biocatalysis. Amsterdam: Elsevier, 2016. S.99.

<https://www.sciencedirect.com/book/9780124115187/organic-synthesis-using-biocatalysis>

Harald, G. 2016. Chapter 2 - Practical and Engineering Aspects of Running Enzyme Reactions. Teoksessa: Goswami, A. Stewart, J. 2016. Organic Synthesis Using Biocatalysis. Amsterdam: Elsevier, 2016. S.50–51.

<https://www.sciencedirect.com/book/9780124115187/organic-synthesis-using-biocatalysis>

Huang L, Cheng ZM. 2008. Immobilization of lipase on chemically modified bimodal ceramic foams for olive oil hydrolysis. Chemical Engineering Journal. 144(1), S. 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.05.015>

Hughes, G. Lewis, J. 2018. Introduction: Biocatalysis in Industry. Chemical Reviews. 118 (1), 1–3. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00741>

Illanes A. Altamirano C. 2008. Enzyme Reactors. Teoksessa: Illanes, A. 2008. Enzyme Biocatalysis: Principles and applications. Springer, Dordrecht. S.205, 206–207. <https://www.springer.com/gp/book/9781402083600>

Kumar, R. Suresh, K. Shankar, S. 1996. Kinetics and reaction engineering of penicillin G hydrolysis. J Chem Technol Biotechnol 66, S. 243–250.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199607\)66:3<243::AID-JCTB488>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199607)66:3<243::AID-JCTB488>3.0.CO;2-O)

Marrazzo WN, Merson RL, McCoy BJ. 1975. Enzyme immobilized in a packed-bed reactor: kinetic parameters and mass transfer effects. *Biotechnol Bioeng.* 10, s. 1515–1528. <https://doi.org/10.1002/bit.260171010>

McDonald, A.G., Boyce, S. Tipton, K.F. 2009. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. *Nucleic Acids Res.* 37, D593–D597. <https://www.enzyme-database.org/cinfo.php?c=4&sc=0&ssc=>

Mohamad, R. Marzuki, H. Buang, A. Huyop, F. Wahab, R. 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), S.205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

Resch, V. Schrittwieser, J. Siirola, E, Kroutil, W. 2011. Novel carbon-carbon bond formations for biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), S.793–799. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271363/>

Ribeiro, A. Holliday, G. Furnham, N. Tyzack, J. Ferris, K. Thornton, J. 2018. Mechanism and Catalytic Site Atlas (M-CSA): a database of enzyme reaction mechanisms and active sites, *Nucleic Acids Research*, 46(1), S. 618–623. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1012>

Rodrigues, R. Ortiz, C. Berenguer-Murica, A. Torres, R. Fernandez-Lafuente, R. 2013. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), S. 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>

Schmidt, N. Eger, E. Kroutil, W. 2016. Building Bridges: Biocatalytic C-C-Bond formation toward Multifunctional Products. *ACS Catalysis*, 6(7), S.4286–4311. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b00758>

Sheldon, R. Brady, D. Bode, M. 2020. The Hitchhiker’s guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chemical Science*, 11, S.2587–2605. <https://doi.org/10.1039/C9SC05746C>

Souza, R. Miranda, L. Bornscheuer, U. 2017. A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis. *Chemistry -A European Journal*, 23(50), S.12040–12063. <https://doi.org/10.1002/chem.201702235>

Sudhakaran, V.K., Deshpande, B.S., Shewale, J.G ym. 1992. Production of 6-APA using a recirculated packed bed batch reactor. *Biotechnol Lett* 14, S. 913–918. <https://doi.org/10.1007/BF01020628>

Tiessen, A. Pérez-Rodríguez, P. & Delaye-Arredondo, L.J. 2012. Mathematical modeling and comparison of protein size distribution in different plant, animal, fungal and microbial species reveals a negative correlation between protein size and protein number, thus providing insight into the evolution of proteomes. *BMC Res Notes* 5, 85. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-85>

Vásquez-Bahena J, Montes-Horcasitas MC, Ortega-López J ym. 2004. Multiple steady-states in a continuous stirred tank reactor: an experimental case study for hydrolysis of sucrose by invertase. *Proc Biochem* 39(12), S. 2179–2182. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.007>

Zeng, W. Xu, B. Du, G. Chen, J. Zhou, J. 2019. Integrating enzyme evolution and high-throughput screening for efficient biosynthesis of l-DOPA, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(12), S.1631–1641. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02237-8>