



Wiktoria CHROMY

Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii,
Politechnika Śląska, Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice



Anna WOLNY

Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii,
Politechnika Śląska, Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice,
anna.wolny@polsl.pl

Metody stabilizacji biokatalizatorów w syntezie organicznej

Methods of biocatalysts immobilization in organic synthesis

DOI: 10.15199/4.2024.1.1

Rozwój skutecznych metod stabilizacji enzymów jest kluczowy dla ewolucji i przemysłowego wdrażania procesów biokatalitycznych. Ciekawe podejście łączy proces stabilizacji białek w cieczach jonowych z immobilizacją fazy aktywnej na stałym nośniku. W efekcie otrzymuje się stabilne, aktywne i heterogeniczne biokatalizatory. Procesy heterogeniczne w produkcji niosą ze sobą wiele korzyści, jak np. łatwe oddzielenie biokatalizatora od mieszaniny reakcyjnej oraz możliwość recyklingu. W związku z tym przeprowadzono przegląd związany z wykorzystaniem materiałów typu supported ionic liquid phases jako skutecznych nośników w stabilizacji enzymów i ich zastosowaniu zarówno w procesach biokatalitycznych w systemie z przepływem ciągłym, jak i okresowym.

Słowa klucze: biokataliza, enzymy, immobilizacja, SILP, technologie, zielona chemia

Literature review, with 40 refs., of methods of enzyme immobilization in the reaction medium. Phys. (adsorption, trapping) and chem. (cross-linking, covalent bonding) enzyme immobilization techniques were discussed. The use of supported ionic liquid phase (SLIP) and supported ionic liquid-like phase (SILLP) as effective techniques for enzyme stabilization was presented. Examples of the use of immobilized enzymes on SILP and SILLP carriers in various chem. processes were presented.

Keywords: biocatalysis, enzymes, immobilization, SILP, technologies, green chemistry

Wstęp

Współczesny przemysł chemiczny zmagają się z wieloma problemami, które dotyczą przede wszystkim aspektów środowiskowych oraz ekonomicznych. Rozwój gospodarczy na świecie w stronę zrównoważonych technologii chemicznych zmusza do opracowania metod minimalizujących wpływ procesów produkcyjnych na środowisko naturalne. Ważnym aspektem podczas produkcji chemikaliów jest ograniczenie wytwarzania odpadów oraz zminimalizowanie wykorzystania substancji określanych jako niebezpieczne [1]. Zgodnie z Agendą 2030 na rzecz Zrównoważonego Rozwoju, przemysł chemiczny powinien skupić się nad wdrożeniem surowców odnawialnych, zminimalizowaniem wykorzystania uciążliwych chemikaliów i zagospodarowaniem odpadów końcowych. Działania te mają na celu dążenie do wprowadzenia technologii wywierających minimalny wpływ na środowisko naturalne i prowadzenie gospodarki w obiegu zamkniętym [2].

Nowoczesnym i ekologicznym podejściem do zrealizowania wspomnianych celów jest zastąpienie klasycznych, często niebezpiecznych i drogich katalizatorów. Wiele firm przemysłu chemicznego pracuje nad wyeliminowaniem niebezpiecznych dla środowiska katalizatorów zastępując je alternatywnymi katalizatorami np. enzymami [3]. Doskonałym przykładem opisanego zjawiska jest firma Merc, która początkowo do produkcji sitagliptyny używała katalizatora na bazie rodu, a następnie opracowała katalizator enzymatyczny. Pierwotnie proces produkcji sitagliptyny polegał na uwodornieniu enamin, pod wysokim ciśnieniem za pomocą chiralnego katalizatora na bazie rodu. Stosowanie metalicznego katalizatora powodowało zanieczyszczenie produktu, co wymagało dodatkowych operacji jednostkowych w celu jego oczyszczenia. Zastąpienie toksycznego

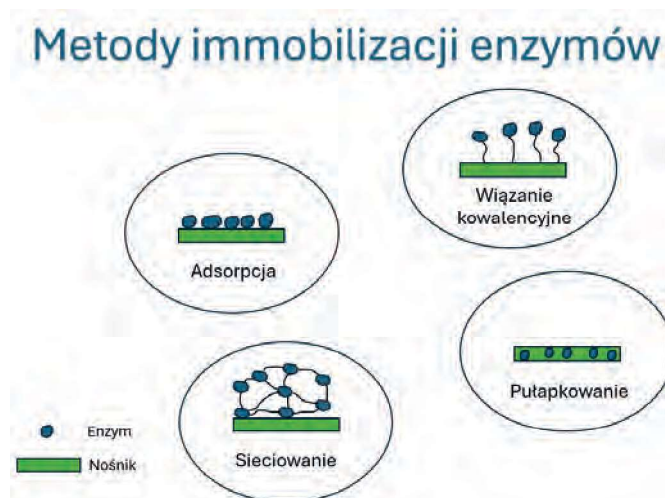
katalizatora, unieruchomioną transaminazą z dodatkiem dimetylo-sulfotlenku (DMSO) pozwoliło na przekształcenie 200 g/l ketonu prositagliptyny w produkt końcowy z wysoką enancjoselektywnością wynoszącą ponad 99,5% [4]. Enzymy to białka mające zdolność do przyspieszania reakcji biochemicznych, znajdując przy tym zastosowanie jako alternatywne biokatalizatory w wielu procesach chemicznych. Biokataliza zachodzi poprzez związanie się substratu z miejscem aktywnym enzymu, które poprzez swój kształt i ładunek pozwala na ogół wiązać się z jednym rodzajem substratu, co wskazuje na ich wysoką specyficzność działania. Dodatkowo enzymy wykazują się wysoką enancjoselektywnością, są biodegradowalne i nieszkodliwe dla środowiska [5]. Jedyną wadą stosowania katalizatorów enzymatycznych w przemyśle chemicznym jest ich niska stabilność i wrażliwość na zmiany temperatury oraz pH. Problem dotyczy także trudności z zwracaniem aktywnego białka do kolejnych cykli reakcyjnych, ponieważ często dochodzi do jego dezaktywacji (m.in. podczas destylacji) lub wiąże się to z koniecznością stosowania kosztownych metod opierających się na ultrafiltracji [6]. Ogromny potencjał katalityczny enzymów skłonił naukowców do wielu badań mających na celu poprawienie ich stabilności w zmiennych warunkach środowiska reakcji. Najpopularniejszym sposobem poprawienia ich stabilności jest immobilizacja, która niesie korzyści dla procesów katalizowanych enzymatycznie w wielu aspektach [6].

Immobilizacja enzymów

Immobilizacja enzymu to proces, polegający na połączeniu enzymu wraz z nośnikiem, tworząc układ enzym – nośnik, mający na celu integrację selektywności i stabilności enzymu wraz z właściwościami

fizycznymi i chemicznymi nośnika. Wiele badań dotyczących immobilizacji enzymów doprowadziło do wykształcenia się pewnych reguł, które należy zachować podczas unieruchamiania enzymów. W celu zapobiegania utraceniu aktywności enzymu podczas immobilizacji, należy pamiętać, aby grupy funkcyjne wchodzące w skład centrum aktywnego białka nie były zaangażowane w proces immobilizacji [3,7].

Techniki immobilizacji enzymów można podzielić na: immobilizację chemiczną (sieciovanie, wiązanie kowalencyjne) oraz immobilizację fizyczną (adsorpcja, pułapkowanie) co przedstawiono graficznie na Rys.1 [3]. Metoda osadzania białka poprzez immobilizację fizyczną opiera się na różnych oddziaływaniach fizycznych generowanych pomiędzy nośnikiem a enzymem, takich jak: oddziaływanie jonowe, wiązania wodorowe oraz siły Wan der Waalsa, natomiast immobilizacja chemiczna polega na wytworzeniu silnych wiązań kowalencyjnych pomiędzy enzymem a nośnikiem [6]. Związanie enzymu z matrycą poprzez wiązanie kowalencyjne zachodzi z udziałem łańcuchów bocznych aminokwasów, takich jak: arginina, histydyna i kwas asparaginowy [8]. Zastosowanie w procesie immobilizowanych enzymów niesie za sobą wiele zalet w stosunku do stosowania ich w formie natywnej. Unieruchomione enzymy wykazują często większą stabilność w procesie, są bardziej odporne na wyższe temperatury oraz zmiany pH, umożliwiają łatwe oddzielenie biokatalizatora z mieszaniny poreakcyjnej poprzez filtrację oraz jego ponowne wykorzystanie w kolejnym cyklu reakcyjnym [3]. Dodatkowo immobilizowane enzymy można zastosować w produkcji w systemie ciągłym [3].



Rys.1. Graficzne przedstawienie metod immobilizacji enzymów

Nośniki stosowane pod immobilizację enzymów dzieli się na matryce organiczne i nieorganiczne. Wśród nośników organicznych znajdują swoje zastosowanie polimery syntetyczne takie jak poli(metakrylan metylu), poli(styren), poli(akrylany), poli(akryloamid) lub biopolimery takie jak chitozan. Natomiast wśród nośników nieorganicznych popularne są takie materiały jak: krzemionka, żel krzemionkowy, tlenek cyrkonu i apatyt [12]. Idealny nośnik pod immobilizację enzymów powinien charakteryzować się obojętnością w stosunku do reagentów, możliwością regeneracji, dużą wytrzymałością mechaniczną i termiczną, powinowactwem do unieruchamianego białka lub możliwością funkcjonalizacji powierzchni [8].

Jednym z najbardziej powszechnie stosowanym rodzajem enzymów w przemyśle chemicznym są lipazy. Lipazy są zdolne do katalizowania, takich reakcji jak: estryfikacja, transestryfikacja, hydro-

liza i utlenianie [13]. Lipazy charakteryzuje specyficzny mechanizm aktywacji w środowisku hydrofobowym. Lipazy mogą przybierać dwie formy o różnej aktywności, pierwsza z nich to forma zamknięta, w której miejsce aktywne jest odizolowane za pomocą ruchomego łańcucha polipeptydowego zwanego lid, zaś druga to forma otwarta w której miejsce aktywne jest narażone na działanie środowiska reakcyjnego. Gdy łańcuch polipeptydowy przemieszcza się, miejsce aktywne zostaje odsłonięte, co skutkuje jego silną adsorpcją na dowolnym hydrofobowym podłożu [9, 13,14]. Z tego względu istotnym aspektem podczas doboru odpowiedniej matrycy pod immobilizację lipaz jest jego hydrofobowy charakter. Nośniki zawierające, grupy hydrofilowe np. grupy hydroksylowe na powierzchni krzemionki, mogą być funkcjonalizowane grupami hydrofobowymi, zmieniając ich charakter [13].

Ciecze jonowe w stabilizacji enzymów

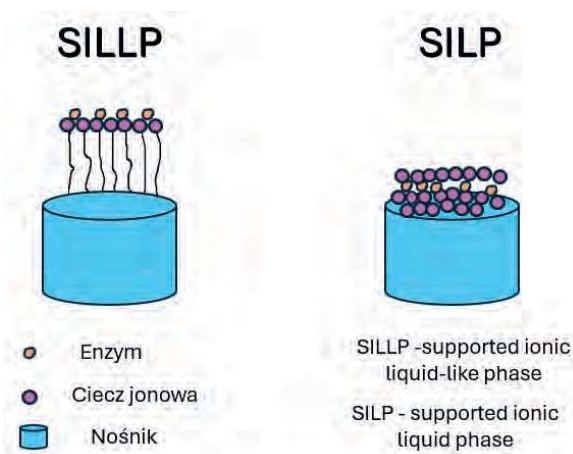
Ciecze jonowe to związki składające się z kationu organicznego i anionu organicznego lub nieorganicznego–Ciecze jonowe znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym, ze względu na możliwość zaprojektowania ich struktury poprzez dobór odpowiedniego kationu i anionu, co pozwala na tworzenie związków o pożądanych właściwościach. Do charakterystycznych cech cieczy jonowych można zaliczyć: brak lotności, dobrą stabilność termiczną, możliwość regulowania hydrofobowości, kwasowości oraz lepkości. Cechy te sprawiają, że ciecze jonowe stanowią doskonały zamiennik dla wielu toksycznych rozpuszczalników organicznych oraz niebezpiecznych katalizatorów, a w wielu procesach chemicznych pełnią rolę zarówno katalizatora jak i rozpuszczalnika [10,15,16,18].

Ciecze jonowe wykorzystywane są również w stabilizacji lipaz. Zastosowanie cieczy jonowych znacząco poprawia aktywność białka poprzez utrzymanie jego aktywnej konformacji i stabilizację trójwymiarowej struktury. W tym celu najczęściej stosowane są ciecze jonowe zawierające kationy alkiloamoniowe i dialkylimidazoliowe oraz aniony dialkilofosforanowy lub N-fenyl-bis(trifluorometanosulfonimid) [18]. Podczas projektowania cieczy jonowych należy zwrócić uwagę na czynniki wpływające na aktywność i stabilność enzymów. Najistotniejszymi właściwościami cieczy jonowych pod kątem stabilności lipaz są hydrofobowość, długość łańcucha alkilowego w kationie, nukleofilowość anionu oraz lepkość [19-22]. Lipazy wykazują większą aktywność w rozpuszczalnikach bardziej hydrofobowych ze względu na to, że nie mają one powinowactwa do wody niezbędnej do utrzymania aktywnej konformacji białka [23-26]. W miarę spadku nukleofilowości anionów stabilność lipaz wzrasta, co związane jest to z oddziaływaniem bardziej nukleofilowych anionów z ładunkami dodatnimi znajdującymi się w strukturze enzymu, i może doprowadzić do zmiany aktywnej konformacji białka oraz jego dezaktywacji [23]. Ważnym czynnikiem wpływającym na stabilizację enzymów jest zdolność do tworzenia wiązań wodorowych. Według doniesień literaturowych aniony cieczy jonowych, które są akceptorami wiązań wodorowych często doprowadzają do denaturacji lipaz [27,28].

Techniki supported ionic liquid phase (SILP) i supported ionic liquid-like phase (SILLP)

Nowoczesnym i stale rozwijającym się podejściem stabilizacji enzymów jest połączenie zalet immobilizacji białka oraz jego stabilizacji w cieczach jonowych. Metoda supported ionic liquid phase

(SILP) polega adsorpcji cieczy jonowej na nośniku a następnie fizycznej immobilizacji enzymu, natomiast technika supported ionic liquid-like phase (SILLP) polega chemicznym związaniu cieczy jonowej z matrycą poprzez wiązania kowalencyjne a następnie fizycznym osadzeniu enzymu na zmodyfikowanym nośniku, co przedstawiono graficznie na Rys.2. Chemiczne związanie cieczy jonowej z matrycą zapobiega ewentualnemu wymywaniu się cieczy z powierzchni nośnika [29].



Rys.2. Graficzne przedstawienie biokatalizatorów typu SILP i SILLP

Główną rolą nośników typu SILP i SILLP jest zapewnienie znacznie wyższej stabilności i aktywności immobilizowanego enzymu w porównaniu z jego formą natywną. Dodatkowo wykorzystanie tych technik pod immobilizację enzymów zapewnia łatwą separację z mieszaniny poreakcyjnej, możliwość ponownego wykorzystania biokatalizatora, a także często osiągnięcie wysokiego stopnia przemiany, wydajności oraz selektywności [11]. Dodatkowo dużym atutem biokatalizatorów SILP i SILLP jest możliwość ich zastosowania w procesach ciągłych, okresowych, oraz w reaktorach ze złożem fluidalnym [10].

Immobilizowane enzymy na nośnikach typu SILP/SILLP w biokatalizie

Zastosowanie biokatalizatorów typu SILP i SILLP w różnych procesach chemicznych stanowi kluczowy aspekt w rozwoju zrównoważonych i zielonych technologii. Niniejszy rozdział ma za zadanie przytoczyć przykłady zastosowania biokatalizatorów SILP i SILLP w różnych procesach chemicznych [10]. W Tabeli 1 przedstawiono przykłady zastosowań immobilizowanych enzymów na nośnikach SILP w biokatalizie, natomiast w Tabeli 2 przedstawiono przykłady zastosowań immobilizowanych enzymów na nośnikach SILLP w biokatalizie.

W 2002 roku po raz pierwszy pojawiły się doniesienia dotyczące wykorzystania biokatalizatorów typu SILP w rozdziale kinetycznym 1-fenyletanolu w nadkrytycznym ditlenku węgla. Najwyższą aktywność katalityczną, selektywność, stabilność (do 16 cykli) oraz enancjoselektywność (99,9%) zaobserwowano dla lipazy B z *Candida antarctica* (CALB) immobilizowanej na adsorbencie Celite modyfikowanym fizycznie bis(trifluorometylosulfonylo)imidkiem 1-etylo-3-metyloimidazoliowym [EMIM][NTf₂]. Modyfikacja nośnika cieczami jonowymi poprawiła aktywność enzymu zarówno w wyso-

Tabela 1. Przykłady zastosowań immobilizowanych enzymów na nośnikach SILP w biokatalizie

CIECZ JONOWA	ENZYM	REAKCJA	Lit.
Kation imidazoliowy Anion [NTf ₂] ^a	CALB ^b	Rozdział kinetyczny 1-fenyletanolu Enancjoselektywność = 99,9% Środowisko bezwodne Rozpuszczalnik - heksan	[30]
Kation imidazoliowy Anion [BF ₄] ^c	CALB	Transestryfikacja maślanu winylu Konwersja = 96%	[31]
Kation imidazoliowy Anion [PF ₆] ^d	CALB	Estryfikacja propionianu (+)-2-izopropyl-5- metylocykloheksanolu Enancjoselektywność = 79%	[32]
Kation imidazoliowy Anion [BF ₄] ^e	CALB	Amidacja (R,S)-1-fenyletyloaminy Enancjoselektywność = 97%	[32]
Kation imidazoliowy Anion [NTf ₂] ^f	LAO ^g	Rozdzielenie racematu ibuprofenu poprzez estryfikację Enancjoselektywność = 95% Konwersja = 35% Temperatura – 20 °C Rozpuszczalnik - izooktan Ibuprofen:1-propanol (1:2, n:n)	[33]

^aanion bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowy, ^blipaza B z *Candida antarctica*, ^canion tetrafluoroboranowy, ^danion heksafluorofosforanowy, ^elipaza z *Aspergillus Oryzae*

kiej temperaturze, jak i w obecności nadkrytycznego ditlenku węgla [30]. W innym doniesieniu literaturowym przetestowano aktywność immobilizowanego CALB na nośniku hybrydowym 2,5-octan celulozy/poliuretan typu SILP w różnych procesach chemicznych. Biokatalizator CALB-SILP wykorzystano m. in. w procesie transestryfikacji maślanu winylu, gdzie wysoką konwersję 1-butanolu (96%) zaobserwowano dla CALB-SILP zmodyfikowanego tetrafluoroboranem oktylometyloimidazoliowym ([OMIM][BF₄]) [31]. W innych badaniach, biokatalizator CALB-SILP modyfikowany heksafluorofosforanem oktylometyloimidazoliowym [OMIM][PF₆] użyty do estryfikacji propionianu (+)-2-izopropyl-5-metylocykloheksanolu zarówno w warunkach okresowych, jak i ciągłych, gdzie enancjoselektywność wyniosła 79%. Następnie zastosowanie biokatalizatora CALB-SILP modyfikowanym tetrafluoroboranem 1-butylo-3-metyloimidazoliowym [BMIM][BF₄] w procesie ciągłym amidacji (R,S)-1-fenyletyloaminy metoksyoctanem metylu spowodowało wzrost enancjoselektywności do 97% w porównaniu z procesem wsadowym. W wyżej wymienionych procesach ciągłych, biokatalizator SILP wykazywał dużą stabilność enzymu przez co najmniej 7 dni [32]. W kolejnych badaniach wykorzystano immobilizowaną lipazę *Burkholderia cepacia* na modyfikowanej cieczy jonowej krzemionce do hydrolizy oliwy z oliwek. Immobilizacja enzymu na nośniku typu SILP spowodowała ogromny wzrost aktywności do 231% w porównaniu z natywną formą białka [18].

W 2007 roku po raz pierwszy w literaturze wspomniano o biokatalizatorach typu SILLP. W większości do immobilizacji enzymów wykorzystywano monolit polistyrenowo-diwinylbenzenowy (PS-DVB) modyfikowany imidazoliowymi cieczami jonowymi [33]. Monolit (PS-DVB) charakteryzują się możliwością modyfikacji powierzchni, co umożliwia zmianę hydrofobowości nośnika umożliwiając wzrost aktywności enzymu [34]. Przykładem wykorzystania tego rodzaju biokatalizatora jest synteza propionianu cytronelilu w nadkrytycznym ditlenku węgla prowadzona w sposób ciągły.

Tabela 2. Przykłady zastosowań immobilizowanych enzymów na nośnikach SILLP w biokatalizie

CIECZ JONOWA	ENZYM	REAKCJA	Lit.
Kation imidazoliowy	CALB ^a	Produkcja propionianu cytronelilu Wydajność = 93% Temperatura - 80 °C Ciśnienie - 10 MPa	[33]
Kation imidazoliowy Anion [NTf ₂] ⁻	CALB	Rozdział kinetyczny 1- fenyloetanolu Konwersja = 50% Enancjoselektywność >99% Temperatura - 50 °C Ciśnienie – 10 MPa	[35]
Kation imidazoliowy [Anion NTf ₂] ⁻	Lipaza PS z <i>Burkholderia cepacia</i>	Kinetyczny rozdział 1-fenyloetanolu Wydajność = 50% Enancjoselektywność > 99% Temperatura - 25-60 °C Rozpuszczalnik - toluen	[37]
Kation imidazoliowy Anion [NTf ₂] ^{-b}	LAO ^c	Rozdzielenie racematu ibuprofenu poprzez estryfikację Enancjoselektywność = 95% Konwersja = 35% Temperatura – 20 °C Rozpuszczalnik - izooktan Ibuprofen:1-propanol (1:2, n:n)	[38]
Kation imidazoliowy Anion [PF ₆] ^{-f}	CALB	Hydrolyza triacetyny Temperatura - 60 °C pH = 7	[39]
Kation imidazoliowy Anion [BF ₄] ^{-d}	PPL ^e	Hydrolyza triacetyny Temperatura - 20-55°C pH = 6-9	[40]

^flipaza B z *Candida antarctica*, ^banion bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowy, ^alipaza z *Aspergillus Oryzae*, ^canion tetrafluoroboranowy, ^eświńska lipaza trzustkowa, ^fanion heksafluorofosforanowy

Na monolicie zmodyfikowanym imidazoliową cieczą jonową immobilizowano CALB, a reakcję prowadzono w temperaturze 80 °C z wydajnością wynoszącą 93% [33]. Zastosowanie opisanego biokatalizatora w połączeniu z zeolitami do rozdzielenia kinetycznego 1-fenyloetanolu w nadkrytycznym ditlenku węgla w systemie ciągłym umożliwiło uzyskanie wysokich wydajności i enancjoselektywności wynoszących odpowiednio 50% oraz >99,9% [35]. W innym doniesieniu literaturowym biokatalizator CALB-SILLP zmodyfikowany cieczą jonową zawierającą anion [NTf₂]⁻ został zastosowany do rozdzielenia kinetycznego 1-fenyloetanolu w systemie okresowym. Prowadzenie procesu w warunkach napromieniowania mikrofalowego spowodowało osiągnięcie wyższych wartości wydajności (50%), enancjoselektywności (>99,9%) oraz stabilności (do 12 cykli), w porównaniu z tradycyjnym ogrzewaniem [36]. Kolejnym biokatalizatorem wykorzystywanym do rozdzielenia kinetycznego 1-fenyloetanolu jest SILLP składający się z węgla aktywnego jako nośnika zmodyfikowanego bis(trifluorometylosulfonylo)imidkiem 1-etylo-3-metyloimidazoliowym [EMIM][NTf₂]⁻, oraz lipazy Ps z *Burkholderia cepacia* unieruchomionej adsorpcyjnie na nośniku. Po 6 godzinach trwania procesu konwersja wyniosła 50%, a enancjoselektywność >99% [37].

Biokatalizatory typu SILLP znajdują także swoje zastosowanie w syntezie farmaceutyków, a przykładem tego jest enancjomeryczny rozdział kinetyczny racematu ibuprofenu poprzez estryfikację. Rozdzielenie enancjomerów jest niezwykle istotne, ponieważ zazwyczaj gdy jeden z enancjomerów wykazuje właściwości leczni-

cze, drugi może wykazywać działanie niepożądane. W przypadku enancjomerów ibuprofenu, enancjomer (S)-(+)-ibuprofenu ma pożądane właściwości farmakologiczne. Do rozdzielenia racematu ibuprofenu użyto nośnika na bazie krzemionki i tlenku magnezu zmodyfikowanego cieczą jonową o anionie bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowym, na którym immobilizowano lipazę *Aspergillus oryzae* (LAO). Po 7 dniach trwania procesu uzyskano konwersję wynoszącą 35% i enancjoselektywność wynoszącą 99,5%. Immobilizowany enzym na nośniku typu SILLP wykazał dużo większą aktywność w badanym procesie niż białko w formie natywnej [38]. Kolejnym przykładem zastosowania biokatalizatora CALB-SILLP zmodyfikowanego cieczą jonową zawierającą anion [NTf₂]⁻ jest synteza oleinianu metylu. Immobilizowany enzym pozwolił na uzyskanie 95% wydajności i był stabilny aż do 45 cykli [39]. W innych doniesieniach literaturowych aktywność biokatalizatora typu SILLP została przetestowana w hydrolyzie triacetyny. Pierwszym sposobem przeprowadzenia reakcji jest unieruchomienie CALB na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych, które zmodyfikowano dialkiloimidazoliowymi cieczami jonowymi [39], natomiast drugim podejściem jest unieruchomienie świńskiej lipazy trzustkowej (PPL) na hybrydowym nośniku chitozan/mezoporowata krzemionka zmodyfikowanym imidazoliowymi cieczami jonowymi [40]. W obu przypadkach immobilizowany enzym wykazał większą aktywność katalityczną niż jego forma natywna [39,40]. Kolejnym interesującym przykładem zastosowania biokatalizatora typu SILLP jest proces utlenienia Bayera – Villigera, co umożliwia wyeliminowanie użycia toksycznych i niebezpiecznych nadtlenukwasów w procesie. W tej reakcji jako nośnik zastosowano wielościenne nanorurki węglowe zmodyfikowane imidazoliową cieczą jonową, na których immobilizowano CALB. Pomimo trudnych warunków wynikających z użycia stężonego nadtlenu wodoru otrzymano wysoką konwersję 2-adamantanonu wynoszącą 92% [10].

Podsumowanie

Podsumowując, biokatalizatory na bazie nośników modyfikowane cieczami jonowymi stanowią istotny fragment w literaturze dotyczącej katalizy enzymatycznej. Środowisko enzymu ma kluczowy wpływ na stabilizację konformacji białka, a ciecze jonowe odgrywają w tym aspekcie istotną rolę. Ciecze jonowe chronią enzym przed degradacją struktury i dezaktywacją w warunkach nadkrytycznego CO₂, wysokich temperatur oraz w środowiskach kwaśnych lub polarnych. Dzięki zintegrowaniu cieczy jonowej, nośnika i aktywnej konformacji lipazy, właściwości katalityczne, takie jak aktywność, stabilność i możliwość wielokrotnego wykorzystania związanych enzymów, mogą być znacząco poprawione. Istotnymi zagadnieniami w projektowaniu biokatalizatora typu SILP i SILLP jest dobór matrycy o odpowiedniej morfologii oraz cieczy jonowej o pożądanych właściwościach umożliwiających aktywację białka. Na podstawie przedstawionych danych literaturowych można stwierdzić, że aktywność enzymów immobilizowanych na nośnikach SILP/SILLP jest większa w porównaniu z białkiem natywnym. Należy podkreślić, że stosowanie nośników typu SILP/SILLP pod immobilizację enzymów poprawia wydajność procesu, zapewnia łatwe oddzielenie i odzyskiwanie biokatalizatora oraz przedłuża żywotność białka. Wymienione korzyści płynące z zastosowania biokatalizatorów typu SILP/SILLP w procesach chemicznych wpisują się w ideę zrównoważonego rozwoju przemysłu oraz rozwoju zielonych technolo-

gii. Pomimo obecności kilku raportów na temat wykorzystania biokatalizatorów SILP/SILLP w systemie ciągłym i procesach enancjoselektywnych, ilość takich badań pozostaje ograniczona i powinna zostać rozszerzona.

Wiktorija CHROMY, obecnie studentka trzeciego roku studiów na kierunku Technologia Chemiczna, o specjalizacji Technologia Organiczna, na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. Jej głównym obszarem zainteresowań jest biokataliza. Aktywnie uczestniczy w życiu akademickim jako członek koła naukowego.

Mgr inż. Anna WOLNY (ORCID 0000-0003-1843-8791) od 2020 roku doktorantka w dyscyplinie inżynieria chemiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej. W ramach pracy doktorskiej prowadzi badania nad projektowaniem aktywnych, stabilnych i heterogenicznych układów dla poprawy jakości, ekologiczności i ekonomiczności procesów chemicznych. Laureatka konkursów, takich jak PRELUDIUM22 organizowanego przez NCN oraz „Drive Innovations – Rozwiązania dla Zrównoważonego Rozwoju” organizowanego przez firmę BASF, a także współautorka licznych publikacji naukowych, zgłoszeń patentowych i uczestniczka wielu konferencji naukowych o wymiarze krajowym i międzynarodowym.

BIBLIOGRAFIA:

- R.A Sheldon: Green chemistry and resource efficiency: towards a green economy. *Green Chemistry* 2016, 18, 3180-3183
- P. Anastas, M. Nolasco, F. Kerton, M. Kirchhoff, P. Licence, T. Pradeep, B. Subramaniam, A. Moores: The Power of the United Nations Sustainable Development Goals in Sustainable Chemistry and Engineering Research. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2021, 9, 24, 8015-8017
- A. Basso, S. Serban: Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis* 2019, 479, 110607
- C.K. Savile, J.M. Janey, E.C. Mundorff, J.C. Moore, S. Tam, W.R. Jarvis, J.C. Colbeck, A. Krebber, F.J. Fleitz, J. Brands, P.N. Devine, G.W. Huisman, G.J. Hughes: Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science* 2010, 329, pp. 305-309
- P.K. Robinson: Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015, 59, 1-41
- T. Jesionowski, J. Zdzarta, B. Krajewska: Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* 2014, 20, 801-821
- M. R.A. Khana: Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bull Natl Res Cent* 2021, 45, 207
- S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram: Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech.*, 2013; 3(1), 1-9
- C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisán, R. Fernandez-Lafuente: Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 2007, 40, 1451-1463
- A. Wolny, A. Chrobok: Silica-Based Supported Ionic Liquid-like Phases as Heterogeneous Catalysts. *Molecules* 2022, 27(18), 5900
- A. Wolny, A. Chrobok: Ionic Liquids for Development of Heterogeneous Catalysts Based on Nanomaterials for Biocatalysis. *Nanomaterials* 2021, 11(8), 2030
- E. P. Cipolatti, A. Valério, R. O. Henriques, D. E. Moritz, J. L. Ninow, D. M. G. Freire, E. A. Manoel, R. Fernandez-Lafuente, D. de Oliveira: Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends. *RSC Adv.*, 2016,6, 104675-104692
- R. Fernandez-Lafuente, P. Armisén, P. Sabuquillo, G. Fernández-Lorente, J.M. Guisán: Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids* 1998, 93, 185-197
- S. Arana-Peña, N.S. Rios, D. Carballares, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. *Catal. Today* 2021 362 130-140
- R.L. Vekariya: A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. *J. Mol. Liq.* 2017, 227, 44-60
- A.S. Amarasekara: Acidic Ionic Liquids. *Chem. Rev.* 2016, 116, 6133-6183
- A.J. Greer, J. Jacquemin, C. Hardacre: Industrial applications of ionic liquids. *Molecules* 2020, 25, 5207
- A. Wolny, A. Chrobok: Supported Ionic Liquid Phase for Biocatalysis: The Current Applications, Synthesis and Prospects. *Current Organic Chemistry*, 2023, 27, 1119-1122
- P. Domínguez de María: Ionic Liquids in Biotransformations and Organocatalysis: Solvents and Beyond John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2012; pp. 1-435
- E. Garcia-Verdugo, P. Lozano, S.V. Luis: Biocatalytic Processes Based on Supported Ionic Liquids. In *Supported Ionic Liquids: Fundamental and Applications*, 1st ed.; Fehrmann, R., Rissager, A., Haumann, M., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Berlin, Germany, 2014; pp. 351-368
- T. Itoh: Ionic liquids as tool to improve enzymatic organic synthesis. *Chem. Rev.* 2017, 117, 10567-10607
- H. Zhao: Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2010, 85, 891-907
- A.P. De Los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F.A. Martínez, M. Rubio, G. Villora: The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of *Candida antarctica* lipase B in transesterification reactions. *Biocatal. Biotransform.* 2007, 25, 151-156
- S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe: Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: A comparative study. *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 2979-2982
- K. Nakashima, J. Okada, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto: Activation of lipase in ionic liquids by modification with comb-shaped poly(ethylene glycol). *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2006, 7, 692-698
- W.-G. Zhang, D.Z. Wei, X.-P. Yang, Q.-X. Song: Penicillin acylase catalysis in the presence of ionic liquids. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2006, 29, 379-383
- M.B. Turner, S.K. Spear, J.G. Huddleston, J.D. Holbrey, R.D. Rogers: Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.* 2003, 5, 443
- S.H. Lee, S.H. Ha, S.B. Lee, Y.-M. Koo: Adverse effect of chloride impurities on lipase-catalyzed transesterifications in ionic liquids. *Biotechnol. Lett.* 2006, 28, 1335-1339
- X. Qiu, S. Wang, S. Miao, H. Suo, H. Xu, Y. Hu: Co-immobilization of Laccase and ABTS onto amino-functionalized ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles for pollutants removal. *J. Hazard. Mater.* 2020, 123353
- P. Lozano, T. Diego, D. de Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra: Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.* 2002, 7, 692-693
- B. Sandig, L. Michalek, S. Vlahovic, M. Antonovici, B. Hauer, M.R. Buchmeiser: A Monolithic hybrid cellulose-2.5-Acetate/polymer bioreactor for biocatalysis under continuous liquid-liquid conditions using a supported ionic liquid phase. *Chem. Eur. J.* 2015, 21, 15835-15842
- B. Sandig, M.R. Buchmeiser: Highly productive and enantioselective enzyme catalysis under continuous supported liquid-liquid conditions using a hybrid monolithic bioreactor. *ChemSusChem* 2016, 9, 2917-2921
- P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, R. Piamtongkam, N. Karbass, T. De Diego, M.I. Burguete, S.V. Luis, J.L. Iborra: Bioreactors based on monolith-supported ionic liquid phase for enzyme catalysis in supercritical carbon dioxide. *Adv. Synth. Catal.* 2007, 349, 1077-1084
- R.C. Rodrigues, K. Hernandez, O. Barbosa, N. Rueda, C. Garcia-Galan, J.C.S. dos Santos, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente: Immobilization of proteins in poly-styrene-divinylbenzene matrices: Functional properties and applications. *Curr. Org. Chem.* 2015, 19, 1707-1718
- P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, N. Karbass, K. Montague, T. De Diego, M.I. Burguete, S.V. Luis: Supported ionic liquid-like phases (SILLPs) for enzymatic processes: Continuous KR and DKR in SILLP-scCO₂ systems. *Green Chem.* 2010, 12, 1803
- D.F. Izquierdo, J.M. Bernal, M.I. Burguete, E. Garcia-Verdugo, P. Lozano, S.V. Luis: An efficient microwave-assisted enzymatic resolution of alcohols using a lipase immobilised on supported ionic liquid-like phases (SILLPs). *RSC Adv.* 2013, 3, 13123
- P. Hara, J.-P. Mikkola, D.Y. Murzin, L.T. Kanerva: Supported ionic liquids in Burkholderia cepacia lipase-catalyzed asymmetric acylation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2010, 67, 129-134.
- A. Wolny, A. Siewniak, J. Zdzarta, F. Ciesielczyk, P. Latos S. Jurczyk, L.D. Nghiem, T. Jesionowski, A. Chrobok: Supported ionic liquid phase facilitated catalysis with lipase from *Aspergillus oryzae* for enhance enantiomeric resolution of racemic ibuprofen. *Environmental Technology & Innovation* 2022, 28, 102936
- X. Wan, S. Tang, X. Xiang, H. Huang, Y. Hu: Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on functionalized ionic liquid modified MWNTs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017, 183, 807-819
- X. Xiang, S. Ding, H. Suo, C. Xu, Z. Gao, Y. Hu: Fabrication of chitosan-mesoporous silica SBA-15 nanocomposites via functional ionic liquid as the bridging agent for PPL immobilization. *Carbohydr. Polym.* 2018, 182, 245-253