



**Politechnika
Śląska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

„Monolity krzemionkowe jako nośniki enzymów wykorzystywanych
w wybranych procesach biotransformacji”

mgr inż. Daria ŚWIĘTOCHOWSKA

PROMOTORZY

dr hab. inż. Katarzyna Szymańska, prof. Pol. Śl.

dr hab. inż. Danuta Gillner, prof. Pol. Śl.

KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ I BIOTECHNOLOGII

Wydział Chemiczny

GLIWICE 2022

*Pragnę z całego serca podziękować moim Promotorkom
Pani dr hab. inż. Katarzynie Szymańskiej, Prof. Pol. Śl.
oraz Pani dr hab. inż. Danucie Gillner, Prof. Pol. Śl.
za poświęcony mi czas, niezliczone dyskusje i rozmowy,
rady oraz wskazówki, będące nieocenionym wsparciem
w trakcie realizacji badań i pisanie niniejszej pracy.*

*Niniejszą pracę dedykuję moim Rodzicom,
bez których pomocy spełnianie marzeń
nie byłoby możliwe.*

*Dziękuję również mojemu Mężowi
za motywację i wiarę we mnie w chwilach zwątpienia.*

Wykaz skrótów i nazw zwyczajowych

APTMS	(3-aminopropylo)trimetoksylan
CTAB	Bromek heksadecylotrimetyloamoniowy
DAAO _{Rg}	Oksydaza D-aminokwasowa wyizolowana z <i>Rhodotorula gracilis</i> (EC 1.4.3.3)
D-ser	D-seryna
FTIR	Spektroskopia fourierowska w podczerwieni
G1P	α -D-glukoza-1-fosforan
GalU	Pirofosforylaza UDP-glukozy (EC 2.7.7.9)
GLA	Aldehyd glutarowy
GOA	Aldehyd glikolowy
GPTMS	(3-glicydylopropylo)trimetoksylan
HEPES	Kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-yl] etanosulfonowy
HPA	Kwas hydroksypirogronowy
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
KAT	Katalaza (EC 1.11.1.6)
L-ery	L-erytruloza
Lipaza CalB	Lipaza B z <i>Candida antarctica</i> (EC 3.1.1.3)
MCF	Mezoporowate pianki komórkowe (<i>ang. Mesostructure cellular foams</i>)
MCF-A	Mezoporowate pianki komórkowe modyfikowane grupami aminowymi
MCF-E	Mezoporowate pianki komórkowe modyfikowane grupami epoksydowymi
MH	Monolit
MH-A	Monolit modyfikowany grupami aminowymi
MH-O	Monolit modyfikowany grupami oktylowymi
MH-OA	Monolit modyfikowany grupami aminowymi i oktylowymi
N435	Novozym 435

OtsA	Syntaza trehalozo-6-fosforanu (EC 2.4.1.15) (<i>ang. trehalose phosphate synthase</i>)
OtsB	Fosfataza trehalozo-6-fosforanu (EC 3.1.3.12) (<i>ang. trehalose phosphate phosphatase</i>)
PEG	Poli(glikol etylenowy)
Pluronic P123	Kopolimer złożony z poli(glikolu etylenowego), PEG i poli(glikolu propylenowego), PPO, zawiera 3 bloki: PEG-PPO-PEG
<i>p</i> -NPA	Octan <i>p</i> -nitrofenylu
PPi	Pirofosforan
RBR	Reaktor ze złożem obrotowym (<i>ang. rotating bed reactor</i>)
RID	Różnicowy detektor refraktometryczny
SBR	Reaktor ze złożem stacjonarnym (<i>ang. stationary bed reactor</i>)
SEM	Skaningowy mikroskop elektronowy
SuSy	Syntaza sacharozy (EC 2.4.1.13)
<i>Ta</i> GalU	Pirofosforylaza UDP-glukozy wyizolowana z <i>Thermocrispum agreste</i> (EC 2.7.7.9)
TEM	Transmisyjny mikroskop elektronowy
TEOS	Tetraetoksysilan
TFA	Kwas trifluorooctowy
ThDP	Pirofosforan tiaminy
TK _{gst}	Transketolaza wyizolowana z <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (EC 2.2.1.1)
TMB	1,3,5-trimetylobenzen
TreT	Transferaza trehalozy
Tris	Tris(hydroksymetylo)aminometan
UDP-glukoza	Glukozodifosforan urydyny, urydyno-5'-difosforano-glukoza
UTP	5'-urydynotrifosforan

Spis treści

Streszczenie	1
Wprowadzenie.....	3
Cel pracy.....	5
PRZEGLĄD LITERATURY	6
1. Immobilizacja enzymów	6
2. Metody immobilizacji enzymów	7
2.1. Adsorpcja fizyczna	8
2.2. Wiązanie kowalencyjne	8
3. Nośniki enzymów	9
3.1. Nośniki krzemionkowe.....	9
3.1.1. Mezoporowate pianki komórkowe.....	10
3.1.2. Monolity krzemionkowe	10
4. Zastosowanie immobilizowanych enzymów w procesach biotransformacji.....	16
4.1. Lipazy	16
4.1.1. Immobilizacja lipaz.....	17
4.2. Nowe podejście do biotransformacji – kaskady enzymatyczne.....	21
4.2.1. Otrzymywanie UDP-glukozy i trehalozy na drodze biotransformacji	22
4.2.2. Otrzymywanie L-erytrozy na drodze biotransformacji	30
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	34
5. Materiały i metody.....	34
5.1. Stosowane odczynniki.....	34
5.2. Stosowany sprzęt.....	35
5.3. Synteza monolitów krzemionkowych (MH).....	35
5.4. Synteza mezoporowatych pianek komórkowych (MCF).....	36
5.5. Funkcjonalizacja nośników krzemionkowych.....	36
5.6. Charakterystyka nośników	37
5.7. Immobilizacja enzymów na sfunkcjonalizowanych nośnikach krzemionkowych	37
5.7.1. Immobilizacja lipazy na nośnikach sfunkcjonalizowanych grupami oktylowymi (MH-O)	38
5.7.2. Immobilizacja lipazy na nośnikach sfunkcjonalizowanych grupami oktylowymi i aminowymi (MH-OA) lub aminowymi (MH-A).....	38
5.7.3. Dobór pH immobilizacji <i>TaGalU</i>	38
5.7.4. Immobilizacja <i>TaGalU</i> wewnątrz mikroreaktora (MH-A).....	39
5.7.5. Immobilizacja $DAAO_{Rg}$, KAT i/lub TK_{gst} na MH-A.....	39
5.8. Oznaczanie ilości zaimmobilizowanego białka.....	40

5.9.	Określenie aktywności i stabilności immobilizowanej lipazy CalB w reakcjach modelowych	41
5.9.1.	Hydroliza octanu <i>p</i> -nitrofenylu.....	41
5.9.2.	Estryfikacja kwasu lewulinowego alkoholem <i>n</i> -butylowym.....	41
5.9.3.	Stabilność immobilizowanej lipazy CalB w różnych rozpuszczalnikach organicznych	42
5.10.	Aktywność enzymatyczna immobilizowanej <i>TaGalU</i>	42
5.11.	Otrzymywanie trehalozy w systemie ciągłym, wobec <i>TaGalU</i> i TreT jako katalizatorów.....	43
5.12.	Aktywność enzymatyczna immobilizowanej DAAO _{Rg}	44
5.13.	Aktywność enzymatyczna immobilizowanej TK _{gst}	44
5.14.	Synteza L-erytrulozy katalizowana przez immobilizowane DAAO _{Rg} , katalazę oraz TK _{gst} 44	
5.15.	Statystyka	45
	OMÓWIENIE WYNIKÓW	46
6.	Przygotowanie nośników krzemionkowych.....	46
6.1.	Monolity krzemionkowe	46
6.2.	Mezoporowate pianki komórkowe	50
7.	Immobilizacja enzymów	54
7.1.	Immobilizacja lipazy CalB i jej zastosowanie	54
7.1.1.	Hydrofobowość nośnika i jej wpływ na immobilizację lipazy CalB	55
7.1.2.	Aktywność i stabilność immobilizowanej lipazy	57
7.1.3.	Stabilność lipaz immobilizowanych na modyfikowanych krzemionkach w różnych rozpuszczalnikach organicznych.....	62
7.2.	Immobilizacja pirofosforylasy UDP-glukozy i jej zastosowanie do produkcji trehalozy 67	
7.2.1.	Dobór warunków immobilizacji pirofosforylasy UDP-glukozy.....	68
7.2.2.	Profil temperaturowy i pH immobilizowanej <i>TaGalU</i>	72
7.2.3.	Długoterminowa stabilność temperaturowa immobilizowanej <i>TaGalU</i>	74
7.2.4.	Immobilizacja <i>TaGalU</i> wewnątrz mikroreaktora i jej zastosowanie w systemie kaskadowym do syntezy trehalozy w układzie ciągłym.....	75
7.3.	Immobilizacja oksydazy D-aminokwasowej, katalazy oraz transketolazy i ich zastosowanie do produkcji L-erytrulozy.....	82
7.3.1.	Profil temperaturowy immobilizowanych: DAAO _{Rg} i TK _{gst}	84
7.3.2.	Długoterminowa stabilność temperaturowa DAAO _{Rg} i TK _{gst}	85
7.3.3.	Immobilizacja enzymów do kaskady wieloenzymatycznej i ich zastosowanie do produkcji L-erytrulozy.....	88

7.3.4. Stabilność immobilizowanych enzymów w wieloenzymatycznej kaskadzie (DAAO _{Rg} , KAT i TK _{gst})	91
Podsumowanie i wnioski	94
Dorobek naukowy	98
Literatura	102

Streszczenie

Głównym celem rozprawy doktorskiej było wykorzystanie modyfikowanych monolitów krzemionkowych, o hierarchicznej strukturze porów, jako nośników różnych enzymów oraz ocena ich użyteczności w wybranych procesach biotransformacji, w tym w procesach wieloenzymatycznych/kaskadowych.

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono badania dotyczące opracowania i zastosowania następujących immobilizowanych biokatalizatorów: kowalencyjnie i/lub adsorpcyjnie unieruchomionej lipazy CalB z *Candida antarctica*, kowalencyjnie unieruchomionej pirofosforylasy UDP-glukozy wyizolowanej z *Thermocristum agreste* (*TaGalU*) oraz kowalencyjnie immobilizowanych/współimmobilizowanych enzymów wchodzących w skład kaskady enzymatycznej: oksydazy D-aminokwasowej wyizolowanej z *Rhodotorula gracilis* (*DAAO_{Rg}*), handlowo dostępnej katalazy oraz transketolazy wyizolowanej z *Geobacillus stearothermophilus* (*TK_{gst}*). Aktywność i stabilność tak otrzymanych biokatalizatorów określono następnie w wybranych reakcjach: hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu oraz estryfikacji kwasu lewulinowego (w przypadku lipazy CalB), syntezy UDP-glukozy (*TaGalU*) i otrzymywania trehalozy (*TaGalU* jako element składowy kaskady), a także w syntezie L-erytrulozy (kaskada enzymatyczna: *DAAO_{Rg}*, katalaza, *TK_{gst}*).

W pracy wykazano, że wybór metody immobilizacji lipazy powinien być uzależniony od warunków procesu, w jakich enzym będzie stosowany. Zastosowanie obu metod immobilizacji (kowalencyjnej i adsorpcyjnej) umożliwiło uzyskanie biokatalizatorów o wysokiej aktywności. Zaś stabilność uzależniona była od typu procesów, w których biokatalizatory były stosowane. Lipaza immobilizowana kowalencyjnie wykazywała stabilność zarówno w procesie hydrolizy jak i estryfikacji, a osadzona adsorpcyjnie była stabilna tylko w procesie estryfikacji. Wykazano również, że kowalencyjna immobilizacja pirofosforylasy UDP-glukozy przyczyniła się do poszerzenia optimum pH i temperatury oraz poprawy stabilności termicznej enzymu (w porównaniu do natywnej formy enzymu). Ponadto enzym ten, unieruchomiony wewnątrz mikroreaktora wykazywał wysoką stabilność procesową, dzięki czemu mógł być użyty jako element kaskady enzymatycznej. W pracy zademonstrowano to na przykładzie kaskady z transferazą trehalozy, do syntezy trehalozy. Innym przykładem procesu kaskadowego było enzymatyczne otrzymywanie L-erytrulozy, gdzie wykorzystywano trzy immobilizowane enzymy. Dowiedziono, że kowalencyjna immobilizacja oksydazy D-aminokwasowej, katalazy oraz transketolazy przyczyniła się do znacznej poprawy stabilności termicznej tych enzymów (w porównaniu do natywnej formy), a najlepszą wydajność L-erytrulozy otrzymano w przypadku współimmobilizacji *DAAO_{Rg}* i katalazy oraz osobnej immobilizacji *TK_{gst}*.

Reasumując, wykazano, że monolity krzemionkowe mogą być wykorzystywane jako efektywne nośniki katalizatorów (enzymów), zarówno w procesach okresowych jak i procesach ciągłych.

Warto również podkreślić, że przeprowadzone badania, w szczególności obejmujące procesy kaskadowe, mogą być punktem wyjścia do zastosowań prezentowanych układów enzymatycznych w produkcji innych cennych związków.

Wprowadzenie

Biotransformacje cieszą się wciąż rosnącym zainteresowaniem, a co ważniejsze wpisują się w trend tzw. „zielonej chemii”. Zastosowanie biokatalizatorów umożliwia otrzymanie wielu związków chemicznych z dobrą wydajnością w łagodnych warunkach (pH, temperatura, ciśnienie atmosferyczne), najczęściej przy zastosowaniu wodnych rozpuszczalników. Ponadto produkty uboczne oraz odpady z procesów biotransformacji są zazwyczaj biodegradowalne. Enzymy odznaczają się wysoką specyficznością i selektywnością, co sprawia, że znajdują coraz więcej zastosowań. Niestety, zastosowanie enzymów w formie natywnej wiąże się z wysokimi kosztami. Ze względów ekonomicznych dąży się do ich obniżenia, poszukując sposobów umożliwiających ich wielokrotne zastosowanie. Atrakcyjnym rozwiązaniem wydaje się być immobilizacja enzymów na nośnikach krzemionkowych, szczególnie w formie monolitów o hierarchicznej strukturze porów. Nośniki te cieszą się dużym zainteresowaniem, ze względu na biokompatybilność, nietoksyczność, kontrolowaną morfologię, porowatość, dużą wytrzymałość termiczną, mechaniczną i chemiczną, czy łatwość wprowadzania na ich powierzchnię różnych grup funkcyjnych. Monolity, w zależności od potrzeb aplikacyjnych, mogą mieć różne kształty/formy: mogą stanowić wypełnienie do reaktorów okresowych lub rdzeń do mikroreaktorów stosowanych w procesach ciągłych.

Śród wielu stosowanych w biotransformacjach enzymów na szczególną uwagę zasługują lipazy. Chociaż szerokie możliwości aplikacyjne tych enzymów sprawiają, że temat ich immobilizacji był już wielokrotnie poruszany, wciąż istnieje ogromne zapotrzebowanie na opracowanie taniej, uniwersalnej i efektywnej metody ich immobilizacji oraz znalezienie nowych sfunkcjonalizowanych nośników, pozwalających na otrzymanie aktywnych i stabilnych heterogenicznych biokatalizatorów. W przypadku lipaz najbardziej popularną metodą jest immobilizacja poprzez fizyczną adsorpcję na hydrofobowych nośnikach, umożliwiającą wiązanie enzymu w konformacji otwartej. Jednakże, w przypadku tej metody nie można wykluczyć wymywania enzymu z nośnika. Stabilne osadzenie biokatalizatora na podłożu wymaga utworzenia wiązania kowalencyjnego. W związku z tym coraz częściej proponuje się nośniki bifunkcjonalizowane, pozwalając na połączenie tych dwóch metod immobilizacji.

W ostatnich latach ogromne zainteresowanie w procesach biotransformacji budzą również kaskady wieloenzymatyczne. Stanowią one obiecujące narzędzia do produkcji złożonych związków o dużej wartości dodanej. Zastosowanie reakcji kaskadowych, w odróżnieniu do klasycznej, wieloetapowej syntezy, niesie duże korzyści środowiskowe i ekonomiczne. Eliminuje konieczność izolacji i oczyszczania produktów pośrednich po każdym etapie,

co zmniejsza ilość stosowanych odczynników i rozpuszczalników, a tym samym ogranicza ilość powstających odpadów. Niejednokrotnie skraca się znacząco czas procesu oraz otrzymuje się lepsze wydajności produktów. Jednakże immobilizacja enzymów wchodzących w skład kaskad wieloenzymatycznych stanowi duże wyzwanie, ze względu na różnice we właściwościach i aktywnościach poszczególnych enzymów. W związku z tym, badania nad otrzymywaniem kaskad wieloenzymatycznych nie są zbyt często prezentowane w literaturze, a stanowią niezwykle ciekawy temat badawczy.

Cel pracy

Celem pracy była synteza i modyfikacje monolitów krzemionkowych, o hierarchicznej strukturze porów, jako nośników różnych enzymów oraz ocena aktywności i stabilności tak otrzymanych biokatalizatorów w wybranych procesach biotransformacji, w tym w procesach wieloenzymatycznych/kaskadowych.

Zakres pracy obejmował realizację czterech głównych zadań:

- (1) syntezę monolitów krzemionkowych w postaci walców i pałek, z zastosowaniem metody zol-żel, w połączeniu z procesem separacji fazowej,
- (2) modyfikację powierzchni nośników różnymi grupami funkcyjnymi (grupy oktylowe, aminowe, epoksydowe),
- (3) immobilizację enzymów oraz ocenę aktywności i stabilności otrzymanych biokatalizatorów w wybranych procesach biotransformacji, w tym:

(a) kowalencyjną i/lub adsorpcyjną immobilizację handlowo dostępnej lipazy B z *Candida antarctica* (CalB) i testowanie jej w reakcjach hydrolizy i estryfikacji, w środowisku wodnym i bezwodnym (rozpuszczalników organicznych). Badania prowadzono w reaktorze z wirującym złożem SpinChem®.

(b) kowalencyjną immobilizację pirofosforylasy UDP-glukozy z *Thermocrisium agreste*, we wnętrzu monolitycznego, przepływowego mikroreaktora krzemionkowego. Badania te były częścią projektu ERA-NET IB, którego głównym założeniem było opracowanie układu do syntezy trehalozy, przy użyciu kaskady enzymatycznej, składającej się z dwóch enzymów: (1) pirofosforylasy UDP-glukozy (GalU), katalizującej proces otrzymywania UDP-glukozy z UTP i glukozy-1-fosforanu, a następnie (2) transferazy trehalozy (TreT), katalizującej syntezę trehalozy z UDP-glukozy i glukozy.

(c) kowalencyjną immobilizację/współimmobilizację enzymów: oksydazy D-aminokwasowej wyizolowanej z *Rhodotorula gracilis* (DAAO), handlowo dostępnej katalazy wyizolowanej z wątroby bydlęcej (KAT) oraz transketolazy wyizolowanej z *Geobacillus stearothermophilus* (TK). Aktywność katalityczną otrzymanej immobilizowanej kaskady enzymatycznej przetestowano w tzw. jednogarnkowej (z ang. „one pot”), dwuetapowej syntezie L-erytrozy. Badania prowadzono w nowoczesnym reaktorze ze złożem stacjonarnym.

PRZEGLĄD LITERATURY

1. Immobilizacja enzymów

Immobilizacja, inaczej zwana również unieruchomieniem, jest procesem prowadzącym do związania enzymu (najczęściej z nośnikiem). Zabieg ten, oprócz zwiększania stabilności, pozwala na wielokrotne wykorzystanie enzymu (możliwość recyklu), a tym samym obniżenie kosztów całego procesu. Rozwiązanie to ułatwia również oddzielenie katalizatora od medium reakcyjnego, a produkty nie są zanieczyszczone białkiem, co ma istotne znaczenie przede wszystkim w farmacji i przemyśle spożywczym. Pozwala to na zredukowanie liczby etapów całego procesu [1-5]. Dodatkowo, unieruchomienie enzymu na podłożu stałym (nośniku) otwiera drogę do prowadzenia procesu nie tylko w systemie okresowym, ale również w systemie ciągłym [6-9]. Badania dowodzą również, że immobilizacja zwiększa stabilność enzymu i chroni go przed niekorzystnym wpływem zmian pH, temperatury, czy rozpuszczalnikami organicznymi [2,5,10-12]. Proces immobilizacji może niestety wpłynąć na obniżenie aktywności unieruchomionego białka, w porównaniu do jego formy natywnej. Może to być spowodowane zmianami konformacyjnymi i utrudnionym dostępem do miejsca aktywnego enzymu po jego unieruchomieniu [13,14]. Z drugiej zaś strony, w literaturze znanych jest wiele przypadków, w których immobilizacja przyczyniła się do poprawy aktywności enzymu [12,15].

W Tabeli 1 zebrano najważniejsze zalety i wady immobilizacji enzymów.

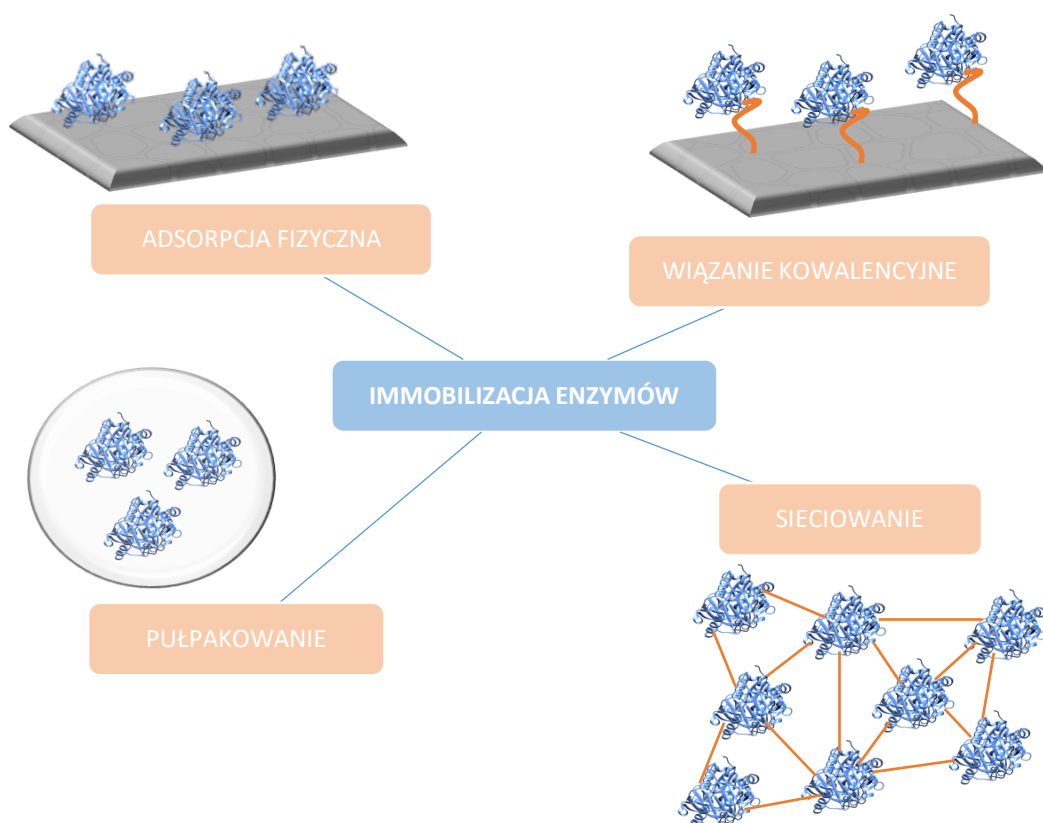
Tabela 1 Najważniejsze zalety i wady immobilizacji enzymów

ZALETY	WADY
Możliwość wielokrotnego wykorzystania enzymu	Ograniczenia transportu masy
Łatwe oddzielenie biokatalizatora od medium reakcji	Dodatkowe koszty związane z zakupem nośnika i odczynników do immobilizacji oraz procesem immobilizacji
Możliwość prowadzenia procesu w układzie ciągłym	Możliwość unieruchomienia enzymu w nieodpowiedniej konformacji, a w konsekwencji utrata aktywności enzymatycznej
Poprawa stabilności enzymu w warunkach reakcji (pH, temperatura, rozpuszczalniki organiczne)	
W niektórych przypadkach wzrost aktywności enzymatycznej	

2. Metody immobilizacji enzymów

Znane są różne metody immobilizacji, w tym między innymi pułapkowanie (inkluzja), czyli zamykanie enzymu wewnątrz nośnika [16,17], związanie enzymu na powierzchni nośnika poprzez adsorpcję fizyczną [18-21] lub wiązanie kowalencyjne [10,22-25] czy sieciowanie (cross-linking) [26-28], czyli tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy cząsteczkami enzymu, co skutkuje utworzeniem nierozpuszczalnych agregatów białkowych.

Graficzne zestawienie poszczególnych metod immobilizacji przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1 Metody immobilizacji enzymów: pułpakowanie, adsorpcja fizyczna, wiązanie kowalencyjne i sieciowanie na przykładzie oksydazy D-aminokwasowej. Schemat wykonano z wykorzystaniem pakietu UCSF Chimera: PDB ID: 1COI.

Ze względu na zakres pracy szczegółowo omówione zostaną dwie metody: adsorpcja fizyczna oraz immobilizacja poprzez wiązanie kowalencyjne.

2.1. Adsorpcja fizyczna

Adsorpcja fizyczna jest najprostszą metodą unieruchomienia enzymów na nośniku. Opiera się na fizycznych oddziaływaniach (takich jak: wiązania wodorowe, siły elektrostatyczne i van der Waalsa czy oddziaływania hydrofobowe) pomiędzy grupami funkcyjnymi enzymu a nośnikiem. Ta metoda immobilizacji jest prosta, szybka, efektywna i tania, a użyty nośnik można zregenerować. Siły wiązania enzymu z nośnikiem są słabe. Dzięki temu nie obserwuje się zmian konformacyjnych białka, przez co aktywność katalityczna pozostaje niezmieniona. Jednakże z drugiej strony, możliwa jest desorpcja enzymu z nośnika, nawet podczas niewielkich zmian warunków reakcji (pH, temperatura, siła jonowa, stężenie substratów), czy pod wpływem działania sił ścinających mieszadła. Adsorpcja jako metoda immobilizacji jest dobrym wyborem do zastosowań w reakcjach prowadzonych w rozpuszczalnikach organicznych, gdyż słabe powinowactwo enzymu do tego typu rozpuszczalników zapobiega wymywaniu enzymu z nośnika [29-32].

2.2. Wiązanie kowalencyjne

Wiązanie kowalencyjne pozwala na silne, nieodwracalne związanie enzymu z nośnikiem, co umożliwia znaczną poprawę stabilności, w porównaniu do natywnej formy enzymu, wielokrotne wykorzystanie biokatalizatora i zapobiega uwalnianiu enzymu do środowiska reakcji [10,33,34]. Wiązanie to powstaje w wyniku reakcji chemicznych między grupami funkcyjnymi nośnika a grupami bocznymi aminokwasów, znajdujących się na zewnętrznej powierzchni białka. Najczęściej grupy funkcyjne enzymu, które biorą udział w wiązaniu z nośnikiem to: grupy aminowe lizyny, argininy i histydyny, grupa tiolowa cysteiny czy karboksylowe kwasu asparaginowego i glutaminowego. Ważne jest, aby w wiązaniu z nośnikiem nie brały udziału reszty aminokwasów tworzących centrum aktywne enzymu, gdyż może to prowadzić do obniżenia aktywności lub nawet całkowitej dezaktywacji biokatalizatora. Należy również zwrócić uwagę, że takie wiązanie enzymu z nośnikiem obniża elastyczność enzymu, co także może prowadzić do obniżenia aktywności. W przypadku tej metody, regeneracja nośnika jest skomplikowana, a często niemożliwa. W przypadku stosowania nośników, które na powierzchni nie mają odpowiednich grup funkcyjnych, zdolnych do wytworzenia wiązania kowalencyjnego z enzymem, konieczna jest ich modyfikacja. Najczęściej na powierzchnię nośnika wprowadza się takie grupy jak: aminowe, epoksydowe, tiolowe czy karboksylowe.

Obecność grup epoksydowych czy tiolowych umożliwia bezpośrednio związanie enzymu z nośnikiem. W przypadku grup aminowych czy karboksylowych, konieczna jest dalsza aktywacja za pomocą karboimidu (aktywacja grup karboksylowych na nośniku) lub aldehydu glutarowego (aktywacja grup aminowych nośnika). Ten ostatni jest stosowany najczęściej ze względu

na prostotę i łagodne warunki aktywacji. W procesie tym jedna grupa aldehydowa aldehydu glutarowego wiąże się z grupą aminową nośnika, a następnie druga grupa aldehydowa reaguje z grupą aminową cząsteczki enzymu. Aldehyd glutarowy ma tendencję do tworzenia struktur dimerycznych lub trimerycznych, co skutkuje powstaniem długiego ramienia dystansującego (tzw. linkera) pomiędzy enzymem a nośnikiem [23,32-36].

Podsumowując, każda z technik immobilizacji ma swoje wady oraz zalety i nie ma jednej uniwersalnej metody dla wszystkich enzymów. W związku z tym każdorazowo przed przystąpieniem do unieruchomienia konkretnego enzymu, konieczny jest dobór zarówno odpowiedniej metody immobilizacji jak i nośnika, do którego będzie on przyłączany.

3. Nośniki enzymów

Ważnym aspektem procesu immobilizacji enzymów jest wybór odpowiedniej matrycy (nośnika). Nośnik powinien cechować się wysokim powinowactwem do enzymu, biokompatybilnością, stabilnością chemiczną i termiczną oraz nierozpuszczalnością w środowisku reakcji. Powinien także posiadać reaktywne grupy funkcyjne, aby umożliwić skuteczne oddziaływanie enzymu z nośnikiem. Ważne są również jego niska cena oraz powszechna dostępność. Ponadto nośnik powinien nadawać się do regeneracji oraz wielokrotnego wykorzystania. [3,10]

Niestety, idealny nośnik nie istnieje. W procesie immobilizacji enzymów zastosowanie znajduje bardzo szeroka grupa rozmaitych materiałów organicznych i nieorganicznych, w tym polimery [24,37-39], nanocząstki [40-42], nanorurki węglowe [25,43], krzemionki [44-47].

Na szczególną uwagę zasługują porowate materiały krzemionkowe, które omówiono szerzej w kolejnych podrozdziałach.

3.1. Nośniki krzemionkowe

Nośniki krzemionkowe są nietoksyczne, cechują się świetną wytrzymałością termiczną oraz mechaniczną. Są stabilne w rozpuszczalnikach organicznych i niezwykle odporne na biodegradację. Co więcej, znajdujące się na ich powierzchni grupy hydroksylowe sprzyjają modyfikacji powierzchni (funkcjonalizacji), w celu umożliwienia skutecznego unieruchomienia enzymu. Procedura funkcjonalizacji polega na reakcji krzemionki z odpowiednim organosilanem, co prowadzi do kowalencyjnego związania odpowiednich grup funkcyjnych na powierzchni. Reakcja prowadzona jest najczęściej w obecności niepolarnego rozpuszczalnika i jest stosunkowo prosta i szybka. Istotną zaletą nośników krzemionkowych jest również możliwość ich regeneracji i ponownego wykorzystania. Wśród nośników krzemionkowych wyróżnia się niezwykle popularne w ostatnich latach mezoporowate materiały krzemionkowe

o uporządkowanej strukturze. Do nich zalicza się nośniki proszkowe, jak mezoporowate pianki komórkowe (MCF) czy mezoporowate sita molekularne typu SBA-15, jak również nośniki monolityczne o hierarchicznej strukturze porów. Krzemionkowe materiały mezoporowate cechują się dużą powierzchnią właściwą, wąskim rozkładem wielkości porów i dobrze zdefiniowaną geometrią porów, co pozwala na skuteczne przyłączenie enzymów oraz minimalizuje ograniczenia dyfuzyjne [3,30,48-50].

Poniżej omówiono szerzej mezoporowate pianki komórkowe oraz monolity krzemionkowe, których otrzymanie, modyfikacja i wykorzystanie było jednym z celów niniejszej pracy.

3.1.1. Mezoporowate pianki komórkowe

Mezoporowate pianki komórkowe (MCF, *ang mesostructured cellular foams*) należą do nośników proszkowych (wielkość cząstek 20-30 μm). Do ich syntezy stosuje się metodę szablonowania: po zmieszaniu wodnego roztworu HCl ze związkiem powierzchniowo czynnym (Pluronic 123) oraz czynnikiem spęczniającym (1,3,5-trimetylobenzen, TMB) tworzy się mikroemulsja typu olej w wodzie (o/w), która pełni rolę szablonu porów. Do tak przygotowanej mikroemulsji wkrapla się prekursor krzemionki (TEOS), który hydrolizuje i kondensuje wokół kropelek mikroemulsji. Podczas starzenia w podwyższonej temperaturze, krzemionka kondensuje, w wyniku czego następuje agregacja kropelek pokrytych krzemionką, co prowadzi do ich wytrącenia. Strącone agregaty poddaje się procesowi filtracji, suszenia oraz kalcynacji. Otrzymane w ten sposób materiały charakteryzują się trójwymiarową otwartą strukturą porów (z całkowitą objętością porów ok. 2 cm^3/g), ze sferycznymi dużymi porami (o średnicy 20-40 nm), połączonych ze sobą jednolitymi oknami (9-20 nm). Te wszystkie cechy: mała wielkość cząstek, duża powierzchnia właściwa (500-1000 m^2/g) oraz duża średnica porów sprawiają, iż nośniki te wykazują duży potencjał do immobilizacji enzymów [45,51-57].

3.1.2. Monolity krzemionkowe

Monolity krzemionkowe charakteryzują się otwartą multimodalną hierarchiczną strukturą makro-/mezoporów. Zespół *Nakanishi* [58,59] opracował syntezę bimodalnych monolitów krzemionkowych w oparciu o procedurę zol-żelową z równoczesną separacją fazową. Dodatki, takie jak rozpuszczalne w wodzie polimery (poli(glikol etylenowy) - PEG czy trójblokowe surfaktanty kopolimerowe (poli(glikol etylenowy)-blok-poli(tlenek propylenu)-blok-poli(glikol etylenowy))), mogą być stosowane jako inicjatory separacji faz. W środowisku kwaśnym, prekursor krzemionki, np. tetraetoksylan (TEOS) czy tetrametoksylan (TMOS) hydrolizują i następnie kondensują, a polimery zaczynają oddziaływać z nowo utworzoną powierzchnią krzemionki, w wyniku czego powstaje trójwymiarowa sieć. Równocześnie następuje rozkład spinodalny prowadzący do rozdziału faz na fazę bogatą w krzemionkę pokrytą polimerem

oraz fazę bogatą w rozpuszczalnik (wodę). Po tym etapie następuje przejście zolu w żel. Począwszy od momentu żelowania rozpoczyna się dojrzewanie i starzenie żelu, tzn. dalsza kondensacja krzemionki, poprzez wiązania krzyżowe powierzchniowych grup hydroksylowych. Szkielety żelu krzemionkowego tak utworzonej makroporowatej struktury zawierają mezopory, których rozmiar można kontrolować poprzez obróbkę otrzymanych monolitów w roztworze amoniaku. Ponieważ rozpuszczalność krzemionki zależy zarówno od pH jak i temperatury, wzrost jednego z tych czynników zwiększy proces dojrzewania Ostwalda (*ang Ostwald ripening*), prowadząc do wzrostu średnicy mezoporów matrycy krzemionkowej. Ostatnimi etapami syntezy są: suszenie (kurczenie się żelu i usunięcie rozpuszczalnika z porów) oraz kalcynacja, podczas której dochodzi do wzmocnienia struktury żelu oraz usunięcia lotnych i organicznych związków (szablonu) z wnętrza nieorganicznej struktury. W ten sposób otrzymuje się szkielet krzemionki z makroporami 0,1-10 μm (powstałymi po usunięciu rozpuszczalnika i związków organicznych) oraz mezoporami w zakresie 10-20 nm, o całkowitej objętości porów ok. 3 cm^3/g [58-61].

Smatt i wsp. [62] zmodyfikowali tę metodę syntezy, stosując tzw. podwójne szablonoowanie. Zastosowali oni połączenie homopolimerowego środka rozdzielającego fazy - poli(glikolu etylenowego) (PEG), który jest inicjatorem separacji fazowej oraz czwartorzędowej soli amoniowej (bromku heksadecylotrimetyloamoniowego, CTAB), która ma zdolność do tworzenia miceli, będących szablonem mezoporów monolitu. Wg *Smatt i in.* [62] krzemionka najpierw łączy się z micelami CTAB, a następnie oddziałuje z PEG, który kontroluje agregację kompleksów CTAB-krzemionka. W ten sposób można otrzymać hierarchicznie zorganizowane, trójmodalne monolity krzemionkowe z małymi mezoporami w zakresie 2-4 nm oraz większymi mezoporami (10-20 nm) i makroporami w zakresie 0,5-35 μm [62]. Dowiedziono również, że makro- i mezoporowatość materiału krzemionkowego można regulować niezależnie od siebie, poprzez modyfikację stosunku poszczególnych reagentów oraz warunków syntezy [60,62,63]. Zmiana stosunku ilości reagentów: (TEOS, PEG, CTAB i HNO_3) oraz sposobu obróbki, zaproponowana przez *Szymańska i in.* [64,65] umożliwiła otrzymanie jeszcze bardziej otwartej struktury monolitu (powierzchnia właściwa 290-650 m^2/g), zawierającego mezopory w zakresie 3-4 nm i 18-20 nm oraz duże makropory w zakresie 2-40 μm , z całkowitą objętością porów w zakresie 2-4 cm^3/g .

Monolity krzemionkowe posiadają unikalną trójwymiarową strukturę, w której makropory przepływowe połączone są z rozległą siecią mezoporów obecnych w stałym szkielecie. Dzięki takiej budowie, generowane są duże i łatwo dostępne powierzchnie, na których można osadzić katalizator, uzyskując wyjątkowo korzystny stosunek powierzchni do objętości. Dodatkowo, obecność stosunkowo dużych makroporów pozwala znacząco zmniejszyć opory

związane z transportem masy reagentów. Co więcej, możliwość przyjmowania przez monolity różnych kształtów (w zależności od kształtu formy, do której wylewa się zol) oraz dostępne metody modyfikacji krzemionki sprawiają, że możliwe jest zaprojektowanie struktury spełniającej określone wymagania katalityczne oraz inżynierskie. W ostatnich latach monolity krzemionkowe z powodzeniem były wykorzystywane jako rdzenie do mikroreaktorów enzymatycznych czy wypełnienie do reaktora koszykowego.

3.1.2.1. Zastosowanie monolitów krzemionkowych w procesach ciągłych

Monolity krzemionkowe o hierarchicznej strukturze porów, na powierzchni których zaimmobilizowane są enzymy, mogą być wykorzystane jako rdzenie mikroreaktorów przepływowych. Zastosowanie mikroreaktorów umożliwia prowadzenie procesów ciągłych, kontrolę parametrów procesowych, takich jak temperatura, natężenie przepływu czy czas reakcji, co ma korzystny wpływ na wydajność i selektywność procesu. Możliwa jest również pełna automatyzacja procesu. Ponadto mikroreaktory dają możliwości projektowania innowacyjnych procesów przemysłowych w produkcji małotonażowej, przede wszystkim w przemyśle farmaceutycznym czy chemicznym do produkcji związków typu *fine chemicals*. Co więcej, zmniejszenie objętości reaktora pozwala na zwiększenie bezpieczeństwa procesu, w tym również syntezy *in situ* substancji niebezpiecznych. Wpływa to także na zmniejszenie ilości odczynników i zużycia energii, co czyni proces bardziej przyjaznym dla środowiska oraz pozwala na znaczne obniżenie kosztów. Dużą zaletą jest również łatwe powiększenie skali, możliwe dzięki zwielokrotnieniu liczby stosowanych urządzeń, umożliwiając w ten sposób zwiększenie produkcji. Co istotne, zastosowanie mikroreaktorów pozwala niejednokrotnie na otrzymanie wyższych wydajności produktu, w porównaniu do uzyskiwanych w systemie okresowym. To ostatnie wynika z intensyfikacji wymiany masy i ciepła pomiędzy reagentami a powierzchnią, na której osadzony jest katalizator oraz niemożliwym do uzyskania w tradycyjnych procesach wyjątkowo korzystnym stosunkiem powierzchni nośnika (na której zachodzi proces katalityczny) do objętości reagentów [6,66-70].

Po raz pierwszy monolity krzemionkowe zostały wykorzystane jako mikroreaktory przez grupę z Instytutu Charlesa Gerhardta w Montpellier [60,71-73]. Do syntezy monolitów stosowano procedurę opracowaną przez *Nakanishi i in.* [58,59] (opisaną w *podrozdziale 3.1.2*), uzyskując materiał o makroporach wielkości 3-6 μm , mezoporach w zakresie 3-10 nm, całkowitej objętości porów do ok. 2,7 cm^3/g i porowatości 76-78% [73]. Z kolei zespół pod kierownictwem prof. Jarzębskiego opracował mikroreaktory bazujące na technologii monolitów krzemionkowych, opracowanej przez *Smatt i in.* [62]. Choć topologia porów jest w obu przypadkach taka sama, to monolity krzemionkowe otrzymane zgodnie z metodologią

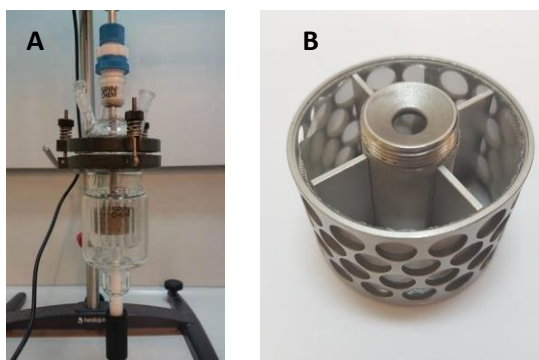
Smatt i in., zmodyfikowaną przez zespół z Gliwic, charakteryzują się makroporami w zakresie 30-50 μm , dużymi mezoporami do 20 nm całkowitą objętością porów sięgającą 4 cm^3/g oraz porowatością 80-90% [64,65]. Tak duże pory/kanały przepływowe umożliwiają zastosowanie dużych natężeń przepływu reagentów przy stosunkowo niewielkich oporach przepływu. Przykładowo, zastosowanie natężenia przepływu 750 $\text{ml}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$ skutkowało jedynie oporami przepływu rzędu 64 kPa/cm [65]. Dzięki temu możliwe jest zastosowanie zwykłych (prostych), a co za tym idzie, niedrogich pomp dozujących. Rozwinięta struktura monolitów krzemionkowych (powierzchnia właściwa S_{BET} ok. 300 m^2/g) umożliwia większy ładunek biokatalizatora, a w efekcie wyższą produktywność. Ponadto kręte kanały przepływowe wymuszają gwałtowne zmiany kierunku przepływu cieczy (chaotyczny przepływ cieczy), co sprzyja powstawaniu zawirowań i intensyfikacji mieszania, pomimo laminarnego przepływu. To wszystko sprawia, że mikroreaktory monolityczne wykorzystano w wielu procesach biotransformacji. Przykładowo, acylotransferaza z *Mycobacterium smegmatis*, unieruchomiona wewnątrz mikroreaktora, została przetestowana w reakcji transestryfikacji glikolu neopentylowego octanem etylu. Glikol neopentylowy posiada w swojej strukturze dwie grupy hydroksylowe, w związku z czym możliwe jest otrzymanie mono- lub diestru. Dowiedziono, że regulacja natężenia przepływu reagentów (a tym samym czasu kontaktu) w mikroreaktorze z osadzonym enzymem, umożliwia kontrolę powstawania jednego z produktów w nadmiarze. Przy natężeniach przepływu $>1,5$ ml/min (czas kontaktu poniżej 1 min) powstawał jedynie monoester, natomiast wraz ze zmniejszaniem przepływu, a tym samym wydłużaniem czasu reakcji udział diestru w mieszaninie poreakcyjnej wzrastał. Co ciekawe, w badanej reakcji prowadzonej w reaktorze okresowym zawsze powstawały obie formy produktu (brak selektywności), a pełna konwersja substratu nie została osiągnięta nawet po 7 h prowadzenia reakcji. Należy również podkreślić, że mikroreaktor był stabilny przez prawie 50 h ciągłej pracy [74].

Innym przykładem wykorzystania mikroreaktorów krzemionkowych jest zastosowanie ich w procesie proteolizy białek. Sprawdzono aktywność proteolityczną trypsyny unieruchomionej kowalencyjnie na monolicie krzemionkowym modyfikowanym grupami aminowymi, w procesie trawienia mioglobiny i cytochromu c (typowych białek globularnych), prowadzonym w układzie ciągłym. Wydajność proteolityczna została określona na podstawie stopnia pokrycia sekwencji aminokwasowej otrzymanego białka w odniesieniu do bazy danych. Po 24 min (stosując przepływ 0,03 ml/min) wartości pokrycia sekwencji z bazą danych wynosiły odpowiednio 90% i 70%. Co ważniejsze, wyniki te są porównywalne z otrzymanymi po 12 h w reaktorze zbiornikowym [65]. Monolity krzemionkowe wykorzystano również do adsorpcyjnej immobilizacji lipazy z *Pseudomonas cepacia*. Immobilizowaną lipazę wykorzystano do rozdziału

kinetycznego nierównomolowej mieszaniny diastereoizomerów (R:S-85:15) drugorzędowego alkoholu allilowego ((+)-1-[(1S,5R)-6,6-dimetylobicyklo[3.1.0]heks-2-en-2-yl]etanolu), poprzez transestryfikację tego alkoholu octanem winylu. Reakcję prowadzono w przepływie ciągłym. Po czasie kontaktu 2,14 min zastosowany substrat – alkohol allilowy (R/S) został w pełni przekształcony do odpowiedniego estru (R) (konwersja substratu 85%, $de > 99\%$). Ponadto, otrzymany mikroreaktor był stabilny przez 10 dni ciągłej pracy [7]. Przeprowadzono również badania z zastosowaniem liaz hydroksynitrylowych wyizolowanych z *Hevea brasiliensis* i z *Manihot esculenta*, immobilizowanych kowalencyjnie na monolicie krzemionkowym. Zastosowanie ich w układzie ciągłym jako biokatalizatorów do enancjoselektywnej syntezy (S)-mandelonitrylu z benzaldehydu i cyjanowodoru, pozwoliło otrzymać konwersję substratu (benzaldehydu) na poziomie 97% i nadmiar enancjomeryczny produktu ee_s 98%, w czasie ok. 3 min. Należy również podkreślić, że krzemionka (nośnik) również może być katalizatorem tej reakcji, jednakże w odróżnieniu od enzymu, jest ona katalizatorem nioselektywnym. Jest to tzw. konkurencyjna reakcja tła. Co istotne, zastosowanie przepływu ciągłego, w szczególności przy wyższych natężeniach przepływu, skutecznie tłumilo nioselektywną, konkurencyjną reakcję tła. Tego efektu nie udało się uzyskać w procesie okresowym z wykorzystaniem tych samych katalizatorów, gdzie po 30 h otrzymano 94% konwersji substratu i ee_s wyniósł jedynie 42% [6].

3.1.2.2. Zastosowanie monolitów krzemionkowych w procesach okresowych

Monolity krzemionkowe mogą mieć również zastosowanie w procesach okresowych. *Szymańska i in.* [49] zsyntetyzowali monolity krzemionkowe w kształcie stożków o wielkości ok. 3,5-5 mm i wykorzystali je jako wypełnienie reaktora ze złożem obrotowym (z ang. *rotating bed reactor*, RBR, *Rys. 2A*) wytworzonego przez szwedzką firmę SpinChem [75]. Reaktor ten zawiera czterokomorowy kosz obrotowy (*Rys. 2B*), zamontowany na końcówce wału mieszadła, w którym umieszcza się heterogeniczne (bio)katalizatory. Niewątpliwą zaletą takiego rozwiązania jest ochrona struktury (bio)katalizatora przed uszkodzeniami mechanicznymi, przy jednoczesnym zapewnieniu równomiernego mieszania i swobodnego przepływu reagentów przez złożo. Przedłuża to żywotność katalizatora oraz gwarantuje łatwe oddzielenie katalizatora z mieszaniny reakcyjnej po zakończonym procesie, ułatwiając tym samym recykling katalizatora [29,49,76-79].



Rys. 2 Reaktor z obrotowym złożem (A), czterokomorowe mieszadło reaktora (B)

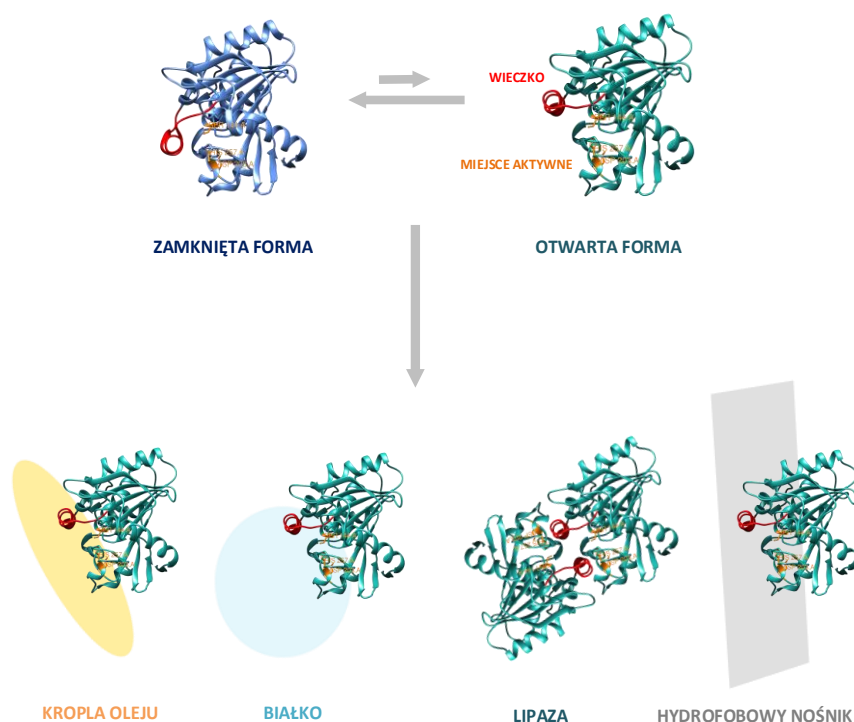
Przykładowym zastosowaniem monolitów jest m.in. praca *Szymańskiej i in.* [49], gdzie porównano wydajność procesu hydrolizy sacharozy z wykorzystaniem inwertazy immobilizowanej na monolitycznych ziarnach krzemionki i na komercyjnym żelu krzemionkowym (Kieselgel 60). Proces prowadzono w reaktorze RBR (SpinChem®). Zastosowanie monolitów krzemionkowych jako nośnika inwertazy, umożliwiło otrzymanie po 75 min trwania reakcji prawie 100% konwersji sacharozy (96-99%), w porównaniu do handlowo dostępnego żelu krzemionkowego Kieselgel 60, gdzie po tym samym czasie otrzymano jedynie ok. 20% [49]. Co więcej, biokatalizator był stabilny w kolejnych 10 cyklach reakcyjnych. Pokazano również możliwość regeneracji monolitów poprzez poddanie ich działaniu wysokiej temperatury, w atmosferze utleniającej (powietrze). Zabieg ten nie wpłynął negatywnie na nośnik, a jego zastosowanie do immobilizacji nowej porcji inwertazy, umożliwiło uzyskanie biokatalizatora o porównywalnej aktywności [49]. Kolejnym przykładem może być zastosowanie monolitów do immobilizacji lakazy oraz wykorzystanie tak otrzymanego biokatalizatora do utleniania pochodnych kwasu benzoowego (kwasu 2-amino-3-hydroksybenzoowego), w układzie trójfazowym (powietrze, ciekły substrat i biokatalizator) [79]. W swoich badaniach Autorzy dowiedli, że zastosowanie reaktora z wirującym złożem nie wymaga dodatkowego napowietrzania (poza jego dostarczaniem z otoczenia).

4. Zastosowanie immobilizowanych enzymów w procesach biotransformacji

4.1. Lipazy

Na przestrzeni lat wśród wielu stosowanych w biotransformacjach enzymów, lipazy (E.C.3.1.1.3) zyskały dużą popularność. W odróżnieniu od większości biokatalizatorów, wykazują szeroką specyficzność substratową, regio- i stereoselektywność. W przypadku reakcji prowadzonych z ich udziałem możliwe jest zastosowanie dużych stężeń substratów, nie tylko w ich naturalnym środowisku (wodnym), ale także w rozpuszczalnikach organicznych. Istotną zaletą jest również brak konieczności stosowania kofaktora i duża dostępność. Lipazy mogą katalizować różne reakcje, takie jak estryfikacja, transestryfikacja, hydroliza, aminoliza czy acydoliza. Wszechstronność lipaz sprawia, że są one jednymi z najczęściej używanych enzymów nie tylko w skali laboratoryjnej, ale również na skalę przemysłową. Znalazły zastosowanie w takich gałęziach przemysłu jak: tekstylny, spożywczy czy papierniczy. Stosowane są do produkcji detergentów, środków zapachowych, farmaceutyków czy biopaliw. Wykorzystuje się je również do rozdzielania mieszanin racemicznych, w produkcji czystych optycznie estrów i pochodnych aminokwasów, z grupy fine chemicals i agrochemikaliów [80-86].

Większość lipaz posiada w swojej budowie dużą kieszeń hydrofobową otaczającą centrum aktywne. Centrum aktywne tworzy triada katalityczna składająca się z seryny, histydyny i kwasu asparaginowego lub glutaminowego i jest ono najczęściej przykryte łańcuchem polipeptydowym, zwanym wieczkiem (*ang. lid*). Wieczko to ma charakter amfipatyczny - posiada wewnętrzną powierzchnię hydrofobową, która oddziałuje z hydrofobową powierzchnią miejsca aktywnego, oraz hydrofilową warstwę zewnętrzną, która oddziałuje ze środowiskiem reakcji. Struktura wieczka stabilizowana jest licznymi oddziaływaniami hydrofobowymi, dlatego w środowisku wodnym wieczko to izoluje centrum aktywne od środowiska reakcji. Mówi się, że lipaza występuje wtedy w konformacji zamkniętej, nieaktywnej. Kiedy lipaza znajdzie się na granicy faz woda-olej, to silnie zaadsorbuje się na hydrofobowej powierzchni (kropla oleju). W tym momencie wieczko się przesuwa, zmieniając swoją konformację i odsłania miejsce aktywne enzymu, co skutkuje otwartą i aktywną katalityczną formą lipazy [82,83,87-90]. Zjawisko to nazywane jest aktywacją międzyfazową. W ten sposób lipaza może adsorbować się również na hydrofobowych białkach, innej cząsteczce lipazy w konformacji otwartej, bądź na hydrofobowym nośniku (Rys. 3).



Rys. 3 Oddziaływanie lipaz z hydrofobową powierzchnią. Schemat wykonano z wykorzystaniem pakietu UCSF Chimera. PDB ID: 3TGL (zamknięta forma lipazy z *Rhizomucor miehei*) i 4TGL (otwarta forma lipazy z *Rhizomucor miehei*).

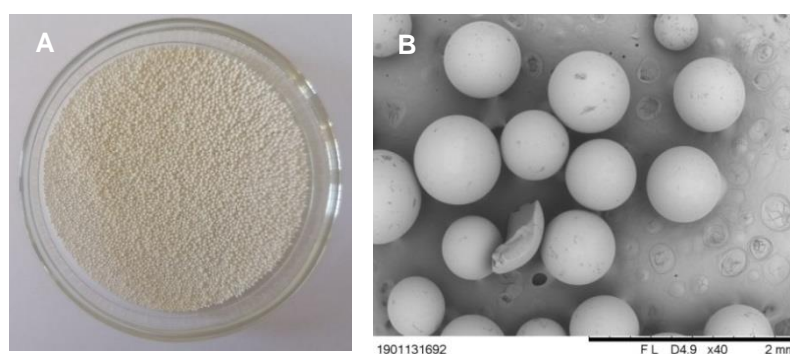
Ze względu na wysoką aktywność, stabilność termiczną i selektywność względem substratu, najczęściej stosowaną komercyjnie lipazą jest lipaza B wyizolowana z drożdży *Candida antarctica* (CalB). Jej struktura została dobrze poznana i opisana. Białko to składa się z 317 aminokwasów, a jego masa molekularna wynosi 33 kDa. Centrum aktywne tworzy triada katalityczna składająca się z Ser105, His224 i Asp187 i jest ono częściowo przykryte niewielkim wieczkiem [87,91-93].

4.1.1. Immobilizacja lipaz

Przemysłowe użycie natywnych lipaz jest ograniczone. Warunkiem koniecznym ich zastosowania na większą skalę jest poprawa stabilności oraz zapewnienie łatwego rozdzielenia enzymu od medium reakcyjnego po zakończeniu procesu, a tym samym umożliwienie wielokrotnego wykorzystania biokatalizatora, co z kolei pociąga za sobą obniżenie kosztów całego procesu. Cel ten można osiągnąć m.in. poprzez immobilizację enzymu. Dobrze dobrana metoda immobilizacji może również wpłynąć na otrzymanie biokatalizatora o zwiększonej aktywności, a nawet selektywności [87,94]. Niewątpliwie najchętniej wykorzystywaną, zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej, immobilizowaną formą lipazy jest handlowo dostępny produkt firmy Novozymes - Novozym 435 [95]. Novozym 435 (Rys. 4) to lipaza B z *Candida antarctica* zaadsorbowana na hydrofobowej makroporowatej żywicy polimerowej o nazwie Lewatit VP OC 1600 (poli (metakrylan metylu) usieciowany diwinylobenzenem).

Pomimo szerokiego zastosowania tego biokatalizatora, posiada on kilka zasadniczych wad. W podwyższonych temperaturach, czy też w obecności rozpuszczalników bądź detergentów, istnieje możliwość desorpcji enzymu [87,96,97]. Kolejną wadą Novozymu 435 jest kruchość nośnika, co powoduje, że może on ulec zniszczeniu/rozdrobieniu w czasie procesu, szczególnie w przypadku zastosowania mieszadła mechanicznego. Najważniejszym problemem jest jednak rozpuszczalność polimerowego nośnika w niektórych rozpuszczalnikach, co powoduje zanieczyszczenie środowiska reakcji zarówno wymyłym enzymem jak i składnikami polimerowego nośnika [82,98-101]. *Zhao i Song* [101] wykazali, że podczas inkubacji Novozymu 435 w rozpuszczalniku organicznym (m.in. heksan, acetonitryl, aceton czy *t*-butanol), w mieszaninie obecnych było siedemnaście związków pochodzących z degradacji nośnika, w tym głównie glicerol, kwas benzoesowy, benzoesan 2-hydroksyetylu, sorbinian 2-hydroksyetylu oraz kwas sorbowy. Co więcej, ostatnie cztery wymienione związki mogą być donorami grupy acylowej w reakcjach estryfikacji lub transestryfikacji w obecności lipazy.

W związku z powyższym znalezienie odpowiedniego nośnika, a przede wszystkim efektywnej metody unieruchomienia lipaz stanowi bardzo ważny i aktualny temat.



Rys. 4. Novozym 435 (A) i jego obraz z mikroskopii SEM (B)

Lipazy unieruchamiano na różnych nośnikach, w tym mezoporowatych krzemionkach [14,102-104], polimerach, w tym najczęściej agarozie [25,105,106] czy nanocząstkach magnetycznych [107-109].

W przypadku lipaz, najbardziej popularną metodą immobilizacji jest immobilizacja oparta na fizycznej adsorpcji na powierzchni hydrofobowego nośnika. Najczęściej wykorzystywane są nośniki modyfikowane grupami oktylowymi [83,105,110-112] lub oktadecylowymi [113-115]. Ten sposób immobilizacji pozwala na hiperaktywację (znaczne polepszenie aktywności) lipaz, w porównaniu do jej natywnej formy [83,87,111,116-118], co można przypisać aktywacji międzyfazowej lipaz na hydrofobowej powierzchni nośnika. Jednakże, ze względu na słabe oddziaływanie, może dojść do wymywania enzymu z nośnika [83,87,88], co obserwowano również w przypadku Novozymu 435 (opisano powyżej). Z drugiej strony, stosuje się

immobilizację kowalencyjną. Zastosowanie silnego wiązania kowalencyjnego do immobilizacji lipaz (na nośnikach z grupami aldehydowymi, aminowymi czy epoksydowymi) wpływa na znaczną poprawę stabilności termicznej i stabilności w rozpuszczalnikach organicznych [14,104,119]. Niektórzy autorzy testowali aktywność i stabilność lipaz immobilizowanych na nośnikach zawierających więcej niż jeden typ grup funkcyjnych, na tzw. nośnikach bifunkcjonalizowanych. *Guajardo i in.* [80] unieruchomili lipazę CalB na krzemionce modyfikowanej grupami oktylowymi (nośnik monofunkcjonalizowany) lub oktylowymi i epoksydowymi jednocześnie (biofunkcjonalizowany). Znacznie lepszą aktywność właściwą wykazała lipaza immobilizowana na nośniku monofunkcjonalizowanym (367 IU/g biokatalizatora) niż ta unieruchomiona na nośniku bifunkcjonalizowanym (156 IU/g). Podobne wyniki dla lipazy CalB odnotowali również *Rueda i wsp.* [87], czy *Hirata i in.* [120], obserwując wyższą aktywność właściwą lipazy CalB, immobilizowanej na agarozie z grupami oktylowymi niż tej, która była immobilizowana na agarozie z grupami oktylowymi i aldehydowymi. Także dla innych lipaz obserwowano podobną tendencję. *Bernal i wsp.* [119] zaproponowali immobilizację lipaz z *Pseudomonas stutzeri* (Psl) i *Alcaligenes sp* (Asl) na krzemionce modyfikowanej grupami oktylowymi lub oktylowymi i aldehydowymi jednocześnie. Lipaza Psl wykazywała najlepszą aktywność na monofunkcjonalizowanej krzemionce, a w przypadku lipazy Asl obserwowano porównywalne aktywności dla obu rodzajów nośników. *Garmroodi i in.* [116] testowali lipazę z *Rhizomucor miehei* na krzemionce typu SBA-15 modyfikowanej grupami oktylowymi lub oktylowymi i epoksydowymi jednocześnie. Również w tym przypadku najlepszą aktywność wykazała lipaza na monofunkcjonalizowanym nośniku. Co więcej, dowiedli, że wraz ze zwiększaniem ilości grup epoksydowych na nośniku bifunkcjonalizowanym maleje aktywność właściwa enzymu. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że poprzez wiązania kowalencyjne, trójwymiarowa struktura enzymu ulega usztywnieniu, co utrudnia przegrupowania przestrzenne białka [116,121]. Jednakże, pomimo słabszej aktywności lipaz na nośnikach bifunkcjonalizowanych przewagą tych nośników nad monofunkcjonalizowanymi jest brak wymywania enzymu z nośnika [116,120,122]. W tym przypadku enzym jest zorientowany jak na nośniku hydrofobowym, tzn. w otwartej, aktywnej konformacji (dzięki obecności grup hydrofobowych), ale jest również silnie związany kowalencyjnie z grupami reaktywnymi nośnika (grupy epoksydowe, aminowe czy aldehydowe), a więc poprawia się stabilność otrzymanego biokatalizatora [116,117,119-121]. Bifunkcjonalizacja nośnika łączy zatem zalety płynące ze stosowania obu sposobów immobilizacji lipaz: hydrofobowej adsorpcji oraz immobilizacji poprzez wiązania kowalencyjne. Immobilizacja na bifunkcjonalizowanych nośnikach przeprowadzana jest najczęściej w kilku etapach [80,87,118,119,121,122]. W pierwszym etapie stosuje się rozpuszczalniki o niskiej sile

jonowej i pH 7, co sprzyja hydrofobowej adsorpcji enzymu, w wyniku której dochodzi do aktywacji międzyfazowej. W drugim etapie zazwyczaj konieczne jest podwyższenie pH do wartości 9-10, co sprzyja tworzeniu wiązań kowalencyjnych bądź jonowych pomiędzy reaktywnymi grupami (epoksydowymi lub aldehydowymi) na nośniku a grupami nukleofilowymi zaadsorbowanego białka. Wprawdzie wytworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy enzymem a nośnikiem modyfikowanym grupami epoksydowymi może zachodzić w neutralnym pH, jednakże wykazano, że wzrost pH do wartości 9 lub 10 pozwala na zwiększenie reaktywności grup nukleofilowych enzymu z grupami epoksydowymi nośnika, a co za tym idzie do otrzymania wielopunktowego wiązania kowalencyjnego [80,121]. W przypadku immobilizacji na nośniku modyfikowanym grupami aldehydowymi środowisko alkaliczne jest konieczne, co umożliwi wytworzenie zasad Schiffa między grupami aminowymi enzymu a grupami aldehydowymi nośnika [118,121]. Ponadto, w celu zwiększenia stabilności wiązania poprzez zasady Schiffa, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowego etapu - redukcji nieprzereagowanych grup aldehydowych do obojętnych grup hydroksylowych i przekształcenie wiązań iminowych (odwracalnych zasad Schiffa) w stabilne drugorzędowe wiązania aminowe. Reakcję tę można przeprowadzić np. borowodorkiem sodu lub kwasem nadjodowym [117,118,122]. Niestety zastosowanie wyższych wartości pH (pH 9-10) w drugim etapie immobilizacji, w przypadku niektórych enzymów może wpływać na zmianę ich trzeciorzędowej struktury, a co za tym idzie powodować znaczny spadek lub nawet utratę aktywności unieruchomionego enzymu [116,117,121].

Podsumowując, dzięki obecności na powierzchni nośnika różnych grup funkcyjnych, możliwa jest immobilizacja zarówno adsorpcyjna jak i kowalencyjna, co może pozytywnie wpłynąć zarówno na aktywność jak i stabilność immobilizowanego enzymu. Należy jednak pamiętać, że dla niektórych enzymów niestabilnych w pH 9-10, drugi etap immobilizacji może wywołać niekorzystne zmiany. Udoskonalenie metody immobilizacji na bifunkcjonalizowanych nośnikach stanowi więc ciekawy temat badawczy.

4.2. Nowe podejście do biotransformacji – kaskady enzymatyczne

W ostatnich latach wieloenzymatyczne reakcje kaskadowe cieszą się dużą popularnością. Stanowią one obiecującą drogę do produkcji farmaceutyków, kosmetyków, biopaliw czy związków z grupy „fine chemicals”. Zastosowanie wieloenzymatycznych reakcji kaskadowych, w odróżnieniu do klasycznej wieloetapowej syntezy, usuwa konieczność izolacji i oczyszczania produktów pośrednich po każdym etapie, zmniejszając liczbę operacji jednostkowych. Pozwala to zaoszczędzić czas, zmniejszyć ilość stosowanych rozpuszczalników, a tym samym wygenerować mniejsze ilości odpadów. To wszystko wpływa na obniżenie kosztów operacyjnych. Niejednokrotnie otrzymuje się również lepsze wydajności, jako że w systemach kaskadowych, powstający w jednym etapie produkt jest szybko zużywany w kolejnym, możliwe jest zatem przesunięcie równowagi reakcji enzymatycznej w kierunku produktu, co zapobiega konieczności stosowania nadmiaru reagentów. Dodatkowo, unieruchomienie wielu enzymów umożliwia zastosowanie procesów kaskadowych w przemyśle. Technologia immobilizacji została dobrze opracowana dla pojedynczych enzymów, jednakże nie dla kaskad enzymatycznych. Immobilizację wielu enzymów można osiągnąć poprzez unieruchomienie poszczególnych enzymów na osobnym nośniku lub poprzez współimmobilizację (z ang. *co-immobilization*) wszystkich enzymów na jednym nośniku. Zaletą tego pierwszego rozwiązania jest niewątpliwie elastyczność operacji jednostkowych oraz możliwość określenia aktywności i stabilności każdego z unieruchomionych enzymów, co niestety jest bardzo trudne przy współimmobilizacji. Jednakże, współimmobilizacja enzymów zmniejsza lub całkowicie eliminuje czas opóźnienia (z ang. *lag time*), co niejednokrotnie przyczynia się do zwiększenia szybkości reakcji oraz wydajności katalitycznej. Opóźnienie to pojawia się w przypadku użycia kilku enzymów immobilizowanych na osobnych nośnikach lub wolnych enzymów i jest spowodowane tym, że stężenie produktów pośrednich będzie początkowo niskie, co nie pozwoli innym enzymom w łańcuchu reakcji na wykazanie aktywności na początku reakcji. Współimmobilizacja enzymów pozwala również usunąć ograniczenia dyfuzji podczas przenoszenia produktów pośrednich, z miejsca aktywnego pierwszego enzymu na drugi, co ma miejsce w przypadku immobilizacji na osobnych nośnikach. Należy jednak pamiętać, że podczas unieruchamiania kilku enzymów na jednym nośniku, istotne są nie tylko oddziaływania między enzymem a nośnikiem, ale również właściwości różnych enzymów. Niezwykle ważne jest znalezienie optymalnych warunków (temperatura, pH oraz medium reakcji), w którym wszystkie zaangażowane w kaskadę enzymy wykazują wysoką aktywność oraz stabilność. W przypadku niezależnie unieruchomionych enzymów, dla poszczególnych enzymów można zastosować inny, specjalnie zoptymalizowany protokół

immobilizacji, wybrać najbardziej odpowiedni nośnik oraz jego modyfikację (grupę funkcyjną na nośniku) [1,2,29,50, 123-126].

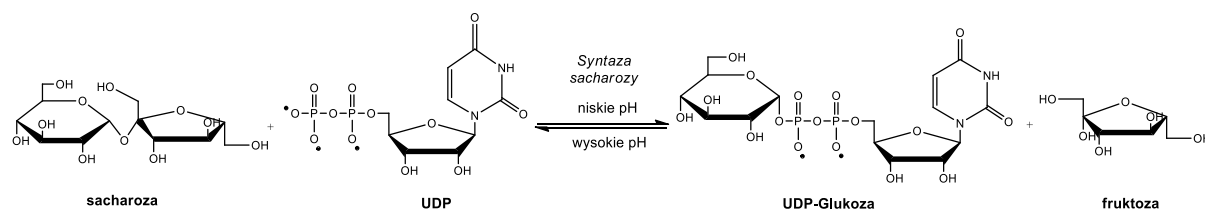
Poniżej przedstawiono przykłady zastosowań kaskad enzymatycznych w wybranych procesach biotransformacji.

4.2.1. Otrzymywanie UDP-glukozy i trehalozy na drodze biotransformacji

4.2.1.1. Enzymatyczna synteza UDP-glukozy

Urydynodifosforan glukozy (UDP-glukoza) jest związkiem o dużym znaczeniu w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Jest on kluczowym prekursorem do syntezy cukrów (w tym trehalozy), oligo- i polisacharydów oraz innych cukrowych pochodnych UDP, m.in. UDP-galaktozy, UDP-ramnozy czy UDP-ksylozy [127-132].

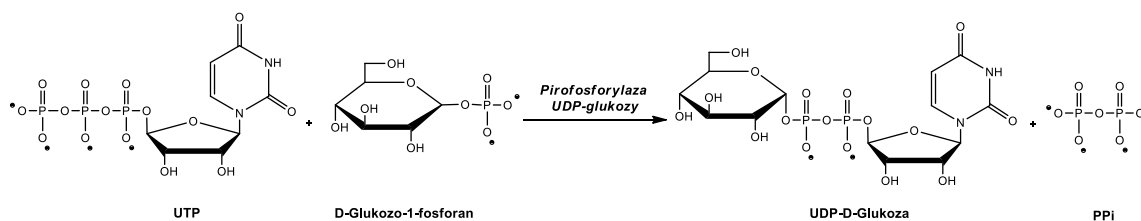
Wśród enzymów katalizujących syntezę UDP-glukozy można wyróżnić syntazę sacharozy (SuSy) oraz pirofosforylazę UDP-glukozy (GalU). SuSy katalizuje odwracalną syntezę sacharozy z UDP z wytworzeniem UDP-glukozy, a odwracalność tej reakcji jest zależna od pH (Rys. 5) [127,132,133].



Rys. 5 Synteza UDP-glukozy wobec syntazy sacharozy

Niższe wartości pH (5,5-7,0) sprzyjają tworzeniu UDP-glukozy, a przy wyższych (7,5–9,0) zachodzi reakcja odwrotna. Dowiedziono, że najlepszym pH, sprzyjającym syntezie UDP-glukozy, jest pH 5,0, w którym stała równowagi (K_{eq}) wynosi 1,14. Wzrost pH do neutralnego bądź lekko alkalicznego znacznie obniża wartość K_{eq} (do 0,1) [132]. Należy również wziąć pod uwagę, że konwersja sacharozy do UDP-glukozy jest termodynamicznie niekorzystna. W takim przypadku konieczne jest stosowanie około 125-krotnego nadmiaru sacharozy w stosunku do UDP, co ze względu na ograniczoną rozpuszczalność sacharozy jest praktycznie niemożliwe [132]. Natomiast w przypadku zastosowania pirofosforylazy UDP-glukozy takie ograniczenia nie istnieją.

Pirofosforylaza UDP-glukozy katalizuje reakcję urydynotrifosforanu (UTP) i glukozy-1-fosforanu, w wyniku czego powstaje UDP-glukoza oraz nieorganiczny pirofosforan (Rys. 6).



Rys. 6 Synteza UDP-glukozy wobec pirofosforylazy UDP-glukozy

Ta grupa enzymów znana jest od lat, jednakże rzadko była wykorzystywana jako biokatalizator do produkcji UDP-glukozy, prawdopodobnie ze względu na niską aktywność właściwą. Jednakże, prowadzone w ostatnich latach prace pod kierunkiem prof. Tischlera, doprowadziły do wyizolowania wysoce aktywnego biokatalizatora. *Kumpf i in.* [131] otrzymali pirofosforylazę UDP-glukozy z *Rhodococcus opacus*, dla której maksymalna szybkość reakcji (V_{max}) wynosiła 177 U/mg (dla UTP), a stała Michaelisa (K_m) 0,51 mM (dla UTP), jednakże enzym ten był niestabilny. Ten sam zespół otrzymał również termostabilną i wysoce aktywną pirofosforylazę UDP-glukozy, wyizolowaną z aktynobakterii *Thermocrisum agreste* DSM 44070, dla której wartość V_{max} wyznaczono na poziomie 1698 U/mg (dla UTP), a K_m 0,15 mM (dla UTP) [130]. Enzym ten był obiektem moich badań.

Podsumowując, ze względu na zależność przebiegu reakcji katalizowanej przez SuSy od pH i wysokiego stężenia substratów, ograniczone jest jej przemysłowe zastosowanie do produkcji UDP-glukozy. Znacznie bardziej korzystne wydaje się być zastosowanie pirofosforylazy, gdzie możliwości aplikacyjne są znacznie szersze.

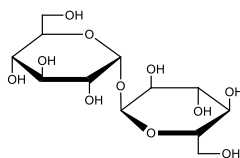
UDP-glukoza jest również substratem dla wielu glikozylotransferaz typu Leloir, w tym transferazy trehalozy, syntazy trehalozy czy α -1,4-galaktozylotransferaz. Jednakże, ze względu na wysoki koszt i słabą dostępność UDP-glukozy, zastosowanie tej grupy enzymów jest ograniczone. Ciekawym rozwiązaniem tego problemu wydaje się być połączenie pirofosforylazy UDP-glukozy z glikozylotransferazami typu Leloir, co umożliwi syntezę *in situ* UDP-glukozy. Przykładowo, *Zhao i in.* [134] zaproponowali połączenie pirofosforylazy UDP-glukozy z galaktokinazą, α -1,4-galaktozylotransferazą (GTs typu Leloir) oraz nieorganiczną pirofosfatazą w wieloenzymatyczną kaskadę enzymatyczną i wykorzystali ją do jednogarnkowej syntezy globotriozy (α -D-galaktopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- β -D-galaktopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozy) i jej pochodnych, jako związków do zastosowań medycznych. W rezultacie otrzymali 3 analogi globotriozy. *Chu i wsp.* [135] podjęli próbę użycia glikozylotransferazy YjiC z *Bacillus licheniformis*, GalU i kinazy octanowej do glikozylacji daunorubicynonu ((8S,10S)-8-acetylo-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,10,11-tetrahydroksy-1-metoksy-5,12-naftacenodionu), z regeneracją UDP-glukozy. W efekcie zsyntetyzowali cukrowe pochodne daunorubicynonu, o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Tę samą kaskadę enzymatyczną wykorzystali również *Shin*

i in. [136] do syntezy cukrowych pochodnych 3,5-dihydroksy-*N*-(4-hydroksyfenilo)benzamidu (Resvera-A). Glikozylacja tego związku (wykazującego działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe) miała na celu zwiększenie jego rozpuszczalności w wodzie, a w konsekwencji poszerzenie możliwości aplikacyjnych w produkcji farmaceutyków i kosmetyków. W efekcie otrzymali dwie pochodne tego związku (Resvero-A 4'-O- α -D-glukozyd oraz 3-O- α -D-glukozyd).

W literaturze nie znalazłam badań z zastosowaniem pirofosforylasy UDP-glukozy w kaskadzie z transferazą trehalozy, a jest to niezwykle interesujący sposób do otrzymywania trehalozy, związku o szerokich możliwościach aplikacyjnych. Takie rozwiązanie zaproponowano w ramach projektu ERA-IB NET, którego miałam przyjemność realizować i stanowi ono tematykę badań niniejszej pracy.

4.2.1.2. Enzymatyczna synteza i możliwości aplikacyjne trehalozy

Trehaloza jest disacharydem zbudowanym z dwóch cząsteczek D-glukozy połączonych wiązaniem α,α -1,1'-O-glikozydowym (Rys. 7).

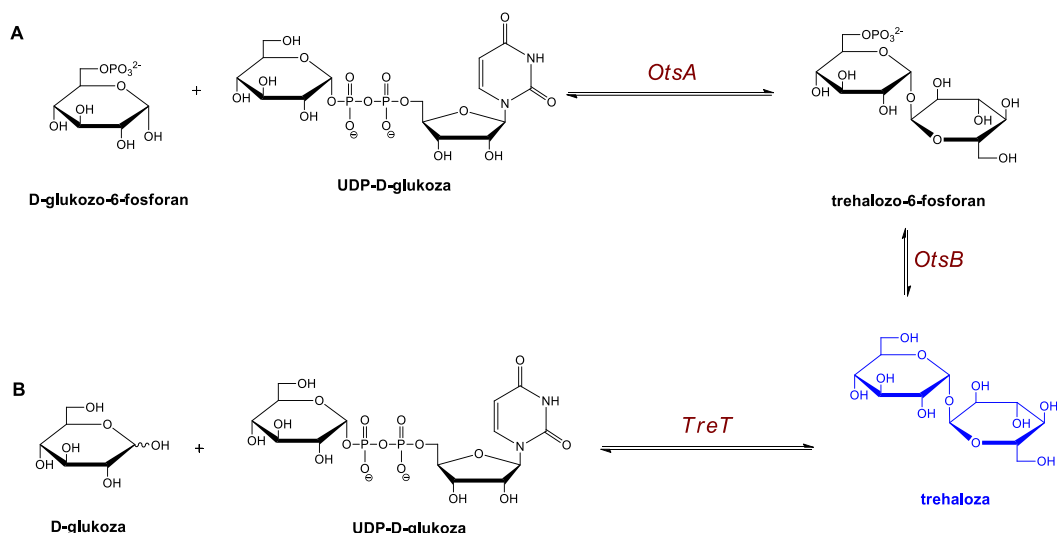


Rys. 7 Struktura trehalozy

Znalazła ona szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym czy kosmetycznym oraz w medycynie. W przemyśle spożywczym dodawana jest podczas suszenia i mrożenia jedzenia. Stosowana jest również jako substancja konserwująca. Redukuje także brzydki zapach i wydłuża okres trwałości produktów spożywczych [137,138]. Jest świetnym zamiennikiem substancji słodzącej dla diabetyków czy osób dbających o wagę [139-141]. W kosmetyce trehaloza stosowana jest jako składnik nawilżający w kremach i balsamach czy jako składnik dezodorantów [137,138,142]. Znalazła również zastosowanie jako substancja pomocnicza leków zawierających białka, takich jak m.in. Advante, Lucentis czy Herceptin [143]. Jest składnikiem kropli do oczu stosowanych w leczeniu syndromu suchego oka [138]. W medycynie trehaloza wykorzystywana jest jako główny składnik roztworów do konserwacji organów i tkanek do transplantacji oraz kriokonserwacji komórek macierzystych, bądź nasienia [137-138]. Co więcej, disacharyd ten przedłuża okres trwałości szczepionek i przeciwciał [138-144]. Istnieją doniesienia, że spożywanie jedzenia zawierającego trehalozę wykazuje korzystny wpływ na regenerację kości i może zapobiec osteoporozie [145,146]. Badania przeprowadzone *in vivo* wykazały również, że trehaloza może znaleźć zastosowanie

w leczeniu zaburzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona lub Huntingtona [147-149].

Ze względu na szerokie możliwości aplikacyjne, opracowanie nowoczesnej, wydajnej i opłacalnej metody produkcji trehalozy stanowi ważny i aktualny temat. Nowe podejścia do produkcji trehalozy dotyczą w głównej mierze biotransformacji enzymatycznych. Znane są również chemiczne metody jej syntezy, jednakże ze względu na wieloetapowość tych metod, konieczność zabezpieczania grup (protekcji/deprotekcji), niskie wydajności produktu oraz brak stereoselektywności katalizatorów chemicznych, są one stosowane sporadycznie. W produkcji na większą skalę, rozpatrywane są tylko procesy biotechnologiczne, angażujące biokatalizatory, które cechują się szeroką regio-, enancjo- i stereoselektywnością. Warto tutaj wymienić biotransformacje wobec syntazy (OtsA) i fosfatazy (OtsB) trehalozo-6 fosforanu oraz transferazy trehalozy (TreT) (Rys. 8).



Rys. 8 Synteza trehalozy wobec syntazy trehalozo-6-fosforanu (OtsA) i fosfatazy trehalozo-6-fosforanu (OtsB) (A) oraz transferazy trehalozy (TreT) (B)

Najbardziej rozpowszechniona ścieżka syntezy trehalozy wykorzystuje dwa enzymy - syntazę trehalozo-6-fosforanu (OtsA) oraz fosfatazę trehalozo-6-fosforanu (OtsB) i składa się z dwóch następujących po sobie etapów (Rys. 8A). W pierwszym z nich OtsA katalizuje reakcję UDP-glukozy z glukoza-6-fosforanem, w wyniku której powstaje trehalozo-6-fosforan, który w dalszym etapie, katalizowanym przez OtsB, ulega defosforylacji do trehalozy. Druga prezentowana ścieżka obejmuje zastosowanie glikozylotransferazy zależnej od cukrowej pochodnej nukleotydu (tzw. glikozylotransferazy typu Leloir) - transferazy trehalozy (TreT), która katalizuje syntezę trehalozy z wykorzystaniem D-glukozy i UDP-glukozy (Rys. 8B). Ta metoda syntezy trehalozy, w odróżnieniu do tej katalizowanej przez OtsA/OtsB, nie wymaga zastosowania glukoza-6-fosforanu, a jedynie taniej i łatwo dostępnej glukozy, a ponadto jest

jednoetapowa i nie wymaga przeprowadzenia dodatkowej defosforylacji nieredukującego disacharydu (trehalozo-6-fosforanu), przez co jest ona szczególnie interesująca do zastosowań w przemyśle, nie tylko do produkcji trehalozy, ale również całej gamy innych glikozydów [127,128,143,150-152].

Na szczególną uwagę zasługuje enzym - transferaza trehalozy wyizolowana z *Thermoproteus uzoniensis*, wykazująca potencjał do sprzęgania szerokiej gamy D- i L-glukopiranoz (m.in. L-allozy, D-galaktozy, D-mannozy czy L-gulozy) z UDP-glukozą, w wyniku czego otrzymuje się analogi trehalozy, z konwersją i enancjoselektywnością powyżej 98% [153].

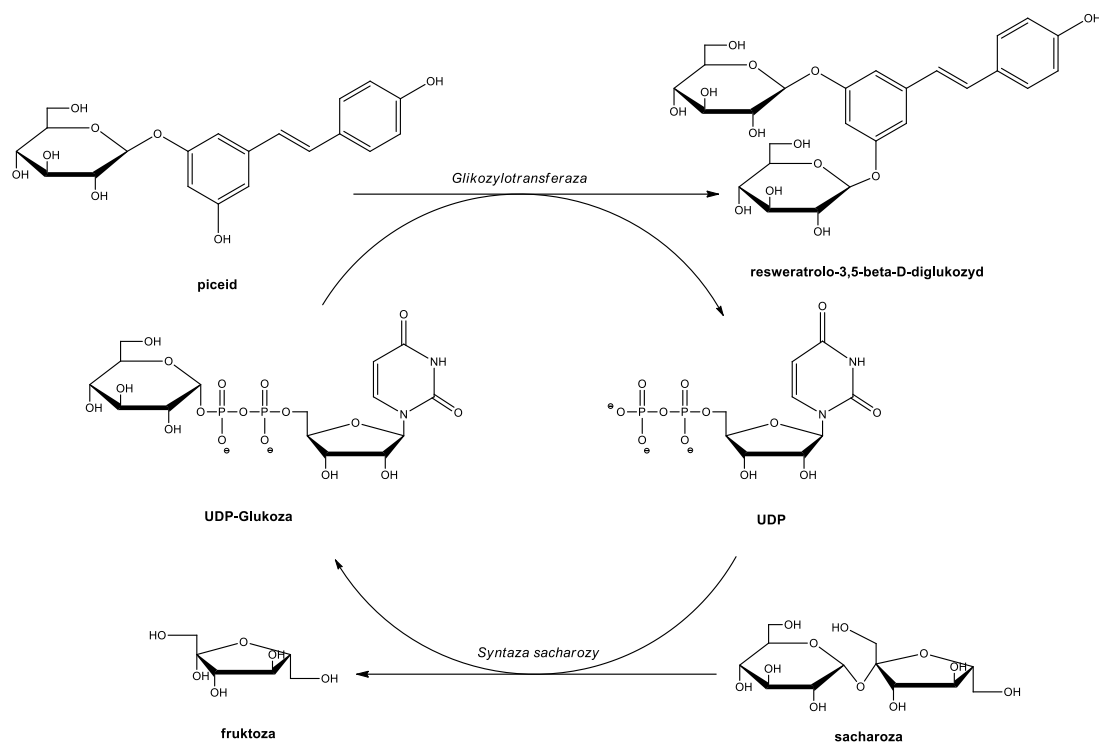
4.2.1.3. *Immobilizacja glikozylotransferaz typu Leloir i enzymów katalizujących syntezę UDP-glukozy (syntazy trehalozy i pirofosforylasy UDP-glukozy)*

Ze względu na fakt, że w literaturze brakuje doniesień opisujących bezpośrednio immobilizację pirofosforylasy UDP-glukozy czy transferazy trehalozy (enzymów będących przedmiotem niniejszej pracy), poniżej przedstawiono przykłady unieruchomienia innych glikozylotransferaz zależnych od cukrowej pochodnej nukleotydu (w tym syntazy sacharozy, katalizującej również syntezę UDP-glukozy).

Pisvejcova i in. [154] unieruchomili kowalencyjnie β -1,4-galaktozylotransferazę na polimerowym nośniku (Eupegrit C250L). Tak przygotowany biokatalizator był stabilny w 13 cyklach reakcyjnych (ok. 40% aktywności początkowej w ostatnim cyklu). Dowiedli również, że enzym ten jest stabilny podczas przechowywania w 4°C przez okres pięciu tygodni [154]. *Orrego i wsp.* [155] zaproponowali z kolei immobilizację syntazy sacharozy (wyizolowanej z *Nitromonas europea*), poprzez wiązanie kowalencyjne na agarozie modyfikowanej grupami aldehydowymi (*ang. glyoxyl agarose*). Proces immobilizacji przeprowadzono w temperaturze 4°C, w pH 10. Otrzymane w ten sposób wielopunktowe wiązanie kowalencyjne doprowadziło do stabilizacji struktury enzymu, w wyniku czego biokatalizator był stabilny termicznie w warunkach reakcji (pH 5 i 45°C). Zaobserwowano jednak, że w zależności od czasu immobilizacji następował spadek aktywności (odpowiednio do 64% przy immobilizacji przez 1 h, lub 5% przy immobilizacji przez 2 h) w stosunku do aktywności przed immobilizacją. Biokatalizator po 1h immobilizacji, jako bardziej aktywny, sprawdzono w procesie otrzymywania UDP-glukozy z sacharozy i UDP. Po 5 h reakcji otrzymano 210 mM UDP-glukozy (wydajność 70%). Taką samą wydajność UDP-glukozy otrzymano w trzech kolejnych cyklach reakcji [155]. Stosując tę samą metodę immobilizacji (nośnik: agarozę modyfikowaną grupami aldehydowymi, pH 10, temperatura 4°C i 2 h) *Trobo-Maseda i in.* [156] unieruchomili syntazę sacharozy wyizolowaną z *Acidithiobacillus caldus*. W rezultacie otrzymali znacznie bardziej aktywny biokatalizator (95% aktywności w stosunku do tej przed immobilizacją), jednakże nie był on

stabilny w warunkach reakcji (pH 5 i 45°C) - po 5 h inkubacji wykazywał jedynie ok. 40% aktywności początkowej. Dodatkowo, zaproponowali więc pokrycie biokatalizatora polimerami: dekstranem i polietylenoiminą (w celu usieciowania enzymu). W wyniku tego stabilność tak zmodyfikowanego biokatalizatora wzrosła 340-krotnie, w porównaniu do nieusieciowanego biokatalizatora. Co więcej, wykazywał stabilność w co najmniej pięciu cyklach syntezy UDP-glukozy [156]. Badania nad immobilizacją transferazy trehalozy opisali natomiast *Mestrom i in.* [156]. Zaproponowali oni immobilizację kowalencyjną transferazy trehalozy na nośniku polimerowym z grupami epoksydowymi (Immobead-150A). Stabilność termiczną tak otrzymanego biokatalizatora zbadano w temperaturze 60°C. Po 2 h inkubacji immobilizowany enzym stracił ok. 35% aktywności początkowej, podczas gdy jego natywna forma zachowała swoją aktywność. Autorzy zasugerowali, że obserwowany spadek aktywności dla immobilizowanego enzymu jest spowodowany obecnością nieprzereagowanych grup epoksydowych na nośniku. W wyższych temperaturach (temperatura reakcji 60°C) mogą powstać dodatkowe wiązania kowalencyjne pomiędzy nośnikiem a enzymem, ograniczające ruchliwość strukturalną lub powodujące denaturację enzymu. Wprawdzie natywna transferaza trehalozy cechowała się lepszą aktywnością, jednak na korzyść immobilizowanego enzymu przemawiała możliwość ponownego wykorzystania. Sprawdzono możliwość recyklu enzymu unieruchomionego na Immobead-150A, w temperaturze 60°C. W ciągu pierwszych 3 cykli, enzym ulegał częściowej dezaktywacji, ze względu na nieprzereagowane grupy epoksydowe na powierzchni nośnika, jednakże w dalszych cyklach (3-10) obserwowano stabilne działanie biokatalizatora [157].

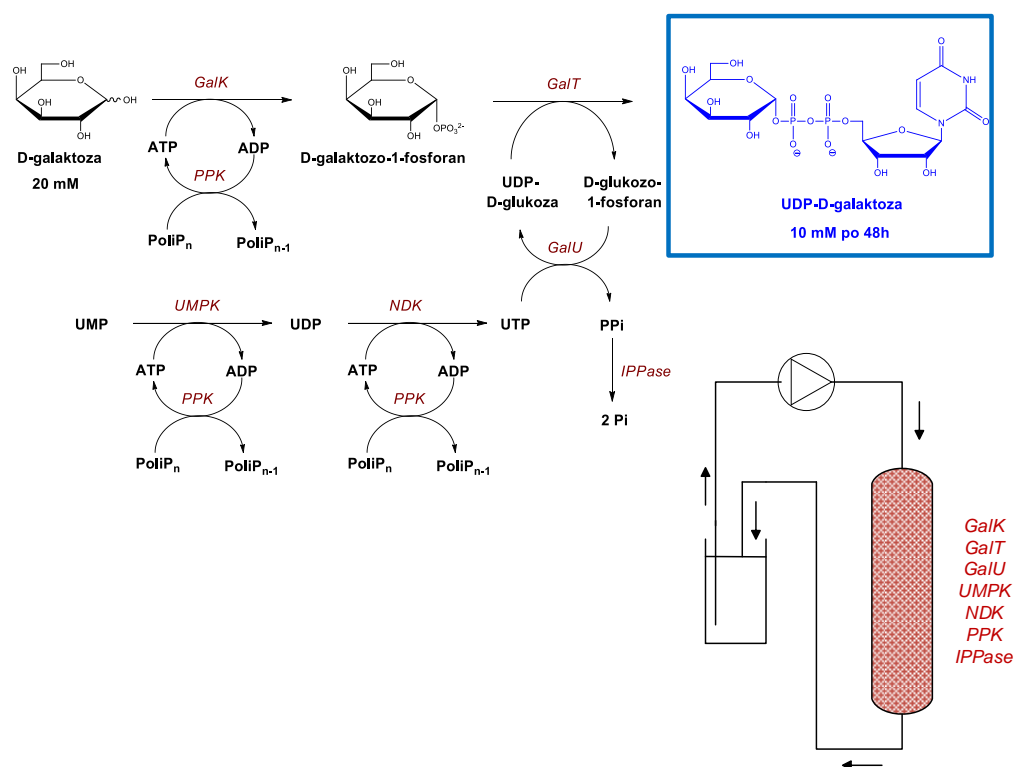
Można więc stwierdzić, że immobilizacja glikozylotransferaz typu Leloir zazwyczaj poprawia ich stabilność termiczną, ale przede wszystkim umożliwia ich wielokrotne wykorzystanie. Należy jednak podkreślić, że oprócz kilku publikacji, tematyka ta była rzadko poruszana. Również przykłady immobilizacji, a potem wykorzystania wieloenzymatycznych kaskad z udziałem tej grupy enzymów są raczej nieliczne. W 2020 roku *Trobo-Maseda i wsp.* [158] podjęli próbę współimmobilizacji glikozylotransferazy GT UGT71A15 z jabłka i syntazy sacharozy wyizolowanej z *Acidithiobacillus caldus* do regioselektywnej glikozylacji resweratrolu-3-O-β-D-glukozydu (piceidu), z regeneracją *in situ* kofaktora (UDP-glukozy) (Rys. 9). Jako nośnik zastosowano kulki agarozowe aktywowane polietylenoiminą (PEI).



Rys. 9 Glikozylacja piceidu katalizowana przez immobilizowaną glikozylotransferazę, sprzężona z regeneracją *in situ* UDP-glukozy, katalizowaną przez immobilizowaną syntazę sacharozy

Takie rozwiązanie pozwoliło na silną adsorpcję enzymów immobilizację obu enzymów, przy zachowaniu praktycznie całkowitej ich aktywności oraz zapewniło lepszą stabilność całego systemu. System ten został przetestowany w dziesięciu kolejnych cyklach reakcji. Według *Trobo-Maseda i wsp.* [158] kolokalizacja enzymów na nośniku, a tym samym występowanie miejsc aktywnych obu enzymów w niedalekiej odległości, sprzyja regeneracji kofaktora. UDP-glukoza używana przez glikozylotransferazę jest natychmiast regenerowana przez syntazę sacharozy, a cały proces zachodzi wewnątrz porowatego nośnika. Zgodnie z przedstawionymi wynikami, szybkość glikozylacji wzrosła pięćdziesięciokrotnie w porównaniu do przypadku, gdy enzymy nie znajdowały się blisko siebie wewnątrz struktury nośnika [158]. Do podobnych wniosków doszli również *Liu i in.* [159]. Zaproponowana przez nich współimmobilizacja glikozylotransferazy i syntazy sacharozy na anionowym porowatym nośniku (żywicy Relisorb SP400), pozwoliła uzyskać prawie 2,5-krotnie lepszą wydajność w reakcji syntezy notofaginy (3'-C-β-D-glukopiranozyd 2',4,4',6'-tetrahydroksydihydrochalkonu) w porównaniu do wydajności otrzymanej przez enzymy immobilizowane na osobnych porcjach nośnika. Dodatkowo, współimmobilizowane biokatalizatory wykazywały dobrą stabilność procesową w co najmniej 15 kolejnych cyklach reakcji (ok. 40% aktywności początkowej po 15 cyklu). Otrzymane biokatalizatory zostały również przetestowane w przepływie ciągłym (w reaktorze z upakowanym złożem). W porównaniu do wcześniej stosowanego systemu okresowego, upakowanie złoża umożliwiło zwiększenie ilości biokatalizatora, a co za tym idzie,

ponad pięciokrotne zwiększenie produktywności [160]. Po 2 h uzyskano całkowitą konwersję substratu (dihydrochalkonu) [160], podczas gdy w systemie okresowym ten sam wynik osiągnięto po ok. 12 h [159]. Co więcej, biokatalizator był stabilny przez ok 210 h ciągłej pracy. Z kolei do syntezy UDP-D-galaktozy z D-galaktozy i UDP-D-glukozy, połączonej z regeneracją *in situ* kofaktorów, Liu i wsp. [161] skonstruowali reaktor kolumnowy z upakowanym złożem. Złoże katalityczne stanowiło aż siedem enzymów (w tym pirofosforylaza UDP-glukozy), unieruchomionych na kulkach agarozowych. Mieszanka reakcyjna zawierała równomolowe ilości (20 mM) D-galaktozy i urydynomonofosforanu (UMP), a także katalityczne ilości (tj. 2 mM) adenozynotrifosforanu (ATP) oraz D-glukozy-1-fosforanu, potrzebne do regeneracji kofaktorów (ATP i UDP-D-glukozy). Polifosforan (poliP) zastosowano jako tanie alternatywne źródło energii, a jedynym produktem ubocznym powstającym w reakcji były nieorganiczne fosforany. Mieszaninę reakcyjną recyrkulowano, dzięki czemu wielokrotnie przepływała ona przez złoże z unieruchomionymi enzymami (Rys. 10).



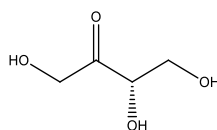
Rys. 10 Synteza UDP-galaktozy katalizowana przez wieloenzymatyczną immobilizowaną kaskadę, w reaktorze ze złożem upakowanym. GalK- galaktokinaza, GalT – urydynylotransferaza galaktozo-1-fosforanu, GalU – pirofosforylaza UDP-glukozy, UMPK – kinaza urydynomonofosforanu, NDK – kinaza difosforanu nukleotydu, PPK – kinaza polifosforanowa, IPPase – nieorganiczna pirofosfataza

Immobilizacja kaskady enzymatycznej na kulkach agarozowych wpłynęła na znaczną poprawę stabilności enzymów, w porównaniu do ich natywnej formy i umożliwiła ciągłe prowadzenie procesu przez 48 h. Po tym czasie otrzymano 10 mM UDP-D-galaktozy (50% wydajności). [161]. Podsumowując, połączenie immobilizowanych enzymów w kaskadę enzymatyczną nie tylko

polepsza stabilność enzymów, ale również umożliwia otrzymanie znacznie lepszych wydajności produktu końcowego w porównaniu do pojedynczych enzymów.

4.2.2. Otrzymywanie L-erytrulozy na drodze biotransformacji

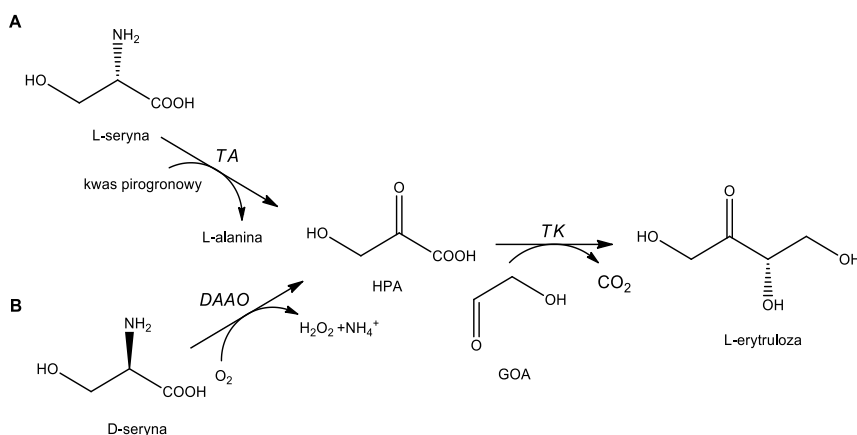
L-erytruloza (3S-1,3,4-trihydroksybutan-2-on, Rys. 11) należy do czterowęglowych hydroksyketoz. Ma postać, lepkiej cieczy o żółtym zabarwieniu i charakterystycznym zapachu. Jest dobrze rozpuszczalna w wodzie. Stosowana jest jako składnik aktywny samoopalaczy. W odróżnieniu do powszechnie stosowanego dihydroksyacetonu (DHA), znacznie wolniej przenika przez warstwę rogową naskórka, dzięki czemu możliwe jest równomierne rozprowadzenie preparatu, a skóra nabiera bardziej naturalnego koloru. Ponadto, jej zastosowanie pozwala zmniejszyć ryzyko wywołania reakcji alergicznej oraz wysuszenia skóry, co często pojawia się podczas stosowania preparatów z DHA. L-erytruloza może być wykorzystywana również jako prekursor do syntezy acetonidu aldehydu glicerynowego, który służy do otrzymywania różnych związków biologicznie czynnych np. związku przeciwgrzybiczego o nazwie Tanikolid, czy modulatora cytokin o nazwie Cytaxozone. L-erytruloza jest również prekursorem do syntezy chiralnych aminoalkoholi (jak np. 2-amino-1,3,4-butanotriol) czy L-erytrozy [162,163].



Rys. 11 Struktura L-erytrulozy

Jedną z metod syntezy L-erytrulozy jest reakcja enzymatyczna katalizowana przez transketolazę (TK) wyizolowaną z *Geobacillus stearothermophilus*, wykorzystującą β -hydroksypirogronian litu (Li-HPA) oraz aldehyd glikolowy jako substraty [164]. Transketolaza jest enzymem zależnym od kofaktorów - difosforanu tiaminy (ThDP) oraz dwuwartościowych jonów metali (np. Mg^{2+}). Enzym ten katalizuje przeniesienie grupy karbonylowej z hydroksypirogronianu (będącego donorem tej grupy) na akceptor (aldehyd), co prowadzi do powstania ketoz (w tym L-erytrulozy), o konfiguracji absolutnej (3S), przez stereoselektywne wytworzenie wiązania C-C, z wydzieleniem CO_2 [165,166]. Głównym problemem podczas reakcji katalizowanej przez TK jest cena komercyjnego Li-HPA. 1 g tego związku o czystości $\geq 97\%$ kosztuje 994,00 zł [167]. Związek ten może być otrzymywany na drodze chemicznej, z toksycznego kwasu bromopirogronowego, w obecności wodorotlenku litu, jednakże z niewielką wydajnością, a dodatkowo konieczny jest złożony proces oczyszczania [166]. Co więcej, *Lorilliere i in.* dowiedli, że zastosowanie kofaktorów niezbędnych dla aktywności TK (ThDP i $MgCl_2$) oraz temperatury powyżej $20^\circ C$, przyczynia się do rozpadu Li-HPA do kwasu

glikolowego. W związku z tym zaproponowano jego syntezę *in situ* z L-seryny, katalizowanej przez transaminazę (TA) (Rys. 12A) [166] lub z D-seryny, wobec oksydazy D-aminokwasowej (DAAO) (Rys. 12B) [168].



Rys. 12 Synteza *in situ* HPA wobec TA (A) lub DAAO (B) sprzężona z syntezą L-erytrulozy wobec TK

Takie rozwiązanie (sprzężenie syntezy HPA z reakcją katalizowaną przez TK), pozwala uniknąć akumulacji HPA w mieszaninie reakcyjnej i zoptymalizować proces syntezy L-erytrulozy. W przypadku stosowania TA do syntezy HPA, konieczne jest użycie, oprócz L-seryny, drugiego substratu - kwasu pirogronowego, generującego dodatkowy produkt uboczny (L-alaninę). Co więcej, przesunięcie równowagi reakcji w stronę produkcji hydroksypirogronianu, wymaga zastosowania nadmiaru jednego z tych substratów (L-seryny, bądź kwasu pirogronowego). Nadmiar HPA z kolei powoduje inhibicję TA [166]. *Lenfant i wsp.* [168] zaproponowali strategię opierającą się na zastosowaniu oksydazy D-aminokwasowej (DAAO), wyizolowanej z drożdży *Rhodotorula gracilis*. Enzym ten katalizuje syntezę HPA z D-seryny i tlenu. W odróżnieniu do DAAO pozyskanego z innych źródeł, ten pozyskany z drożdży cechuje się dobrą stabilnością w szerokim zakresie temperatur i pH. Zaletą zastosowania DAAO do syntezy HPA jest nieodwracalność reakcji oraz brak konieczności zastosowania dodatkowego substratu. Oprócz pożądanego produktu (HPA) w reakcji tej powstaje również nadtlenek wodoru oraz amoniak. Ze względu na możliwość inhibicji DAAO, w przypadku nagromadzenia się nadtlenu wodoru, do kaskady wprowadzono dodatkowy enzym - katalazę, zdolną do dysmutacji tego produktu ubocznego do wody i tlenu. Zastosowanie wieloenzymatycznej kaskady, składającej się z natywnych enzymów: DAAO, katalazy oraz TK pozwoliło na otrzymanie L-erytrulozy z wydajnością 67% (e.e.>95%) [168]. Ponadto kaskada ta została przetestowana do syntezy innych cennych związków, jak fruktoza, L-sorboza, D-altroheptuloza czy D-ksyluloza, z D-seryny i odpowiednich aldehydów, z dobrymi wydajnościami i wysoką enancjo- lub diastereoselektywnością.

4.2.2.1. Immobilizacja oksydazy D-aminokwasowej, katalazy i transketolazy

Jedną z głównych przeszkód w stosowaniu oksydazy D-aminokwasowej (DAAO) czy transketolazy (TK) na większą skalę jest ich niska stabilność. Ze względu na duży potencjał aplikacyjny tych enzymów, przetestowano różne metody immobilizacji. Uzyskano znaczną poprawę ich stabilności, ale przede wszystkim, co ma szczególne znaczenie w przemyśle, biokatalizatory takie można było wykorzystywać wielokrotnie. *Kuan i wsp.* [169] opisali immobilizację DAAO z *Rhodotorula gracillis* na magnetycznych kulkach, funkcjonalizowanych niklem. Immobilizacja przyczyniła się do polepszenia stabilności termicznej biokatalizatora. Względna aktywność immobilizowanego enzymu po 1 h inkubacji w 50°C wynosiła 56%, podczas gdy natywna forma enzymu po tym czasie była całkowicie nieaktywna. Co więcej, immobilizowany enzym znacznie wolniej ulegał inaktywacji nadtlakiem wodoru, w porównaniu do jego natywnej formy. Po 9 h inkubacji w 10 mM H₂O₂, pozostała aktywność wynosiła odpowiednio 72% (forma immobilizowana) i 22% (forma natywna). Zbadano również możliwość ponownego wykorzystania immobilizowanej DAAO w kolejnych 20 cyklach. Obserwowano stopniowy spadek aktywności unieruchomionego enzymu, aż do 37% aktywności początkowej w 20 cyklu. Według Autorów, spadek ten jest prawdopodobnie wynikiem inaktywacji enzymu w obecności H₂O₂ [169]. Podobne obserwacje poczynili również *Wang i wsp.* [170], którzy unieruchomili DAAO z *Rhohosporidium toruloides* na mezoporowatej krzemionce. Obserwowali oni stopniowy spadek aktywności unieruchomionego enzymu, aż do 30% aktywności początkowej po 6 cyklach. *Dang i wsp.* [171] zaproponowali immobilizację DAAO na nośnikach krzemionkowych (SBA-15, MCF i MCM-41), modyfikowanych 3-aminopropylotrietoksylanem. Najlepszym wariantem okazała się immobilizacja na nośniku typu MCF, z zastosowaniem aldehydu glutarowego jako linkera. Sprawdzono możliwość recyklu tak przygotowanego biokatalizatora. Cechował się on dobrą stabilnością w siedmiu kolejnych cyklach reakcyjnych, a niewielki spadek (z 87% konwersji cefalosporyny C w 1 cyklu do ok. 70% w 7 cyklu), według Autorów wynikał z częściowej utraty biokatalizatora w każdym cyklu [171]. *Li i wsp.* [172] unieruchomili DAAO i katalazę osobno na wielościennych nanorurkach węglowych. Możliwości katalityczne obu enzymów sprawdzili w reakcji utleniającej deaminacji D-alaniny wobec DAAO, a wytworzony nadtlak wodoru (produkt uboczny) był rozkładany wobec katalazy. Autorzy dowiedli, że stosowanie razem obu unieruchomionych enzymów przyczyniło się do ponad pięciokrotnej poprawy wydajności katalitycznej, w stosunku do wolnej DAAO. Do tych samych wniosków doszli również *Fernandez-Lafuente i in.* [173]. Ponadto, dowiedli oni, że współimmobilizacja obu tych enzymów wewnątrz jednego nośnika (agarozy) jest znacznie bardziej efektywna i pozwala na stabilną pracę układu bez utraty

aktywności, przez 40 cykli reakcyjnych, podczas gdy sama unieruchomiona DAAO już po 20 cyklach straciła ponad połowę swojej aktywności początkowej.

Transketolazę (TK) z kolei immobilizowano wewnątrz kapilary ze stopionej krzemionki (mikroreaktora), funkcjonalizowanej niklem. Enzym ten wykazywał stabilność przez ponad 96 h ciągłej pracy [174]. Bardzo dobrą stabilność TK po immobilizacji odnotowali również *Halim i wsp.* [175]. Zastosowali oni ten sam sposób specyficznej immobilizacji, jednakże jako nośnik zastosowali kulki agarozowe, które stanowiły wypełnienie do reaktora kolumnowego z upakowanym złożem. Stabilność tak otrzymanego biokatalizatora testowano przez 48 h ciągłej pracy: przez pierwsze 12 h obserwowano 100% wydajność produktu, po czym obniżyła się ona do 76% po 48 h reakcji. Ponadto, TK wyizolowaną z *Saccharomyces cerevisiae*, unieruchomiono również na magnezowo-glinowych podwójnych wodorotlenkach warstwowych (z ang. MgAl layered double hydroxides), stosując adsorpcję lub współstrącanie [176]. Przy zastosowaniu enzymu immobilizowanego tą drugą metodą uzyskano znacznie wyższą aktywność (ok. 95% konwersji HPA, w porównaniu do 40% uzyskanej dla enzymu immobilizowanego metodą adsorpcji) i stabilność biokatalizatora (>95% konwersja HPA w 6 cyklach reakcji, podczas gdy dla enzymu zaadsorbowanego na nośniku konwersja obniżyła się z 40% po 1 cyklu do ok. 5% po 6 cyklu). Do tych samych wniosków doszli również *Touissni i in.* [177], unieruchamiając transketolazę z *Escherichia coli*. Najwyższą aktywność (12 U/mg nośnika) Autorzy zaobserwowali stosując koprecypitację.

W literaturze nie znaleziono natomiast doniesień na temat immobilizacji wszystkich trzech opisywanych enzymów równocześnie (DAAO, katalazy oraz TK).

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

5. Materiały i metody

5.1. Stosowane odczynniki

W Tabeli 2 zestawiono stosowane w pracy odczynniki i substancje pomocnicze oraz źródła ich pochodzenia.

Tabela 2 Stosowane odczynniki i źródła ich pochodzenia

Odczynniki	Producent/ źródło
(3-aminopropyl)trimetoksysilan (97%), (3-glicydoksypropyl)trimetoksysilan (98%), n-oktylotrietoksysilan (97%), acetonitryl (99,9%), diwodorofosforan potasu (99%), poli(glikol etylenowy) 35 000, tetraetoksysilan (TEOS, 98%), toluen (99,5%) aldehyd glikolowy (dimer), hydroksypirogronian litu (monohydrat, 97%), odczynnik Lowry'ego, odczynnik Folina-Ciocaltau (2 N), kwas lewulinowy (98%), eter diizopropylowy (98,5%), Pluronic 123, 1,3,5-trimetylobenzen (TMB, 99%)	Sigma-Aldrich
Aldehyd glutarowy (25%,cz), etanol (96%, czda), kwas chlorowodorowy (35-38%, czda), kwas octowy (80%, czda), octan sodu (trihydrat, czda), tris (hydroksymetylo)aminometan (97%), woda amoniakalna (25%, czda), kwas azotowy(V) (65%, czda), TRITON X-100, n-butanol (99,5%, czda), heksan (95%), aceton (99%), chloroform (czda), fluorek amonu (czda)	Avantor Performance Materials (dawniej POCH)
Chlorek magnezu (bezwodny, 99%), glukozo-1-fosforan (98%), chlorek sodu (czda)	Alfa Aesar
Wodorofosforan sodu (12.hydrat, czda)	Merck
HEPES	Fluka
UDP-glukoza (98%), urydynotryfosforan (UTP, 97%)	Carbosynth
Bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB, 99%), D-seryna (98%), octan <i>p</i> -nitrofenylu (<i>p</i> -NPA, 97%), Bengal Rose (85%)	Acros Organics
Pirofosforan tiaminy	Glentham Life Science
Wodorotlenek sodu (czda), octan amonu (czda)	Chempur

Enzymy stosowane w badaniach:

lipazę B z *Candida antarctica* oraz katalazę z wątroby bydłowej zakupiono w Sigma-Aldrich, pirofosforylazę UDP-glukozy wyizolowaną z *Thermocrisium agreste* otrzymano dzięki uprzejmości prof. Dirka Tischlera z Ruhr Universität (Bochum), w ramach współpracy w projekcie ERA-NET IB,

transketolazę z *Geobacillus stearothermophilus*, oksydazę D-aminokwasową z *Rhodotorula gracilis* (oraz związek L-erytrulozę) otrzymano dzięki uprzejmości prof. Laurence Hecquet z Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand,

Novozym 435 otrzymano dzięki uprzejmości firmy Novozymes.

5.2. Stosowany sprzęt

W Tabeli 3 przedstawiono wykaz zastosowanej aparatury.

Tabela 3 Stosowany sprzęt

Sprzęt	Producent
Chromatograf gazowy (GC) 6890 N wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny	Agilent
Wysokosprawny chromatograf ciekłowy (HPLC) 1200 Series wyposażony w różnicowy detektor refraktometryczny (RID) oraz w diodowy detektor UV-Vis (DAD)	Agilent
Spektrofotometr UV/Vis U-2800A	HITACHI
Titratore TitroLine 7000 wyposażony w elektrodę pH InLab Reach 225 (Mettler-Toledo)	SI Analytics
Mieszadło magnetyczne z kontrolą temperatury MR Hei-Tec; Mieszadło mechaniczne Hei-Torque	Heidolph
Waga analityczna EX125D	OHAUS
Waga analityczna ATL-224-V	Acculab
Pompa infuzyjna jednostrzykawkowa AP14	Ascor
Wytrząsarka wielofunkcyjna (inkubator z wytrząsaniem i chłodzeniem) SI-1202	Enviro-Genie
Reaktor z wirującym złożem (objętość 250 ml)	SpinChem®
Spektrofotometr Direct Detect™ Quantitation System	Merck Millipore
pH-metr CP-401 wyposażony w elektrodę EPP-1	Elmetron

5.3. Synteza monolitów krzemionkowych (MH)

Monolity krzemionkowe otrzymano według metody opisanej w literaturze [49,74]. W skrócie, poli(glikol etylenowy) 35 000 (PEG, 8,67 g) rozpuszczono w 100 ml 1 M kwasu azotowego (V). Następnie wkroplono 82,8 ml tetraetoksyilanu (TEOS), po czym dodano 3,8 g bromku heksadecylotrimetyloamoniowego (CTAB). Otrzymany żółty zółty zółty dokładnie wymieszano, a następnie rozlano do odpowiednich form: po 50 µl do małych stożkowych dołków płytek wielodołkowych (w celu otrzymania form stożkowych) lub specjalnych form o kształcie walca o średnicy 4 lub 6 mm i długości 5 cm (stanowiących rdzeń do mikroreaktora przepływowego),

bądź o średnicy 2 mm i długości 5 cm. Żoł pozostawiono do żelowania i starzenia przez 7 dni (lub 10 dni w przypadku długich walców), w temperaturze 40°C. Następnie monolity poddano obróbce hydrotermalnej w 1 M roztworze amoniaku, przez 9 h, w temperaturze 90°C, po czym próbki przepłukano wodą, wysuszono w temperaturze pokojowej i kalcynowano w temperaturze 550°C przez 10 h.

5.4. Synteza mezoporowatych pianek komórkowych (MCF)

2 g związku powierzchniowo czynnego (Pluronic 123) rozpuszczono w mieszaninie 60 ml 2 M HCl oraz 15 ml wody destylowanej. Następnie dodano 0,023 g fluorku amonu, po czym wkraplano 5,8 ml 1,3,5 trimetylobenzenu (TMB). Otrzymany roztwór mieszano pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze 40°C, przez 1 h. Po tym czasie dodano 4,7 ml tetraetoksyilanu (TEOS) i kontynuowano mieszanie pod chłodnicą zwrotną, w 40°C, przez kolejną godzinę. Następnie otrzymaną zawiesinę przelano do teflonowych pojemników i termostatowano w 40°C przez 20 h, a następnie w 100°C przez 24 h. Tak przygotowaną zawiesinę sączono na lejku Buchnera. Uzyskany osad przepłukano wodą destylowaną, wysuszono w temperaturze pokojowej i kalcynowano w temperaturze 550°C przez 8 h.

5.5. Funkcjonalizacja nośników krzemionkowych

Przed procesem funkcjonalizacji nośniki krzemionkowe wygrzewano przez ok. 2 h, w temperaturze 200°C, celem desorpcji zaadsorbowanych cząsteczek wody. Następnie 1 g nośników krzemionkowych (MH lub MCF) zalano roztworem odpowiedniego organosilanu w toluenie. Mieszaninę termostatowano (85°C) pod chłodnicą zwrotną, przez 24 h (MCF) lub 72 h (MH), ciągle mieszając. Szczegółowe proporcje reagentów zestawiono w Tabeli 4.

Tabela 4 Proporcje reagentów stosowane do funkcjonalizacji nośników krzemionkowych

Rodzaj nośnika	Rodzaj wprowadzanych grup funkcyjnych/ prekursor	Ilość wprowadzanych grup funkcyjnych [mmol/g _{nośnika}]/ [ml _{prekursora} /g _{nośnika}]	Ilość rozpuszczalnika (tolenu) [ml/g nośnika]
MH-A	Grupy aminowe/(3-aminopropyl)trimetoksyilan	1,5/0,27	32,5
MH-O	Grupy oktylowe/n-oktylotrietoksyilan	1,5/0,49	32,5
MH-OA	O: Grupy oktylowe/n-oktylotrietoksyilan, A: Grupy aminowe/(3-aminopropyl)trimetoksyilan	O: 0,75/0,24, A: 0,75/0,13	32,5
MCF-A	Grupy aminowe/(3-aminopropyl)trimetoksyilan	1,5/0,27	25
MCF-E	Grupy epoksydowe/(3-glicydoksypropyl)trimetoksyilan	1,5/0,34	25

5.6. Charakterystyka nośników

Strukturę zsyntetyzowanych nośników scharakteryzowano wykorzystując techniki opisane poniżej.

Do określenia wielkości porów w zakresie makroporów zastosowano porozymetrię rtęciową (Quantachrome Pore Master 60). Analizę wykonał dr inż. Radosław Lach z Polskiego Towarzystwa Ceramicznego w Krakowie.

Parametry strukturalne materiałów wyznaczono stosując niskotemperaturową adsorpcję azotu (Micromeritics ASAP 2020). Powierzchnię właściwą określono z wykorzystaniem pięciopunktowej metody BET (Brunauer – Emmett - Teller) wykorzystującą dane dla adsorpcji pod ciśnieniem względnym (p/p_0) w zakresie 0,1-0,25, zaś objętość mezoporów obliczono na podstawie algorytmu BJH (Barrett – Joyner - Halenda).

Ogólną strukturę MH obserwowano z zastosowaniem skaningowego mikroskopu transmisyjnego (Hitachi TM3000), a MCF przy pomocy mikroskopu elektronowego (JOEL JEM 2000FX).

Ilość grup funkcyjnych wyliczono dzięki wynikom otrzymanym z analizy elementarnej węgla, wodoru, azotu i tlenu (CHNS) (LECO TruSpec Micro), wykonanej przez mgr inż. Wojciecha Urbańczyka, doktoranta Politechniki Śląskiej.

Wprowadzenie grup funkcyjnych potwierdzono wykorzystując spektroskopię fourierowską w podczerwieni (FTIR) (Nicolet iS50 firmy ThermoScientific). Próbki (5% masy próbki) ucierano z KBr, suszono i poddawano analizie.

Hydrofobowość modyfikowanych nośników określono poprzez adsorpcję hydrofobowego barwnika rózu bengalskiego na powierzchni nośnika, wykorzystując metodę opisaną przez *Vescovi i wsp.* [121]. W skrócie, 0,1 g rozdrobnionych nośników zawieszono w 2 ml roztworu rózu bengalskiego w wodzie (320 $\mu\text{g/ml}$) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po tym czasie próbki odwirowano (9000 rpm, 20 min, temperatura pokojowa). Zmierzono absorbancję supernatantu przed i po inkubacji, przy długości fali 548 nm. Ilość zaadsorbowanego barwnika obliczono z przygotowanej krzywej wzorcowej ($y=0,0076x$, gdzie $R^2=0,9989$). Dla każdej próbki wykonano trzy powtórzenia.

5.7. Immobilizacja enzymów na sfunkcjonalizowanych nośnikach krzemionkowych

W ramach pracy stosowano kowalencyjną i adsorpcyjną metodę immobilizacji opisaną w literaturze [6,178,179]. Pierwszym etapem było przygotowanie nośnika. W tym celu sfunkcjonalizowane krzemionki przemywano kolejno: etanolem i wodą destylowaną. Każdorazowo stosowano po ok. 100 ml etanolu, wody lub buforu, a każdy etap trwał 30 min i był

powtarzany trzykrotnie. Następnie, w zależności od grupy funkcyjnej nośnika i immobilizowanego enzymu, stosowano następujące procedury:

5.7.1. Immobilizacja lipazy na nośnikach funkcjonalizowanych grupami oktylowymi (MH-O)

Przed immobilizacją lipazy, nośnik MH-O (w formie stożków o wymiarach 5,1 x 3,3 mm, 1 g) przemyto 0,1 M buforem fosforanowym (pH 7,0, 3 x 100 ml, mieszanie przez 30 min), po czym inkubowano w 3,75 ml roztworu lipazy (4,4 mg białka/ml) w 0,1 M buforze fosforanowym, o pH 7,0, przez 3 h, w temperaturze 25°C, a następnie przez noc w 6°C. Po tym czasie nośnik przemyto buforem fosforanowym (0,1 M, pH 7,0, 1x 100 ml, mieszanie przez 30 min), odsączono i wysuszono pod próżnią w temperaturze 4°C.

5.7.2. Immobilizacja lipazy na nośnikach funkcjonalizowanych grupami oktylowymi i aminowymi (MH-OA) lub aminowymi (MH-A)

W przypadku nośników zawierających grupy aminowe (MH-OA i MH-A, w formie stożków o wymiarach 5,1 x 3,3 mm, 1 g), proces immobilizacji enzymu musi poprzedzić aktywacja grup aminowych aldehydem glutarowym (inkubacja w 100 ml 2,5% (v/v) roztworu aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0, przez 3 h). Nadmiar aldehydu odmyto wodą destylowaną. Kolejnym etapem była immobilizacja enzymu. W tym celu aktywowany nośnik inkubowano w 3,75 ml roztworu lipazy (4,4 mg białka/ml) w buforze fosforanowym (0,1 M, pH 7,0), przez 3 h, w temperaturze 25°C i kontynuowano w 6°C przez noc. Nadmiar białka wymyto według metody opisanej w literaturze [52]: 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0 (3 x 100 ml; mieszanie przez 30 min), 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0 zawierającym 0,5 M NaCl (1 x 100 ml, mieszanie przez 45 min), 0,1 M buforem octanowym o pH 4,5 (1 x 100 ml, mieszanie przez 1 h) i ostatecznie wodą destylowaną (3 x 100 ml, mieszanie przez 30 min). W celu zablokowania nieprzereagowanych, aktywnych grup funkcyjnych na powierzchni nośnika, nośnik inkubowano w 0,5 M buforze Tris-HCl o pH 7,8 (100 ml) przez noc, w temperaturze 4°C, po czym bufor Tris-HCl odmyto wodą destylowaną (2 x 100 ml przez 30 min) oraz 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0 (1 x 100 ml przez 30 min). Ostatecznie monolity odsączono i suszono pod próżnią w temperaturze 4°C.

5.7.3. Dobór pH immobilizacji TaGalU

Wpływ pH na efektywność procesu immobilizacji badano dla TaGalU, unieruchamiając ją na nośniku typu MCF, funkcjonalizowanym grupami aminowymi (MCF-A) lub epoksydowymi (MCF-E). W przypadku MCF-A przeprowadzono aktywację grup aminowych (wg procedury opisanej w *podrozdziale 5.7.2*). Nośnik z grupami epoksydowymi (MCF-E) nie wymaga aktywacji,

dlatego etap ten pominięto. Następnie każdy z nośników podzielono na 4 równe porcje (po 0,1 g nośnika) i przemyto 0,1 M buforem fosforanowym odpowiednio o pH 5,0; 6,0; 7,0 lub 8,0. Kolejnym etapem była immobilizacja enzymu. Przygotowano roztwory *TaGalU* w buforach o odpowiednich pH i każdą z porcji nośnika zalano 4 ml roztworu enzymu (1,5 mg białka/ml) i pozostawiono na 3 h, w temperaturze 25°C, po czym przez noc w temperaturze 6°C. Należy zwrócić uwagę, że ze względu na skład preparatów enzymatycznych wykorzystanych do immobilizacji, ostatecznie pH immobilizacji uległo zmianie i wynosiło odpowiednio 5,5; 6,0; 6,7 i 7,8. Następnie nadmiar białka wymyto analogicznie, jak opisano w *podrozdziale 5.7.2*. Ostatecznie gotowy biokatalizator zalano 10 ml 50 mM buforu HEPES, o pH 7,0 i przechowywano w temperaturze 4°C.

5.7.4. Immobilizacja *TaGalU* wewnątrz mikroreaktora (MH-A)

Po wstępnym przemyciu monolitu MH-A (w formie walca o średnicy 6 mm i długości 5 cm) etanolem, wodą i 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0 (každorazowo przez 1 h, stosując przepływ 0,5 ml/min), grupy aminowe nośnika aktywowano 2,5 % roztworem aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0, przez 1 h (stosując przepływ 0,5 ml/min). Nadmiar aldehydu odmywano wodą destylowaną przez 1 h (0,5 ml/min) i 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0 przez kolejną 1 h (0,5 ml/min). Następnie 7 ml roztworu *TaGalU* (14 mg białka/ml), w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0, przepuszczano przez mikroreaktor przez 3 h w obwodzie zamkniętym (0,5 ml/min), w temperaturze pokojowej, po czym mikroreaktor pozostawiono w roztworze enzymu przez noc, w temperaturze 4°C. Nadmiar białka wymyto kolejno: 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0 przez 15 min (0,1 ml/min) i dodatkowe 30 min (0,5 ml/min), 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0 z dodatkiem 0,5 M NaCl przez 1 h (0,5 ml/min), 0,1 M buforem octanowym o pH 4,5 przez 45 min (0,5 ml/min) i ostatecznie wodą destylowaną przez 1 h (0,5 ml/min). Monolit przepłukano 0,5 M buforem Tris-HCl o pH 7,8, przez 15 min (0,5 ml/min) i pozostawiono w Tris-HCl na noc, w temperaturze 4°C. Następnie monolit z unieruchomionym enzymem płukano wodą destylowaną przez 1 h (0,5 ml/min), po czym 50 mM buforem HEPES o pH 7,0 przez kolejną 1 h (0,5 ml/min). Ostatecznie monolit przechowywano zanurzony w 50 mM buforze HEPES o pH 7,0 w temperaturze 4°C.

5.7.5. Immobilizacja DAAO_{Rg}, KAT i/lub TK_{gst} na MH-A

Po wstępnym przygotowaniu monolitu MH-A (w formie walców o wymiarach 4 x 2 mm), grupy aminowe aktywowano aldehydem glutarowym, jak opisano w *podrozdziale 5.7.2*. Następnym krokiem była immobilizacja enzymów. W zależności od stosowanego wariantu immobilizacji stosowano następujące procedury:

Każdy z enzymów immobilizowany na oddzielnej porcji nośnika [DAAO][KAT][TK]

W tym celu 3 porcje nośnika MH-A (0,5 g każdy) zalano roztworami odpowiednich enzymów: [DAAO] 3,5 ml o stężeniu 0,7 mg białka/ml; [KAT] 3,5 ml o stężeniu 2,0 mg białka/ml; [TK] 6,5 ml o stężeniu 2,0 mg białka/ml. Wszystkie roztwory przygotowano w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0 i inkubowano w 25°C przez 3 h, po czym w 6°C przez noc.

Współimmobilizacja DAAO_{Rg} i KAT [DAAO+KAT][TK]

W przypadku współimmobilizacji [DAAO+KAT], MH-A (0,5 g) najpierw zanurzono w roztworze DAAO_{Rg} (6,5 ml, o stężeniu 0,4 mg białka/ml), w buforze fosforanowym (0,1 M, pH 7,0) na 2 h, w temperaturze 25°C, a następnie do tego dodano 1,0 ml roztworu katalazy (7,5 mg białka/ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,0) i całość inkubowano przez kolejne 4 h, po czym pozostawiono na noc w temperaturze 6°C.

Współimmobilizacja wszystkich enzymów [DAAO+KAT+TK]

Podczas współimmobilizacji [DAAO+KAT+TK], MH-A (1 g) początkowo zanurzono w roztworze TK_{gst} (9,5 ml, o stężeniu 1,5 mg białka/ml) na 2 h w temperaturze 25°C, po czym do tego dodano 1 ml roztworu DAAO_{Rg} (2,5 mg białka/ml) i inkubowano przez kolejne 2 h, a następnie wprowadzono 2,5 ml KAT (5,0 mg białka/ml) i całość inkubowano przez kolejne 4 h w temperaturze 25°C. Ostatecznie, całość pozostawiono na noc w 6°C.

We wszystkich przypadkach nadmiar białka odmyto zgodnie z procedurą opisaną w *podrozdziale 5.7.2*. Ostatecznie nośnik z unieruchomionymi enzymami przechowywano w wodzie destylowanej z dodatkiem 0,1 mM ThDP i 1 mM MgCl₂, w temperaturze 4°C.

5.8. Oznaczanie ilości zaimmobilizowanego białka

Zazwyczaj stężenie białka określano metodą Lowry'ego, stosując jako standard albuminę surowicy bydlęcej [180], natomiast w przypadku *TaGalU* ilość białka określono poprzez pomiar absorbancji przy 280 nm, przyjmując teoretyczny współczynnik ekstynkcji ($11,585 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) i teoretyczną masę cząsteczkową (33 678 Da). Ilość białka zaimmobilizowanego na monolitach wyliczono jako różnicę pomiędzy ilością białka użytego do immobilizacji a ilością wymytego w trakcie procesu odmywania.

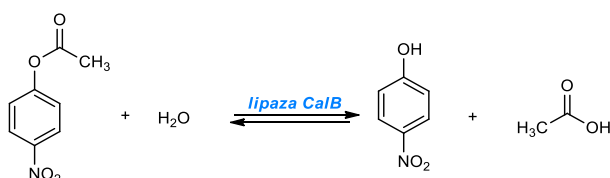
W celu porównania ilości białka zaimmobilizowanego na nośnikach krzemionkowych z ilością białka obecnego w handlowym preparacie Novozym 435, dokonano desorpcji enzymu z żywicy akrylowej, stosując metodę zaproponowaną przez *Cabrera i wsp.* [110]. W skrócie, 1 g Novozymu 435 inkubowano przez 4 h, w 50 ml 25 mM buforu fosforanowego (pH 7,0) z 2% dodatkiem Triton X-100 (v/v). Ilość zdesorbowanego białka określono metodą Lowry'ego.

5.9. Określenie aktywności i stabilności immobilizowanej lipazy CalB w reakcjach modelowych

W procedurach badania aktywności enzymatycznych ilości odczynników podane są jako stężenia w mieszaninie reakcyjnej.

5.9.1. Hydroliza octanu *p*-nitrofenylu

Reakcje testowe dla immobilizowanej lipazy wykonano w reaktorze z wirującym złożem (SpinChem[®], opis *Rozdział 3.1.2.2*), o objętości 250 ml. Aktywność lipaz w reakcji hydrolizy określono stosując metodę opisaną przez *Gustaffson i wsp.* [181] (*Rys. 13*). Lipazę immobilizowaną na sfunkcjonalizowanych nośnikach MH (0,14 g) lub Novozym 435 (0,05 g) umieszczono w koszyku reaktora. Roztwór substratu (5,5 mM octan *p*-nitrofenylu w acetonitrylu) wymieszano z 50 mM buforem fosforanowym (pH 7,0) w stosunku objętościowym 3:17 (końcowe stężenie substratu 0,825 mM). Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 ml. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 37°C, przez 15 min, po czym wlewano do reaktora. Reakcję prowadzono w 37°C, przy obrotach mieszadła 500 rpm. Ilość wytworzonego *p*-nitrofenolu analizowano metodą spektrofotometryczną, przy długości fali 400 nm, w oparciu o sporządzoną wcześniej krzywą wzorcową ($y=8,1x+0,002$; $R^2=0,9996$). W celu określenia stabilności operacyjnej biokatalizatorów, reakcję hydrolizy powtarzano czterokrotnie, z wykorzystaniem tych samych ziaren katalizatora. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną zlewano, a biokatalizator znajdujący się w koszyku przemywano trzykrotnie buforem fosforanowym (50 mM, pH 7,0, po 100 ml).



Rys. 13 Hydroliza octanu *p*-nitrofenylu wobec lipazy jako katalizatora

5.9.2. Estryfikacja kwasu lewulinowego alkoholem *n*-butylowym

Estryfikację kwasu lewulinowego alkoholem *n*-butylowym (*Rys. 14*) przeprowadzono w następujący sposób: biokatalizator (1 g MH z osadzoną lipazą lub 0,26 g Novozymu 435) wprowadzono do kosza mieszadła reaktora SpinChem[®]. Kwas lewulinowy (355 mM) zmieszano z *n*-butanolem (710 mM) i eterem diizopropylowym (90,03 ml). Objętość całkowita mieszaniny reakcyjnej wynosiła 100 ml. Przed wprowadzeniem do naczynia reakcyjnego, reagenty inkubowano w temperaturze 50°C przez 15 min. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C, przy obrotach 500 rpm.



Rys. 14 Estryfikacja kwasu lewulinowego *n*-butanolem wobec lipazy jako katalizatora

Ilość otrzymanego lewulinianu butylu określono metodą chromatografii gazowej. Wcześniej sporządzono krzywą wzorcową ($y=10,8x-14,9$, gdzie $R^2=0,9984$). Do analiz stosowano chromatograf gazowy Agilent Technologies 6890N wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny oraz kolumnę kapilarną Agilent Technologies HP-5 (o średnicy 0,32 mm; długości 30 m; grubości filmu 0,25 μm). Jako gaz nośny zastosowano hel (przepływ 2,5 ml/min). Temperaturę dozownika ustawiono na 320°C, a detektora na 350°C. Program temperaturowy pieca chromatografu wyglądał następująco: izoterma 100°C przez 5 min, następnie przyrost temperatury z prędkością 10°C/min do 150°C (5 min), po czym przyrost temperatury z prędkością 45°C/min do 300°C (przez 3,33 min), ostatecznie obniżenie temperatury z prędkością 60°C/min do 100°C (przez 3,33 min). 1 μl analizowanej próbki dozowano strzykawką z wykorzystaniem dozownika z podziałem strumienia gazu (split, przy zadanym podziale 1:100).

Stabilność operacyjną badanych biokatalizatorów określono w czterech kolejnych cyklach reakcyjnych. Po każdym cyklu biokatalizator przemyto eterem diizopropylowym (3 x 30 min, w temperaturze pokojowej).

5.9.3. Stabilność immobilizowanej lipazy CalB w różnych rozpuszczalnikach organicznych

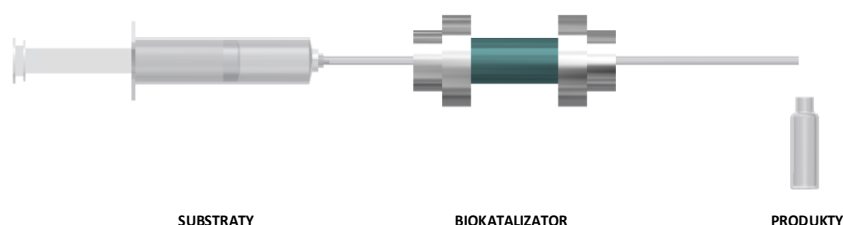
W celu określenia stabilności immobilizowanej lipazy CalB w różnych rozpuszczalnikach organicznych, 0,1 g biokatalizatora (Novozym 435 lub lipaza na monolitach krzemionkowych) inkubowano w 1 ml rozpuszczalnika organicznego (acetonitryl, octan etylu, heksan, butanol, aceton, eter diizopropylowy, toluen, chloroform), w 37°C, przez 24 h. Następnie próbki dokładnie wysuszono na powietrzu i sprawdzono ich aktywność katalityczną w modelowej reakcji hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu (opisane w *podrozdziale 5.9.1*). Przeprowadzono również próby kontrolne stosując biokatalizatory bez uprzedniej inkubacji w rozpuszczalnikach. Badania wykonano w trzech powtórzeniach.

5.10. Aktywność enzymatyczna immobilizowanej *TaGalU*

Aktywność *TaGalU* określono w reakcji syntezy UDP-glukozy z UTP i gluko-1-fosforanu. Jeśli nie napisano, że jest inaczej, UTP (2mM), gluko-1-fosforan (2 mM) oraz kofaktor MgCl_2 (3 mM), rozpuszczono w buforze HEPES (50 mM, pH 7,0). Objętość całkowita wynosiła 3 ml. Przed rozpoczęciem procesu mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 15 min w 50°C, po czym dodano immobilizowany enzym (1,1 mg biokatalizatora), w celu zapoczątkowania

reakcji. Reakcję prowadzono w 50°C, przy obrotach mieszadła 500 rpm. Pobierano próbkę po 2, 5 i 8 min.

W przypadku procesu prowadzonego w systemie ciągłym, monolit przemywano przed reakcją buforem HEPES (50 mM, pH 7,0), przez 30 min (stosując przepływ 0,5 ml/min). Następnie, w strzykawce umieszczono wcześniej przygotowaną mieszaninę reakcyjną, zawierającą 2 mM UTP, 2 mM glukozy-1-fosforanu oraz 3 mM MgCl₂. Strzykawkę podłączono do mikroreaktora zawierającego unieruchomiony enzym na monolicie krzemionkowym. Mieszaninę reakcyjną tłoczono przez monolit (stosując pompę strzykawkową) w zakresie prędkości przepływów 0,05-1,25 ml/min. Na wylocie zbierano próbki (Rys. 15). Pobrane próbki rozcieńczano MeCN w stosunku objętościowym 1:1 i analizowano.



Rys. 15 Schemat aparatury do pracy w systemie ciągłym

Ilość wytworzonej UDP-glukozy badano metodą HPLC, na aparacie 1200 Series firmy Agilent Technologies, wyposażonym w detektor UV i kolumnę Accucore-150-Amide-HILIC firmy Thermo Scientific, o wymiarach 100 x 3 mm, z wielkością cząstek 2,6 µm. Przebieg reakcji monitorowano przy długości fali 260 nm, stosując przepływ izokratyczny eluentu, zawierającego 70% MeCN i 30% 134 mM roztworu octanu amonu pH 5,35 (natężenie przepływu 0,8 ml/min). Ilość wytworzonej UDP-glukozy wyliczono w oparciu o sporządzoną wcześniej krzywą wzorcową ($y=1183,2x-6,8$; $R^2=0,9988$).

5.11. Otrzymywanie trehalozy w systemie ciągłym, wobec TaGalU i TreT jako katalizatorów

Przed reakcją, monolity przemywano buforem HEPES (50 mM, pH 7,0) przez 1 h (stosując przepływ 0,5 ml/min). Pierwszy mikroreaktor zawierał immobilizowany TaGalU, a proces prowadzono w temperaturze pokojowej, drugi – zawierał immobilizowaną TreT, a proces prowadzono w temperaturze 55°C. Mieszaninę reakcyjną: UTP (10 mM), G1P (10 mM), Glu (10 mM) i MgCl₂ (20 mM) w buforze HEPES (50 mM, pH 7,0) tłoczono przez mikroreaktory z szybkością przepływu 0,05 ml/min. Stężenie glukozy i trehalozy w próbkach pobieranych w czasie reakcji określano metodą HPLC, z zastosowaniem procedury opisanej w literaturze

[182]. W skrócie, stosowano kolumnę REZEX-ROA Organic Acid H⁺ (8%) (300 x 7,8 mm), termostatowaną w 60°C i różnicowy detektor refraktometryczny (RID). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina izokratyczna zawierająca 2,5 mM kwas siarkowy (VI), w wodzie podwójnie destylowanej. Natężenie przepływu przez kolumnę wynosiło 0,5 ml/min.

5.12. Aktywność enzymatyczna immobilizowanej DAAO_{Rg}

D-serynę (50 mM) rozpuszczono w buforze Tris-HCl (0,5 M, pH 7,5). Objętość całkowita wynosiła 3 ml. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 15 min w 26°C, po czym dodano natywną katalazę (0,1 mg) oraz immobilizowaną DAAO_{Rg} (0,03 g biokatalizatora, 0,1 mg białka). Całość mieszano (500 rpm), przez 12 min, w temperaturze 26°C. Reakcję prowadzono w atmosferze tlenu. W trakcie procesu pobierano próbki po 3, 6, 9 i 12 min. Ilość wytworzonego HPA sprawdzano za pomocą HPLC, z zastosowaniem metody opisanej w *Rozdziale 5.14*.

5.13. Aktywność enzymatyczna immobilizowanej TK_{gst}

HPA (50 mM), GOA (50 mM) oraz kofaktory: ThDP (0,1 mM) i MgCl₂ (1 mM), rozpuszczono w wodzie destylowanej. Objętość całkowita mieszaniny wynosiła 3 ml. Przed dodaniem enzymu mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 15 min w 50°C, po czym dodano immobilizowaną TK_{gst} (0,018 g biokatalizatora, 0,1 mg białka). Reakcję prowadzono w łaźni wodnej (50°C), przez 5 min, na mieszadle magnetycznym (400 rpm). W trakcie procesu pobierano próbki po 1, 3 i 5 min. Ilość otrzymanej L-erytrulozy określono chromatograficznie (HPLC), metodę opisano w *Rozdziale 5.14*.

5.14. Synteza L-erytrulozy katalizowana przez immobilizowane DAAO_{Rg}, katalazę oraz TK_{gst}

Reakcję prowadzono w reaktorze ze stacjonarnym złożem, o objętości 25 ml. Ogólna procedura została opisana przez *Lorillere i wsp.* [166]. W skrócie, D-serynę (50 mM), GOA (50 mM), ThDP (0,1 mM) oraz MgCl₂ (1 mM) rozpuszczono w wodzie destylowanej. Objętość całkowita mieszaniny wynosiła 20 ml. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 15 min w 30°C. Reakcję zapoczątkowano dodając immobilizowane enzymy: DAAO_{Rg} (0,25 g katalizatora, zawierającego 2 mg białka), katalazę (0,25 g katalizatora, zawierającego 4 mg białka) oraz TK_{gst} (0,5 g katalizatora, zawierającego 6 mg białka). Do mieszaniny reakcyjnej dostarczano tlen z butli (10 ml/min). Reakcję prowadzono przy obrotach 400 rpm, w temperaturze 30°C. Przez cały czas trwania reakcji utrzymywano stałą wartość pH (7,0), dozując odpowiednią ilość 0,1 M HCl titratorem automatycznym. Postęp reakcji śledzono wykorzystując metodę HPLC, opisaną poniżej.

Do analizy ilości HPA, GOA oraz L-erytrozy wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową, stosując kolumnę Bio-Rad Aminex HPX-87 H (300 x 7,8 mm), termostatowaną w 60°C oraz RID. Stosowano mieszaninę izokratyczną zawierającą 0,1% TFA w wodzie podwójnie destylowanej, a szybkość przepływu wynosiła 0,6 ml/min. Ilość powstającej L-erytrozy i HPA określano na podstawie sporządzonych krzywych wzorcowych: ($y=4510,1x+2561,8$, $R^2=0,9981$ dla L-erytrozy, dla HPA: $y=3605,9x-26,0$, gdzie $R^2=0,9979$), a ilość konwertowanego GOA z krzywej ($y=3151,8x-353,9$, $R^2=0,9980$). Czasy retencji poszczególnych składników wynosiły odpowiednio: 8,5 min (HPA), 11,6 min (L-ery) oraz 12,4 min (GOA).

5.15. Statystyka

Analizy wykonywano w trzech powtórzeniach, na tej podstawie wyliczono średnią i odchylenia standardowe, korzystając z programu Excel.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

6. Przygotowanie nośników krzemionkowych

Głównym założeniem pracy była efektywna immobilizacja enzymów na porowatych nośnikach krzemionkowych. W ramach pracy zsyntetyzowano monolity krzemionkowe, zmodyfikowano je grupami funkcyjnymi i dokonano ich dogłębnej charakterystyki. Badania te objęły również nośniki krzemionkowe w formie proszków (mezoporowate pianki komórkowe, MCF).

6.1. Monolity krzemionkowe

Monolity krzemionkowe zsyntetyzowano z zastosowaniem metody zol-żelowej w połączeniu z separacją fazową (wytwarzanie makroporów) i szablonowaniem, co zostało dokładnie opisane w *Rozdziale 3.1.2*. W zależności od formy, do jakiej wylewano zol, otrzymano je w kształcie: stożków o wymiarach zewnętrznych 5,1 mm x 3,3 mm (H/d) (*Rys. 16A*), walców o wymiarach zewnętrznych 4 mm x 2 mm (*Rys. 16B*) oraz walców o wymiarach zewnętrznych 5 cm x 4 lub 6 mm (*Rys. 16C*). Te ostatnie stanowią rdzeń mikroreaktora przepływowego.



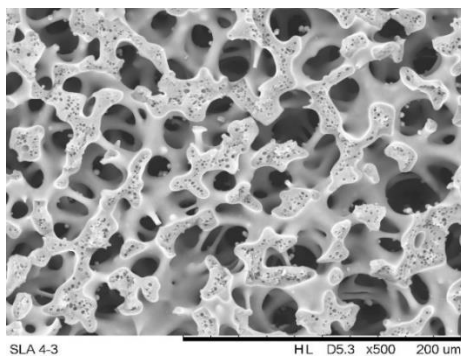
Rys. 16 Monolity krzemionkowe w formie paciorków (A), walców (B) lub rdzenia do mikroreaktora (C)

Otrzymane monolity krzemionkowe poddano funkcjonalizacji. Monolity krzemionkowe w formie stożków sfunkcjonalizowano grupami aminowymi, oktylowymi lub aminowymi i oktylowymi jednocześnie, zaś monolity krzemionkowe w formie walców - grupami aminowymi. Wykorzystywano następujące organosilany: (3-aminopropyl)trimetoksylsilan (prekursor grup aminowych) oraz n-oktylotrietoksylsilan (prekursor grup oktylowych). Grupy alkoholowe obecne w każdym z wymienionych związków ulegały hydrolizie, a następnie kondensacji z grupami hydroksylowymi (Si-O-H) obecnymi na powierzchni nośnika krzemionkowego. Proces ten zachodził w obecności niepolarnego rozpuszczalnika – toluenu [30,183].

Rozważając immobilizację enzymu na nośniku, konieczne jest poznanie jego struktury oraz charakteru chemicznego powierzchni, gdyż parametry te mają istotny wpływ na aktywność otrzymanego biokatalizatora. W związku z powyższym dokonano charakterystyki otrzymanych

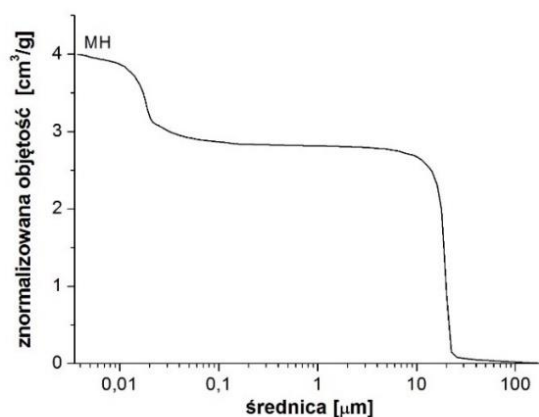
nośników. Strukturę otrzymanych materiałów badano z wykorzystaniem takich technik pomiarowych jak: porozymetria rtęciowa, niskotemperaturowa adsorpcja azotu, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) i transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM). Spektroskopia w podczerwieni (FTIR) pozwoliła natomiast na potwierdzenie obecności poszczególnych grup funkcyjnych w badanych nośnikach, a analiza elementarna dodatkowo umożliwiła dokładne określenie ilościowe wprowadzonych grup funkcyjnych.

Mimo różnic w kształcie otrzymanych monolitów (stożki, walce), posiadały one te same parametry struktury, tj. wielkość i kształt porów oraz powierzchnię właściwą. W związku z powyższym poniżej przedstawiono charakterystykę na przykładzie monolitów krzemionkowych w formie stożków. Na Rys. 17 przedstawiono zdjęcia SEM dla niemodyfikowanych monolitów krzemionkowych. Cechują się one trójwymiarową otwartą strukturą porów. Dowodem na otwartość struktury są duże makropory tworzące sieć krętych kanałów. Taka budowa nośników zapewnia dostępność powierzchni dla enzymów oraz praktycznie nieograniczoną możliwość penetracji struktury nośnika przez reagenty.

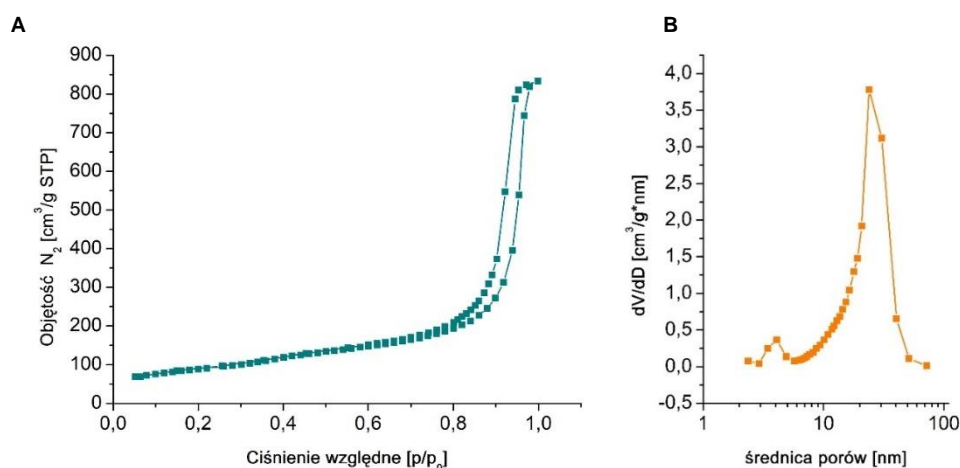


Rys. 17 Zdjęcie SEM struktury niemodyfikowanych MH

Do oceny struktury niemodyfikowanych monolitów krzemionkowych (MH) zastosowano również porozymetrię rtęciową, która wykazała obecność makroporów w zakresie 20-50 μm oraz mezoporów w zakresie 20-30 nm (Rys. 18). Niskotemperaturowa adsorpcja azotu potwierdziła istnienie mezoporów w zakresie 20-30 nm, a dodatkowo obecność małych mezoporów w zakresie 2-4 nm (Rys. 19B). Mezoporowatą strukturę monolitów potwierdza również charakterystyczny przebieg izoterm adsorpcji i desorpcji azotu (Rys. 19A). Przebieg ten klasyfikowany jest jako izoterma typu IV z pętlą histerezy typu H1, i jest on charakterystyczny dla materiałów mezoporowatych [184].



Rys. 18 Rozkład skumulowanej objętości porów w funkcji średnicy określony metodą porozymetrii rtęciowej dla niemodyfikowanego monolitu krzemionkowego (MH)



Rys. 19 Izotermy adsorpcji i desorpcji azotu w -196°C (A) oraz rozkład objętości porów (B) dla niemodyfikowanego monolitu krzemionkowego (MH)

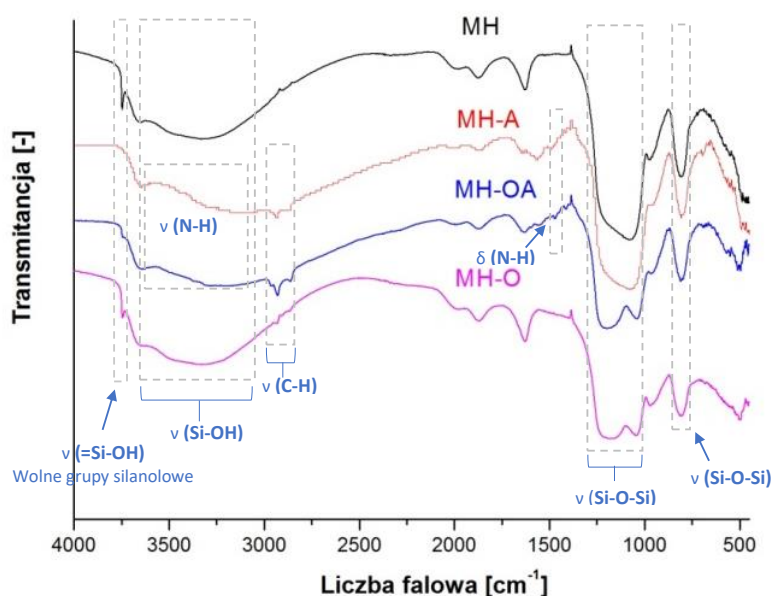
Powierzchnia właściwa monolitu krzemionkowego (MH) obliczona została z wykorzystaniem metody BET (Brunauer – Emmett - Teller) dla ciśnień względnych w zakresie 0,05 – 0,2. Rozkład objętości porów został określony przy użyciu metody BJH (Barrett, Joyner, Halenda) z desorpcyjnej gałęzi izotermy. Można zaobserwować, że niemodyfikowane monolity krzemionkowe cechuje duża powierzchnia właściwa (S_{BET}), która wynosi ok. $300\text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Powierzchnia właściwa monolitów uległa zmianie po funkcjonalizacji. W przypadku monolitów modyfikowanych grupami aminowymi (MH-A) zmniejszyła się niemalże o połowę, a dla nośników modyfikowanych grupami oktylowymi (MH-O) o 10% (Tabela 5). Jednakże, pomimo zmniejszenia porowatości po funkcjonalizacji nośniki wciąż charakteryzowały się wystarczająco dużą powierzchnią, umożliwiającą wprowadzenie i przyłączenie enzymu oraz efektywny transport reagentów. Ilość grup obecnych na przygotowanych nośnikach (Tabela 5) wyliczono na podstawie wyników z analizy elementarnej, zakładając całkowitą

hydrolizę organosilanów (prekursora grup aminowych): (3-aminopropyl)trimetoksysilanu (APTMS), prekursora grup oktylowych: *n*-oktylotrietoksysilanu, a następnie ich kondensację z grupami hydroksylowymi (-OH) nośnika krzemionkowego. Ilość grup aminowych na MH jest ponad dwukrotnie większa aniżeli grup oktylowych (Tabela 5), co może wynikać z większej reaktywności metoksysilanów niż etoksysilanów [185].

Tabela 5 Powierzchnia właściwa, skład pierwiastkowy oraz ilość grup funkcyjnych niemodyfikowanych oraz modyfikowanych nośników krzemionkowych

Nośnik	S _{BET} [m ² /g]	C / H / N [m%]	Ilość grup funkcyjnych [mmol/g _{silica}]
MH	310	-	-
MH-A	154	2,62/1,24/0,82	0,6
MH-O	290	2,53/1,26/-	0,27
MH-OA	208	4,32/1,31/0,74	0,5 (A) 0,25 (O)

Obecność grup funkcyjnych na nośniku potwierdzono metodą FTIR. Otrzymane widma monolitów krzemionkowych przed i po modyfikacji grupami funkcyjnymi pokazano na Rys. 20.



Rys. 20 Widmo FTIR monolitu krzemionkowego przed modyfikacją (MH) oraz po modyfikacji (MH-O, MH-A, MH-OA)

Na widmie krzemionki bez modyfikacji (MH) obserwuje się charakterystyczne szerokie pasmo w zakresie 3200-3600 cm⁻¹ odpowiadające drganiom rozciągającym Si-OH oraz ostry pik przy 3740 cm⁻¹, który odpowiada symetrycznym drganiom rozciągającym wolnych, tzw. izolowanych grup silanolowych. Pasma absorpcyjne w zakresie 1000-1250 cm⁻¹

i przy 800 cm^{-1} przypisywane są drganiom Si-O-Si szkieletu krzemionki [186,187]. Dla modyfikowanych krzemionek zaobserwowano widoczne zmiany. Zmniejszenie intensywności pasma izolowanych grup silanowych (3740 cm^{-1}), świadczy o zastąpieniu ich grupami funkcyjnymi aminowymi i/lub oktylowymi [188,189]. Niestety, trudno jest zidentyfikować grupy funkcyjne -NH_2 , gdyż charakterystyczne dla nich pasma ($3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) nakładają się z drganiami grup O-H. Jednakże pojawia się dodatkowo niewielkie pasmo przy 1600 cm^{-1} , które można przypisać drganiom deformacyjnym grupy aminowej [190]. Co więcej, w przypadku MH-A i MH-OA obserwuje się drgania rozciągające C-H w grupie propylowej w zakresie $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ [51]. Dla MH-O drgania grup metylenowych z łańcucha oktylowego (w zakresie $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$) są słabo widoczne, co może wynikać z niewielkiej ilości wprowadzonych grup oktylowych (Tabela 5) [191].

6.2. Mezoporowate pianki komórkowe

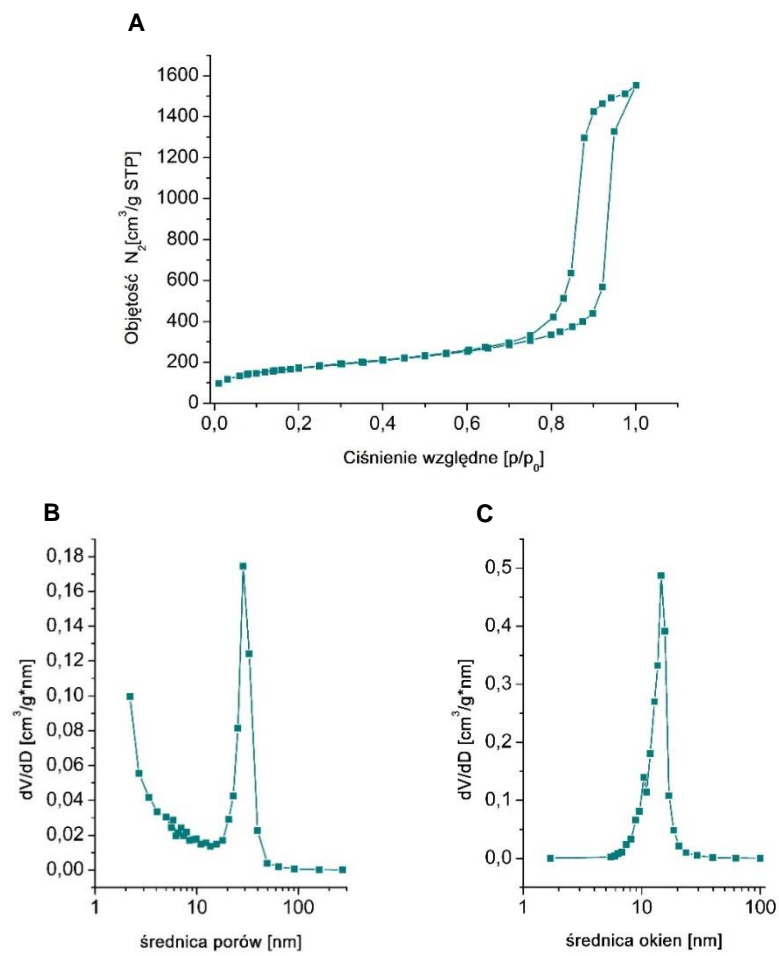
W ramach pracy otrzymano również mezoporowate pianki komórkowe (MCF) w formie proszków (Rys. 21).



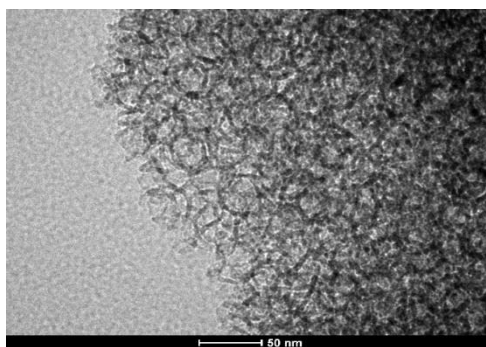
Rys. 21 Mezoporowate pianki komórkowe

MCF funkcjonalizowano grupami aminowymi lub epoksydowymi. Jako prekursor grup aminowych zastosowano, wspomniany już wcześniej (3-aminopropyl)trimetoksylan, a (3-glicydoksypropyl)trimetoksylan wykorzystano jako prekursor grup epoksydowych. Nośniki MCF przed i po funkcjonalizacji również poddano szczegółowej charakterystyce.

W porównaniu do monolitów krzemionkowych, w przypadku MCF obecne są jedynie mezopory w zakresie $20\text{-}30\text{ nm}$ (Rys. 22B), połączone mniejszymi oknami w zakresie $9\text{-}20\text{ nm}$ (Rys. 22C). Przebieg izotermy adsorpcji i desorpcji azotu w -196°C jest typowy dla materiałów mezoporowatych (izoterma typu IV z histerezą typu H1) [184] (Rys. 22A). Mezoporowatą strukturę potwierdza również zdjęcie z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) (Rys. 23).



Rys. 22 Izotermy adsorpcji i desorpcji azotu w -196°C (A) oraz rozkład objętości porów (B) i okien (C) dla MCF



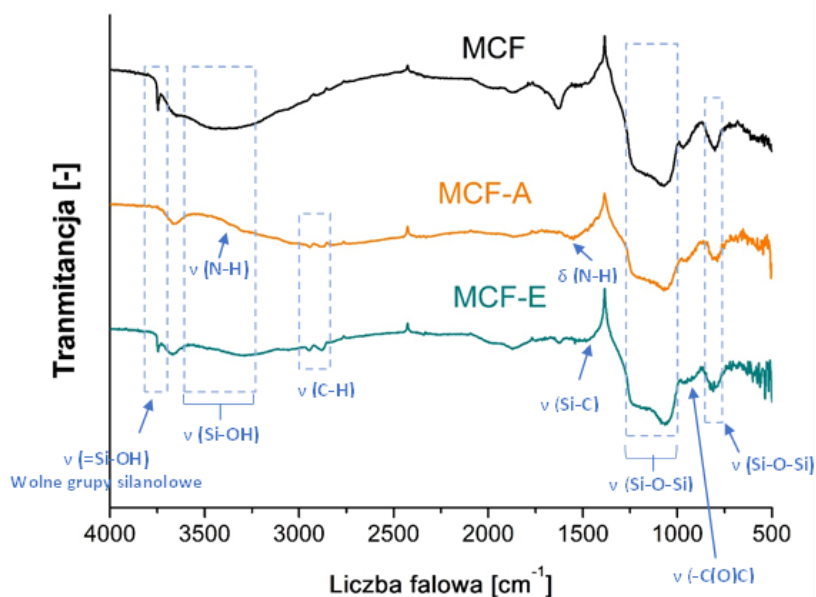
Rys. 23 Zdjęcie TEM struktury MCF

Nośniki typu MCF charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą (S_{BET} ok. $600 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). Proces funkcjonalizacji grupami aminowymi (MCF-A) lub epoksydowymi (MCF-E) spowodował zmniejszenie powierzchni właściwej z $580 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ (dla czystego nośnika), o odpowiednio ok. 30% (do $450 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) i 40% (do $350 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) (Tabela 6). Dodatkowo, zaobserwowano zmniejszenie objętości porów (V_p), średnicy porów (d_p) i łączących je okien (d_w). Pomimo tego po funkcjonalizacji, zarówno pory jak i okna były wystarczająco duże, aby zapewnić łatwą dostępność powierzchni tych materiałów zarówno dla enzymu jak i reagentów.

Tabela 6 Parametry strukturalne MCF przed i po funkcjonalizacji

Nośnik	$S_{BET} [\text{m}^2/\text{g}]$	$V_p [\text{cm}^3/\text{g}]$	$d_p [\text{nm}]$	$d_w [\text{nm}]$
MCF	580	2,40	27	14
MCF-A	450	1,96	23	13
MCF-E	350	1,64	22	12

Dla otrzymanych mezoporowatych pianek komórkowych wykonano także widmo w podczerwieni (Rys. 24).



Rys. 24 Widmo FTIR mezoporowatych pianek komórkowych przed modyfikacją (MCF) oraz po modyfikacji (MCF-A, MCF-E)

Również w przypadku tych nośników obserwuje się drgania charakterystyczne dla krzemionki: przy 3740 cm^{-1} , w zakresie $3200\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$, $1000\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$ oraz przy 800 cm^{-1} (Rys. 24). Wprowadzenie grup funkcyjnych na MCF (aminowych lub epoksydowych) przyczyniło się do zmniejszenia intensywności pasma przy 3740 cm^{-1} oraz pojawiły się nowe pasma, charakterystyczne dla tych grup. Dla MCF-A i MCF-E obserwuje się dwa pasma w zakresie 2850-

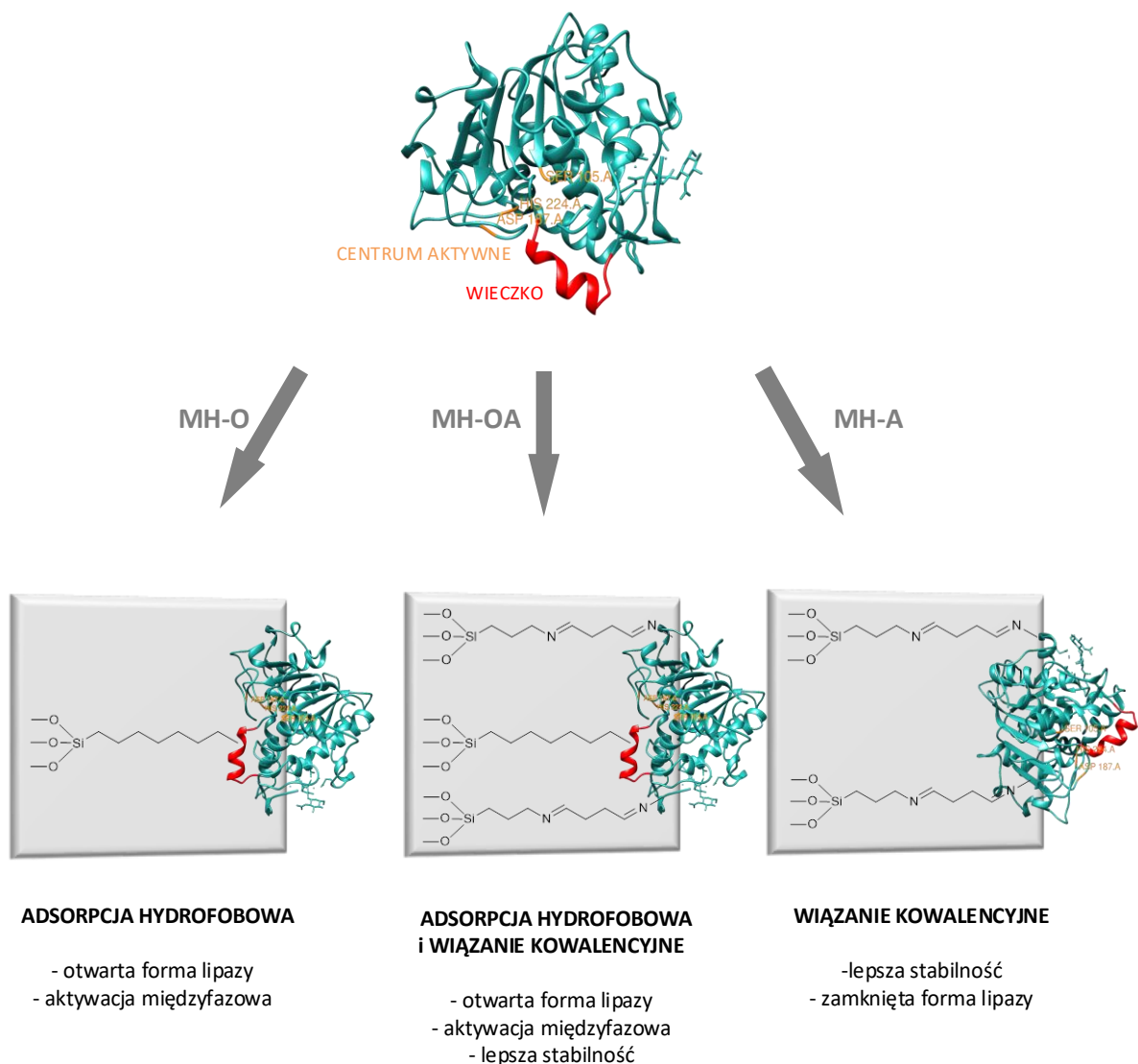
2950 cm^{-1} , które można przypisać drganiom rozciągającym wiązania C-H grupy propylowej. Co więcej, dla MCF-E pojawia się niewielkie pasmo przy 1445 cm^{-1} , które odpowiada drganiom wiązania Si-C w grupie glicydoksyłowej oraz drgania rozciągające pierścienia grupy epoksydowej przy 905 cm^{-1} [190,192]. Dla MCF-A widoczne jest niewielkie pasmo przy 1600 cm^{-1} , charakterystyczne dla drgań deformacyjnych wiązania N-H, podczas gdy charakterystyczne pasmo absorpcyjne tego wiązania przy 3200-3600 cm^{-1} pokrywa się z pasmem grup -OH.

7. Immobilizacja enzymów

Na otrzymanych nośnikach krzemionkowych immobilizowano enzymy: (i) lipazę B z *Candida antarctica* (CalB), (ii) pirofosforylaze UDP-glukozy oraz (iii) oksydaze D-aminokwasową, katalaze oraz transketolaze. Aktywność i stabilność immobilizowanej lipazy CalB testowano w reakcji hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu oraz estryfikacji kwasu lewulinowego *n*-butanolem. Możliwości aplikacyjne immobilizowanej pirofosforylazy UDP-glukozy sprawdzono w enzymatycznej kaskadzie do otrzymywania trehalozy. Kaskadę wieloenzymatyczną składającą się z oksydazy D-aminokwasowej, katalazy oraz transketolazy testowano w syntezie L-erytruły.

7.1. Immobilizacja lipazy CalB i jej zastosowanie

W niniejszej pracy zaproponowano immobilizację lipazy B z *Candida antarctica* (CalB) na nośnikach krzemionkowych w formie stożkowych ziaren (Rys. 16A) funkcjonalizowanych: grupami aminowymi (MH-A), oktylowymi (MH-O) oraz krzemionce bifunkcjonalizowanej grupami aminowymi i oktylowymi równocześnie (MH-OA). Obecność grup oktylowych (hydrofobowych) – MH-O umożliwiła fizyczną adsorpcję enzymu na powierzchni nośnika. Zaletą tej metody immobilizacji jest prostota i szybkość wykonania. Pomimo, że ten sposób immobilizacji oparty jest na słabych fizycznych oddziaływaniach (jak np. siły van der Waalsa, oddziaływania jonowe, hydrofobowe czy wiązania wodorowe), to jest on dobrym rozwiązaniem w przypadku zastosowania takich biokatalizatorów w reakcjach prowadzonych w środowisku rozpuszczalnika organicznego. Ponadto obecność grup oktylowych zapewnia aktywację międzyfazową immobilizowanej lipazy (co omówiono szerzej w *Rozdziale 4.1.1*). Modyfikacja nośnika grupami aminowymi (MH-A) umożliwia natomiast kowalencyjne związanie enzymu. W celu efektywnego związania białka przed immobilizacją grupy aminowe zostały aktywowane aldehydem glutarowym (GLA), który pełnił funkcję łącznika pomiędzy grupami aminowymi nośnika a grupami aminowymi enzymu. Tworzenie wiązania kowalencyjnego poprzez GLA jest szczególnie atrakcyjne, ze względu na możliwość tworzenia trwałych połączeń w łagodnych warunkach (neutralne pH immobilizacji) [193,194]. Zastosowanie nośnika MH-OA do immobilizacji lipazy umożliwia zatem adsorpcję lipazy oraz utworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupami aminowymi białka a reaktywnymi grupami nośnika (Rys. 25).



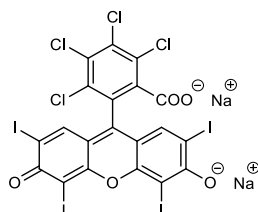
Rys. 25 Immobilizacja lipazy na nośnikach krzemionkowych. Schemat wykonano z wykorzystaniem pakietu UCSF Chimera; PDB ID: 1TCA.

Aktywność otrzymanych biokatalizatorów sprawdzono w modelowej reakcji hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu (reakcja prowadzona w środowisku wodnym) oraz w reakcji estryfikacji kwasu lewulinowego *n*-butanolem, prowadzonej w rozpuszczalniku organicznym. Jako katalizator odniesienia wybrano powszechnie dostępny i szeroko wykorzystywany Novozym 435. Dodatkowo porównano stabilność otrzymanych biokatalizatorów w rozpuszczalnikach organicznych, tj. octanie etylu, heksanie, toluenie, chloroformie, *n*-butanolu, acetonie czy eterze diizopropylowym, jak również wykazano możliwość ich wielokrotnego recyklu.

7.1.1. Hydrofobowość nośnika i jej wpływ na immobilizację lipazy CalB

Hydrofobowość nośnika ma znaczący wpływ na aktywność immobilizowanej na nim lipazy, co szczegółowo omówiono w części literaturowej niniejszej rozprawy (Rozdział 4.1.1). Znane są różne metody oznaczania hydrofobowości nośników. W niniejszej pracy określono ją

poprzez pomiar ilości zaadsorbowanego na nośniku hydrofobowego barwnika (rózu bengalskiego, *ang. Bengal Rose Dye*), Rys. 26 [112,121].



Rys. 26 Struktura rózu bengalskiego

Generalnie, większa ilość związanego przez nośnik barwnika świadczy o większej hydrofobowości powierzchni krzemionki. Zaobserwowano, że wprowadzenie grup funkcyjnych na powierzchnię krzemionkowego nośnika spowodowało znaczne zwiększenie ilości zaadsorbowanego barwnika, która wzrosła z 0,015 mg/g (dla czystej krzemionki MH) do 0,133 mg/g dla MH-O, do 0,233 mg/g dla MH-A oraz do 0,311 mg/g dla MH-OA (Tabela 7).

Tabela 7 Hydrofobowość funkcjonalizowanych nośników krzemionkowych (na podstawie adsorpcji barwnika rózu bengalskiego) oraz ilość białka i wydajność immobilizacji lipazy na funkcjonalizowanych nośnikach krzemionkowych

Nośnik	Hydrofobowość [mg _{barwnika} /g _{nośnika}]	Ilość białka [mg/g _{nośnika}]	Wydajność immobilizacji [%]
MH	0,0149±0,0014	-	-
MH-A	0,2329±0,0082	19,4 ^a	56,0
MH-O	0,1329±0,0039	15,3 ^a	44,3
MH-OA	0,3105±0,0010	27,0 ^a	78,4
N435	-	64,8 ^b	-

^a określono metodą Lowry'ego

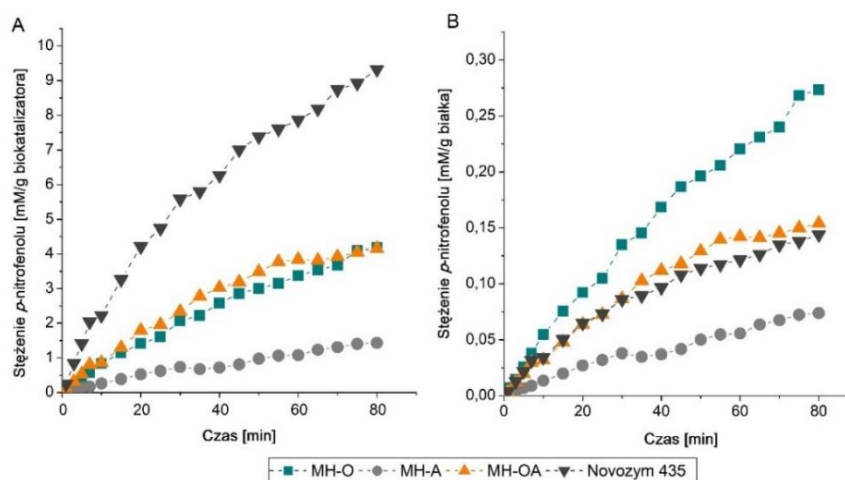
^b białko z nośnika zdesorbowano Tritonem-X, następnie jego ilość określono metodą Lowry'ego

Wyniki adsorpcji uzyskane dla MH-A i MH-OA potwierdzają hipotezę wysuniętą przez innych autorów. Wg *Vescovi i in.* [121] wyższe wartości adsorpcji barwnika w przypadku MH-A i MH-OA wynikają z obecności na powierzchni nośnika grup aminowych o wysokiej wartości pK, które mają zdolność do oddziaływań jonowych ze zjonizowanymi grupami w strukturze barwnika (Rys. 26). Warto również zauważyć, że ilość zaadsorbowanego barwnika na MH-OA jest praktycznie równa sumie wartości uzyskanych dla MH-A i MH-O, co świadczy, że z barwnikiem oddziałują nie tylko grupy oktylowe, ale i aminowe. W badaniach nad immobilizacją lipazy stwierdzono, że rodzaj grup funkcyjnych wprowadzonych na nośnik ściśle koreluje z ilością zaadsorbowanego barwnika, a ta z kolei z ilością unieruchomionego białka (Tabela 7). Najmniej białka zaimmobilizowało się na nośniku typu MH-O (immobilizacja

adsorpcyjna), nieco więcej na nośniku typu MH-A (immobilizacja poprzez wiązanie kowalencyjne). Nie dziwi również fakt, że najwięcej białka związało się z nośnikiem bifunkcjonalizowanym (MH-OA). Mimo to, ilość białka naniesionego na przygotowane nośniki krzemionkowe jest ponad dwukrotnie niższa w porównaniu do ilości białka obecnego w handlowym preparacie Novozym 435 (N435) (Tabela 7). Z tego względu w badaniach aktywności, ilość zastosowanego Novozymu 435 przeliczano w taki sposób, aby ilość białka w N435 odpowiadała ilości białka unieruchomionego na monolitach krzemionkowych. W reakcji hydrolizy katalizatorem odniesienia była lipaza unieruchomiona na nośniku MH-OA, zaś w przypadku estryfikacji – lipaza unieruchomiona na nośniku MH-O.

7.1.2. Aktywność i stabilność immobilizowanej lipazy

Aktywność otrzymanych biokatalizatorów testowano zarówno w środowisku wodnym (hydroliza octanu *p*-nitrofenylu), jak i organicznym (estryfikacja kwasu lewulinowego). Procesy te prowadzono w reaktorze z wirującym złożem (SpinChem[®]), stosując obroty mieszadła 500 rpm. Hydrolizę octanu *p*-nitrofenylu prowadzono w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0). Wyniki przedstawiono na Rys. 27. Jako katalizator odniesienia zastosowano Novozym 435.



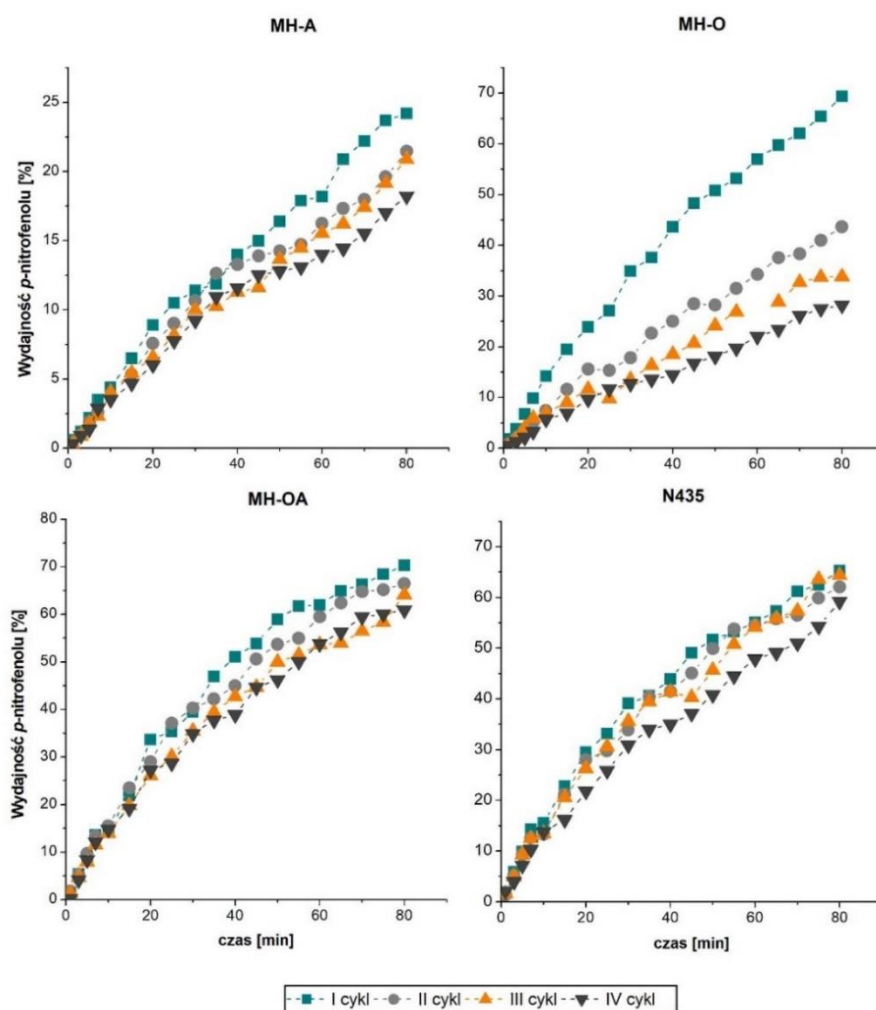
Rys. 27 Hydroliza octanu *p*-nitrofenylu wobec lipaz immobilizowanych na różnych nośnikach. Aktywność immobilizowanych lipaz w przeliczeniu na gram immobilizowanego katalizatora (A) oraz aktywność immobilizowanych lipaz w przeliczeniu na ilość związanego białka (B) Warunki reakcji: *p*-NPA (0,825 mM) w buforze fosforanowym (50 mM, pH 7,0), objętość całkowita – 100 ml, lipaza (0,14 g MH lub 0,05 g N435), 37°C, 500 rpm

Najwyższe stężenie produktu (*p*-nitrofenolu) w odniesieniu do ilości biokatalizatora uzyskano stosując Novozym 435 (N435) (9,32 mM/g biokatalizatora), trochę niższe stężenia produktu otrzymano stosując lipazę CalB immobilizowaną na MH-O (4,18 mM/g biokatalizatora) oraz MH-OA (4,16 mM/g biokatalizatora) (Rys. 27A). Najmniejszą zaś aktywność wykazywał katalizator immobilizowany na MH-A (1,43 mM/g biokatalizatora). Niemniej należy zaznaczyć,

że wysoka aktywność N435 wynika z dużej ilości białka osadzonego na polimerowym nośniku (*Tabela 7*). Przeliczając wydajność *p*-nitrofenolu na ilość związanego z nośnikiem białka zdecydowanie lepszą aktywność hydrolytyczną wykazuje lipaza osadzona na MH-O, zaś MH-OA wykazuje porównywalną aktywność do N435 (*Rys. 27B*).

Wysoka aktywność lipazy osadzonej na nośnikach z grupami hydrofobowymi (MH-O, MH-OA) może wynikać z aktywacji międzyfazowej enzymu. Hydrofobowa powierzchnia (tzw. wieczko) otaczająca miejsce aktywne enzymu, oddziałuje z grupami oktylowymi nośnika, co prowadzi do otwarcia „wieczka” i ułatwia zajście reakcji [80,195]. Najniższe stężenie *p*-nitrofenolu otrzymano stosując lipazę osadzoną na nośniku MH-A, mimo iż oznaczona ilość białka, była większa niż na MH-O (*Tabela 7*). W przypadku MH-A tak niska aktywność lipazy CalB może wynikać z usztywnienia trzeciorzędowej struktury immobilizowanego białka, co z kolei utrudnia zmiany konformacyjne, niezbędne dla katalitycznej aktywności enzymu. Dodatkowo, może to być wynikiem związania lipazy w konformacji zamkniętej, w której małe „wieczko” utrudnia dostęp substratów do centrum aktywnego enzymu. Takie zjawiska były wcześniej obserwowane i opisane w literaturze [80,87,121].

Stabilność biokatalizatora i możliwość jego wykorzystania w wielu cyklach reakcyjnych jest kluczowym aspektem mającym istotny wpływ na koszt operacji przemysłowych. W ramach pracy stabilność otrzymanych biokatalizatorów (MH-A, MH-O, MH-OA) oraz komercyjnego N435 przetestowano w czterech kolejnych cyklach reakcyjnych (hydroliza octanu *p*-nitrofenylu) (*Rys. 28*).

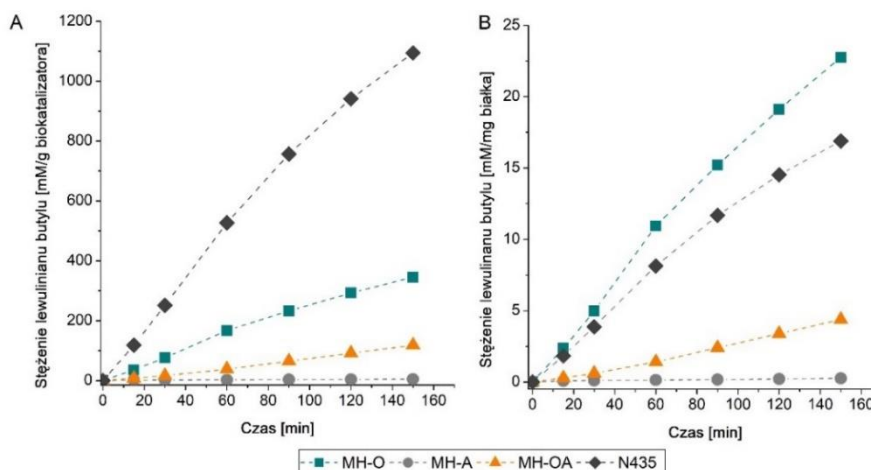


Rys. 28 Stabilność biokatalizatorów w reakcji hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu
 Warunki reakcji: *p*-NPA (0,825 mM) w buforze fosforanowym (50 mM, pH 7,0), objętość całkowita: 100 ml, lipaza (0,14 g MH lub 0,05 g N435), 37°C, 500 rpm

Novozym 435, jak również lipaza immobilizowana na MH-A i MH-OA, wykazują bardzo dobrą stabilność w kolejnych cyklach hydrolizy, podczas gdy dla lipazy związanej adsorpcyjnie z nośnikiem MH-O obserwowano obniżenie aktywności w kolejnych cyklach reakcyjnych. Wynika to najprawdopodobniej z procesu wymywania enzymu z powierzchni nośnika w środowisku wodnym. Należy więc stwierdzić, że katalizator immobilizowany adsorpcyjnie na nośniku MH-O nie jest odpowiednim do prowadzenia reakcji w takim środowisku. Desorpcję enzymu z nośnika zawierającego grupy oktylowe w reakcji hydrolizy zaobserwowali również inni badacze [120,122]. Nośniki modyfikowane grupami aminowymi (MH-A) i aktywowane aldehydem glutarowym umożliwiają silne kowalencyjne związanie lipazy na nośniku, co uniemożliwia desorpcję enzymu z nośnika. Natomiast przypadku lipazy osadzonej na MH-OA, enzym związany jest nie tylko za pomocą oddziaływań hydrofobowych,

ale dodatkowo tworzone jest stabilne wiązanie kowalencyjne. Zatem w warunkach, w których desorpcja enzymów staje się znaczącym problemem, ten bifunkcjonalizowany biokatalizator może mieć duży potencjał.

Otrzymane katalizatory przebadano również w procesach prowadzonych w środowisku rozpuszczalnika organicznego. W tym celu jako reakcję modelową wybrano estryfikację kwasu lewulinowego n-butanołem, stosując eter diizopropylowy jako rozpuszczalnik. Estryfikacja kwasu lewulinowego cieszy się w ostatnich latach ogromnym zainteresowaniem. Surowcem jest kwas lewulinowy, który produkowany jest z zasobów odnawialnych (odpady z przemysłu zawierające cukry, biomasa lignocelulozowa). Otrzymywane estry – lewuliniany, mogą zastępować produkty ropopochodne, dlatego też znalazły zastosowanie w sektorze biopaliw, czy w przemyśle chemicznym do wytwarzania rozpuszczalników, plastyfikatorów, zapachów i farmaceutyków [14,196,197]. Wyniki przeprowadzonych reakcji przedstawiono na Rys. 29.



Rys. 29 Estryfikacja kwasu lewulinowego n-butanołem wobec lipaz immobilizowanych na różnych nośnikach. Aktywność immobilizowanych lipaz w przeliczeniu na gram katalizatora (A) oraz aktywność immobilizowanych lipaz w przeliczeniu na ilość związanego białka (B)

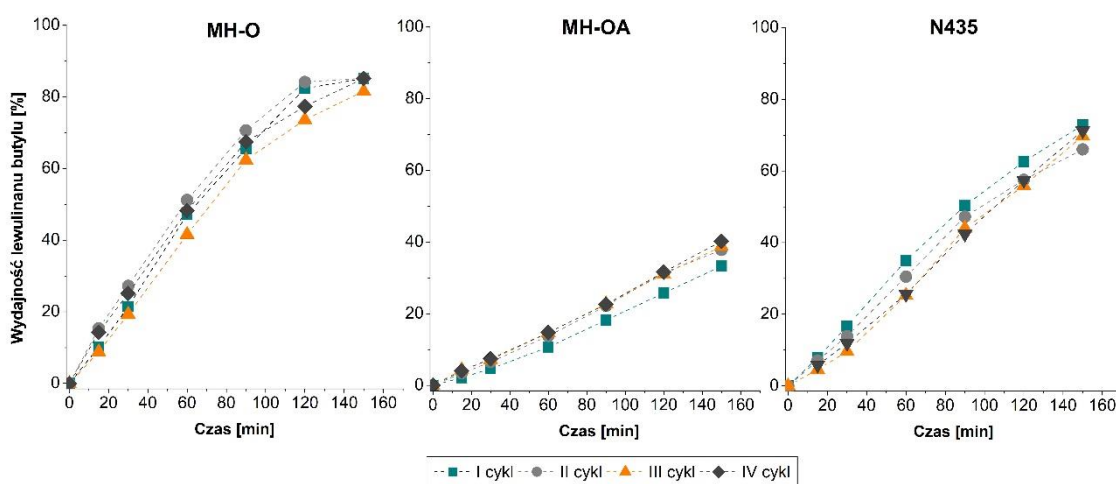
Warunki reakcji: kwas lewulinowy (355 mM), n-butanol (712 mM), eter diizopropylowy (90,03 ml), objętość całkowita - 100 ml, lipaza (1 g MH lub 0,26 g N435), 50°C, 500 rpm

Z przeprowadzonych badań, wynika, że lipaza immobilizowana kowalencyjnie na nośnikach modyfikowanych grupami aminowymi (MH-A) praktycznie nie wykazywała aktywności w reakcji estryfikacji (Rys. 29A). Podobnie jak w reakcji hydrolizy, najlepszą aktywność w przeliczeniu na gram biokatalizatora wykazał N435. Aktywność lipazy immobilizowanej na MH-O była wprawdzie niższa, ale wciąż dwukrotnie wyższa niż dla biokatalizatora immobilizowanego na MH-OA. Niższa aktywność lipazy immobilizowanej na MH-OA, w porównaniu do MH-O była zaskakująca, gdyż na nośnikach typu MH-OA związało się dwukrotnie więcej białka (Tabela 7). Aktywność badanych katalizatorów zmniejszała się odpowiednio

MH-O>MH-OA>MH-A. Podobne obserwacje zostały opisane w literaturze, gdzie lipazy immobilizowane na monofunkcjonalizowanych, hydrofobizowanych nośnikach wykazywały wyższą aktywność w reakcjach prowadzonych zarówno w środowisku wodnym jak i rozpuszczalnika organicznego, w porównaniu do tych opartych o nośniki bifunkcjonalizowane (Rozdział 4.1.1.). Najprawdopodobniej, pomimo podobnej orientacji przestrzennej lipazy na obu typach nośników (MH-O, MH-OA), dodatkowe jej usztywnienie poprzez kowalencyjne związanie z grupą aminową (MH-OA) ogranicza elastyczność enzymu niezbędną do zachowania jego aktywności katalitycznej.

Nieco inny obraz otrzymuje się po przeliczeniu aktywności lipaz na ilość związanego białka (tzw. aktywność właściwa). Biorąc powyższe pod uwagę, najlepszym biokatalizatorem jest lipaza osadzona na krzemionce funkcjonalizowanej grupami oktylowymi (MH-O, Rys. 29B). Widać zatem wyraźnie, że wysoka aktywność N435, czy to w reakcji hydrolizy czy estryfikacji, wynika z dużej ilości białka związanego z polimerową matrycą.

W ramach prowadzonych badań określono również stabilność otrzymanych katalizatorów w kolejnych cyklach procesowych. Testów tych nie wykonano dla katalizatora opartego o nośnik typu MH-A, gdyż nie wykazywał on aktywności w estryfikacji kwasu lewulinowego. Wszystkie przebadane biokatalizatory cechowały się bardzo dobrą stabilnością w kolejnych cyklach reakcyjnych (Rys. 30). W środowisku organicznym powinowactwo enzymu do nośnika jest większe niż powinowactwo enzymu do rozpuszczalnika organicznego, więc nie obserwuje się jego wymywania z nośnika.



Rys. 30 Stabilność biokatalizatorów w reakcji estryfikacji kwasu lewulinowego *n*-butanolem w środowisku eteru diizopropylowego.

Warunki reakcji: kwas lewulinowy (355 mM), *n*-butanol (712 mM), eter diizopropylowy (90,03 ml), objętość całkowita – 100 ml, lipaza (1 g MH lub 0,26g N435), 50°C, 500 rpm

7.1.3. Stabilność lipaz immobilizowanych na modyfikowanych krzemionkach w różnych rozpuszczalnikach organicznych

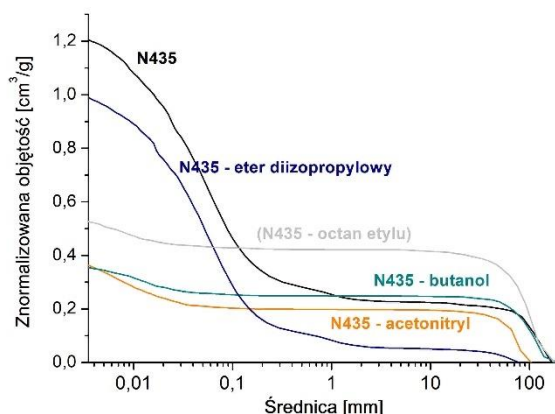
W literaturze istnieje wiele doniesień na temat negatywnego wpływu niektórych rozpuszczalników organicznych na aktywność biokatalizatorów. Mogą one nie tylko powodować dezaktywację enzymu, ale także reagować/wpływać destrukcyjnie na sam nośnik, a przez to pośrednio na aktywność heterogenicznego biokatalizatora [198]. Zastosowanie nieorganicznych nośników krzemionkowych, które z definicji są odporne na rozpuszczalniki organiczne, praktycznie eliminuje wpływ rozpuszczalników na strukturę nośnika [3,14]. Jednakże wciąż należy się liczyć z negatywnym wpływem rozpuszczalnika organicznego na aktywność osadzonego na krzemionce enzymu. Wprawdzie, w przypadku stosowania eteru diizopropylowego nie zaobserwowano negatywnego wpływu rozpuszczalnika na badane biokatalizatory, jednak w celu wykazania szerszych możliwości ich zastosowania przeprowadzono dodatkowe testy stabilności w innych rozpuszczalnikach organicznych. Sprawdzone wpływ różnych rozpuszczalników na stabilność i aktywność otrzymanych biokatalizatorów. Podobnym testom poddano również handlowy Novozym 435. Wybrano rozpuszczalniki, które są często wykorzystywane w syntezie organicznej, lub są produktami reakcji (np. estryfikacji). Biokatalizatory inkubowano w rozpuszczalniku przez 24 h, w temperaturze 37°C, a następnie zdekantowano rozpuszczalnik i biokatalizator dokładnie wysuszono. Tak otrzymane preparaty zastosowano w modelowej reakcji hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu.

Na *Rys. 31* przedstawiono zdjęcia biokatalizatorów (lipaza osadzona na monolitach krzemionkowych funkcjonalizowanych grupami oktylowymi (MH-O), oktylowymi i aminowymi jednocześnie (MH-OA) oraz Novozym 435 (N435), po inkubacji w różnych rozpuszczalnikach organicznych. Można zauważyć, że po dokładnym wysuszeniu nośniki krzemionkowe nie wykazywały istotnych zmian w wyglądzie zewnętrznym, podczas gdy w przypadku N435 zauważono widoczne zmiany (*Rys. 31*). Dodatkowe testy, porozymetria rtęciowa i niskotemperaturowa adsorpcja azotu potwierdziły te obserwacje.

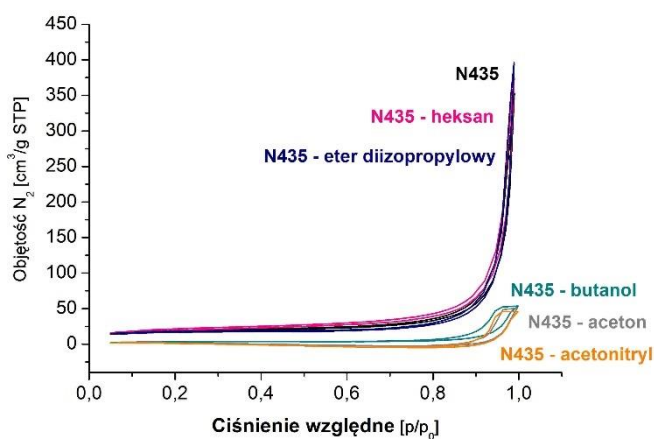
ROZPUSZCZALNIK	-	OCTAN ETYLU	HEKSAN	BUTANOL	ACETON	ETER DIIZOPROPYLO- -WY	ACETONITRYL	TOLUEN	CHLOROFORM
N435									
MH-O									
MH-OA									

Rys. 31 Biokatalizatory po inkubacji w różnych rozpuszczalnikach organicznych – Novozym 435 (N435), lipaza osadzona na nośniku z grupami oktylowymi (MH-O) lub oktylowymi i aminowymi (MH-OA)

Metodą porozymetrii rtęciowej określono porowatość w zakresie mezo- i makroporów (Rys. 32), natomiast metodą niskotemperaturowej adsorpcji azotu (Rys. 33) określono objętość mezoporów (V_p) oraz powierzchnię właściwą (S_{BET}) N435 po inkubacji w różnych rozpuszczalnikach. Dla wszystkich biokatalizatorów oznaczono również aktywność po inkubacji w rozpuszczalniku, stosując je w reakcji hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu (Tabela 8; jako 1 przyjęto aktywność biokatalizatorów nieinkubowanych wcześniej w rozpuszczalniku).



Rys. 32 Rozkład skumulowanej objętości porów w funkcji średnicy dla Novozymu 435 (N435) inkubowanego w różnych rozpuszczalnikach organicznych, określony metodą porozymetrii rtęciowej



Rys. 33 Izotermy adsorpcji i desorpcji azotu w -196° dla N435 inkubowanego w różnych rozpuszczalnikach organicznych

Tabela 8 Parametry struktury biokatalizatorów inkubowanych w rozpuszczalnikach organicznych oraz ich aktywność w reakcji hydrolizy octanu p-nitrofenylu
Warunki reakcji: p-NPA (0,825 mM) w buforze fosforanowym (50 mM, pH 7,0, 34 ml), lipaza (0,1 g biokatalizatora), 37°C, 500 rpm

Rozpuszczalnik	N435			MH-O	MH-OA
	Nazwa	S _{BET} [m ² /g]	V _p [cm ³ /g]	Pozostała aktywność	Pozostała aktywność
-	59	0,48	1,00	1,00	1,00
Aceton	3	0,07	0,84±0,06	0,87±0,03	0,97±0,00
Acetonitryl	1	0,07	0,72±0,04	0,95±0,03	0,83±0,11
Butanol	11	0,08	0,87±0,06	1,00±0,05	0,86±0,02
Chloroform	-	-	1,00±0,04	0,95±0,01	0,91±0,00
Eter diizopropylowy	53	0,53	0,97±0,18	1,00±0,08	0,92±0,10
Heksan	67	0,51	1,00±0,12	1,00±0,01	1,00±0,01
Octan etylu	-	-	0,22±0,01	1,00±0,05	0,66±0,01
Toluen	-	-	1,00±0,03	0,97±0,12	0,98±0,08

Jak można zauważyć (*Rys. 32, Rys. 33, Tabela 8*), wiele rozpuszczalników organicznych wpływa negatywnie na strukturę porów N435 i, co jest zaskakujące, różnice występują zarówno w skali makro jak i mezoporów (*Rys. 32*). Zaobserwowano, że butanol i acetonitryl miały znaczący i destrukcyjny wpływ na strukturę mezoporów, przy zachowaniu struktury makroporów żywicy będącej nośnikiem w preparacie N435. Eter diizopropylowy natomiast wykazywał równomierne niewielkie działanie na strukturę obu rodzajów porów w N435. Największy wpływ na strukturę nośnika w N435 miał octan etylu, w przypadku którego objętość makroporów wzrosła prawie dwukrotnie i obserwowano tzw. „puchnięcie” żywicy Lewatit VP OC 1600 (poli/metakrylan metylu sieciowany diwinylobenzenem).

Zmiany strukturalne polimerowego nośnika mogą być związane z jego rozpuszczaniem i uwalnianiem do mieszaniny reakcyjnej różnych związków chemicznych [98,101] (co omówiono szerzej w *Rozdziale 4.1.1*). Jednakże w ramach niniejszej pracy nie prowadzono badań potwierdzających te doniesienia.

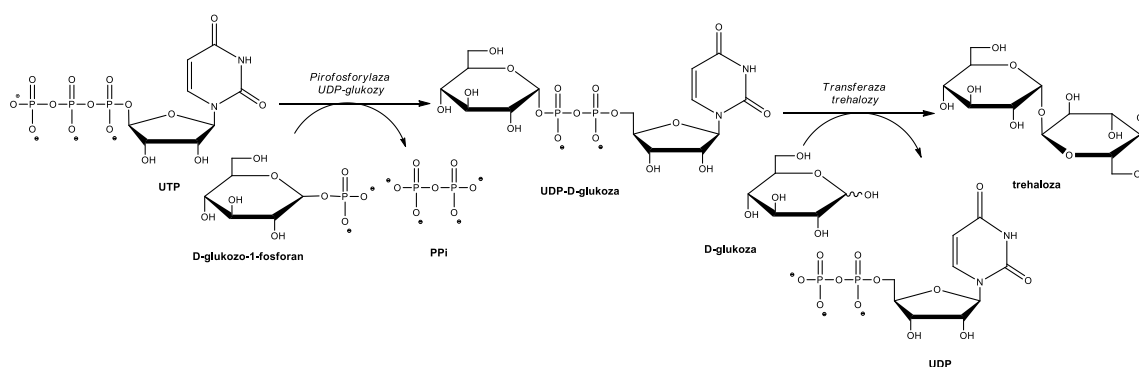
Badania wykazały, że rozpuszczalniki takie jak: chloroform, eter diizopropylowy, toluen i heksan nie wpłynęły znacząco na aktywność badanych biokatalizatorów (*Tabela 8*). W przypadku acetonu, butanolu i acetonitrylu, względna aktywność N435 zmieniła się nieznacznie i wynosiła 72-87% w stosunku do kontroli. Największe zmiany obserwowano dla N435 inkubowanego w octanie etylu, gdzie relatywna aktywność wynosiła tylko 22%. Można zauważyć, że znaczny

spadek aktywności dobrze koreluje ze zmianami w strukturze nośnika polimerowego (*Tabela 8, Rys. 32 i Rys.33*). Należy podkreślić, że otrzymane w ramach niniejszej pracy biokatalizatory, bazujące na sfunkcjonalizowanych nośnikach krzemionkowych (MH-O, MH-OA), nie wykazywały znaczącej wrażliwości na organiczne rozpuszczalniki, co w konsekwencji przekładało się na lepszą stabilność otrzymanych biokatalizatorów.

Wcześniejsze obserwacje opisane w literaturze oraz przeprowadzone badania są niewątpliwie dowodem na ingerencję rozpuszczalników organicznych w strukturę polimerowego nośnika oraz zanieczyszczenie mieszaniny reakcyjnej, co należy brać pod uwagę podczas planowania procesu biotransformacji z zastosowaniem N435, szczególnie w przypadku produktów stosowanych w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym czy kosmetycznym, gdzie wymagana jest ich wysoka czystość.

7.2. Immobilizacja pirofosforylasy UDP-glukozy i jej zastosowanie do produkcji trehalozy

Prezentowane w niniejszym rozdziale badania realizowano w ramach projektu ERA-NET IB, którego głównym założeniem było opracowanie stabilnej kaskady enzymatycznej do ciągłej produkcji cennych sacharydów i ich pochodnych, w tym m. in. trehalozy. Do tego celu zaproponowano wykorzystanie pirofosforylasy UDP-glukozy (GalU) oraz transferazy trehalozy (TreT). Pirofosforylase UDP-glukozy (GalU) zastosowano jako katalizator reakcji syntezy UDP-glukozy z 5'-urydynotrifosforanu (UTP) i glukozy-1-fosforanu. Transferaza trehalozy z kolei należy do glikozylotransferaz typu Leloir, katalizujących stereo- i enancjoselektywnie przeniesienie cukrowej pochodnej nukleotydu (5'-urydynodifosforanu glukozy - UDP-glukozy), będącej donorem reszty cukrowej, na monosacharyd (glukozę) [199]. W rezultacie powstaje trehaloza oraz 5'-urydynodifosforan (UDP) (Rys. 34).



Rys. 34 Synteza trehalozy katalizowana pirofosforylazą UDP-glukozy i transferazą trehalozy

Pirofosforylaza UDP-glukozy została wyizolowana z aktynobakterii *Thermocristum agreste* DSM 44070 (*TaGalU*) i nieodpłatnie przekazana przez zespół prof. Dirka Tishlera w ramach współpracy w projekcie ERA-IB. *TaGalU* cechuje się niezwykle wysoką aktywnością. Spośród wszystkich pirofosforylaz UDP-glukozy, enzym ten zajmuje drugie miejsce pod względem aktywności specyficznej w syntezie UDP-glukozy z UTP i glukozy-1-fosforanu, jednak jej stabilność w podwyższonych temperaturach jest stosunkowo niska [130]. Możliwości aplikacyjne natywnych form enzymu są utrudnione ze względu na małą stabilność operacyjną i krótki okres trwałości oraz brak możliwości wielokrotnego wykorzystania. Aby uniknąć tych ograniczeń, w ramach niniejszej pracy *TaGalU* zaimmobilizowano kowalencyjnie na nośnikach krzemionkowych. Docelowo, plan badań zakładał wykorzystanie tego enzymu w systemie ciągłym, a tym samym jego immobilizację wewnątrz monolitu krzemionkowego, będącego rdzeniem mikroreaktora. Prace te poprzedzono doбором warunków immobilizacji tego enzymu i prowadzenia procesu ciągłego. Wstępne eksperymenty

doboru warunków immobilizacji prowadzono na proszkowych odpowiednikach monolitów krzemionkowych – mezoporowatych piankach komórkowych (MCF). Ze względu na tożsamy charakter chemiczny materiałów typu MCF i monolitów krzemionkowych wytypowane parametry unieruchamiania zostały następnie zastosowane w badaniach immobilizacji *TaGalU* na nośnikach monolitycznych. Ostatecznie, sprawdzono możliwości aplikacji otrzymanego biokatalizatora w kaskadzie do ciągłej produkcji trehalozy. Dokładną charakterystykę obu rodzajów nośnika przedstawiono w *Rozdziale 5.6*.

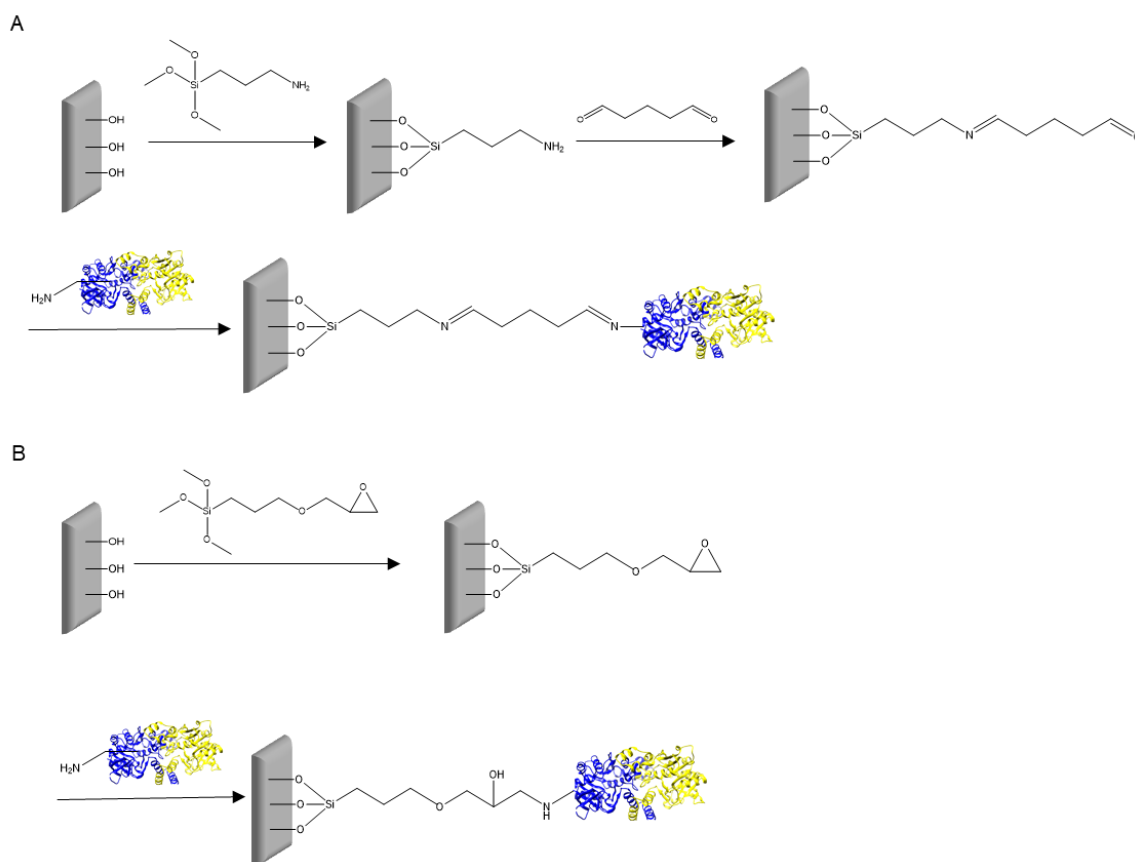
Należy zaznaczyć, że niewiele jest doniesień literaturowych opisujących immobilizację pirofosforylasy UDP-glukozy czy glikozylotransferaz typu Leloir (*podrozdział 4.2.1.3*). Ponadto, na podstawie przeglądu literaturowego stwierdzono, że tematyka dotycząca immobilizacji, a potem zastosowania kaskady enzymatycznej składającej się z glikozylotransferazy typu Leloir (transferaza trehalozy) oraz pirofosforylaz UDP-glukozy nie była dotychczas opisana.

Należy również nadmienić, że natywna forma pirofosforylasy UDP-glukozy została wyizolowana i scharakteryzowana przez Dr Antje Kumpf z Ruhr Universität Bochum, zaś izolacją i charakterystyką transferazy trehalozy zajmował się Dr Luuk Mestrom z TU Delft, a immobilizacją i charakterystyką immobilizowanej formy transferazy trehalozy mgr inż. Marta Przepis, doktorantka Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej, co zostało szczegółowo opisane w ich pracach doktorskich. Co więcej, badania nad zastosowaniem kaskady enzymatycznej do produkcji trehalozy prowadzone były wspólnie z mgr inż. Martą Przepis, a wyniki otrzymane w ramach tej współpracy przedstawiono w obu rozprawach doktorskich.

7.2.1. Dobór warunków immobilizacji pirofosforylasy UDP-glukozy

Pierwszym etapem badań był dobór warunków immobilizacji *TaGalU*. Spośród różnych metod unieruchamiania enzymów, najczęściej stosowaną jest immobilizacja poprzez wiązanie kowalencyjne, gdyż umożliwia silne związanie enzymu z nośnikiem, zapobiegając jego wymywaniu, a tym samym zwiększając stabilność biokatalizatora [23,200]. Istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność immobilizacji jest charakter chemiczny zastosowanego nośnika (rodzaj grup funkcyjnych na jego powierzchni). Enzym *TaGalU* unieruchomiono kowalencyjnie na nośniku krzemionkowym w formie proszku (MCF), modyfikowanym grupami aminowymi lub epoksydowymi. Nośniki funkcjonalizowane grupami aminowymi są wykorzystywane najczęściej, ale jak już wspomniano w *Rozdziale 2.2*, wymagają one aktywacji aldehydem glutarowym (*Rys. 35A*). Z kolei grupy epoksydowe znajdujące się na nośniku, mogą reagować bezpośrednio z grupami obecnymi w łańcuchach bocznych aminokwasów w enzymie (aminowymi, tiolowym czy hydroksylowymi), tworząc silne wiązanie kowalencyjne,

przy niewielkiej modyfikacji struktury białka. Proces ten zachodzi w łagodnych warunkach (Rys. 35B) [200-203]. Dzięki przedstawionym zaletom, nośniki funkcjonalizowane grupami aminowymi i epoksydowymi są najczęściej wykorzystywane do kowalencyjnej immobilizacji



enzymów i zostały one wybrane również do badań w niniejszej pracy.

Rys. 35 Ogólny schemat funkcjonalizacji nośnika krzemionkowego grupami aminowymi (A) lub epoksydowymi (B) i kowalencyjnej immobilizacji pirofosforylasy UDP-glukozy. Strukturę pirofosforylasy UDP-glukozy otrzymano od A. Kumpf.

Istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność immobilizacji jest dobór odpowiedniego pH, ze względu na jonizację białek oraz na reaktywność (dostępność) grup funkcyjnych nośnika [204,205]. Wpływ pH na immobilizację *TaGalU* przetestowano w zakresie 5,3–7,8. W Tabeli 9 zebrano wyniki immobilizacji *TaGalU* na obydwu badanych nośnikach, w zależności od pH.

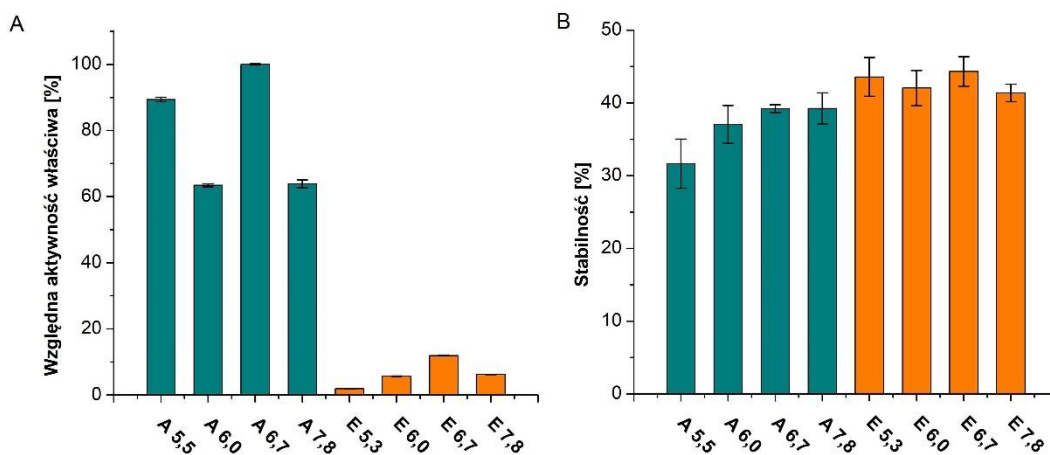
Tabela 9 Ilość zaimmobilizowanego białka oraz wydajność immobilizacji TaGalU na MCF, w zależności od grupy funkcyjnej oraz pH immobilizacji

Nośnik	pH immobilizacji	Ilość zaimmobilizowanego białka [mg/ g nośnika]	Wydajność immobilizacji [%]
MCF-A	5,5	19,8	48
	6,0	30,1	78
	6,7	17,4	43,8
	7,8	24,1	66
MCF-E	5,3	38,5	100
	6,0	38,0	100
	6,7	34,4	86,3
	7,8	35,4	82,3

Znacznie więcej białka zostało unieruchomione na MCF funkcjonalizowanym grupami epoksydowymi, w porównaniu do nośnika z grupami aminowymi (Tabela 9). W przypadku nośnika typu MCF-E ilość zaimmobilizowanego białka nieznacznie maleje wraz ze wzrostem pH immobilizacji, natomiast dla nośnika typu MCF-A nie obserwuje się wyraźnej zależności. Najmniej białka związało się z nośnikiem modyfikowanym grupami aminowymi przy zastosowaniu pH 5,5 oraz 6,7 (odpowiednio 19,8 i 17,4 mg/g nośnika).

Aktywność otrzymanych biokatalizatorów badano w reakcji syntezy UDP-glukozy z UTP i glukozo-1-fosforanu. Stwierdzono, że ilości zaimmobilizowanego białka nie przekładają się na aktywności otrzymanych biokatalizatorów. Zaobserwowano, że TaGalU immobilizowana na nośnikach modyfikowanych grupami aminowymi wykazuje znacznie lepszą aktywność aniżeli immobilizowana na nośnikach z grupami epoksydowymi (Rys. 36A). Obserwowany efekt najprawdopodobniej wynika z usytuowania cząsteczki białka względem powierzchni nośnika. Immobilizacja poprzez grupy aminowe wymaga aktywacji aldehydem glutarowym (GLA), który jednocześnie jest linkerem. Jak już wspomniano w Rozdziale 2.2, GLA ma tendencję do tworzenia dimerycznych lub trimerycznych struktur, pozwalając na odsunięcie cząsteczki białka od powierzchni nośnika. Pozwala to na większą mobilność unieruchomionego enzymu, co najprawdopodobniej korzystnie wpływa na jego aktywność katalityczną. Podobne zachowanie obserwowali również inni badacze [51,52,194,203]. Natomiast unieruchomienie enzymu na nośnikach modyfikowanych grupami epoksydowymi prawdopodobnie powoduje deformację lub nadmierną sztywność trzeciorzędowej struktury białka, co utrudnia strukturalną i konformacyjną elastyczność, niezbędną dla zachowania

optymalnej aktywności enzymu. Rozważając wpływ pH immobilizacji na aktywność enzymu wykazano, że najlepsze wyniki otrzymano stosując pH 6,7 w procesie immobilizacji. Tendencja ta została zachowana przy katalizatorach bazujących na krzemionkach funkcjonalizowanych zarówno grupami aminowymi jak i epoksydowymi (Rys. 36A).



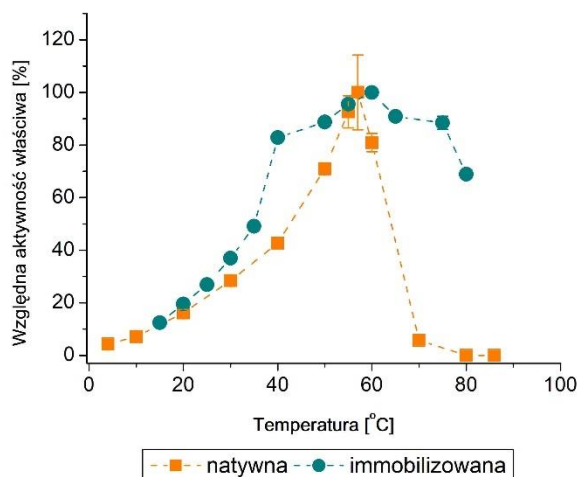
Rys. 36 Wpływ grup funkcyjnych na nośniku krzemionkowym (A- aminowe, E –epoksydowe) oraz pH immobilizacji na aktywność właściwą TaGalU (A) i stabilność w trakcie przechowywania (B) immobilizowanej TaGalU

Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), MgCl₂ (3 mM) w HEPES (50 mM, pH 7,0), objętość całkowita – 3 ml, TaGalU immobilizowana na MCF-A lub MCF-E (1,1 mg biokatalizatora), 30°C, 500 rpm, 5 min. Najwyższą otrzymaną aktywność (uzyskaną przy A 6,7) przedstawiono jako 100%. Stabilność przechowywania przedstawiono jako stosunek aktywności enzymu po 1 miesiącu przechowywania w 4°C do aktywności enzymu bezpośrednio po immobilizacji. Aktywność początkową (przed inkubacją) przedstawiono jako 100%. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczono z trzech powtórzeń.

Z praktycznego punktu widzenia, oprócz aktywności katalitycznej, bardzo istotnym czynnikiem jest również stabilność biokatalizatora. W związku z tym aktywność biokatalizatorów przetestowano po miesiącu ich przechowywania w HEPES o odpowiednim pH, w temperaturze 4°C. We wszystkich testowanych przypadkach biokatalizatory wykazywały ok. 40% aktywności początkowej (Rys. 36B). Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki zdecydowano, że do dalszych badań do immobilizacji TaGalU stosowane będą nośniki z grupami aminowymi oraz 0,1 M bufor fosforanowy, pH 6,7.

7.2.2. Profil temperaturowy i pH immobilizowanej TaGalU

Otrzymany heterogeniczny biokatalizator poddano charakterystyce procesowej. Sprawdzono wpływ temperatury na aktywność immobilizowanej TaGalU w zakresie temperatur 15-80°C (Rys. 37).

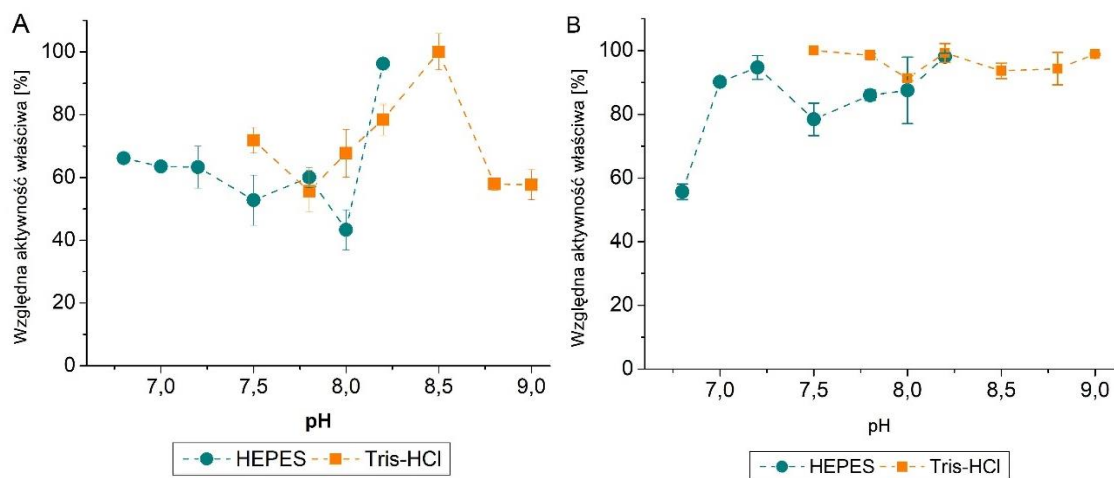


Rys. 37 Profil temperaturowy TaGalU natywnej* i immobilizowanej na MCF-A
Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), MgCl₂ (3 mM) w HEPES (50 mM, pH 7,0), objętość całkowita – 3 ml, TaGalU immobilizowana na MCF-A (0,93 μg białka), zakres temperatur 15-80°C, 500 rpm; aktywność wyznaczoną w optimum temperaturowym przyjęto jako 100%. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczono z trzech powtórzeń.

* wyniki dla enzymu natywnego wykonała A. Kumpf [130]

Otrzymany profil temperaturowy pozwala na stwierdzenie, że optimum temperaturowe dla immobilizowanej TaGalU mieści się w zakresie 50-70°C (Rys. 37). Porównując te wyniki z otrzymanymi przez dr Kumpf dla enzymu natywnego, można zauważyć znacznie szerszy zakres temperatur, w którym immobilizowany enzym wykazuje aktywność 80-100% [130]. Oznacza to, że unieruchomienie na nośniku krzemionkowym stabilizuje strukturę enzymu, dzięki czemu biokatalizator jest mniej wrażliwy na zmiany warunków i wykazuje dobrą aktywność w szerszym zakresie temperatur. Podobne wyniki zostały już wcześniej zaobserwowane dla innych enzymów [10,12,206].

Wyznaczono również profil pH dla badanego enzymu, stosując bufor HEPES w zakresie 6,8-8,2 oraz Tris-HCl w zakresie 7,5-9,0 (Rys. 38).

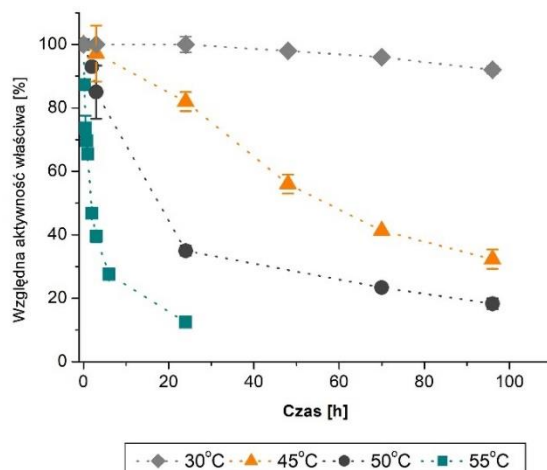


Rys. 38 Profil pH TaGalU natywnej*(A) i immobilizowanej (B) na MCF-A
 Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), MgCl₂ (3 mM) w buforze (50 mM), objętość całkowita – 3 ml, TaGalU immobilizowana na MCF-A (0,93 µg białka), 50°C, 500 rpm. Aktywność zmierzona w optimum pH (8,5 dla natywnej, 7,5 dla immobilizowanej) została wzięta jako 100% aktywności. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczono z trzech powtórzeń.
 * wyniki dla enzymu natywnego wykonała A. Kumpf [130]

Analizując profil pH można zauważyć, że TaGalU immobilizowana na nośniku krzemionkowym wykazuje bardzo wysoką aktywność w znacznie szerszym zakresie pH (7,0-9,0), w porównaniu do natywnej formy, dla której optimum pH obserwuje się przy 8,5 (Rys. 38). Jednym ze sposobów wyjaśnienia tego zjawiska może być sugerowana w literaturze teza, że mikrośrodowisko wokół centrum aktywnego immobilizowanego enzymu i mieszaniny reakcyjnej ma często nierówny podział stężeń jonów H⁺ i OH⁻ z powodu oddziaływań elektrostatycznych z nośnikiem, a tym samym różni się od mikrośrodowiska enzymu natywnego, co niejednokrotnie prowadzi do przesunięcia optimum pH [200,207-209]. Choć immobilizowana TaGalU wykazywała wysoką aktywność praktycznie w całym testowanym zakresie pH, to ze względu na niestabilność białka podczas stosowania buforu Tris-HCl [130], w dalszych badaniach stosowano bufor HEPES pH 7,0.

7.2.3. Długoterminowa stabilność temperaturowa immobilizowanej TaGalU

Rozważając możliwości aplikacyjne biokatalizatora, zbadano również długoterminową stabilność termiczną immobilizowanej TaGalU. W tym celu unieruchomiony enzym inkubowano w temperaturze 30, 45, 50 lub 55°C przez określony czas, po czym testowano jego aktywność w reakcji modelowej, według procedury opisanej w *Rozdziale 5.10*. Wyniki zebrano na *Rys. 39*.



Rys. 39 Długoterminowa stabilność temperaturowa immobilizowanej TaGalU

Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), MgCl₂ (3 mM) w HEPES (50 mM, pH 7,0), objętość całkowita -3 ml, TaGalU immobilizowana na MCF-A (0,93 μg białka), temperatura prowadzenia reakcji: 50°C, 500 rpm. Inkubacja immobilizowanego enzymu w odpowiedniej temperaturze. 100% aktywności względnej odpowiada aktywności enzymu przed inkubacją. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczono z trzech powtórzeń.

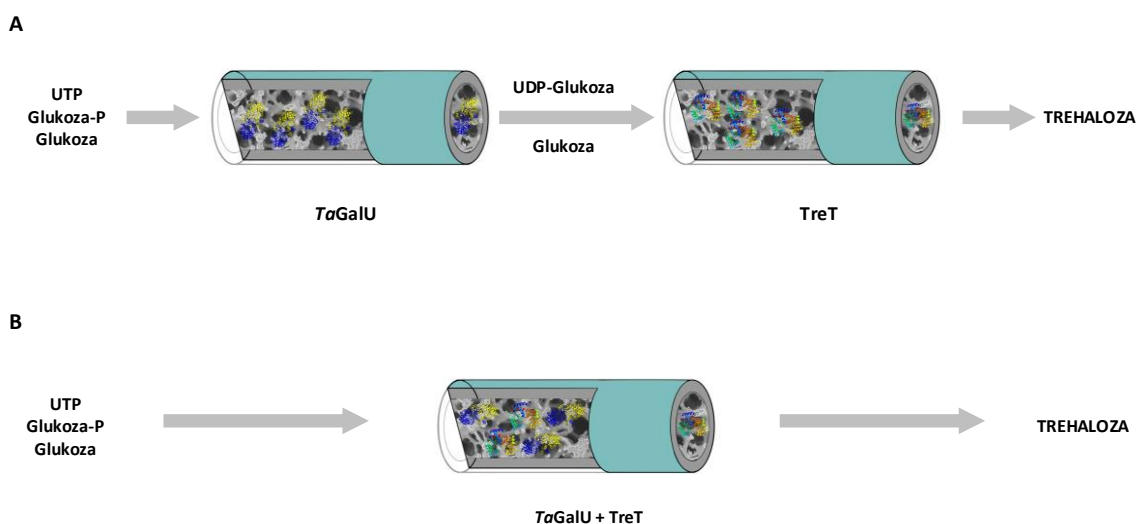
Pomimo, iż enzym ten, jak wynika z profilu temperaturowego, najlepszą aktywność osiąga w temperaturze 60°C (*Rys. 37*), to w tych warunkach jest całkowicie niestabilny. Co więcej, dwudziestoczerogodzinna inkubacja w temperaturze 55°C spowodowała utratę 90% początkowej aktywności (*Rys. 39*). Nieco lepszą stabilność enzym wykazywał w 50 i 45°C. Po 24 h inkubacji w tych temperaturach aktywność TaGalU obniżyła się odpowiednio o 40 i 80% (w stosunku do aktywności początkowej). Jedynie w temperaturze 30°C biokatalizator ten był stabilny przez ponad 90 h inkubacji, co z punktu widzenia stosowania w procesie ciągłym jest bardzo ważne. Otrzymane wyniki mają istotny wpływ na wybór temperatury prowadzenia procesu kaskadowego, opisanego w dalszej części pracy. Ponadto dowiedziono, że immobilizacja TaGalU przyczyniła się do znacznej poprawy stabilności tego enzymu w porównaniu do jego natywnej formy [130].

Dotychczas zaprezentowane wyniki potwierdzają korzystny wpływ kowalencyjnego związania TaGalU ze zmodyfikowanym nośnikiem krzemionkowym (MCF), szczególnie w aspekcie stabilności enzymu. Należy również podkreślić, że przy wyborze warunków prowadzenia reakcji z użyciem immobilizowanej TaGalU konieczne będzie dobranie

warunków, będących kompromisem między najwyższą aktywnością enzymu a jego długoterminową stabilnością temperaturową.

7.2.4. Immobilizacja *TaGalU* wewnątrz mikroreaktora i jej zastosowanie w systemie kaskadowym do syntezy trehalozy w układzie ciągłym

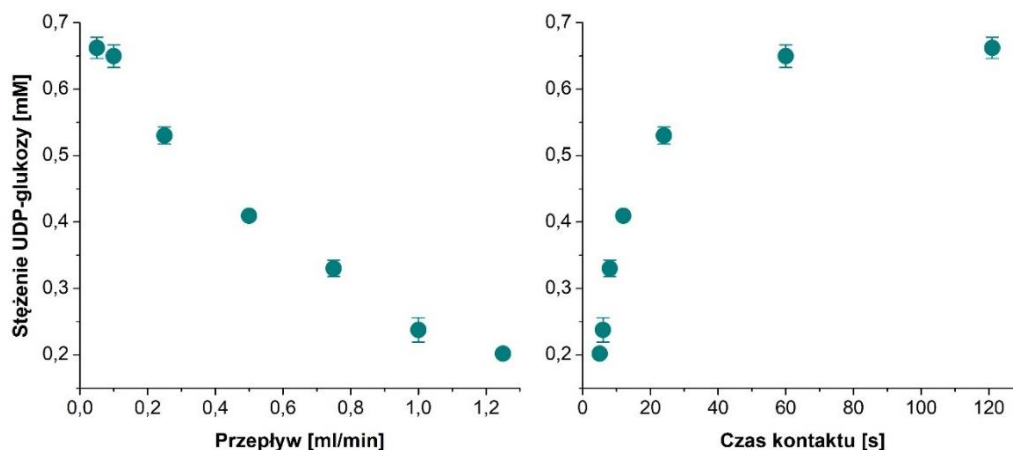
Określone w poprzednich rozdziałach warunki immobilizacji i pracy immobilizowanej *TaGalU* zastosowano w badaniach unieruchomienia tego enzymu na monolitach krzemionkowych. W niniejszym podrozdziale przedstawiono możliwość zastosowania immobilizowanej pirofosforylasy UDP-glukozy w połączeniu z immobilizowaną transferazą trehalozy w procesie ciągłej syntezy trehalozy. W ramach niniejszej pracy zaproponowano dwie koncepcje kowalencyjnej immobilizacji enzymów wchodzących w skład kaskady: immobilizację każdego enzymu wewnątrz osobnych krzemionkowych mikroreaktorów (Rys. 40A) oraz współimmobilizację (z ang. *co-immobilization*) obu enzymów wewnątrz jednego mikroreaktora (Rys. 40B).



Rys. 40 Koncepcja kaskady enzymatycznej: Immobilizacja *TaGalU* i *TreT* na osobnych monolitach (A), współimmobilizacja *TaGalU* i *TreT* (B)

Pierwszym etapem otrzymania ciągłej kaskady enzymatycznej była immobilizacja poszczególnych enzymów wewnątrz monolitu i określenie ich aktywności katalitycznej i stabilności procesowej. *TaGalU* zaimmobilizowano wewnątrz monolitu krzemionkowego w formie pałki o długości 1 cm i średnicy 6 mm (Rys. 16C, Rozdział 6). Ze względu na wysoką aktywność tego enzymu, zastosowanie tak krótkiego monolitu jest wystarczające. Nośnik na swej powierzchni zawierał grupy aminowe, które aktywowano aldehydem glutarowym, a immobilizację prowadzono w pH 6,7, co ustalono w podrozdziale 7.2.1. We wnętrzu mikroreaktora unieruchomiono 6,3 mg białka (wydajność immobilizacji 20,5%). Tak przygotowany mikroreaktor testowano w reakcji syntezy UDP-glukozy z UTP i glukozo-1-

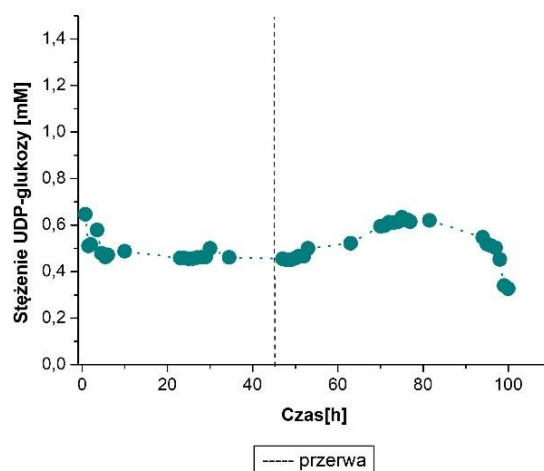
fosforanu, stosując przepływy reagentów w zakresie 0,05-1,25 ml/min, co we wskazanej geometrii monolitu generuje czas kontaktu enzym-substrat od 5 sekund do 2 min. Zastosowanie przepływu 0,05 ml/min (czas kontaktu 2 min) pozwala na otrzymanie ok. 0,65 mM UDP-glukozy, co daje ok. 33% wydajności produktu. Jak się spodziewano, wraz ze wzrostem czasu kontaktu (zmniejszenie natężenia przepływu) obserwowano wyższe wydajności produktu (Rys. 41).



Rys. 41 Aktywność katalityczna TaGalU immobilizowanej wewnątrz monolitu krzemionkowego, w reakcji otrzymywania UDP-glukozy

Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), $MgCl_2$ (3 mM) w HEPES (50 mM, pH 7,0), TaGalU immobilizowana na MH-A (6,3 mg białka), 30°C, przepływ 0,05–1,25 ml/min. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczone z trzech powtórzeń.

Z aplikacyjnego punktu widzenia, bardzo istotnym parametrem jest stabilność układu. Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, że aktywność immobilizowanej w mikroreaktorze TaGalU utrzymuje się na stałym poziomie przez 90 h ciągłej pracy w temperaturze 30°C (Rys. 42).



Rys. 42 Stabilność procesowa *TaGalU* immobilizowanej wewnątrz monolitu krzemionkowego w reakcji otrzymywania UDP-glukozy

Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), $MgCl_2$ (3 mM) w HEPES (50 mM, pH 7,0), *TaGalU* immobilizowana na MH-A (6,3 mg białka), 30°C, przepływ 0,05 ml/min

W niniejszych rozważaniach nie przedstawiłam podobnej charakterystyki dla transferazy trehalozy wyizolowanej z *Thermoproteus uzoniensis*, gdyż jest była ona wykonywana przez mgr inż. Martę Przypis i jest częścią Jej rozprawy doktorskiej. Ze względu na konieczność nawiązania do tych badań będę odnosić się do wspólnej publikacji, w której mamy równy, wiodący udział [182].

Kolejnym etapem badań było zatem dobranie najbardziej korzystnych warunków prowadzenia procesu kaskadowego. W tym celu porównano optymalne warunki określone dla poszczególnych enzymów – *TaGalU* i *TreT*. Okazało się, że enzymy te wykazują całkowicie różne preferencje temperaturowe [182]. Jak pokazano w poprzednim rozdziale, *TaGalU* wykazuje dobrą aktywność i stabilność procesową w temperaturze nie wyższej niż 30°C (Rys. 39). W odróżnieniu do transferazy trehalozy, która w tej temperaturze nie wykazuje praktycznie żadnej aktywności. *TreT* jest bowiem enzymem wyizolowanym z organizmu termofilnego (*Thermoproteus uzoniensis*) i jest najbardziej aktywna w temperaturze 55°C [182]. Z kolei w tej temperaturze (55°C) *TaGalU* ulega szybkiej dezaktywacji (Rys. 39).

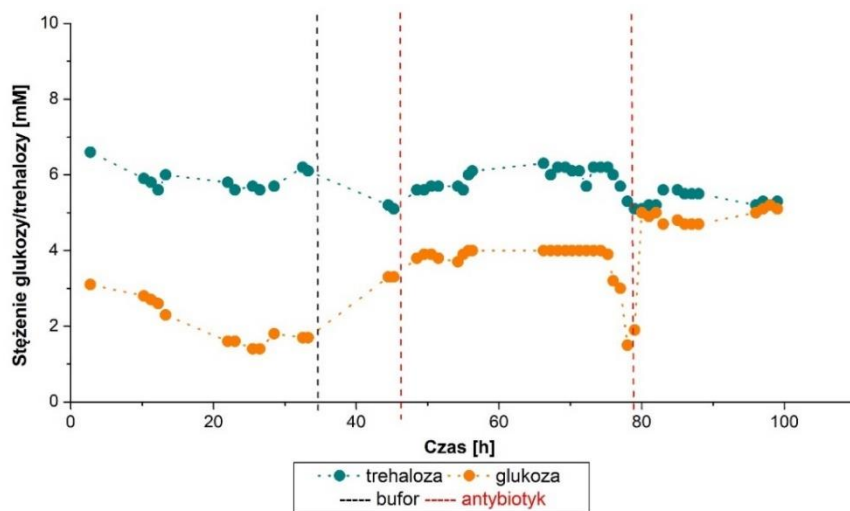
W świetle powyższych wyników, bezzasadnym wydawało się stosowanie układu, w którym oba enzymy byłyby immobilizowane we wnętrzu jednego mikroreaktora. Takie rozwiązanie skutkowałoby niewielką sumaryczną wydajnością procesu, przy zastosowaniu temperatury poniżej 30°C lub bardzo krótką żywotnością mikroreaktora w przypadku zastosowania wyższych temperatur. W takiej sytuacji dobrym pomysłem wydawało się zastosowanie kaskady dwóch mikroreaktorów połączonych jeden za drugim. We wnętrzu pierwszego z nich immobilizowana była *TaGalU*, a we wnętrzu drugiego – *TreT*. W takim układzie każdy z mikroreaktorów mógł pracować w najlepszym dla danego enzymu reżimie temperaturowym, co pozwoliło

na uzyskanie dobrej całkowitej wydajności procesu. Dodatkowo, w razie potrzeby, takie rozwiązanie pozwala na otrzymywanie/wydzielenie produktu pośredniego (tj. UDP-glukozy).

W przypadku prezentowanej kaskady enzymatycznej zastosowano więc system dwóch mikroreaktorów, w którym każdy enzym inkubowany był w temperaturze optymalnej dla niego, czyli temperaturze nie większej niż 30°C dla *TaGalU* oraz 55°C dla *TreT*. Dodatkowo, z myślą o przyszłym zastosowaniu systemu w większej skali oraz biorąc pod uwagę względy ekonomiczne, postanowiono, że *TaGalU* będzie inkubowana w temperaturze pokojowej (ok. 26°C), aby uniknąć dodatkowych kosztów związanych z termostowaniem tego mikroreaktora. Stężenia substratów (10 mM UTP, G1P i Glu) oraz stężenie kofaktora (20 mM MgCl₂) dostosowano do preferencji transferazy trehalozy.

Zastosowanie kaskady łączącej oba mikroreaktory wymaga również doboru odpowiedniego natężenia przepływu, z jakim mieszanina reakcyjna będzie tłoczona przez monolity. Porównując możliwości aplikacyjne pojedynczych biokatalizatorów: *TaGalU* w reakcji syntezy UDP-glukozy z UTP i glukozo-1-fosforanu (*Rys. 41*) oraz *TreT* w reakcji syntezy trehalozy z UDP-glukozy i glukozą [182], wybrano natężenie przepływu 0,05 ml/min. Aby umożliwić całkowitą konwersję UTP i glukozo-1-fosforanu do UDP-glukozy, ilość *TaGalU* w mikroreaktorze zwiększono do 41,1 mg. Zastosowane natężenie przepływu pozwala na otrzymanie trehalozy (wobec transferazy trehalozy) z wydajnością 84% (8,4 mM) [182].

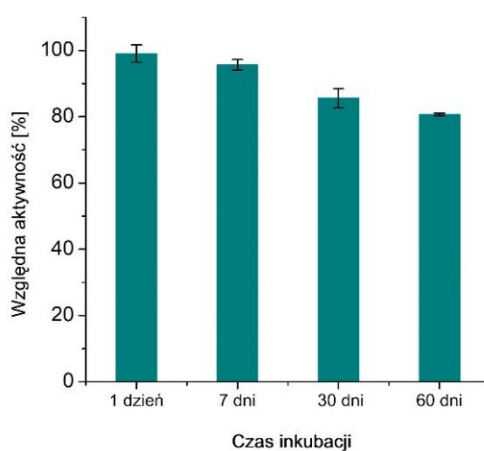
Ostatecznie, oba mikroreaktory połączono ze sobą tworząc układ sekwencyjny pracujący przy przepływie substratów równym 0,05 ml/min, układ pokazany na *Rys. 40A*. Zastosowanie przepływu 0,05 ml/min (tj. 3 ml/h) w prezentowanej kaskadzie mikroreaktorów połączonych jeden za drugim (i. immobilizowana *TaGalU*, ii. immobilizowana *TreT*), umożliwia otrzymanie wydajności produktu końcowego – trehalozy na poziomie około 60-65% (6-6,5 mM), przez ok. 100 h ciągłej pracy całego układu (*Rys. 43*).



Rys. 43 Produkcja trehalozy w kaskadzie enzymatycznej immobilizowanej we wnętrzu mikroreaktorów. Warunki prowadzenia reakcji: UTP (10 mM), G1P (10 mM), Glu (10 mM), $MgCl_2$ (20 mM) w HEPES (50 mM, pH 7,0), TaGalU na MH-A (41,1 mg białka) w temperaturze pokojowej, TreT na MH-A (9,8 mg białka) w 55°C, przepływ 0,05 ml/min

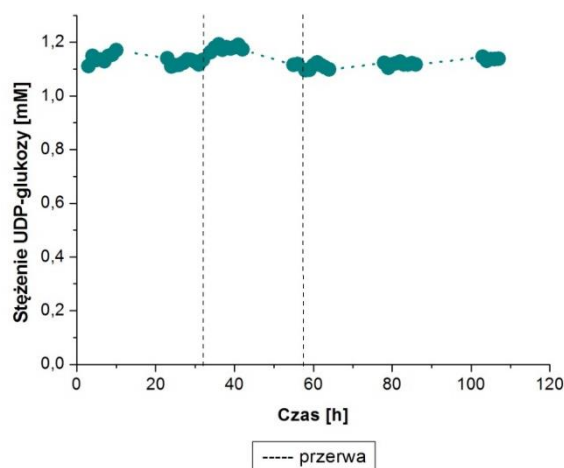
Spadek wydajności trehalozy w procesie prowadzonym w kaskadzie (ok. 65%, Rys. 43), w stosunku do wydajności prezentowanej w pojedynczym mikroreaktorze zawierającym TreT (ok. 84%, [182]), może wynikać z częściowego hamowania aktywności TreT przez fosforany, powstające po pierwszym etapie reakcji. Fosforany są bowiem produktem ubocznym reakcji syntezy UDP-glukozy z UTP, katalizowanej przez TaGalU. Przez pierwsze 30 h procesu (Rys. 43) stężenie otrzymywanej trehalozy utrzymywało się na stałym poziomie ok. 6,5 mM. Zauważono natomiast, że konwersja glukozy, jednego z substratów w procesie, jest wyższa niż wynikałoby to z ilości powstającej trehalozy (stopniowe obniżanie stężenia glukozy, mimo, że stężenie trehalozy utrzymywało się na stałym poziomie, Rys. 43). Powyższe zjawisko najprawdopodobniej wyniknęło z faktu, że we wnętrzu mikroreaktora zaczęły namnażać się mikroorganizmy wykorzystujące glukozę jako pożywkę. Intensywne przemywanie buforem skutkowało minimalną poprawą, dlatego też zdecydowano się na zastosowanie roztworu antybiotyków (firmy Calbiochem), zawierającego w swoim składzie penicylinę, streptomycynę i amfoterycynę B, o działaniu antybakteryjnym i przeciwgrzybicznym. Dzięki zastosowaniu tego preparatu przeciwdrobnoustrojowego, przez kolejne 30 h stężenie glukozy i trehalozy utrzymywało się na stałym poziomie. W ok. 80 h procesu zauważono jednak kolejny, większy spadek stężenia glukozy w badanej mieszaninie reakcyjnej. Tym razem wpłynęło to również na zmniejszenie ilości otrzymywanej trehalozy. Z tego względu zdecydowano się na zastosowanie kolejnej dawki preparatu, co znów ustabilizowało pracę mikroreaktora. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują, że takie działanie jest skuteczne, a immobilizowane enzymy są odporne na działanie koktajlu składającego się z penicyliny, streptomycyny

i amfoterycyny B i zachowują aktywność katalityczną (Rys. 43). Niestety, procedura ta nie niweluje źródła problemu, jakim jest namnażanie się w reaktorach mikroorganizmów. Dodatkowo, powoduje dłuższe przerwy technologiczne, trwające minimum 1 dobę. W tym aspekcie działaniem prewencyjnym może być przechowywanie mikroreaktorów z zaimobilizowanymi enzymami w 0,05% roztworze azynu sodu [210,211], który znany jest jako doskonały inhibitor wzrostu mikroorganizmów. Monolit z zaimobilizowaną TaGalU przechowywano w 0,05% roztworze NaN₃ (temperatura 4°C) i sprawdzano aktywność enzymu, w reakcji standardowej, po 1 dniu, tygodniu, a także po 1 miesiącu i 2 miesiącach. Wyniki przedstawiono na Rys. 44.



Rys. 44 Aktywność TaGalU immobilizowanej wewnątrz mikroreaktora po inkubacji w 0,05% NaN₃ w 4°C
Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), MgCl₂ (20 mM), NaN₃ (0,05%) w HEPES (50 mM, pH 7,0), TaGalU na MH-A (41,1 mg białka), temperatura pokojowa, przepływ 0,4 ml/min

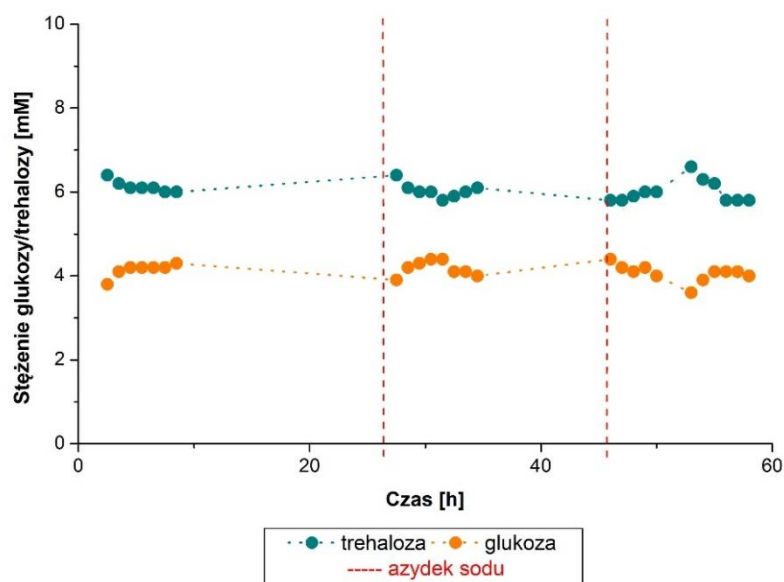
Wyniki przedstawione na Rys. 44 pokazują niewielki spadek aktywności biokatalizatora w czasie przechowywania w roztworze NaN₃. Następnym krokiem było sprawdzenie stabilności procesowej enzymu w obecności NaN₃, co przedstawiono na Rys. 45. Wykazano, że biokatalizator ten jest stabilny przez co najmniej 100 h ciągłej pracy. Co więcej, biokatalizator z unieruchomioną TreT również wykazuje świetną stabilność procesową w obecności NaN₃ [182].



Rys. 45 Stabilność procesowa TaGalU immobilizowanej we wnętrzu mikroreaktora, w obecności azydku sodu

Warunki prowadzenia reakcji: UTP (2 mM), G1P (2 mM), MgCl₂ (20 mM), NaN₃ (0,05%) w HEPES (50 mM, pH 7,0), TaGalU na MH-A (12,47 mg białka), temperatura pokojowa, przepływ 0,05 ml/min

Stosowanie dodatku NaN₃ powoduje jednak konieczność jego usuwania po procesie i oczyszczania produktu końcowego, a tym samym generuje dodatkowe problemy technologiczne i koszty. Rozwiązaniem tego problemu może być stosowanie krótkotrwałych przerw w procesie i przemywanie mikroreaktorów roztworem NaN₃ celem ich dezynfekcji. Wyniki tego eksperymentu pokazano na Rys. 46, wykazując, że jednogodzinne przerwy technologiczne stosowane w reżimie raz na dobę są wystarczające, aby zapewnić stabilną pracę mikroreaktorów i eliminację namnażania się mikroorganizmów w ich wnętrzu.



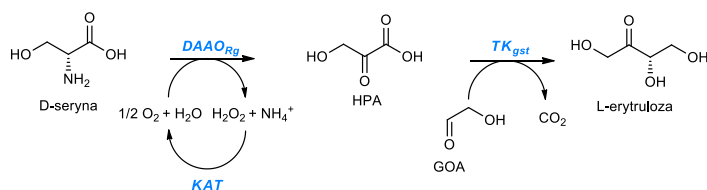
Rys. 46 Wpływ przemywania azydkiem sodu na stabilne otrzymanie trehalozy w kaskadzie enzymatycznej, złożonej z TaGalU i TreT, immobilizowanych w mikroreaktorach krzemionkowych

Warunki prowadzenia reakcji: UTP (10 mM), G1P (10 mM), Glu (10 mM), MgCl₂ (20 mM) w HEPES (50 mM, pH 7,0), TaGalU na MH-A (37,6 mg białka) w temperaturze pokojowej, TreT na MH-A (10,0 mg białka) w 55°C, przepływ 0,05 ml/min

7.3. Immobilizacja oksydazy D-aminokwasowej, katalazy oraz transketolazy i ich zastosowanie do produkcji L-erytrulozy

Badania opisane w poniższym rozdziale prowadzone były we współpracy z zespołem prof. Laurence Hecquet z Clermont Université we Francji oraz prof. Loredano Pollegioni z Univerista degli Studi dell'Insubria z Włoch. Przeprowadzone badania stanowią uzupełnienie i kontynuację badań prowadzonych przez zespół Prof. L. Hecquet, dotyczących zastosowania natywnych form enzymów do tzw. jednogarnkowej (z ang. „one pot”), dwuetapowej syntezy α -hydroksyketonów (w tym L-erytrulozy, D-fruktozy czy L-sorbozy) [168]. Warto nadmienić, że produkty, które otrzymano z wysokimi wydajnościami i selektywnościami, rzadko występują naturalnie, a stanowią bloki budulcowe do produkcji związków o dużym znaczeniu biologicznym. W badaniach wykorzystano enzymy: mezofilną oksydazę D-aminokwasową wyizolowaną z *Rhodotorula gracilis* (DAAO_{Rg}), katalazę wyizolowaną z wątroby bydlecej (KAT) oraz termostabilną transketolazę wyizolowaną z *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}). DAAO_{Rg} została wyizolowana przez zespół prof. L. Pollegioni z Università degli Studi dell'Insubria we Włoszech, natomiast TK_{gst} - przez zespół prof. L. Hecquet z Clermont Université we Francji. Powyższe enzymy otrzymano w ramach współpracy naukowej, podczas gdy użyta w badaniach katalaza (KAT) jest enzymem dostępnym handlowo (Sigma Aldrich).

W ramach niniejszej pracy stosowano wyżej wymienione enzymy do produkcji L-erytrulozy. DAAO_{Rg} katalizuje utleniającą deaminację D-seryny do kwasu hydroksypirogronowego (HPA) w obecności tlenu. Otrzymany HPA jest następnie przekształcany do L-erytrulozy wobec TK_{gst}. Katalizowana przez DAAO_{Rg} synteza HPA z D-seryny wiąże się z powstawaniem, oprócz pożądanego produktu, również produktów ubocznych – amoniaku oraz nadtlenu wodoru. Dowiedziono, że nagromadzenie się tworzącego się w reakcji nadtlenu wodoru (H₂O₂) może sprzyjać szybkiej dezaktywacji DAAO_{Rg} (poprzez utlenienie niektórych wrażliwych aminokwasów, np. metioniny, cysteiny, itp.) lub niespecyficznie utleniać produkty reakcji (dekarboksylacja HPA do kwasu glikolowego) [169,173,212]. Dlatego też konieczne jest wprowadzenie katalazy (KAT), która jest niezbędna do dysmutacji powstałego nadtlenu wodoru do wody i tlenu (Rys. 47).



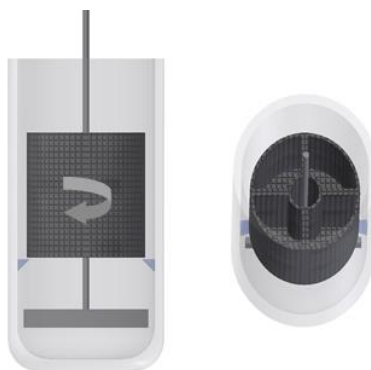
Rys. 47 Synteza L-erytrulozy katalizowanej przez DAAO_{Rg} i TK_{gst} z równoczesną degradacją H₂O₂ wobec katalazy (KAT)

Ponadto, ze względu na możliwość inhibicji DAAO_{Rg} nagromadzonym HPA oraz niestabilność tego produktu pośredniego w medium reakcyjnym [164-166,168], konieczne jest natychmiastowe przetwarzanie HPA do produktu końcowego (L-erytrozy), z wykorzystaniem transketolazy (tzw. kaskada równoczesna, z *ang. simultaneous cascade*), co potwierdzają również badania na enzymach natywnych [168].

Należy jednak pamiętać, że z punktu widzenia potencjalnego zastosowania takiego rozwiązania na skalę przemysłową, czy nawet laboratoryjną, stosowanie natywnych form enzymów jest nieoptymalne. W celu poprawy ich stabilności oraz możliwości wielokrotnego wykorzystania, w ramach niniejszej pracy zaproponowano ich immobilizację na nośnikach krzemionkowych. Otrzymanie stabilnych, heterogenicznych biokatalizatorów jest głównym celem tej części pracy. W tym celu wykorzystano powszechnie stosowaną kowalencyjną metodę immobilizacji na ziarnach krzemionkowych (*Rys. 16B, Rozdział 6*), funkcjonalizowanych grupami aminowymi (opis w *podrozdziale 7.2.1*). Enzymy immobilizowano oddzielnie lub współimmobilizowano na jednej porcji nośnika. W literaturze dostępne są prace opisujące immobilizację poszczególnych enzymów kaskady, jednakże nigdy nie immobilizowano ich wszystkich razem na jednym typie nośnika (co omówiono szerzej w *Rozdziale 4.2.2.1*).

Badania rozpoczęto od ustalenia korzystnych warunków pracy kaskady enzymatycznej złożonej z powyżej wymienionych enzymów. Zastosowanie enzymów w układzie kaskadowym wymaga przeprowadzenia wielu badań wstępnych, tj. określenia profilu temperaturowego czy długoterminowej stabilności temperaturowej. Dla zastosowań przemysłowych szczególne znaczenie ma nie tylko dobra aktywność unieruchomionych enzymów, ale również ich dobra stabilność. Szczególną uwagę zwrócono na stabilność otrzymanych heterogenicznych katalizatorów w kilku kolejnych cyklach reakcyjnych.

Badania prowadzono w procesie okresowym, z zastosowaniem reaktora ze stacjonarnym złożem (*ang. stationary bed reactor, SBR, Rys. 48*).

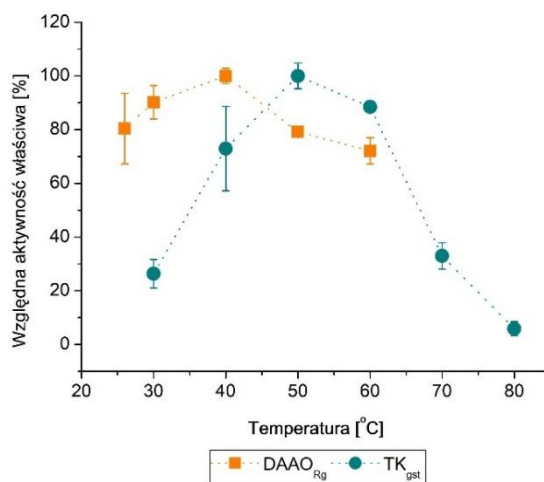


Rys. 48 Reaktor ze złożem stacjonarnym (SBR)

To nowoczesne rozwiązanie zostało opracowane w 2021 roku przez nasz zespół pod kierownictwem prof. Szymańskiej i przedstawione w zgłoszeniu patentowym (P.435044 [213]). Jego główną zaletą jest perforowany czterokomorowy, stacjonarny kosz, który umieszcza się we wnętrzu reaktora wokół wału mieszadła (Rys. 48). Kosz ten ochrania znajdujące się w nim ziarna (bio)katalizatora przed uszkodzeniem mechanicznym, wywołanym pracą mieszadła. Jednakże, w odróżnieniu do obrotowego kosza w reaktorach typu RBR (np. w SpinChem[®]), kosz nie porusza się wraz z mieszadłem.

7.3.1. Profil temperaturowy immobilizowanych: DAAO_{Rg} i TK_{gst}

Przed przystąpieniem do badań z wykorzystaniem wszystkich enzymów, scharakteryzowano każdy z osobna. Badania rozpoczęto od określenia profilu temperaturowego. W tym celu oksydazę D-aminokwasową (DAAO_{Rg}) oraz transketolazę (TK_{gst}) zaimmobilizowano na osobnych nośnikach krzemionkowych. Unieruchomiono 3,3 mg DAAO_{Rg}/g nośnika (wydajność immobilizacji 80%) oraz 8,3 mg TK_{gst}/g nośnika (wydajność immobilizacji 40%) Zbadano aktywność immobilizowanych biokatalizatorów w zakresie temperatur 26-60°C lub 26-80°C odpowiednio dla DAAO_{Rg}, i TK_{gst} (Rys. 49).



Rys. 49 Profil temperaturowy DAAO_{Rg} i TK_{gst} immobilizowanych na MH-A

Warunki prowadzenia reakcji (DAAO_{Rg}): D-ser (50 mM) w Tris-HCl (0,5 M, pH=7,5), objętość całkowita - 3 ml, O₂, DAAO_{Rg} (0,1 mg białka), katalaza natywna (0,1 mg), 26-60°C, 500 rpm. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczono z trzech powtórzeń. Jako 100% przyjęto aktywność zmierzoną w optimum temperaturowym (40°C)

(TK_{gst}): HPA (50 mM), GOA (50 mM), ThDP (0,1 mM), MgCl₂ (1 mM), objętość całkowita 3 ml, TK_{gst} (0,15 mg białka), pH 7,0, 30-80°C, 500 rpm. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczono z trzech powtórzeń; jako 100% przyjęto aktywność zmierzoną w optimum temperaturowym (50°C).

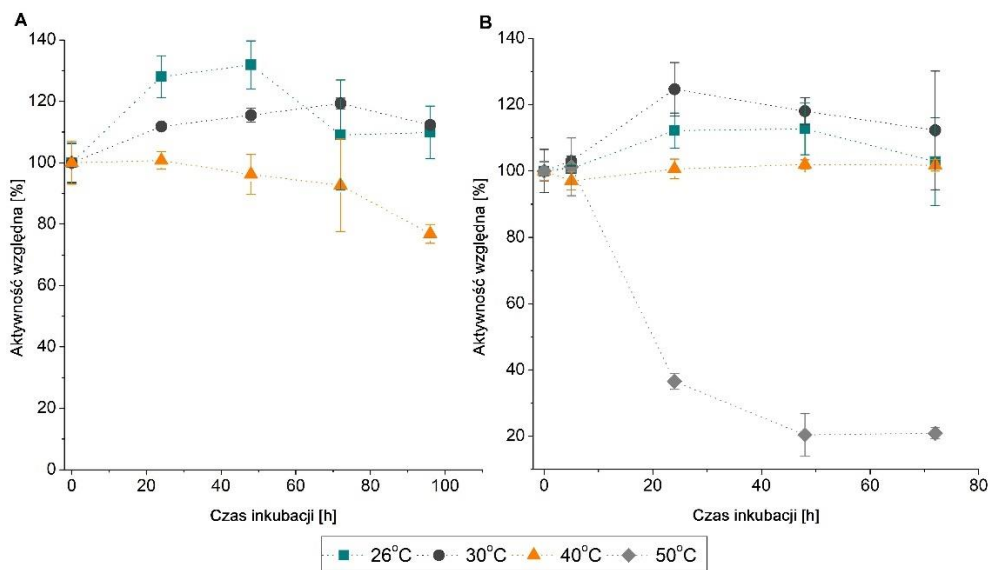
Na Rys. 49 można zauważyć, że DAAO_{Rg} wykazuje dobrą aktywność w temperaturach 26-50°C, gdzie maksimum obserwuje się w temperaturze 40°C. Natomiast w przypadku termostabilnej transketolazy, wyizolowanej z *Geobacillus stearothermophilus*, najwyższą aktywność obserwuje

się w temperaturze 50°C, a optimum temperaturowe dla tego enzymu mieści się w granicach 45-60°C (Rys. 49).

Katalaza (KAT) wyizolowana z wątroby bydłej stosowana w tych badaniach jest enzymem komercyjnym (Sigma Aldrich). Według danych zawartych w literaturze, optimum temperaturowe natywnej katalazy ustalono na 20-40°C [214-216]. Ponadto katalaza była już wielokrotnie immobilizowana, co opisano w literaturze. We wszystkich testowanych przypadkach obserwowano szeroki zakres optimum temperaturowego (10-60°C) oraz dobrą stabilność temperaturową [215-218]. W związku z tym w ramach niniejszej pracy nie badano ani profilu temperaturowego, ani stabilności katalazy unieruchomionej na nośniku krzemionkowym, zakładając jej dobrą aktywność i stabilność w testowanych warunkach.

7.3.2. Długoterminowa stabilność temperaturowa DAAO_{Rg} i TK_{gst}

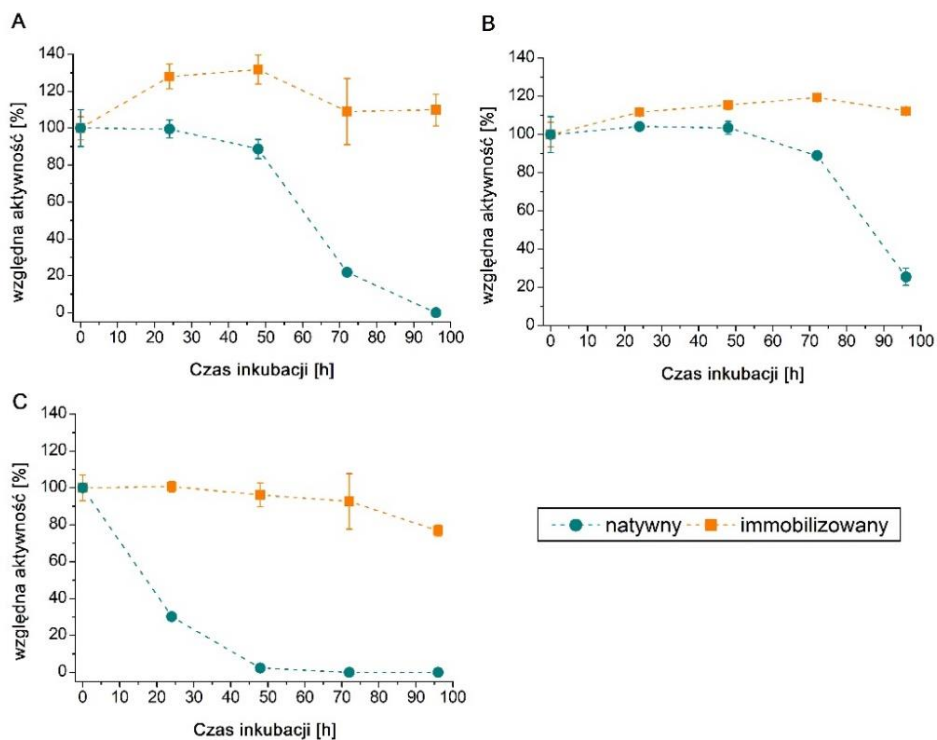
W oparciu o wyznaczony profil temperaturowy (Rys. 49) zbadano również długoterminową stabilność termiczną enzymów. Stabilność immobilizowanego DAAO_{Rg} sprawdzono w temperaturach 26, 30 i 40°C i stwierdzono, że wykazuje on bardzo dobrą stabilność zarówno w 26 jak i 30°C (Rys. 50A). W 40°C obserwuje się nieznaczny spadek aktywności enzymu w czasie. Stabilność immobilizowanej TK_{gst} przetestowano w temperaturach 26, 30, 40 oraz 50°C (Rys. 50B). W najwyższej stosowanej temperaturze obserwowano drastyczny spadek aktywności enzymu, po 24 h inkubacji zachowuje jedynie ok. 40% aktywności początkowej. W pozostałych temperaturach enzym ten był stabilny przez ponad 70 h inkubacji. Co więcej, zarówno w przypadku immobilizowanej DAAO_{Rg} jak i TK_{gst} obserwuje się wzrost aktywności po 24 h inkubacji (Rys. 50, Rys. 51). Może to wynikać ze zmian struktury enzymów wywołanych immobilizacją.



Rys. 50 Długoterminowa stabilność temperaturowa DAAO_{Rg} (A) i TK_{gst} (B) immobilizowanych na MH-A. Warunki prowadzenia reakcji (DAAO_{Rg}): D-ser (50 mM) w Tris-HCl (0,5 M, pH=7,5), objętość całkowita – 3 ml, O₂, DAAO_{Rg} (0,1 mg białka), katalaza natywna (0,1 mg), 26 °C, 500 rpm. 100% aktywności względnej odpowiada aktywności enzymu przed inkubacją. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczone z trzech powtórzeń.

(TK_{gst}): HPA (50 mM), GOA (50 mM), ThDP (0,1 mM), MgCl₂ (1 mM), objętość całkowita – 3 ml, TK_{gst} (0,15 mg białka), pH 7,0, 50°C, 500 rpm. 100% aktywności względnej odpowiada aktywności enzymu przed inkubacją. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczone z trzech powtórzeń.

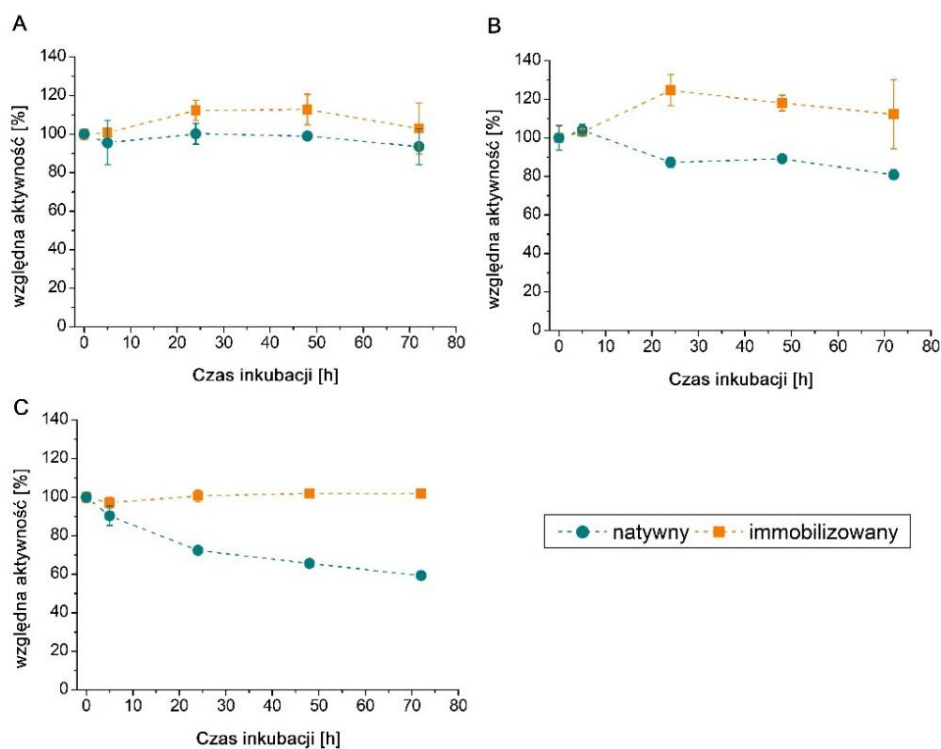
Porównano również stabilność temperaturową natywnych i immobilizowanych enzymów (Rys. 51).



Rys. 51 Długoterminowa stabilność temperaturowa DAAO_{Rg} natywnej i immobilizowanej na MH-A w 26°C (A), 30°C (B) i 40°C (C)

Warunki prowadzenia reakcji: D-ser (50 mM) w Tris-HCl (0,5 M, pH=7,5), objętość całkowita -3 ml, O₂, DAAO_{Rg} (0,1 mg białka), katalaza natywna (0,1 mg), 26°C, 500 rpm. Inkubacja enzymu w odpowiedniej temperaturze. 100% aktywności względnej odpowiada aktywności enzymu przed inkubacją. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczone z trzech powtórzeń.

Jak widać, immobilizacja spowodowała znaczne polepszenie stabilności DAAO_{Rg} w porównaniu do natywnej formy enzymu (Rys. 51). Również w przypadku TK_{gst} obserwuje się poprawę stabilności spowodowanej immobilizacją enzymu (Rys. 52).



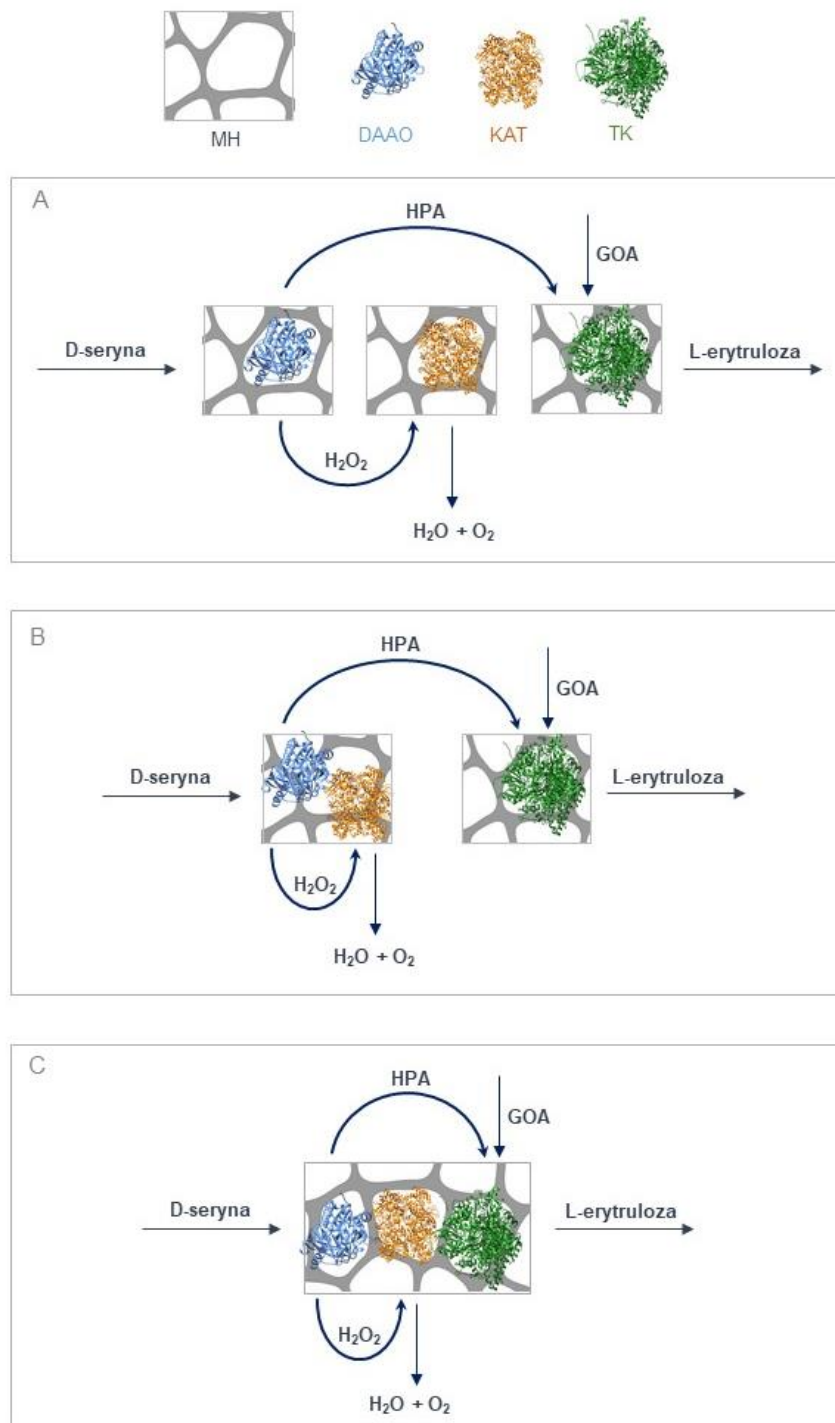
Rys. 52 Długoterminowa stabilność temperaturowa TK_{gst} natywnej i immobilizowanej na MH-A w 26°C (A), 30°C (B) i 40°C (C)

Warunki prowadzenia reakcji: HPA (50 mM), GOA (50 mM), ThDP (0,1 mM), $MgCl_2$ (1 mM), objętość całkowita – 3 ml, TK_{gst} (0,15 mg białka), pH 7,0, 50°C, 500 rpm. Inkubacja enzymu w odpowiedniej temperaturze. 100% aktywności względnej odpowiada aktywności enzymu przed inkubacją. Średnie z odchyleniem standardowym wyliczono z trzech powtórzeń

7.3.3. Immobilizacja enzymów do kaskady wieloenzymatycznej i ich zastosowanie do produkcji L-erytruły

Głównym celem postawionym w tej części pracy było opracowanie efektywnej, immobilizowanej kaskady do syntezy L-erytruły z D-seryny. Zastosowanie trzech enzymów w kaskadzie wymagało dobrania takich warunków procesowych, które będą odpowiednie dla każdego z nich. Ze względu na obniżanie się aktywności immobilizowanej $DAAO_{Rg}$ w czasie, w temperaturze 40°C (Rys. 50A), jako maksymalną temperaturę prowadzenia procesu wybrano 30°C i tę temperaturę stosowano do dalszych eksperymentów.

Zaproponowano trzy warianty immobilizacji enzymów (Rys. 53): każdy enzym immobilizowano na osobnej porcji nośnika [DAAO][KAT][TK] (Rys. 53A), $DAAO_{Rg}$ i katalaza immobilizowana na jednej porcji nośnika, a TK_{gst} oddzielnie [DAAO+KAT][TK] (Rys. 53B) oraz wszystkie enzymy unieruchomiono na jednej porcji nośnika (współimmobilizacja wszystkich enzymów) [DAAO+KAT+TK] (Rys. 53C).



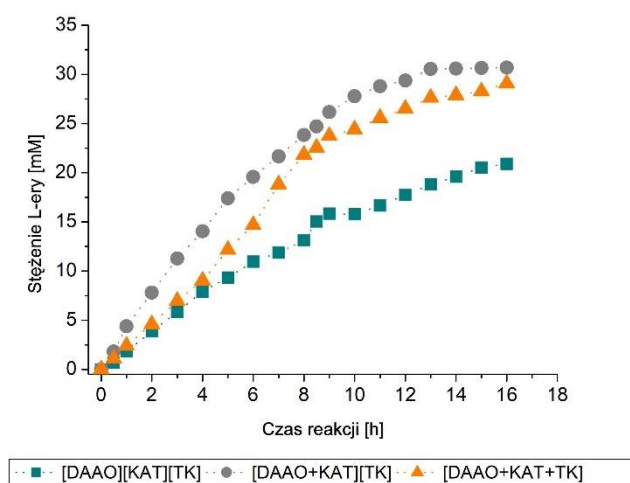
Rys. 53 Trzy warianty immobilizacji DAAO_{R9}, KAT i TK_{gst} na monolicie krzemionkowym (MH): [DAAO][KAT][TK] (A), [DAAO+KAT][TK] (B), [DAAO+KAT+TK] (C). Schemat wykonano z wykorzystaniem pakietu UCSF Chimera: PDB ID: 1COI (DAAO), 1TGU (KAT) 3HYL (TK).

Warunki immobilizacji (w tym ilość enzymu czy nośnika oraz czasy inkubacji) poszczególnych wariantów kaskad odpowiednio modyfikowano (co opisano dokładnie w części eksperymentalnej w *podrozdziale 7.3*), aby ilość poszczególnych enzymów biorących udział w syntezie L-erytrulozy była porównywalna (*Tabela 10*).

Tabela 10 Ilości zaimmobilizowanego białka w różnych typach immobilizowanych kaskad

Typ kaskady	DAAO _{Rg} [mg]	KAT [mg]	TK _{gst} [mg]
[DAAO][KAT][TK]	2,17	4,34	7,39
[DAAO+KAT] [TK]	1,71	3,80	7,40
[DAAO+KAT+TK]	1,45	3,38	6,41

Otrzymane immobilizowane enzymy wchodzące w skład kaskady zastosowano w reakcji otrzymywania L-erytrozy (Rys. 54).



Rys. 54 Synteza L-erytrozy katalizowana przez enzymy w różnych typach kaskad

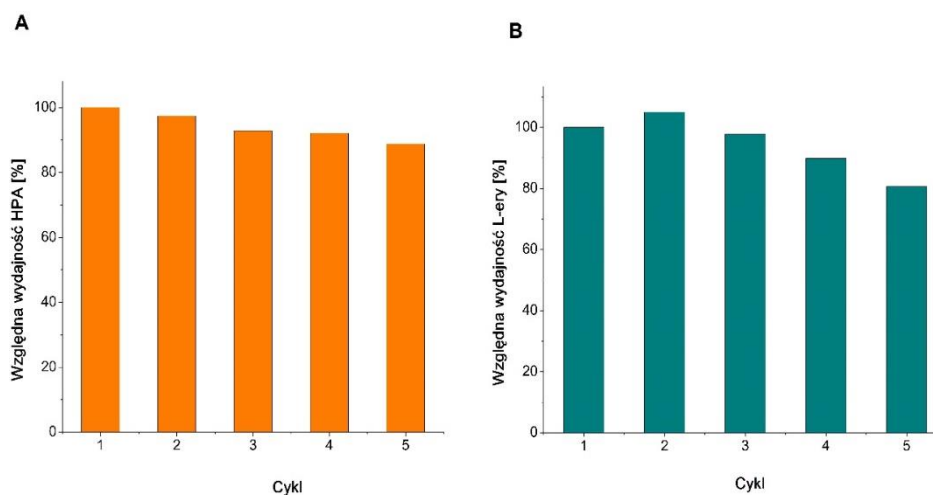
Warunki reakcji: D-ser (50 mM), GOA (50 mM), ThDP (0,1 mM), MgCl₂ (1 mM), objętość całkowita – 20 ml, dokładne ilości enzymów podano w Tabeli 10, pH=7,0, 30°C, 400 rpm, O₂ (10 ml/min), 16 h, pH regulowano 0,1 M HCl

Przeprowadzone badania wykazały, że najmniejszą wydajność L-erytrozy uzyskano stosując osobno immobilizowane enzymy ([DAAO][KAT][TK], Rys. 54), pomimo iż w tej wersji kaskady ilość poszczególnych enzymów była największa, w porównaniu do pozostałych wariantów (Tabela 10). W tym przypadku wytworzony przez DAAO_{Rg} nadtlenek wodoru i HPA transportowane są pomiędzy porcjami nośnika, na których unieruchomiono DAAO_{Rg} a tymi, na których zaimmobilizowano odpowiednio katalazę lub transketolazę. Uzyskane wyniki sugerują, że głównym czynnikiem powodującym spadek wydajności L-erytrozy był destrukcyjny wpływ H₂O₂ na aktywność i stabilność DAAO_{Rg}. Co więcej, w tym przypadku już po 2 h prowadzenia reakcji zaobserwowano tworzenie się produktu ubocznego (kwasu glikolowego – produktu dekarboksylacji HPA). Powstawanie produktu ubocznego było związane z dłuższym czasem kontaktu HPA z H₂O₂. Zaskoczeniem było uzyskanie podobnych, wyższych wydajności L-erytrozy przy zastosowaniu dwóch pozostałych kombinacji. Zastosowanie układu, gdzie wszystkie enzymy zaimmobilizowane były na jednej porcji nośnika

([DAAO+KAT+TK]) oraz układu, gdzie DAAO_{Rg} i katalaza zaimmobilizowane były na tym samym nośniku ([DAAO+KAT][TK]) umożliwiło natychmiastowy rozkład H₂O₂ do H₂O i O₂. Zaobserwowany efekt nazywany jest „kanałowaniem substratu” (*ang. substrate channeling*) [123,219] i wynika z bliskiej odległości pomiędzy enzymami unieruchomionymi na tej samej porcji nośnika. Produkty pierwszego etapu (HPA i/lub H₂O₂ wytworzone wobec DAAO_{Rg}) są przenoszone bezpośrednio do następnego enzymu kaskady (katalazy i/lub TK_{gst}), znajdującego się w bliskim sąsiedztwie. Małe odległości pomiędzy enzymami w tych przypadkach prowadzą do zwiększonej wydajności L-erytrulozy, w porównaniu do pierwszego wariantu kaskady, w której każdy enzym immobilizowano na osobnych porcjach nośnika. Jednocześnie zaobserwowano, że transport drugiego z produktów pośrednich (HPA) nie miał już tak znaczącego wpływu na całkowitą wydajność L-erytrulozy. Stosując wariant, w którym wszystkie enzymy unieruchomiono na jednej porcji nośnika, gdzie transport HPA odbywał się jedynie wewnątrz jednej porcji, otrzymano praktycznie takie same wyniki, jak dla wariantu, w którym DAAO_{Rg} i katalaza immobilizowane były na jednej porcji nośnika, a TK_{gst} na drugiej (transport HPA odbywał się pomiędzy tymi porcjami). Można to tłumaczyć różnicami w szybkości reakcji katalizowanej przez TK_{gst}, w porównaniu do DAAO_{Rg} oraz dobrym transportem masy pomiędzy porcjami nośnika. Transport ten wynika z wyjątkowej struktury użytego nośnika. Nieco niższa wydajność L-erytrulozy dla układu [DAAO+KAT+TK]) może wynikać także z nieznacznie mniejszej ilości białka użytego w reakcji (*Tabela 10*).

7.3.4. Stabilność immobilizowanych enzymów w wieloenzymatycznej kaskadzie (DAAO_{Rg}, KAT i TK_{gst})

Z punktu widzenia rozwiązań procesowych niezwykle ważnym parametrem jest możliwość wielokrotnego wykorzystania katalizatorów. Z tego względu dla dwóch najlepszych kombinacji katalizatorów ([DAAO+KAT][TK] oraz [DAAO+KAT+TK]) wykonano testy stabilności w kolejnych cyklach reakcyjnych. Jednakże najpierw, aby ograniczyć czynniki, które mogłyby wpłynąć na uzyskane wyniki, oddzielnie określono stabilność procesową współimmobilizowanych DAAO_{Rg} i KAT ([DAAO+KAT]) (*Rys. 55A*) oraz immobilizowanej transketolazy [TK] (*Rys. 55B*). Przeprowadzone badania wykazały bardzo dobrą stabilność obu testowanych biokatalizatorów w pięciu kolejnych cyklach reakcyjnych (*Rys. 55*).

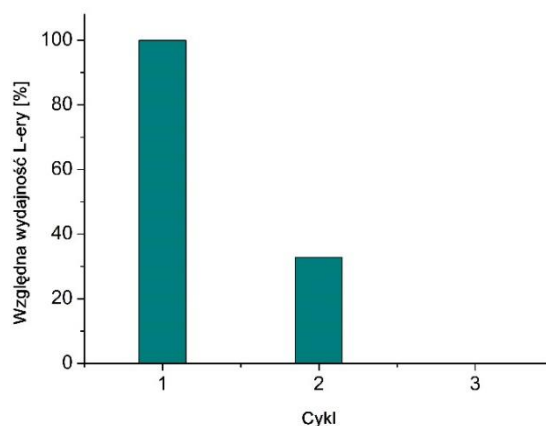


Rys. 55 Stabilność współimmobilizowanych $DAAO_{Rg}$ i KAT (A) oraz immobilizowanej TK_{gst} (B) w $30^{\circ}C$, w kolejnych cyklach procesowych

Warunki prowadzenia reakcji: (A): $D-ser$ (50 mM), $ThDP$ (0,1 mM), $MgCl_2$ (1 mM), objętość całkowita – 20 ml, $DAAO_{Rg}$ i KAT współimmobilizowane na MH-A (odpowiednio 2 mg i 4 mg białka), $30^{\circ}C$, 400 rpm, O_2 (10 ml/min). Każdy cykl trwał 6 h. 100% wydajności odpowiada wydajności otrzymanej w 1 cyklu.

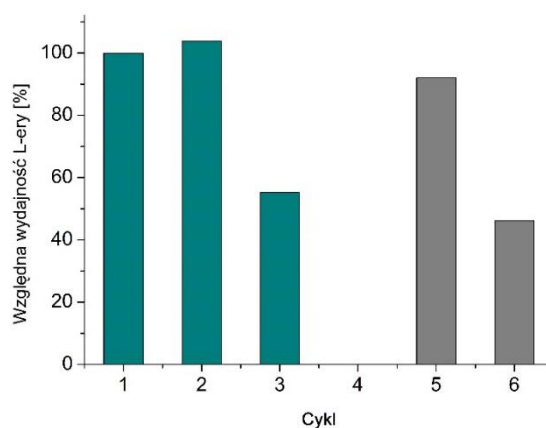
(B): HPA (50 mM), GOA (50 mM), $ThDP$ (0,1 mM), $MgCl_2$ (1 mM), objętość całkowita – 20 ml, TK_{gst} immobilizowana na MH-A (6 mg białka), $30^{\circ}C$, 400 rpm. pH regulowano 0,1 M HCl. 100% wydajności odpowiada wydajności otrzymanej w pierwszym cyklu.

Kolejnym etapem prac było określenie stabilności kaskad: [DAAO+KAT+TK] oraz [DAAO+KAT][TK] w następujących po sobie cyklach procesowych (Rys. 56 i Rys. 57).



Rys. 56 Stabilność współimmobilizowanych na MH-A [DAAO+KAT+TK] w kolejnych cyklach procesowych w temperaturze $30^{\circ}C$

Warunki reakcji: $D-ser$ (50 mM), GOA (50 mM), $ThDP$ (0,1 mM), $MgCl_2$ (1 mM), objętość całkowita – 20 ml, $DAAO_{Rg}$ (2 mg białka), TK_{gst} (6 mg białka), KAT (4 mg białka), pH=7,0, $30^{\circ}C$, 400 rpm, O_2 (10 ml/min), pH regulowano 0,1 M HCl. Każdy cykl trwał 6 h. 100% wydajności odpowiada wydajności otrzymanej w pierwszym cyklu.



Rys. 57 Stabilność immobilizowanej kaskady typu [DAAO+KAT][TK] w kolejnych cyklach procesowych w temperaturze 30°C; UWAGA: po całkowitej utracie aktywności (4 cykl) dodano świeżą porcję współimmobilizowanych [DAAO+KAT]

Warunki reakcji: D-ser (50 mM), GOA (50mM), ThDP (0,1 mM), MgCl₂ (1 mM), objętość całkowita – 20 ml, DAAO_{Rg} (2 mg białka), TK_{gst} (6 mg białka), KAT (4 mg białka), pH=7,0, 30°C, 400 rpm, O₂ (10 ml/min), pH regulowano 0,1 M HCl. Każdy cykl trwał 6 h. Po 4 cyklu dodano świeżą porcję DAAO_{Rg} (2 mg białka) i KAT (4 mg białka). 100% wydajności odpowiada wydajności otrzymanej w pierwszym cyklu.

Przeprowadzone badania wykazały utratę aktywności enzymów po dwóch cyklach procesowych, dla układu, gdzie wszystkie enzymy zaimmobilizowane były na jednej porcji nośnika ([DAAO+KAT+TK]). Podobną zależność uzyskano dla układu [DAAO+KAT][TK], z tym, że wykazywał on aktywność przez trzy cykle reakcyjne. Otrzymane wyniki są zaskakujące, gdyż poszczególne biokatalizatory badane oddzielnie cechowały się bardzo dobrą stabilnością (Rys. 55). Podczas testowania stabilności, w kolejnych cyklach nie obserwowano produktu pośredniego (HPA). Może to wskazywać na dezaktywację lub inhibicję DAAO_{Rg}, przy czym dezaktywacja ta nie wynikała z toksycznego działania H₂O₂ (gdyż ten był usuwany przez katalazę). Najprawdopodobniej DAAO była inhibowana przez GOA (substrat drugiego etapu kaskady, Rys. 47). Przypuszczenia te potwierdzają wyniki przedstawione wcześniej na Rys. 55A, wskazujące na bardzo dobrą stabilność DAAO w układzie, w którym brak jest GOA. Dzięki zastosowaniu niezależnie unieruchomionych DAAO_{Rg} i TK_{gst} w wariacie [DAAO+KAT][TK], możliwe było zastąpienie [DAAO i KAT] po utracie aktywności (po 4 cyklu) nowym, świeżo zaimmobilizowanym biokatalizatorem, bez konieczności usuwania wciąż stabilnej TK_{gst}. Taki zabieg pozwolił na ponowną pracę kaskady i otrzymanie wysokiej wydajności L-erytrolyzy (Rys. 57).

Podsumowanie i wnioski

Celem niniejszej pracy było wykorzystanie modyfikowanych monolitów krzemionkowych, jako nośników różnych enzymów oraz ocena ich użyteczności w wybranych procesach biotransformacji.

W ramach przeprowadzonych badań zsyntetyzowano monolity krzemionkowe o hierarchicznej strukturze porów. Miały one formę walców o średnicy 4-6 mm i długości 4 cm oraz ziaren (o średnicy zastępczej 2-4 mm), o kształcie stożka lub walca. Pomimo różnic w kształcie i wielkości, otrzymane nośniki charakteryzowały się jednakowymi parametrami struktury, wynikającymi z metody ich syntezy. Duża powierzchnia właściwa oraz struktura porów stworzyła odpowiednie warunki do immobilizacji enzymów, nie ograniczając transportu reagentów zarówno wewnątrz monolitu jak i pomiędzy ziarnami. Dodatkowo, modyfikacja monolitów krzemionkowych odpowiednimi grupami funkcyjnymi, pozwoliła na uzyskanie specyficznego charakteru chemicznego ich powierzchni. Różnorodność kształtów i rozmiarów otrzymanych nośników, przy zachowaniu struktury wewnętrznej, pozwoliła na ich wykorzystanie zarówno w procesach okresowych (reaktor z wirującym lub stacjonarnym złożem; monolity w formie ziaren), jak i w procesach ciągłych (mikroreaktory; monolity o kształcie walców o średnicy 4-6 mm). Na otrzymanych funkcjonalizowanych nośnikach osadzano wybrane enzymy, po czym określano aktywność i stabilność uzyskanych biokatalizatorów.

Pierwszym rozpatrywanym enzymem była lipaza B z *Candida antarctica* (CalB), osadzona na krzemionce modyfikowanej grupami aminowymi, oktylowymi lub obydwoma grupami równocześnie. Wprowadzenie grup oktylowych miało na celu zwiększenie hydrofobowości powierzchni nośnika, a grup aminowych miało umożliwić kowalencyjne związanie enzymu. Stosowano dwie metody immobilizacji: adsorpcję na monolitach krzemionkowych z grupami oktylowymi oraz wiązanie kowalencyjne na nośnikach z grupami aminowymi. Wykorzystanie nośników z dwoma różnymi grupami, miało umożliwić równocześnie trwałe kowalencyjne związanie enzymu, przy zachowaniu jego otwartej formy. Otrzymane biokatalizatory testowano w dwóch typach reakcji: hydrolizy w środowisku wodnym i estryfikacji w środowisku organicznym.

Analiza wyników przeprowadzonych badań pozwala na sformułowanie kilku wniosków:

- Wprowadzenie grup oktylowych na powierzchnię monolitu krzemionkowego spowodowało zwiększenie hydrofobowości jego powierzchni (potwierdzonej poprzez adsorpcję hydrofobowego barwnika - różu bengalskiego).

- Rodzaj grup funkcyjnych wprowadzonych na powierzchnię nośnika (oktylowe, aminowe) koreluje z ilością zaadsorbowanego barwnika, a to z kolei z ilością unieruchomionego białka.
- Ilość unieruchomionego białka nie koreluje bezpośrednio z aktywnością otrzymanych biokatalizatorów. Zarówno w procesie hydrolizy jak i estryfikacji, największą aktywność wykazywał biokatalizator na nośniku MH-O, pomimo że zawierał najmniejszą ilość białka.
- Obecność grup hydrofobowych na powierzchni krzemionki (MH-O, MH-OA) gwarantuje wysoką aktywność immobilizowanej lipazy, wynikającą z aktywacji międzyfazowej enzymu.
- Immobilizacja lipazy CalB na MH-OA pozwoliła na uzyskanie wysokiej aktywności i stabilności katalizatora, ze względu na istnienie dwóch różnych oddziaływań nośnik-enzym (hydrofobowego, pozwalającego na aktywację międzyfazową enzymu oraz wiązania kowalencyjnego zapobiegającego wymywaniu się enzymu). Biokatalizator wykazywał najlepszą aktywność i bardzo dobrą stabilność w procesach prowadzonych w rozpuszczalniku organicznym.
- Wybór metody immobilizacji lipazy CalB powinien być uzależniony od warunków procesu, w którym biokatalizator będzie stosowany.
- Biokatalizatory oparte o nieorganiczne nośniki krzemionkowe (MH-O i MH-OA) wykazały znacznie lepszą stabilność w większości testowanych rozpuszczalników organicznych, w porównaniu do komercyjnie dostępnego preparatu Novozym 435. Zaobserwowano degradację polimerowej matrycy Novozymu 435 w rozpuszczalnikach organicznych, szczególnie w octanie etylu.

Kolejnym badanym enzymem była pirofosforylaza UDP-glukozy wyizolowana z *Thermocrispum agreste* (TaGalU), którą unieruchomiono na nośnikach krzemionkowych modyfikowanych grupami aminowymi lub epoksydowymi. Obecność obu grup umożliwia kowalencyjne związanie enzymu, jednakże grupy aminowe wymagają dodatkowej aktywacji aldehydem glutarowym. W przypadku tego enzymu dobrano warunki immobilizacji (m.in. pH immobilizacji), w zależności od rodzaju grup funkcyjnych nośnika. Jako kryterium oceny przyjęto aktywność i stabilność otrzymanych katalizatorów. Określono również najbardziej korzystne warunki pracy unieruchomionego enzymu. Warunki te zastosowano do immobilizacji pirofosforylazy UDP-glukozy we wnętrzu krzemionkowego mikroreaktora, umożliwiającego prowadzenie procesu w sposób ciągły. Końcowym etapem prac było opracowanie,

wraz z mgr inż. Martą Przypis, warunków prowadzenia ciągłego, wieloenzymatycznego procesu syntezy trehalozy, z wykorzystaniem transferazy trehalozy (TreT).

Analiza wyników tej części badań pozwala na sformułowanie następujących wniosków:

- Najlepszą aktywność uzyskano w przypadku immobilizacji pirofosforylasy UDP-glukozy na krzemionce funkcjonalizowanej grupami aminowymi w pH 6,7.
- Aktywacja grup aminowych obecnych na nośniku aldehydem glutarowym, przyczyniła się do zwiększenia elastyczności unieruchomionego enzymu, co pozytywnie wpłynęło na aktywność otrzymanego biokatalizatora.
- Otrzymane biokatalizatory były aktywne, w szerszym zakresie temperatur i pH oraz stabilne termicznie przez znacznie dłuższy czas, w porównaniu z enzymem w formie natywnej.
- Mimo, że największe ilości białka osadzono na nośnikach funkcjonalizowanych grupami epoksydowymi (wydajność immobilizacji 80-100 %), nie przekładało się to na aktywność otrzymanych biokatalizatorów.
- *TaGalU* immobilizowana wewnątrz mikroreaktora wykazywała wysoką stabilność procesową (stały poziom wydajności UDP-glukozy przez ok. 90 h ciągłej pracy).
- Ze względu na różne preferencje temperaturowe, najlepszym wariantem immobilizacji enzymów wchodzących w skład kaskady do ciągłej produkcji trehalozy (*TaGalU* i TreT), jest unieruchomienie każdego z enzymu na osobnych monolitach.
- Zastosowanie kaskady enzymatycznej (*TaGalU* i TreT) do produkcji trehalozy w systemie ciągłym, umożliwia otrzymanie wydajności trehalozy na poziomie 60-65%, przez prawie 100 h ciągłej pracy.
- W celu uniknięcia zakażenia układu mikroorganizmami, najlepiej jest okresowo przemywać mikroreaktory enzymatyczne 0,05% roztworem NaN_3 . Zabieg ten nie wpływa negatywnie na aktywność i stabilność biokatalizatorów (biokatalizatory są stabilne przez co najmniej 100 h ciągłej pracy). Zastosowanie do tego celu preparatu o działaniu anybakteryjnym/przeciwgrzybiczym, również nie wpływa na stabilność katalizatora, jednak wymaga kilkukrotnego dodatku.

Ostatnia część badań dotyczyła immobilizacji enzymów: oksydazy D-aminokwasowej wyizolowanej z *Rhodotorula gracilis* (DAAO_{Rg}), handlowo dostępnej katalazy wyizolowanej z wątroby bydłowej oraz transketolazy wyizolowanej z *Geobacillus stearothermophilus* (TK_{gst}) na monolitach krzemionkowych, funkcjonalizowanych grupami aminowymi. Enzymy te „współpracują ze sobą” w kaskadzie, w procesie syntezy L-erytrułozy. W ramach prowadzonych badań określono stabilność termiczną immobilizowanych enzymów,

a następnie zaproponowano trzy warianty ich immobilizacji/współimmobilizacji: każdy enzym immobilizowany na osobnej porcji nośnika [DAAO][KAT][TK]; DAAO_{Rg} i katalaza współimmobilizowane na jednej porcji nośnika, a TK_{gst} oddzielnie; [DAAO+KAT][TK] oraz wszystkie enzymy współimmobilizowane na jednej porcji nośnika [DAAO+KAT+TK].

Otrzymane wyniki umożliwiają wyciągnięcie następujących wniosków:

- Kowalencyjna immobilizacja DAAO_{Rg} i TK_{gst} na monolitach krzemionkowych przyczyniła się do znacznej poprawy stabilności termicznej tych enzymów (w porównaniu do natywnej formy).
- Współimmobilizacja DAAO_{Rg} i katalazy oraz immobilizacja TK_{gst} na monolitach krzemionkowych z grupami aminowymi umożliwiła wielokrotne wykorzystanie biokatalizatorów (w co najmniej 5 cyklach).
- Wykazano, że największe wydajności L-erytrozy uzyskano stosując układy kaskadowe typu: [DAAO+KAT][TK] oraz [DAAO+KAT+TK].
- Współimmobilizacja DAAO_{Rg} z katalazą zapewnia krótszy czas kontaktu DAAO_{Rg} z nadtlenkiem wodoru (produkt uboczny), który jest natychmiast rozkładany wobec katalazy, co w konsekwencji eliminuje destrukcyjny wpływ H₂O₂ na aktywność DAAO_{Rg} i pozwala na otrzymanie najlepszych wydajności L-erytrozy.
- Unieruchomienie transketolazy na osobnej porcji nośnika nie wpływa negatywnie na uzyskaną wydajność L-erytrozy.
- Wykazano, że najlepszy układ kaskady ([DAAO+KAT][TK]) wykazywał stabilność w trzech kolejnych cyklach reakcyjnych, po czym tracił aktywność. Niemniej wprowadzenie nowej porcji [DAAO+KAT] przywracało pierwotną aktywność kaskady.
- Brak stabilności kaskady enzymatycznej do produkcji L-erytrozy w kolejnych cyklach reakcyjnych jest wynikiem dezaktywacji DAAO_{Rg} aldehydem glikolowym, będącym (obok HPA) drugim substratem do syntezy L-erytrozy wobec TK_{gst}.

Dorobek naukowy

Wykaz publikacji

1. L. Mestrom, M. Przypis, D. Kowalczykiewicz*, A. Pollender, A. Kumpf, R. S. Marsden, I. Bento, A. Jarzębski, K. Szymańska, A. Chruściel, D. Tischler, R. Schoevaart, U. Hanefeld, P. Hagedoorn, Leloir glycosyltransferases in applied biocatalysis: a multidisciplinary approach, *Int. J. Mol. Sci.*, 20 (2019) 5263. doi:10.3390/ijms20215263. **140 pkt MNiSW, IF 4,556**
2. A. Kumpf, D. Kowalczykiewicz*, K. Szymańska, M. Mehnert, I. Bento, A. Łochowicz, A. Pollender, A. Jarzębski, D. Tischler, Immobilization of the highly active UDP-glucose pyrophosphorylase from *Thermocristum agreste* provides a highly efficient biocatalyst for the production of UDP-glucose, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 740. doi:10.3389/fbioe.2020.00740. **100 pkt MNiSW, IF 5,890**
3. D. Kowalczykiewicz*, K. Szymańska, D. Gillner, A. Jarzębski, Rotating bed reactor packed with heterofunctional structured silica-supported lipase. Developing an effective system for the organic solvent and aqueous phase reactions, *Micropor. Mesopor. Mat.* 312 (2021) 110789, doi:10.1016/j.micromeso.2020.110789. **100 pkt MNiSW, IF 5,876**
4. D. Kowalczykiewicz*, M. Przypis, L. Mestrom, A. Kumpf, D. Tischler, P.-L. Hagedoorn, U. Hanefeld, A. Jarzębski, K. Szymańska, Engineering of continuous bienzymatic cascade process using monolithic microreactors – in flow synthesis of trehalose, *Chem. Eng. J.*, 2022, 427, 131439, doi:10.1016/j.cej.2021.131439. **200 pkt MNiSW, IF 16,744**
5. D. Świętochowska, A. Łochowicz, N. Ocal, L. Pollegioni, F. Charmantray, L. Hecquet, K. Szymańska, Co-immobilization of D-amino acid oxidase and transketolase on monolithic silica pellets for one-pot, two-step, cascade synthesis of L-erythrulose from D-serine , wysłane do redakcji

Współczynnik IF oraz punkty ministerialne podano zgodnie z bazą OMEGA, dostępnej na stronie Biblioteki Politechniki Śląskiej.

Zgłoszenia patentowe

1. K. Szymańska, A. Jarzębski, D. Kowalczykiewicz*, K. Odrozek, Sposób otrzymywania porowatych monolitów zol-żelowych o zwiększonych wymiarach geometrycznych przy zachowaniu hierarchicznej struktury porów, zgłoszenie patentowe P.423320 z dn. 31.10.2017
2. K. Szymańska, D. Kowalczykiewicz*, D. Stradomska, J. Thullie, Reaktor heterogeniczny, zgłoszenie patentowe P.435044 z dn. 21.08.2020

* Nazwisko rodowe

Wykaz konferencji naukowych

1. K. Szymańska, D. Kowalczykiewicz, W. Pudło, A. Jarzębski, Nanostructured multichannel flow microreactors for continuous synthesis of fine chemicals, 2nd International Conference InterNanoPoland 2017, Katowice, 22-23.06.2017, **poster**
2. D. Kowalczykiewicz*, D. Gillner, P. Wójcik, K. Szymańska, Zastosowanie immobilizowanych lipaz w reakcji otrzymywania estrów kwasu lewulinowego, XVIII Konferencja Naukowo-Techniczna, Ustroń - Jaszowiec, 8-10.11.2017, **referat**
3. D. Kowalczykiewicz*, K. Szymańska, A. Kumpf, A. Pollender, D. Tischler, A. Jarzębski, Optimized conditions for UDP-glucose pyrophosphorylase immobilization and its application in trehalose production, 4th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Trzebnica, 25-27.06.2018, **poster**
4. D. Gillner, M. Przypis, D. Kowalczykiewicz, P. Wójcik, K. Matuszek, A. Chrobok, K. Szymańska, A. Jarzębski, Chemical and enzymatic methods for the synthesis of levulinic acid esters, production, 4th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Trzebnica, 25-27.06.2018, **referat**
5. D. Kowalczykiewicz*, K. Szymańska, D. Gillner, A. Jarzębski, Monolity krzemionkowe jako nośniki enzymów wykorzystywanych w procesach biotransformacji, VII Ogólnopolska Konferencja Pomiędzy Naukami, Chorzów, 14.09.2018, **poster**
6. D. Kowalczykiewicz*, D. Gillner, K. Szymańska, A. Jarzębski, Modyfikowane krzemionki jako stabilne nośniki biokatalizatorów, XIX Konferencja naukowo-techniczna, Ustroń – Jaszowiec, 24-26.10.2018, **poster**
7. D. Kowalczykiewicz*, K. Szymańska, D. Gillner, A. Jarzębski, Stabilny i efektywny biokatalizator do stosowania w reaktorach z wirującym złożem, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 9-10.05.2019, **poster**
8. D. Kowalczykiewicz*, M. Przypis, K. Szymańska, A. Łochowicz, A. Kumpf, D. Tischler, L. Mestrom, P. Hagedoorn, U. Hanefeld, A. Jarzębski, Immobilized enzymatic cascade for the continuous flow trehalose production, Symbioza, 8th Intercollegiate Biotechnology Symposium, Warszawa, 17-19.05.2019, **poster**
9. D. Kowalczykiewicz*, A. Łochowicz, K. Szymańska, A. Kumpf, D. Tischler, A. Jarzębski, Pirofosforylaza UDP-glukozy immobilizowana na nośnikach krzemionkowych, Science Beyond Disciplines, 8th Edition of the Conference for Young Scientists, Chorzów, 19-20.09.2019, **referat**
10. D. Kowalczykiewicz*, A. Łochowicz, D. Gillner, K. Szymańska, Immobilizowane enzymy użyteczne w przemyśle biotechnologicznym, XX Konferencja Naukowo-Techniczna, Ustroń – Jaszowiec, 23-26.10.2019, **referat**
11. D. Świętochowska, A. Łochowicz, D. Gillner, L. Pollegioni, N. Ocal, F. Charmantray, L. Hecquet, K. Szymańska, Immobilized multi-enzymatic cascade for L-erythrulose production, Symbioza, 9th Intercollegiate Biotechnology Symposium, Warszawa, 21-23.05.2021, **poster**
12. A. Łochowicz, D. Świętochowska, L. Pollegioni, N. Ocal, F. Charmantray, L. Hecquet, K. Szymańska, Enzyme coimmobilization on silica monoliths, Symbioza, 9th Intercollegiate Biotechnology Symposium, online, 21-23.05.2021, **poster**

13. A. Łochowicz, D. Świętochowska, L. Pollegioni, N. Ocal, F. Charmantray, L. Hecquet, K. Szymańska, Multi-enzymatic cascade from immobilized enzymes, National Scientific Conference „e-Factory of Science”, VI edition, online, 20.11.2021, **poster**
14. D. Stradowska, D. Świętochowska, K. Szymańska, Application of a basket fixed bed reactor for heterogeneous process, National Scientific Conference „e-Factory of Science”, VI edition, online, 20.11.2021, **poster**
15. A. Łochowicz, D. Świętochowska, L. Pollegioni, N. Ocal, F. Charmantray, L. Hecquet, K. Szymańska, Stability of immobilized enzymes cascades, 48th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering & Membrane Conference PERMEA 2022, Tatranskie Matlary, 23–26.05.2022, **poster**
16. A. Łochowicz, D. Świętochowska, L. Pollegioni, N. Ocal, F. Charmantray, L. Hecquet, K. Szymańska, Enzymatic production of L-erythrose, 5th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry, Jura Krakowsko-Częstochowska, 13–15.06.2022, **poster**

Nagrody

1. Jednorazowe stypendium Rektora za publikację Leloir glycosyltransferases in applied biocatalysis: a multidisciplinary approach wydaną w czasopiśmie International Journal of Molecular Science, 2019, 20, 1-35, doi: 10.3390/ijms20215263, we współpracy z autorami reprezentującymi zagraniczny ośrodek naukowy TU Delft, Holandia
2. Grant za publikację wydaną w czasopiśmie TOP10 w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (artykuł: Rotating bed reactor packed with heterofunctional structured silica-supported lipase. Developing an effective system for the organic solvent and aqueous phase reactions, w czasopiśmie Microporous Mesoporous Materials, 2021, 312, 110789, doi:10.1016/j.micromeso.2020.110789.)
3. Jednorazowe stypendium Rektora za publikację Engineering of continuous bienzymatic cascade process using monolithic microreactors – in flow synthesis of trehalose wydaną w czasopiśmie Chemical Engineering Journal, 2022, 427, 131439, doi:10.1016/j.cej.2021.131439, we współpracy z autorami reprezentującymi zagraniczny ośrodek naukowy TU Delft, Holandia

Szkolenia i staże naukowe

1. Biocatalysis and Protein Engineering Course, 9-13.04.2018, Holandia, Delft University of Technology, Department of Biotechnology
2. Scientific and Research Internship, 5-17.08.2019, Niemcy, Ruhr University Bochum, Faculty of Biology and Biotechnology
3. Innowacyjna Dydaktyka Nauczyciela Akademickiego Politechniki Śląskiej, realizowany w ramach Projektu Innowacyjna Dydaktyka Nauczyciela Akademickiego Politechniki Śląskiej (POWR.03.04.00-00-D080/16)

Udział w projektach badawczych

1. „Podstawy procesowe ciągłego trójfazowego mikroreaktora enzymatycznego ze złożem o hierarchicznej strukturze”, termin realizacji: 01.10.2016-20.09.2017, Umowa: UMO-

2013/09/B/ST8/02420, projekt OPUS, instytucja finansująca: Narodowe Centrum Nauki,

Wykonawca

2. Enzymatic sugar coupling (No-P) „Nowatorskie biokatalityczno - procesowe rozwiązania dla nowych zrównoważonych procesów – biokatalizatory np. enzymy, mikroorganizmy, układy bezkomórkowe”, termin realizacji: 01.10.2016-31.03.2019, Projekt 04/030/PNN16/0024 (PNN-21/RCH3/2016), instytucja finansująca: NCBiR, **Wykonawca**
3. „Hydroliza skrobi pochodzącej z mąk – optymalizacja procesu produkcyjnego”, termin realizacji: 10.07.2017-30.06.2018, Umowa NB-192/RCH2/2017, finansowane przez NUTRICIA Danone, Zakłady Produkcyjne Sp. z o.o., **Wykonawca**
4. „Badania nad optymalizacją procesu hydrolizy skrobi”, termin realizacji: 01.07.2018-31.12.2018, Umowa NB-216/RCH2/2018, finansowane przez NUTRICIA Danone, Zakłady Produkcyjne Sp. z o.o., **Wykonawca**
5. „Badania nad enzymatycznymi i chemoenzymatycznymi metodami otrzymywania estrów kwasu mlekowego”, termin realizacji 01.10.2018 – 31.07.2019, Umowa 03/UD/IC/NI/GA ZAK/PŚI/2018, finansowane przez Grupa Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn Spółka Akcyjna, **Wykonawca**
6. „Proces otrzymywania immobilizowanego biokatalizatora w postaci lipazy osadzonej na nowoczesnym nośniku krzemionkowym, charakteryzującym się dużą porowatością, o odpowiednim uziarnieniu, w ilości 150 g (objętość katalizatora 1 L)”, termin realizacji: 09.12.2020-10.05.2021, Umowa 01/UD/IC/NI/GA ZAK/POLITECHNIKA ŚL/2020; numer projektu: NB-260/RCH2/2020, finansowane przez Grupę Azoty – Zakłady Azotowe Kędzierzyn, **Wykonawca**

Literatura

1. S. Arana-Pena, D. Carballares, R. Morellon-Sterling, A. Berenguer-Murcia, A. R. Alcantara, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice...or not?, *Biotechnol. Adv.* 51 (2021) 107584. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107584.
2. Q. Ji, B. Wang, J. Tan, L. Zhu, L. Li, Immobilized multienzymatic systems for catalysis of cascade reactions, *Process Biochem.* 51 (2016) 1193. doi: 10.1016/j.procbio.2016.06.004.
3. J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility, *Catalyst* 8 (2018) 92. doi:10.3390/catal8020092.
4. J. Chapman, A. E. Ismail, C. Z. Dinu, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks, *Catalysts*, 3 (2018) 238. doi:10.3390/catal8060238.
5. B. P. Dwivedee, J. Bhaumik, S. K. Rai, J. K. Laha, U. C. Banerjee, Development of nanobiocatalysts through the immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase for applications in efficient kinetic resolution of racemic compounds, *Bioresour. Technol.* 239 (2017) 464. doi:10.1016/j.biortech.2017.05050.
6. M. P. van der Helm, P. Bracco, H. Busch, K. Szymańska, A. B. Jarzębski, U. Hanefeld, Hydroxynitrile lyases covalently immobilized in continuous flow microreactors, *Catal. Sci. Technol.* 9 (2019) 1189. doi:10.1039/c8cy02192a.
7. D. J. Strub, K. Szymańska, Z. Hrydziuszko, J. Bryjak, A. B. Jarzębski, Continuous flow kinetic resolution of a nonequimolar mixture of diastereoisomeric alcohol using a structured monolithic enzymatic microreactor, *React. Chem. Eng.* 4 (2019) 587. doi:10.1039/c8re00177d
8. F. Rinaldi, J. Fernandez-Lucas, D. de la Fuente, C. Zheng, T. Bavaro, B. Peters, G. Massolini, F. Annunziata, P. Conti, I. de la Mata, M. Terreni, E. Calleri, Immobilized enzyme reactors based on nucleoside phosphorylases and 2'-deoxyribosyltransferase for the in-flow synthesis of pharmaceutically relevant nucleoside analogues, *Biores. Technol.* 307 (2020) 123258. doi:10.1016/j.biortech.2020.123258.
9. A. Szelwicka, P. Zawadzki, M. Sitko, S. Boncel, W. Czardybon, A. Chrobok, Continuous Flow Chemo-Enzymatic Baeyer–Villiger Oxidation with Superactive and Extra-Stable Enzyme/Carbon Nanotube Catalyst: An Efficient Upgrade from Batch to Flow, *Org. Process Res. Dev.* 23 (2019) 1386. doi:10.1021/acs.oprd.9b00132.
10. M. Hassan, Q. Yang, Z. Xiao, Covalent immobilization of glucoamylase enzyme onto chemically activated surface of κ -carrageenan, *Bulletin of the National Research Centre*, 43 (2019) 102. doi:10.1186/s42269-019-0148-0.
11. F. Rmili, B. Hadrich, M. Chamkha, A. Sayari, A. Fendri, Optimization of an organic solvent-tolerant lipase production by *Staphylococcus capitis* SH6. Immobilization for biodiesel production and biodegradation of waste greases, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 52 (2022) 108. doi:10.1080/10826068.2021.1920034.
12. S. S. Ibrahim, A. A. Al-Salamah, A. M. El-Toni, K. S. Almaary, M. A. El-Tayeb, Y. B. Elbadawi, G. Antranikian, Enhancement of alkaline Protease activity and stability via covalent immobilization onto hollow core-mesoporous shell silica nanospheres, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 184. doi:10.3390/ijms17020184.
13. D. Qi, M. Gao, X. Li, J. Lin, Immobilization of pectinase onto porous hydroxyapatite/calcium alginate composite Bbeads for improved Pperformance of Rrecycle, *ACS Omega* 5 (2020) 20062. doi:10.1021/acsomega.0c01625.
14. H. M. Salvi, G. D. Yadaw, Surface functionalization of SBA for immobilization of lipase and its application in synthesis of alkyl levulinates: Optimization and kinetics, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18 (2019) 101038. doi:10.1016/j.bcab.2019.101038.
15. Y.-T. Zhu, X.-Y. Ren, Y.-M. Liu, Y. Wei, L.-S. Qing, X. Liao, Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: Characterization and application for enzymatic inhibition assays, *Mater. Sci. Eng.* 38 (2014) 278. doi:10.1016/j.msec.2014.02.011

16. M. Xing, Y. Chen, B. Li, S. Tian, Highly efficient removal of patulin using immobilized enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* TF-06 entrapped in calcium alginate beads, *Food Chem.* 377 (2022) 131973. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131973.
17. S. Raghu, G. Pennathur, Enhancing the stability of a carboxylesterase by entrapment in chitosan coated alginate beads, *Turk. J. Biol.* 42 (2018) 307. doi:10.3906/biy-1805-28.
18. J. C. Quilles Junior, A. L. Ferrarezi, J. P. Borges, R. R. Brito E. Gomes, R. da Silva, J. M. Guisán, M. Boscolo, Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism. *Bioprocess Biosyst Eng.* 39 (2016) 1933. doi:10.1007/s00449-016-1667-9.
19. S. Pang, Y. Wu, X. Zhang, B. Li, J. Ouyang, Immobilization of laccase via adsorption onto bimodal mesoporous Zr-MOF, *Process Biochem.* 51 (2016) 229. doi:10.1016/j.procbio.2015.11.033.
20. C. Bonzom, L. Schild, H. Gustaffsson, L. Olsson, Feruloyl esterase immobilization in mesoporous silica particles and characterization in hydrolysis and transesterification, *BMC Biochemistry* 19 (2018) 1. doi:10.1186/s12858-018-0091-y.
21. F. A. Lage, J. J. Bassi, M. C. Corradini, L. M. Toderó, J. H. Luiz, A. A. Mendez, Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system, *Enzyme Microb Technol.* 84 (2016) 56. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.12.007.
22. B. Wang, J. Zhou, X.-Y. Zhang, Y.-S. Yang, C.-H. Liu, H.-L. Zhu, Q.-C. Jiao, Covalently immobilized crude D-amino acid transaminase onto UiO-66-NH₂ surface for D-Ala biosynthesis, *Int. J. Biol. Macromol.* 175 (2012) 451. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.027.
23. K. Szałapata, M. Osińska-Jaroszuk, J. Bryjak, M. Jaszek, A. Jarosz-Wilkotazka, Novel application of porous and cellular materials for covalent immobilization of pepsin, *Brazilian J. Chem. Eng.* 33 (2016) 251. doi:10.1590/0104-6632.20160332s20140111.
24. S. Olshannikova, V. Koroleva, M. Holyavka, A. Pashkov, V. Artyukhov, Covalent immobilization of thiol proteinases on chitosan, *Chem. Proc.* 2 (2020) 7. doi:10.3390/ECCS2020-07527.
25. A. Zniszczoł, A. P. Herman, K. Szymańska, J. Mrowiec-Białoń, K. Z. Walczak, A. Jarzębski, S. Boncel, Covalently immobilized lipase on aminoalkyl- carboxy- and hydroxy-multiwall carbon nanotubes in enantioselective synthesis of solketal esters, *Enz. Micro. Technol.* 87 (2016) 61. doi:10.1016/j.enzmictec.2016.02.015.
26. E. Araya, P. Urrutia, O. Romero, A. Illanes, L. Wilson, Design of combined crosslinked enzyme aggregates (combi-CLEAs) of β -galactosidase and glucose isomerase for the one-pot production of fructose syrup from lactose, *Food Chem.* 288 (2019) 102. doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.024.
27. J. Hong, D. Jung, S. Park, Y. Oh, K. K. Oh, S. J. Lee, Immobilization of laccase via cross-linked enzyme aggregates prepared using genipin as a natural cross-linker, *Int. J. Biol. Macromol.* 169 (2021) 541. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.136.
28. R. Verma, A. Kumar, S. Kumar, Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1, *Process Biochem.* 80 (2019) 72. doi:10.1016/j.procbio.2019.01.019.
29. R. A. Sheldon, J. M. Woodley, Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00203.
30. M. Hartman, X. Kostrov, Immobilization of enzymes on porous silicas-benefits and challenges, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6277. doi:10.1039/c3cs60021a.
31. T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: review, *Adsorption* 20 (2014) 801-821. doi:10.1007/s10450-014-9623-y.
32. D.-M. Liu, J. Chen, Y.-P. Shi, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *Trends in Anal. Chem.* 102 (2018) 332. doi:10.1013/j.traac.2018.03.011.
33. J. Sun, S. Wang, W. Li, R. Li, S. Chen, H. I. Ri, T. M. Kim, M. S. Kang, L. Sun, X. Sun, Q. Yuan, Improvement of trehalose production by immobilized trehalose synthase from *Thermus thermophilus* HB27. *Molecules* 23 (2018) 1087. doi:10.3390/molecules23051087.

34. Y. Xin, G. Wang, W. Han, Y. Shen, H. Uyama, An ideal enzyme immobilization carrier: a hierarchically porous cellulose monolith fabricated by phase separation method, *Pure Appl. Chem.* 90 (2018) 1055. doi:10.1515/pac-2017-0710.
35. O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodriguez, R. Fernandez-Lafuente, Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization, *RSC Adv.* 4 (2014) 1583. doi:10.1039/C3RA45991H.
36. R. R. de Melo, R. C. Alnoch, A. F. L. Vilela, E. M. de Souza, N. Krieger, R. Ruller, H. H. Sato, C. Mateo, New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: A tool for enzyme immobilization at neutral pH, *Molecules* 22 (2017) 1088. Doi:10.3390/molecules22071088.
37. A. Dantas, A. Valerio, J. L. Ninow, J. V. de Oliveira, D. de Oliveira, Potential application of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) immobilized on nonporous polystyrene particles, *Environ. Prog. Sustain. Energy* 38 (2019) 608. doi:10.1002/ep.12953.
38. C. Guerrero, C. Vera, N. Serna, A. Illanes, Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose, *Biores. Technol.* 232 (2017) 53. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.003.
39. E. P. Cicolatti, A. Valerio, R. O. Henriques, M. C. C. Pinto, G. Fernandez Lorente, E. A. Manoel, J. M. Guisan, J. L. Ninow, D. de Oliveira, B. C. Pessela, Production of new nanobiocatalysts via immobilization of lipase B from *C. antarctica* on polyurethane nanosupports for application on food and pharmaceutical industries, *Int. J. Biol. Macromol.* 165 (2020) 2957. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.179.
40. C. Li, S. Jiang, X. Zhao, H. Liang, Co-immobilization of enzymes and magnetic nanoparticles by metal-nucleotide hydrogel nanofibers for improving stability and recycling, *Molecules* 22 (2017) 179. doi:10.3390/molecules22010179
41. P. Bolibok, M. Wiśniewski, K. Roszek, A. P. Terzyk, Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide, *Sci. Nat.* 104 (2017) 36. doi:10.1007/s00114-017-1459-3.
42. C.-C. Yu, Y. Y. Kuo, C.-F. Liang, W.-T. Chien, H.-T. Wu, T.-C. Chang, F.-D. Jan, C.-C. Lin, Site-Specific immobilization of enzymes on magnetic nanoparticles and their use in organic chemistry, *Bioconjugate Chem.* 23 (2012) 714. doi:10.1021/bc200396r.
43. S. Boncel, A. Zniszczoł, K. Szymańska, J. Mrowiec-Białoń, A. Jarzębski, K. Z. Walczak, Alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* non-covalently immobilised on pristine versus oxidised multi-wall carbon nanotubes as efficient and recyclable catalytic systems in the synthesis of Solketal esters, *Enzyme Microbiol. Technol.* 53 (2013) 263. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.05.003.
44. K. Zielińska, K. Szymańska, R. Mazurkiewicz, A. Jarzębski, Batch and in-flow kinetic resolution of racemic 1-(N-acylamino)alkylphosphonic and 1-(N-acylamino)alkylphosphinic acids and their esters using immobilized penicillin G acylase, *Tetrahedron: Asym.* 28 (2017) 146. doi:10.1016/j.tetasy.2016.11.007.
45. D. Stradomska, M. Heba, A. Czernek, N. Kuźnik, D. Gillner, K. Maresz, W. Pudło, A. Jarzębski, K. Szymańska, Lipase immobilized on MCFs as biocatalysts for kinetic and dynamic kinetic resolution of sec-alcohols, *Catalyst* 11 (2021) 518. doi:10.3390/catal11040518.
46. G. Petricola, T. Tommasi, M. Dosa, E. Camelin, E. Berruto, C. Ottone, D. Fino, V. Cauda, M. Piumetti, Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for the immobilization of formate dehydrogenase (FDH), *Int. J. Biol. Macromol.* 177 (2021) 261. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.02.114.
47. A. Kołodziejczak-Radzimska, J. Zdarta, T. Jesionowski, Physicochemical and catalytic properties of acylase from *Aspergillus melleus* immobilized on amino- and carbonyl-grafted Stöber silica. *Biotechnol. Prog.* 34 (2018) 767. doi:10.1002/btpr.2610
48. K. Szymańska, W. Pudło, J. Mrowiec-Białoń, A. Czardybon, J. Kocurek, A. B. Jarzębski, Immobilization of invertase on silica monoliths with hierarchical pore structure to obtain continuous flow enzymatic microreactors of high performance, *Micropor. Mesopor. Mat.* 170 (2013) 75. doi:10.1016/j.micromeso.2012.11.037.
49. K. Szymańska, K. Odrozek, A. Zniszczoł, W. Pudło, A. Jarzębski, A novel hierarchically structured siliceous packing to boost the performance of rotating bed enzymatic reactors, *Chem. Eng. J.* 315 (2017) 18. doi:10.1016/j.cej.2016.12.131.

50. K. Xu, X. Chen, R. Zheng, Y. Zheng, Immobilization of multi-enzymes on support materials for efficient biocatalysis, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 660. doi:10.3389/fbioe.2020.00660.
51. K. Szymańska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń, A.B. Jarzębski, Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalysts, *Micropor. Mesopor. Mat.* 99 (2007) 167–175. doi:10.1016/j.micromeso.2006.08.035.
52. A. B. Jarzębski, K. Szymańska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń, Covalent immobilization of trypsin on to siliceous mesostructured cellular foams to obtain effective biocatalysts, *Catal. Today* 124 (2007) 2. doi:10.1016/j.cattod.2007.03.023.
53. J. Bryjak, K. Szymańska, A. B. Jarzębski, Laccase immobilization on mesostructured silicas, *Chem. Process Eng.* 33 (2012) 611-620. doi:10.2478/v10176-012-0051-9.
54. A. Chrzanowska, A. Derylo-Marczewska, M. Wasilewska, Mesocellular silica foams (MCFs) with tunable pore size as a support for lysozyme immobilization: adsorption equilibrium and kinetics, biocomposite properties, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 5479. doi:10.3390/ijms21155479
55. L. Hermida, J. Agustian, A. Z. Abdullah, A. R. Mohamed, Review of large-pore mesostructured cellular foam (MCF) silica and its applications, *Open Chem.* 17 (2019) 1000. doi:10.1515/chem-2019-0107.
56. R. George, S. Sugunan, Synthesis and characterization of immobilized glucoamylase on mesocellular foams through spectroscopic techniques and catalytic activity of immobilized enzyme, *Mat. Tod.: Proceed.* 50 (2022) 107-112. doi: 10.1016/j.matpr.2021.06.245
57. J. Zdarta, A. Feliczak-Guzik, K. Siwinska-Ciesielczyk, I. Nowak, T. Jesionowski, Mesostructured cellular foam silica materials for laccase immobilization and tetracycline removal: A comprehensive study, *Micropor. Mesopor. Mat.* 291 (2020) 109688. doi:10.1016/j.micromeso.2019.109688.
58. K. Nakanishi, Pore structure control of silica gels based on phase separation, *J. Porous Mater.* 4 (1997) 67. doi: 10.1023/A:1009627216939.
59. K. Nakanishi, R. Takahashi, T. Nagakane, K. Kitayama, N. Koheiya, H. Shikata, N. Soga, Formation of hierarchical pore structure in silica gel. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 17 (2000) 191. doi:10.1023/A:1008707804908.
60. A. Galarneau, Z. Abid, B. Said, Y. Didi, K. Szymańska, A. B. Jarzębski, F. Tancret, H. Hamaizi, A. Bengueddach, F. Di Renzo, F. Fajula, Synthesis and textural characterization of mesoporous and meso-/ macroporous silica monoliths obtained by spinodal decomposition. *Inorganics* 4 (2016) 9. doi:10.3390/inorganics4020009.
61. H. Lyu, T.-A. Asoh, H. Uyama, Hierarchical silica monolith prepared using cellulose monolith as template, *Polym. Degrad. Stab.* 177 (2020) 109164. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109164.
62. J. H. Smatt, S. Schunk, M. Linden, Versatile Double-Templating Synthesis Route to Silica Monoliths Exhibiting a Multimodal Hierarchical Porosity, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2354. doi:10.1021/cm0213422.
63. W. Pudło, W. Gawlik, J. Mrowiec-Białoń, T. Buczek, J. Malinowski, A. B. Jarzębski, Materials with multimodal hierarchical porosity, *Inżynieria Chem. i Proces.* 27 (2006) 177.
64. K. Szymańska, W. Pudło, J. Mrowiec-Białoń, A. Czardybon, J. Kocurek, A. B. Jarzębski, Immobilization of invertase on silica monoliths with hierarchical pore structure to obtain continuous flow enzymatic microreactors of high performance, *Micropor. Mesopor.* 170 (2013) 75. doi:10.1016/j.micromeso.2012.11.037
65. K. Szymańska, M. Pietrowska, J. Kocurek, K. Maresz, A. Koreniuk, J. Mrowiec-Białoń, P. Widtak, E. Magner, A. Jarzębski, Low back-pressure hierarchically structured multichannel microfluidic bioreactors for rapid protein digestion – Proof of concept, *Chem. Eng. J.* 287 (2016) 148. doi:10.1016/j.cej.2015.10.120.
66. D. Pirozzi, M. Abagnale, L. Minieri, P. Pernice, A. Aronne, In-situ sol-gel modification strategies to develop a monolith continuous microreactor for enzymatic green reactions, *Chem. Eng. J.* 306 (2016) 10101016. doi:10.1016/j.cej.2016.08.035.
67. E. Laurenti, A. dos Santos Vianna Jr, Enzymatic microreactors in biocatalysis: History, features, and future perspectives, *Biocatal.* 1 (2015) 148. doi:10.1515/boca-2015-0008.
68. K. Szymańska, A. Ciemięga, K. Maresz, W. Pudło, J. Malinowski, J. Mrowiec-Białoń, A. B. Jarzębski, Catalytic functionalized structured monolithic micro-/mesoreactors: engineering, properties,

- and performance in flow synthesis: An overview and guidelines, *Front. Chem. Eng.* 3 (2021) 789102. doi:10.3389/fceng.2021.789102.
69. K. Maresz, A. Koreniuk, J. J. Malinowski, J. Mrowiec-Białoń, Badania porównawcze przepływowych monolitycznych mikroreaktorów i reaktorów ze złożem stałym w reakcji estryfikacji, *Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Chemicznej Polskiej Akademii Nauk*, 19 (2015) 37.
 70. M. Sanri, L. Sanicneto, V. Nascimento, J. B. Azeredo, E. V. M. Orozco, L. H. Andrade, H. Groger, C. Santi, Flow biocatalysis: A challenging alternative for the synthesis of APIs and natural compounds, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 990. doi:10.3390/ijms22030990.
 71. A. El Kadib, R. Chimenton, A. Sachse, F. Fajula, A. Galarneau, B. Coq, Functionalized inorganic monolithic microreactors for high productivity in fine chemicals catalytic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 4969. doi:10.1002/anie.200805580.
 72. A. Sachse, A. Galarneau, F. Fajula, F. Di Renzo, P. Creux, B. Coq, Functional silica monoliths with hierarchical uniform porosity as continuous flow catalytic reactors, *Micropor. Mesopor. Mater.* 140 (2011) 58. doi:10.1016/j.micromeso.2010.10.044.
 73. A. Galarneau, A. Sachse, B. Said, C.-H. Pelisson, P. Boscario, N. Brun, L. Courtheoux, N. Olivi-Tran, B. Coasne, F. Fajula, Hierarchical porous silica monoliths: A novel class of microreactors for process intensification in catalysis and adsorption, *C. R. Chimie* 19 (2016) 231. doi:10.1016/j.crci.2015.05.017.
 74. K. Szymańska, K. Odrozek, A. Zniszczoł, G. Torello, V. Resch, U. Hanefeld, A.B. Jarzębski, MsAcT in siliceous monolithic microreactors enables quantitative ester synthesis in water, *Catal. Sci. Technol.* 6 (2016) 4882. doi:10.1039/c5cy02067k.
 75. www.spinchem.com [dostęp 12.11.2020 r.]
 76. R. A. Sheldon, P. C. Pereira, Biocatalysis engineering: the big picture, *Chem. Soc. Rev.* 46 (2017) 2678. doi:10.1039/C6CS00854B.
 77. H. Mallin, J. Muschiol, E. Bystrom, U.T. Bornscheuer, Efficient biocatalysis with immobilized enzymes or encapsulated whole cell microorganism by using the Spinchem reactor system, *ChemCatChem* 5 (2013) 3529-3532. doi:10.1002/cctc.201300599.
 78. S. Pithani, S. Karlsson, H. Emtenas, C. T. Oberg, Using Spinchem rotating bed reactor technology for immobilized enzymatic reactions: A case study, *Org. Process Res. Dev.* 23 (2019) 1926. doi:10.1021/acs.oprd.9b00240.
 79. K. Odrozek, K. Szymańska, M. Lewańczuk, G. Dzido, W. Pudło, J. Bryjak, A. Jarzębski, Aerobowe, enzymatyczne utlenianie pochodnych kwasu benzoowego w reaktorze z wirującym złożem o hierarchicznej strukturze porów. *Chem. Rev.* 1 (2017) 2446. doi:10.15199/62.2017.12.7.
 80. N. Guajardo, C. Bernal, L. Wilson, Z. Cabrera, Selectivity of R--monobenzoate glycerol synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B immobilized on heterofunctional supports, *Process Biochem.* 50 (2015) 1870. doi:10.1016/j.prcocbio.2015.06.025.
 81. W. Shuai, R. K. Das, M. Naghdi, S. K. Brar, M. Verma, A review on the important aspects of lipase on immobilization on nanomaterials, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64 (2017) 496. doi:10.1002/bab.1515.
 82. C. Ortiz, M. L. Ferreira, O. Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, A. Berenguer-Murcia, L. E. Briand, R. Fernandez-Lafuente, Novozym 435 the "perfect" lipase immobilized biocatalyst?, *Catal. Sci. Technol.* 9 (2019) 2380. doi:10.1039/c9cy00415g.
 83. S. Arana-Pena, N. S. Rios, D. Carballares, C. Mendez-Sanchez, Y. Lokha, L. R. B. Goncalves, R. Fernandez-Lafuente, Effects of enzyme loading and immobilization conditions on the catalytic features of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl-agarose beads, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 36. doi:10.3389/fbioe.2020.00036.
 84. G. Filho, A. G. Silva, C. Z. Guidini, Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 7399. doi:10.1007/s00253-019-210027-6.
 85. J. Sun, Y. Chen, J. Sheng, M. Sun, Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase on macroporous resin using different methods: Characterization of the biocatalysts in hydrolysis reaction, *BioMed Research Int.* (2015) doi:10.1155/2015/139179.
 86. S. P. de Souza, R. AD de Almeida, G. G. Garcia, R. AC Leao, J. Bassut, R. OMA de Souza, I Itabaiana Jr, Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on epoxy functionalized silica: characterization

- and improving biocatalytic parameters, *J Chem. Technol. Biotechnol.* 93 (2018) 105. doi:10.1002/jctb.5327.
87. N. Rueda, T. L. Albuquerque, R. Bartolome-Cabrero, L. Fernandez-Lopez, R. Torres, C. Ortiz, J. C. dos Santos, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Reversible immobilization of lipases on heterofunctional octyl-amino agarose beads prevents enzyme desorption, *Molecules* 21 (2016) 646. doi:10.3390/molecules21050646.
 88. R. C. Rodriguez, J. J. Virgen-Ortiz, J. C. S dos Santos, A. Berenguer-Murcia, A. R. Alcantara, O. Barboa, C. Ortiz, R. Fernandez – Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems and solutions, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 746. doi:10.1016/j.biotechnadv.2019.04.003.
 89. F. I. Khan, D. Lan, R. Durrani, W. Huan, Z. Zhao, Y. Wang, The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5 (2017) 16. doi:10.3389/fbioe.2017.00016.
 90. N. Binhayeeding, T. Yunu, N. Pichid, S. Klomklao, K. Sangkharak, Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production, *Process Biochem.* 95 (2020) 174. doi:10.1016/j.procbio.2020.02.007.
 91. B. Stauch, S. J. Fisher, M. Cianci, Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation, *J. Lipid Research* 56 (2015) 2348. doi:10.1194/jlr.M063388.
 92. H. Höck, S. Engel, S. Weingarten, H. Keul, U. Schwaneberg, M. Möller, M. Bocola, Comparison of *Candida antarctica* Lipase B variants for conversion of ϵ -caprolactone in aqueous medium-Part 2, *Polymers (Basel)* 10 (2018) 524. doi:10.3390/polym10050524.
 93. T. Zisis, P. L. Freddolino, P. Turunen, M.C.F. van Teeseling, A. E. Rowan, K. G. Blank, Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation, *Biochem.* 54 (2015) 5969. doi:10.1021/acs.biochem.5b00586.
 94. L. Zhou, Y. He, L. Ma, Y. Jiang, Z. Huang, L. Yin, J. Gao, Conversion of levulinic acid into alkyl levulinates: Using lipase immobilized on meso-molding three-dimensional macroporous organosilica as catalyst, *Biores. Technol.* 247 (2018) 568. doi:10.1016/j.biotech.2017.08.134.
 95. <https://www.novozymes.com/en> [dostęp 20.11.2020 r.]
 96. S. Weinberger, A. Pellis, J. W. Comerford, T. J. Farmer, G. M. Guebitz, Efficient physisorption of *Candida Antarctica* Lipase B on polypropylene beads and application for polyester synthesis, *Catalysts* 8 (2018) 369. doi:10.3390/catal8090369.
 97. P. Nicolas, V. L. Lassale, M. L. Ferreira, About the role of typical spacer/crosslinker on the design of efficient magnetic biocatalysts based on nanosized magnetite, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 122 (2015) 296. doi:10.1016/j.molcatb.2015.09.0131381.
 98. C. Jose, R. D. Bonetto, L. A. Gambaro, M del Pilar Guaugue Torres, M. L. Foresti, M. L. Ferreira, L. E. Briand, Investigation of the causes of deactivation-degradation of the commercial biocatalyst Novozym 435 in ethanol and ethanol-aqueous media, *J. Mol. Cat. B. Enz.* 71 (2011) 95. doi:10.1016/j.molcatb.2011.04.004.
 99. C. Jose, G. B. Austic, R. D. Bonetto, R. M. Burton, L. E. Briand, Investigation of the stability of Novozym 435 in the production of biodiesel, *Catal. Tod.* 213 (2013) 73. doi:10.1016/j.cattod.2013.02.013.
 100. M. V. Toledo, C. Jose, S. E. Collins, R. D. Bonetto, M. L. Ferreira, L. E. Briand, Esterification of R/S-ketoprofen with 2-propanol as reactant and solvent catalyzed by Novozym 435 at selected conditions, *J. Mol. Cat. B: Enz.* 83 (2012) 108. doi:10.1016/j.molcatb.2012.06.016.
 101. H. Zhao, Z. Song, Migration of reactive trace compounds from Novozym 435 into organic solvents and ionic liquids, *Biochem. Eng. J.* 49 (2010) 113-118. doi:10.1016/j.bej.2009.12.004.
 102. N. Zhong, W. Chen, L. Liu, H. Chen, Immobilization of lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production", *Food Chem.* 271 (2019) 739. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.185
 103. J. P. Miguez, R. S. Gama, I. C. A. Bolina, C. C. de Melo, M. R. Cordeiro, D. B. Hirata, A. A. Mendez, Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst

- prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica, *Chem. Eng. Res. Des.* 139 (2018) 296. doi:10.1016/j.cherd.2018.09.037
- 104.M. Babaki, M. Yousefi, Z. Habibi, J. Brask, M. Mohammadi, Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil, *Biochem. Eng. J.* 101 (2015) 23. doi:10.1016/j.bej.2015.04.020.
 - 105.E. A. Manoel, J. C. S. dos Santos, D. M. G. Freire, N. Rueda, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of enzyme, *Enz Microb. Technol.* 71 (2015) 53. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.02.001.
 - 106.H. Zhang, L. J. Peng, Y. Wang, Y. Q. Li, Lipase immobilization on epoxy-activated poly (vinyl acetate-acrylamide) microspheres, *Colloids Surf. B* 1 (2015) 206. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.03.056.
 - 107.J. Cao, H. Xu, F. Li, Y. Zou, Y. Ran, X. Ma, Y. Cao, Q. Xu, D. Qiao, Y. Cao, One-step direct transesterification of wet yeast for biodiesel production catalyzed by magnetic nanoparticle-immobilized lipase, *Renew. Energy* 171 (2021) 11. doi:10.1016/j.renene.2021.02.065
 - 108.P. Shalini, B. Deepanraj, S. Vijayalakshmi, J. Ranjitha, Synthesis and characterisation of lipase immobilised magnetic nanoparticles and its role as a catalyst in biodiesel production, *Mat. Tod. Proceedings*, artykuł w druku, doi:10.1016/j.matpr.2021.07.027
 - 109.M. H. da Silva Cavalcanti, L. B. Alves, A. Duarte, A. A. Mendes, J. M. S. F. de Silva, N. H. F. da Silveira, M. T. Escote, L. S. Virtuoso, Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance, *Chem. Eng. J.* 431 (2022) 134128. doi:10.1016/j.cej.2021.134128.
 - 110.Z. Cabrera, G. Fernandez-Lorent, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Palomo, J. M. Guisan, Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports, *J. Mol. Catal. B* 57 (2009) 171. doi:10.1016/j.molcatb.2008.08.012.
 - 111.M. Yousefi, M. Mohammadi, Z. Habibi, Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose, *J. Mol. Catal. B: Enz.* 104 (2014) 87. doi:10.1016/j.molcatb.2014.03.005.
 - 112.L. N. Lima, G. C. Oliveira, M. J. Rojas, H. F. Castro, P. C. M. Da Ros, A. A. Mendes, R. L. C. Giordano, P. W. Tardioli, Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent free systems, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42 (2015) 523. doi:10.1007/s10295-015-1586-9.
 - 113.S. Moreno-Perez, P. Luna, F. J. Senorans, J. M. Guisan, G. Fernandez-Lorente, Enzymatic synthesis of triacylglycerols of docosahexaenoic acid: Transesterification of ethyl esters with glycerol, *Food Chem.* 187 (2015) 225. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.095.
 - 114.M. Vardasco-Martin, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar, R. Fernandez-Lafuente, C. Otero, Selective synthesis of partial glycerides of conjugated linoleic acids via modulation of the catalytic properties of lipases by immobilization on different supports, *Food Chem.* 245 (2018) 39. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.072.
 - 115.E. Abreu Silveira, S. Moreno-Perez, A. Basso, Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the Ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. *BMC Biotechnol.* 17 (2017) 88. doi:10.1186/s12896-017-0407-9.
 - 116.M. Garmroodi, M. Mohammadi, A. Ramazani, M. Ashjari, J. Mohammadi, B. Sabour, M. Yousefi, Covalent binding of hyper-activated *Rhizomucor miehei* lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports, *International Journal of Biological Macromolecules.* 86 (2016) 208. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.076.
 - 117.A. Suescun, N. Rueda, J. C. S. dos Santos, J. J. Castillo, C. Ortiz, R. Torres, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on glyoxyl–octyl supports: Improved stability and reactivation strategies, *Process Biochem.* 50 (2015) 1211. doi:10.1016/j.procbio.2015.05.010.
 - 118.N. Rueda, J. C. dos Santos, R. Torres, C. Ortiz, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads, *RSC Adv.* 5 (2015) 11212. doi:10.1039/C4RA13338B.
 - 119.C. Bernal, P. Urrutia, A. Illanes, L. Wilson, Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: opportunities for covalent immobilization of enzymes, *New Biotechnol.* 30 (2013) 500. doi:10.1016/j.nbt.2013.01.011.

- 120.B. Hirata, T. L. Albuquerque, N. Rueda, J. M. Sanchez-Motero, E. Garcia-Verdugo, R. Porcar, R. Fernandez-Lafuente, Advantages of heterofunctional octyl supports: production of 1,2-Dibutyryl by specific and selective hydrolysis of tributyrin catalyzed by immobilized lipases, *ChemistrySelect* 1 (2016) 3259. doi:10.1002/slct.201600274.
- 121.V. Vescovi, W. Kopp, J. M. Guisan, R. L. C. Giordano, A. A. Mendez, P. W. Tardioli, Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms, *Process Biochem.* 51 (2016) 2055. doi:10.1016/j.procbio.2016.09.016.
- 122.N. Rios, C. Mendez-Sanchez, S. Arana-Pena, N. Rueda, C. Ortiz, L. R. B. Goncalves, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on glyoxyl-octyl agarose beads: Improved stability and reuseability, *BBA-Proteins Proteom.* 1867 (2019) 741. doi:10.1016/j.bbapap.2019.06.005.
- 123.F. Kazenwadel, M. Franzreb, B. E. Rapp, Synthetic enzyme supercomplexes: co-immobilization of enzyme cascades, *Anal. Methods* 7 (2015) 4030. doi:10.1039/C5AY00453E.
- 124.T. Hwang, S. Lee, Multienzymatic cascade reactions via enzyme complex by immobilization, *ACS Catal.* 9 (2019) 4402. doi:10.1021/acscatal.8b04921.
- 125.C. Zhong, B. Duić, J. M. Bolivar, B. Nidetzky, Three-enzyme Phosphorylase cascade immobilized on solid support for biocatalytic synthesis of cello-oligosaccharides, *ChemCatChem.* 12 (2020) 1350. doi:10.1002/cctc.201901964.
- 126.J. M. Sperl, V. Siber, Multienzyme cascade reactions – status and recent advances, *ACS Catal.* 8 (2018) 2385. doi:10.1021/acscatal.7b03440.
- 127.K. Schmolzer, M. Lemmerer, A. Gutmann, B. Nidetzky, Integrated process design for biocatalytic synthesis by a Leloir Glycosyltransferase: UDP-glucose production with sucrose synthase, *Biotechnol. Bioeng.* 114 (2017) 924. doi:10.1002/bit.26204.
- 128.T. Eixelsberger, B. Nidetzky, Enzymatic redox cascade for one-pot synthesis of uridine 5'-diphosphate xylose from uridine 5'-Diphosphate Glucose, *Adv. Synth. Catal.* 356 (2014) 3575. doi:10.1002/adsc.201400766.
- 129.F. De Bryun, J. Maertens, J. Beauprez, W. Soetaert, M. de Mey, Biotechnological advances in UDP-sugar based glycosylation of small molecules, *Biotech. Adv.* 33 (2015) 288. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.005.
- 130.A. Kumpf, D. Kowalczykiewicz, K. Szymańska, M. Mehnert, I. Bento, A. Łochowicz, A. Pollender, A. Jarzębski, D. Tischler, Immobilization of the highly active UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Thermocristum agreste* provides a highly efficient biocatalyst for the production of UDP-glucose, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 740. doi:10.3389/fbioe.2020.00740
- 131.A. Kumpf, A. Partzsch, A. Pollender, I. Bento, D. Tischler, Two Homologous enzymes of the GalU Family in *Rhodococcus opacus* 1CP-RoGalU1 and RoGalU2, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5809. doi:10.3390/jims20225809.
- 132.A. Gutman, B. Nidetzky, Unlocking the potential of Leloir Glycosyltransferases for applied biocatalysis: efficient synthesis of uridine 5'-diphosphate-glucose by Sucrose Synthase, *Adv. Synth. Catal.* 358 (2016) 36009. doi:10.1002/adsc.201600754
- 133.K. Schmolzer, A. Gutmann, M. Diricks, T. Desmet, B. Nidetzky, Sucrose synthase: A unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development, *Biotech. Adv.* 34 (2016) 88. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.11.003.
- 134.X. Zhao, Y. Zou, M. Xue, Z. Ma, S. Wang, P. G. Wang, M. Chen, A one-pot approach to bio-synthesize globotriose and its derivatives from simpler substrates, *Eur. J. Med. Chem.* 80 (2014) 423. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.067.
- 135.L. L. Chu, R. P. Panday, J. Y. Shin, H. J. Jung, Synthetic analog of anticancer drug daunorubicin from daunorubicinone using one-pot enzymatic UDP-recycling glycosylation, *J. Mol. Cat. B Enzym.* 124 (2016) 1. doi:10.1016/j.molcatb.2015.11.020.
- 136.J. Y. Shin, R. P. Pandley, H. Y. Jung, L. L. Chu, Y. I. Park, J. K. Sohng, In vitro single-vessel enzymatic synthesis of novel Resvera-A glucosides, *Carbohydr. Res.* 424 (2016) 8. doi:10.1016/j.carres.2016.02.001.

- 137.X. Cai, I. Seitzl, W. Mu, T. Zhang, T. Stressler, L. Fischer, B. Jiang, Biotechnical production of trehalose through the trehalose synthase pathway: current status and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 2965-2976. doi:10.1007/s00253-018-8814-y.
- 138.M. Burek, S. Waśkiewicz, I. Wandzik, K. Kamińska, Trehalose – properties, biosynthesis and applications, *Chemik.* 69 (2015) 469-476.
- 139.C. Arai, N. Arai, S. Arai, C. Yoshizane, S. Miyata, A. Mizote, A. Suyama, S. Endo, T. Ariyasu, H. Mitsuzumi, S. Ushio, Continuous intake of Trehalose induces white adipose tissue browning and enhances energy metabolism. *Nutricion Metab.* 16 (2019) 45. doi:10.1186/s12986-019-0373-4.
- 140.C. Arai, N. Arai, A. Mizote, K. Kohno, K. Iwaki, T. Hanaya, S. Arai, S. Ushio, S. Fukuda, Trehalose prevents adipocyte hypertrophy and mitigates insulin resistance, *Nutr. Res.* 12 (2010) 840. doi:10.1016/j.nutres.2010.10.009.
- 141.C. Yoshizane, A. Mizote, M. Yamada, N. Arai, S. Arai, K. Maruta, H. Mitsuzumi, T. Ariyasu, S. Ushio, S. Fukuda, Glycemic, insulinemic and incretin responses after oral trehalose ingestion in healthy subjects, *Nutric. J.* 16 (2017) 9. doi:10.1186/s12937-017-0233-x.
- 142.S. J. Marathe, N. N. Shah, R. S. Singhal, Enzymatic synthesis of fatty acid esters of trehalose: Process optimization, characterization of the esters and evaluation of their bioactivities, *Bioorg. Chem.* 94 (2020) 103460. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103460.
- 143.J. Lee, E.-W. Lin, U. Y. Lau, J. L. Hedrick, E. Bat, H. D. Maynard, Trehalose glycopolymers as excipients for protein stabilization, *Biomacromolec.* 14 (2013) 2561. doi:10.1021/bm4003046.
- 144.C. Shiraldi, I. Di Lernia, M. De Rosa, Trehalose production: exploiting novel approaches, *Trends in Biotechnol.* 20 (2002) 420. doi:10.1016/S0167-7799(02)02041-3.
- 145.X. Xu, R. Wang, R. Wu, W. Yan, T. Shi, Q. Jiang, D. Shi, Trehalose reduces bone loss in experimental biliary cirrhosis rats via ERK phosphorylation regulation by enhancing autophagosome formation, *The FASEB J.* 00 (2020) 1. doi:10.1096/fj.20190258RRR.
- 146.S. Ohtake, Y. J. Wang, Trehalose: current use and future applications, *J. Pharmac. Sci.* 100 (2011) 2020. doi:10.1002/jps.2245.
- 147.H.-J. Lee, Y.-S. Yoon, S.-J. Lee, Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction, *Cell Death. Disease.* 9 (2018) 712. doi:10.1038/s41419-018-0749-9.
- 148.M. Khalifeh, G. E. Barrett, A. Sahebkar, Trehalose as a promising therapeutic candidate for the treatment of Parkinson's disease, *Br J. Pharmacol.* 176 (2019) 1173. doi:10.1111/bph.14623.
- 149.M. Burek, I. Wandzik, Trehalose-rich, degradable hydrogels designed for trehalose release under physiologically relevant conditions, *Polymers* 11 (2019) 2027. doi:10.3390/polym11122027.
- 150.D. Tishler, S. Niescher, S. R. Kaschabek, M. Schlömann, Trehalose phosphate synthases OtsA1 and OtsA2 of *Rhodococcus opacus* 1CP, *FEMS Microbiol. Lett.* 342 (2013) 113. doi:10.1111/1574-6968.12096.
- 151.A. Thammahong, S. Puttikamonkul, J. R. Perfect, R. G. Brennan, R. A. Cramer, Central role of the trehalose biosynthesis pathway in the pathogenesis of human fungal infections: opportunities and challenges for therapeutic development, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 81 (2017). doi:10.1128/MMBR.00053-16.
- 152.Y.-F. Lin, P.-C. Su, P.-T. Chen, Production and characterization of a recombinant thermophilic trehalose synthase from *Thermus antranikianii*, *J. Biosci. Bioeng.* 129 (2020) 418. doi:10.1016/j.biosc.2019.10.009.
- 153.L. Mestrom, S. R. Marsden, H. van der Eijk, J. U. Laustsen, C. M. Jeffries, D. I. Svergun, P.-L. Hagedorn, I. Bento, U. Hanefeld, Anomeric delectivity of Trehalose Transferase with rare L Sugars, *ACS Catal.* 10 (2020) 8835. doi:10.1021/acscatal.0c02117.
- 154.A. Pisvejcova, C. Rossi, L. Husakova, V. Kren, S. Riva, D. Monti, β -1,4-galactosyltransferase-catalyzed glycosylation of sugar derivatives: Modulation of the enzyme activity by α -lactalbumin, immobilization and solvent tolerance, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 39 (2006) 98. doi:10.1016/j.molcatb.2006.01.013.
- 155.H. Orrego, L. Trobo-Maseda, J. Rocha-Martin, J. M. Guisan, Immobilization-stabilization of a complex multimeric sucrose synthase from *Nitrosomonas europaea*. Synthesis of UDP-glucose. *Enzyme Microb. Technol.* 105 (2017) 51. doi:10.1016/j.enzmictec.2017.06.008.

- 156.L. Trobo-Maseda, A. H. Orrego, S. Moreno-Perez, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, J. Rocha-Martin, Stabilization of multimeric sucrose synthase from *Acidithiobacillus caldus* via immobilization and post-immobilization techniques for synthesis of UDP-glucose, *Appl. Microbiol. Biotech.* 120 (2018) 773. doi:10.1007/s00253-017-8649-y.
- 157.L. Mestrom, S. R. Marsden, D. G. G. McMillan, R. Schoevaart, P.-L. Hagedoorn, U. Hanefeld, Comparison of enzymes immobilised on Immobeads and Inclusion Bodies: A case study of a Trehalose Transferase, *ChemCatChem* 12 (2020) 3249-3256. doi:10.1002/cctc.202000241.
- 158.L. Trobo-Maseda, A.H. Orrego, J.M. Guisan, J. Rocha-Martin, Coimmobilization and colocalization of a glycosyltransferase and a sucrose synthase greatly improves the recycling of UDP-glucose: Glycosylation of resveratrol 3-o- β -D-glucoside, *Int. J. Biol. Mol.* 157 (2020) 510. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.120.
- 159.H. Liu, G. Tegl, B. Nidetzky, Glycosyltransferase co-immobilization for natural product glycosylation: cascade biosynthesis of the C-glucoside nothofagin with efficient reuse of enzymes, *Adv. Synth. Catal.* 363 (2021) 2157-2169. doi:10.1002/adsc.202001549.
- 160.H. Liu, B. Nidetzky, Leloir glycosyltransferases enabled to flow synthesis: Continuous production of the natural C-glycoside nothofagin, *Biotechnol. Bioeng.* 118 (2021) 4402. doi:10.1002/bit.27908.
- 161.Z. Liu, J. Zhang, X. Chen, P.G. Wang, Combined biosynthetic pathway for de novo production of UDP-Galactose: catalysis with multiple enzymes immobilized on agarose beads, *ChemBioChem.* 3 (2002) 348. doi:10.1002/1439-7633(20020402)3:4<348::AID-CBIC348>3.0.CO;2-K.
- 162.F. Carly, A. Steels, S. Telek, M. Vandermies, J.-M. Micaud, P. Fickers, Identification and characterization of EYD1, encoding an erythritol dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* and its application to bioconvert erythritol into erythrulose, *Bioresour. Technol.* 247 (2018) 963. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.168.
- 163.L. Pan, Y.-K. Fang, P. Zhou, K.-Q. Jin, G. Wang, Y.-P. Liu, Strategy of oxygen transfer coefficient control on the L-erythrulose fermentation by newly isolated *Gluconobacter kondonii*, *Electron. J. Biotechnol.* 24 (2016) 26. doi:10.1016/j.ejbt.2016.08.006.
- 164.J. Abdoul – Zabar, I. Sorel, V. Helaine, F. Charmantray, T. Devamani, D. Yi, V. de Berardinis, D. Louis, P. Marilere, W.-D. Fessner, L. Hecquet, Thermostable transketolase from *Geobacillus starothermophilus*: characterization and catalytic properties, *Adv. Synth. Catal.* 2013 (355) 116. doi:10.1002/adsc.201200590.
- 165.N. Ocal, M. L'enfant, F. Charmantray, L. Pollegioni, J. Martin, P. Auffray, J. Collin, L. Hecquet, D-serine as a key building block: Enzymatic process development and smart applications within the cascade enzymatic concept, *Org. Proces. Res. Dev.* 24 (2020) 769. doi:10.1021/acs.oprd.0c00024.
- 166.M. Lorillere, M. De Sousa, F. Bruna, E. Heuson, T. Gefflaut, V. de Berardinis, T. Saravanan, D. Yi, W.-D. Fessner, F. Charmantray, L. Hecquet, One-pot, two-step cascade synthesis of naturally rare l-erythro (3S,4S) ketoses by coupling a thermostable transaminase and transketolase, *Green Chem.* 19 (2017) 425. doi:10.1039/C6GC02015A.
- 167.<https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/aldrich/54913> [dostęp 12.03.2022 r.]
- 168.M. L'enfant, D. Bruna, M. Lorillere, N. Ocal, W.-D. Fessner, L. Pollegioni, F. Charmantray, L. Hecquet, One-pot cascade synthesis of (3S)-hydroxyketones catalyzed by transketolase via hydroxypyruvate generated in situ from D-serine by D-amino acid oxidase, *Adv. Synth. Catal.* 2019 (361) 2550. doi:10.1002/adsc.201900109.
- 169.I. Kuan, R. Liao, H. Hsieh, K. Chen, C. Yu, Properties of *Rhodotorula gracilis* D-Amino Acid Oxidase immobilized on magnetic beads through His-Tag, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 110. doi:10.1263/jbb.105.110.
- 170.M. Wang, W. Qi, H. Xu, H. Yu, S. Zhang, Z. Shen, Affinity-binding immobilization of D-amino acid oxidase on mesoporous silica by a silica-specific peptide, *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 46 (2019) 1461. doi:10.1007/s10295-019-02210-5.
- 171.P. T. Dang, H. G. Le, V. T. Hoang, H. T. H. Tran, C. D. Dao, K. T. Nguyen, G. H. Le, Q. K. Nguyen, T. V. Nguyen, T. A. Vu, Immobilization of D-amino acid oxidase enzyme on hybrid mesoporous MCF, SBA-15 and MCM-41 nanomaterials, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (2017) 947. doi:10.1166/jnn.2017.17632.

- 172.R. Li, J. Sun, Y. Fu, K. Du, M. Cai, P. Ji, W. Feng, Immobilization of genetically-modified D-amino acid oxidase and catalase on carbon nanotubes to improve the catalytic efficiency, *Catalysts* 6 (2016) 66. doi:10.3390/catal6050066.
- 173.R. Fernandez-Lafuente, V. Rodriguez, J. M. Guisan, The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into α -keto acids (phenylpyruvic acid), *Enzyme Microb. Technol.* 23 (1998) 28. doi:10.1016/S0141-0229(98)00028-3.
- 174.S. Matosevic, G. J. Lye, F. Baganz, Design and characterization of a prototype enzyme microreactor: quantification of immobilized Transketolase kinetics, *Biotechnol. Prog.* 26 (2010) 118. doi:10.1002/btpr.319.
- 175.A. A. Halim, N. Szita, F. Baganz, Characterization and multi-step transketolase--transaminase bioconversions in an immobilized enzyme microreactor (IEMR) with packed tube, *J. Biotechnol.* 168 (2013) 567. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.09.001.
- 176.K. Benaissi, V. Helaine, V. Prevot, C. Forano, L. Hecquet, Efficient immobilization of yeast Transketolase on layered double hydroxides and application for ketose synthesis, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 1497. doi:10.1002/adsc.201000925.
- 177.N. Touisni, F. Charmantray, V. Helaine, C. Forano, L. Hecquet, C. Mousty, Optimized immobilization of transketolase from *E. coli* in MgAl-layered double hydroxides, *Colloids Surf. B* 112 (2013) 452. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.07.023.
- 178.K. Szymańska, W. Pudło, J. Mrowiec-Białoń, A. Czardybon, J. Kocurek, A. B. Jarzębski, Immobilization of invertase on silica monoliths with hierarchical pore structure to obtain continuous flow enzymatic microreactors of high performance, *Micropor. Mesopor. Mat.* 170 (2013) 75. doi:10.1016/j.micromeso.2012.11.037.
- 179.D. Kowalczykiewicz, K. Szymańska, D. Gillner, A. B. Jarzębski, Rotating bed reactor packed with heterofunctional structured silica-supported lipase. Developing an effective system for the organic solvent and aqueous phase reactions, *Micropor. Mesopor. Mat.* 312 (2021) 110789. doi:10.1016/j.micromeso.2020.110789.
- 180.O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry.* 193 (1951) 265.
- 181.H. Gustafsson, C. Thorn, K. Holmberg, A comparison of lipase and trypsin encapsulated in mesoporous materials with varying pore sizes and pH conditions, *Colloid Surface B.* 87 (2011) 464. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.06.012.
- 182.D. Kowalczykiewicz, M. Przypis, L. Mestrom, A. Kumpf, D. Tischler, P.-L. Hagedoorn, U. Hanefeld, A. Jarzębski, K. Szymańska, Engineering of continuous bienzymatic cascade process using monolithic microreactors – In flow synthesis of trehalose, *Chemical Engineering Journal*, 427 (2022) 131439. doi:10.1016/j.cej.2021.131439.
- 183.A.-M. Putz, L. Almasy, A. Len, C. Ianasi, Functionalized silica materials synthesized via co-condensation and post-grafting methods, *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures* 27 (2019) 323. doi:10.1080/1536383X.2019.1593154.
- 184.J. Ościk, *Adsorpcja*, Wydanie II, PWN, Warszawa 1979
- 185.S. Y. Lee, J. Soo Kim, S. H. Lim, S. H. Jang, D. H. Kim, N.H. Park, J. W. Jung, J. Choi, The investigation of the silica-reinforced rubber polymers with the methoxy type silane coupling agents, *Polymers* 12 (2020) 3058. doi:10.3390/polym12123058.
- 186.T. Karbowski, M. A. Saada, S. Rigolet, A. Ballandras, G. Weber, I. Bezverkhyy, M. Soulard, J. Patarin J. P. Bellat, New insights in the formation of silanol defects in silicalite-1 by water intrusion under high pressure, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 11454. doi:10.1039/c000931h.
- 187.H. Dai, S. Ou, Z. Liu, H. Huang, Pineapple peel carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol/mesoporous silica SBA-15 hydrogel composites for papain immobilization, *Carbohydrate Polymers.* 169 (2017) 504. doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.057.
- 188.B. Zou, C. Song, X. Xu, J. Xia, S. Huo, F. Cui, Enhancing stabilities of lipase by enzyme aggregate coating immobilized onto ionic liquid modified mesoporous materials, *Appl. Surf. Sci.* 311 (2014) 62. Doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.210.

- 189.M. Salvi, G. D. Yadaw, Surface functionalization of SBA for immobilization of lipase and its application in synthesis of alkyl levulinates: Optimization and kinetics, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 18 (2019) 101038. doi:10.1016/j.bcab.2019.101038.
- 190.E. P. F. Nhavene, G. F. Andrade, J. A. Q. S. G Faria, D. A. Gomes, E. M. B de Sousa, Biodegradable polymers grafted onto multifunctional mesoporous silica nanoparticles for gene delivery, *ChemEng.* 2 (2018) 24. doi:10.3390/chemengineering2020024.
- 191.H. Huang, C. Yang, H. Zhang, M. Liu, Preparation and characterization of octyl and octadecyl-modified mesoporous SBA-15 silica molecular sieves for adsorption of dimethyl phthalate and diethyl phthalate, *Micropor. Mesopor. Mat.* 111 (2008) 254. doi:10.1016/j.micromeso.2007.07.038.
- 192.A. Wach, P. Natkański, M. Drozdek, B. Dudek, P. Kuśtrowski, Functionalization of mesoporous SBA-15 silica by grafting of polyvinylamine on epoxy-modified surface, *Polimery* 62 (2017) 516. doi:10.14314/polimery.2017.516.
- 193.R. R. de Melo, R. C. Alnoch, A. F. L Vilela, E. M. de Souza, N. Krieger, R. Ruller, H. H Sato, C. Mateo, New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: A tool for enzyme immobilization at neutral pH, *Molecules* 22 (2017) 1088. doi:10.3390/molecules2201088.
- 194.I. Serra, I. Benucci, M. S. Robescu, C. Lombardelli, M. Esti, C. Calvio, M. Pregolato, M. Terreni, T. Bavaro, Developing a novel enzyme immobilization process by activation of epoxy carriers with glucosamine for pharmaceutical and food applications, *Catalysts* 9 (2019) 843. doi:10.3390.catal9100843.
- 195.W. Shuai, R. K. Das, M. Naghdi, S. K. Brar, M. Verma, A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64 (2017) 496. doi:10.1002/bab.1515.
- 196.M. Przepis, K. Matuszek, A. Chrobok, M. Swadźba-Kwaśny, D. Gillner, Inexpensive and tuneable protic ionic liquids based on sulfuric acid for the biphasic synthesis of alkyl levulinates, *J. Mol. Liq.* 308 (2020) 113166. doi:10.1016/j.molliq.2020.113166.
- 197.K. C. Badgujar, V. C. Badgujar, B. M. Bhanage, A review on catalytic synthesis of energy rich fuel additive levulinate compounds from biomass derived levulinic acid, *Fuel Process. Technol.* 197 (2020) 106213. doi:10.1016/j.fuproc.2019.106213.
- 198.A. Kumar, K. Dhar, S. S. Kanwar, P. K. Arora, Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications, *Biol. Proced. Online* 18 (2016) 2. doi:10.1186/s12575-016-0033-2.
- 199.L. Mestrom, S. R. Marsden, M. Dieters, P. Achterberg, L. Stolk, I. Bento, U. Hanefeld, P.-L. Hagedoorn, Artificial fusion of mCherry enhances Trehalose Transferase solubility and stability, *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (2019) . doi:10.1128/AEM.03084-18.
- 200.S. Z. Mazlan, S. A. Hanifah, Effects of temperature and pH on immobilized laccase activity in conjugated methacrylate-acrylate microspheres, *Int. J. Pol. Sci.* (2017) Article ID: 5657271 1-8. doi:10.1155/2017/5657271.
- 201.C. Mateo, R. Torres, G. Fernandez-Lorent, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. Lopez-Gallego, O. Abian, J. M. Palomo, L. Betancor, B. C. C. Pessela, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method, *Biomacromolecules* 4 (2003) 772-777. doi:10.1021/bm0257661
- 202.X. Fei, S. Chen, D. Liu, C. Huang, Y. Zhang, Comparison of amino and epoxy functionalized SBA-15 used for carbonic anhydrase immobilization, *J. Biosci. Bioeng.* 122 (2016) 314. doi:10.1016/j.jbiosc.2016.02.004.
- 203.P. Bonomi, T. Bavaro, I. Serra, A. Tagliani, M. Terreni, D. Ubiali, Modulation of the microenvironment surrounding the active site of Penicillin G Acylase immobilized on acrylic carriers improves the enzymatic synthesis of cephalosporins, *Molecules* 18 (2013) 14349. doi:10.3390/molecules181114349.
- 204.G. Peng, C. Zhao, B. Liu, F. Ye, J. Jiang, Immobilized trypsin onto chitosan modified monodisperse microspheres: A different way for improving carrier's surface biocompatibility, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 5543. doi:10.1016/j.aosusc.2021.01.071.
- 205.C. Daglioglu, F. Zihnioglu, Covalent immobilization of trypsin on glutaraldehyde-activated silica for protein fragmentation, *Artif. Cells Blood Substit. Immob. Biotechnol.* 40 (2012) 387. doi:10.3109/10731199.2012.686917.

- 206.M. Gahlout, D. M. Rudakiya, S. Gupte, A. Gupte, Laccase-conjugated amino-functionalized nanosilica for efficient degradation of Reactive Violet 1 dye, *Int. Nano Lett.* 7 (2017) 195. doi:10.1007/s40089-017-0215-1.
- 207.L. F. Bracco, G. J. Levin, N. Urtasun, A. A. N. del Canizo, F. J. Wolman, M. V. Miranda, O. Cascone, Covalent immobilization of soybean seed hull urease on chitosan minispheres and the impact on their properties, *Biocat. Agricult. Biotech.* 18 (2019) 101093. doi:10.101/j.bcab.2019.101093.
- 208.M. Bolivar, B. Nidetzky, The Microenvironment in Immobilized Enzymes: Methods of characterization and its role in determining enzyme performance, *Molecules* 24 (2019) 3460. doi:10.3390/molecules24193460.
- 209.U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszńska, Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-Application to Oxidoreductases, *Molecules* 19 (2014) 8995. doi:10.3390/molecules19078995.
- 210.S. Segers, A. Jozef, Traffic jam at the bacterial sec translocase: Targeting the SecA nanomotor by small-molecule inhibitors, *Chem. Biol.* 18 (2011) 685-689. doi:10.1016/j.chembiol.2011.04.007.
- 211.L. Cabrol, M. Quemeneur, B. Misson, Inhibitory effects of sodium azide on microbial growth in experimental resuspension of marine sediment, *J. Microbiol. Meth.* 133 (2017) 62. doi:10.1016/j.imiet.2016.12.021.
- 212.S. Buto, L. Pollegioni, L. D. Angiuro, M. S. Pilone, Evaluation of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* for the production of alpha-keto acids: a reactor system, *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 1288. doi:10.1002/bit.260441104.
- 213.K. Szymańska, D. Kowalczykiewicz, D. Stradomska, J. Thullie, Reaktor heterogeniczny, zgłoszenie patentowe P.435044 z dn. 21.08.2020
- 214.L. Groth, Heat and pH dependence of catalase. A comparative study, *Acta Biol. Hung.* 38 (1987) 279.
- 215.Ö. Alptekin, S. Seyhan Tukul, D. Yildirim, Immobilization and characterization of bovine liver catalase on eggshell, *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (2008) 609. doi:10.2298/JSC0806609A.
- 216.Y. I. Dogac, M. Teke, Immobilization of bovine catalase onto magnetic nanoparticles, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 43 (2013) 750. doi:10.1080/10826068.2013.773340.
- 217.T. Itoh, R. Ishii, S. Matsuura, S. Hamakawa, T. Hanaoka, T. Tsunoda, J. Mizuguchi, F. Mizukami, Catalase encapsulated in mesoporous silica and its performance, *Biochem. Eng. J.* 44 (2009) 167. doi:10.1016/j.bej.2008.11.015.
- 218.G. Gorenek, E. Akyilmaz, E. Dinckaya, Immobilization of catalase by entrapping in alginate beads and catalase biosensor preparation for the determination of hydrogen peroxide decomposition, *Artif. Cell. Blood Sub. Biotech.* 32 (2004) 453. doi:10.1081/BIO-200027518.
- 219.H.-J. Federsel, T. S. Moody, S. J. C. Taylor, Recent trends in enzyme immobilization—concepts for expanding the biocatalysis toolbox, *Molecules* 26 (2021) 2822. doi:10.3390/molecules26092822.