

**POLITECHNIKA ŚLASKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROJEKTOWANIA PROCESOWEGO**

AUTOREFERAT

**KATALIZATORY I WIELOKANAŁOWE MIKORAEKTORY ENZYMATYCZNE
OPARTE NA NOŚNIKACH KRZEMIONKOWYCH, SZCZEGÓLNIE
MONOLITACH O HIERARCHICZNEJ STRUKTURZE PORÓW –
OTRZYMYWANIE, WŁAŚCIWOŚCI, STOSOWANIE**

Dr inż. Katarzyna Szymańska

Gliwice, 2017

1. Imię i Nazwisko: *Katarzyna Szymańska*

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 2009** Uzyskanie stopnia doktora nauk technicznych, w zakresie dyscypliny inżynieria chemiczna, na podstawie pracy „Otrzymywanie efektywnych biokatalizatorów enzymatycznych opartych na mezostrukturalnych krzemionkowych piankach komórkowych i ich procesowe wykorzystanie” - rozprawa została wyróżniona
Promotor: prof. dr hab. inż. Andrzej Jarzębski, Wydział Chemiczny Politechnika Śląska w Gliwicach
- 2003 – 2005** Studia Podyplomowe, Wydział Matematyczno-Fizyczny Politechniki Śląskiej „Nauczanie matematyki w szkołach”
Temat pracy: „Rachunek zbiorów, rachunek zdań i rachunek zdarzeń”
Promotor: dr inż. Halina Jądro
- 2001 – 2003** Fakultatywne Studium Pedagogiczne przy Politechnice Śląskiej
- 1998 – 2003** Politechnika Śląska Wydział Chemiczny
Kierunek – Inżynieria Chemiczna i Procesowa
Specjalność - Inżynieria Chemiczna i Procesowa
Temat pracy: „Synteza i badania strukturalne nanoporowatych materiałów tlenkowych nowej generacji”
Promotor: prof. dr hab. inż. Andrzej Jarzębski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2009- nadal adiunkt – Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny
2008 – 2009 asystent – Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny

Stáže:

2016 MSSI, University of Limerick – staż naukowy (1 miesiąc)

2015 Instytut Biochemii, TU Bergakademie Freiberg – staż naukowy (1 tydzień)

2013 Instytut Biochemii, TU Bergakademie Freiberg – staż naukowy (1 tydzień)

2011 MSSI, University of Limerick – staż naukowy (3 miesiące)

2006 Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej – staż naukowy (3 miesiące)

2003 Instytut Inżynierii Chemicznej PAN Gliwice – praca na umowę zlecenie (3 miesiące)

2002 Paroc Trzemeszno sp. z o.o. Trzemeszno – obóz naukowy (3 tygodnie)

2001 Instytut Inżynierii Chemicznej PAN Gliwice - praktyka studencka (3 tygodnie)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz

4a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Katalizatory i wielokanałowe mikroraektory enzymatyczne oparte na nośnikach krzemionkowych, szczególnie monolitach o hierarchicznej strukturze porów – otrzymywanie, właściwości, stosowanie

4b) Wykaz prac (publikacji) wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

[H1] M. Oelschlägel, A. Riedel, A. Zniszczoł, **K. Szymańska**, A. B. Jarzębski, M. Schlömann, D. Tischler, *Immobilization of an integral membrane protein for biotechnological phenylacetaldehyde production*, Journal of Biotechnology 174 (2014) 7-13.

[H2] **K. Szymańska**, M. Pietrowska, J. Kocurek, K. Maresz, A. Koreniuk, J. Mrowiec-Białoń, P. Widłak, E. Magner, A. B. Jarzębski, *Low back-pressure hierarchically structured multichannel microfluidic bioreactors for rapid protein digestion – Proof of concept*, Chemical Engineering Journal 287 (2016) 148–154.

[H3] **K. Szymańska**, K. Odrozek, A. Zniszczoł, G. Torrelo, V. Resch, U. Hanefeld, A. B. Jarzębski, *MsAcT in siliceous monolithic microreactorenables quantitative ester synthesis in water*, Catalysis Science & Technology 6 (2016) 4882–4888.

[H4] A. Drożdż, A. Chrobok, S. Baj, **K. Szymańska**, J. Mrowiec-Białoń, A. B. Jarzębski, *The chemo-enzymatic Baeyer–Villiger oxidation of cyclic ketones with an efficient silica-supported lipase as a biocatalyst*, Applied Catalysis A: General 467 (2013) 163-170.

[H5] J. Bryjak, **K. Szymańska**, A.B. Jarzebski, *Laccase immobilisation on mesostructured silicas*, Chemical and Process Engineering 33(4) (2012) 611-620.

[H6] **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*, Microporous and Mesoporous Materials 170 (2013) 75-82.

[H7] K. Zielińska, **K. Szymańska**, A. B. Jarzębski, R. Mazurkiewicz, *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: Asymmetry 28 (2017) 146-152.

[H8] **K. Szymańska**, K. Odrozek, A. Zniszczoł, W. Pudło, A. B. Jarzębski, *A novel hierarchically structured siliceous packing to boost the performance of rotating bed enzymatic reactors*, Chemical Engineering Journal 315 (2017) 18-24.

4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

I. WPROWADZENIE

W 1998 r. rozpoczęłam pięcioletnie studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej na kierunku Inżynieria Chemiczna i Procesowa. W 2003 r. obroniłam z wyróżnieniem pracę magisterską, zatytułowaną „Synteza i badania strukturalne nanoporowatych materiałów tlenkowych nowej generacji”, wykonaną pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Jarzębskiego i uzyskałam tytuł zawodowy magistra inżyniera. W ramach studiów, oprócz obowiązkowych praktyk studenckich, uczestniczyłam w obozie naukowym organizowanym przez Paroc Trzemeszno sp. z o.o., gdzie odpowiadałam za analizę pobranych próbek i częściową interpretację otrzymanych wyników. W 2003 r. przez okres trzech miesięcy pracowałam w ramach umowy zlecenia w Instytucie Inżynierii Chemicznej PAN, uczestnicząc w realizacji projektu badawczego KBN. Przygotowując się do podjęcia pracy dydaktycznej na uczelni, ukończyłam dwuletnie Fakultatywne Studium Pedagogiczne na Politechnice Śląskiej (2003 r.) oraz półtoraroczne studia podyplomowe na Wydziale Matematyczno-Fizycznym Politechniki Śląskiej (2005 r.).

W grudniu 2003 r. rozpoczęłam studia doktoranckie w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej. Równocześnie, pod kierunkiem prof. Jarzębskiego, prowadziłam badania naukowe, których zwieńczeniem była rozprawa doktorska pt. „Otrzymywanie efektywnych biokatalizatorów enzymatycznych opartych na mezostrukturalnych krzemionkowych piankach komórkowych i ich procesowe wykorzystanie”, obroniona z wyróżnieniem, w styczniu 2009 r. W okresie studiów

doktoranckich odbyłam trzymiesięczny staż naukowy na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, w grupie prof. Jolanty Bryjak, uznanej specjalistki w zakresie unieruchamiania enzymów. W trakcie pobytu pogłębiłam swoją wiedzę z zakresu technik immobilizacji i charakterystyki preparatów enzymatycznych. Współpraca zaowocowała wieloma publikacjami [1-3], a uzyskane wyniki częściowo przedstawiłam w rozprawie doktorskiej.

Badania przeprowadzone przeze mnie w tym okresie miały na celu wykazanie zalet i dużego potencjału aplikacyjnego mezoporowatych krzemionek, zwłaszcza mezoporowatych pianek komórkowych (MCF) i sit molekularnych typu SBA-15, jako nośników do immobilizacji enzymów (inwertaza, glukoamylaza, tripsyna). Materiałem referencyjnym stosowanym w badaniach były komercyjne żele krzemionkowe. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że wielkość i objętość/ilość porów, a w konsekwencji także powierzchnia właściwa materiału, decydują o aktywności otrzymanego biokatalizatora. Katalizatory oparte na matrycach typu MCF i SBA-15, charakteryzujących się porami o średnicach 23 - 26 nm (MCF) i 6 - 8 nm (SBA-15) oraz powierzchnią właściwą powyżej 500 m²/g, cechowała znacznie większa aktywność niż katalizatory, w których nośnikami enzymów były komercyjne żele krzemionkowe, posiadające pory o średnicach poniżej 5 nm i porównywalną powierzchnię właściwą. Stwierdzono ponadto istotny wpływ wielkości ziaren nośnika na obserwowaną szybkość reakcji. Ziarna większości typowych żeli krzemionkowych mieszczą się w zakresie wielkości 0,1 – 0,5 mm, podczas gdy wielkość ziaren syntetyzowanych nośników krzemionkowych nie przekracza 50 µm. Zmniejszenie wielkości cząstek nośników skutkuje zwiększeniem dostępnej powierzchni i skróceniem drogi dyfuzji wewnętrznej, co w konsekwencji poprawia dostępność osadzonego enzymu dla cząsteczek substratu i pozytywnie wpływa na aktywność biokatalizatorów. Połączenie wszystkich tych cech, tj. małej wielkości ziarna, dużej powierzchni właściwej oraz dużej średnicy porów sprawiło, że mezoporowate nośniki krzemionkowe typu MCF i SBA-15 okazały się bardzo atrakcyjnymi nośnikami do immobilizacji enzymów [1-3].

Przeprowadzone badania wykazały także znaczący wpływ charakteru chemicznego powierzchni nośnika. Nośniki syntetyzowane z dodatkiem niewielkiej ilości NH₄F wykazały się większą efektywnością w kowalencyjnym wiązaniu inwertazy, co prowadziło do otrzymania katalizatorów o większej aktywności katalitycznej od ich odpowiedników, otrzymanych z wykorzystaniem nośników, o podobnej strukturze porowatej, ale syntetyzowanych bez udziału NH₄F. Różnice w aktywności wynikały prawdopodobnie z obecności grup Si-F na powierzchni nośnika; hipoteza ta jest jednak bardzo trudna

do udowodnienia. Badania biokatalizatorów przeprowadzone z wykorzystaniem nośników typu MCF wykazały, że ich aktywność warunkowana jest przede wszystkim obecnością grup funkcyjnych, ich rodzajem i gęstością. Stwierdzono, że nośniki zmodyfikowane grupami aminowymi, aktywowanymi aldehydem glutarowym, wiązały więcej białka, a otrzymane katalizatory charakteryzowała lepsza aktywność właściwa, niż ich odpowiedniki, w których proteiny związane były z powierzchnią nośnika bezpośrednio za pomocą grup epoksydowych. Wprowadzenie łącznika (aldehydu glutarowego) chroniło białko przed bezpośrednim kontaktem z powierzchnią nośnika, a zwiększając jego swobodę ruchu stworzyło warunki dla wyższej aktywności. Chemiczne wiązanie z matrycą każdego z badanych enzymów zwiększało dodatkowo ich odporność na negatywny wpływ podwyższonej temperatury. Wykazano, że opracowane biokatalizatory mogą być używane wielokrotnie, co tworzy warunki dla ich praktycznego stosowania.

Opisane wyżej badania poświęcone były zasadniczo kowalencyjnej immobilizacji enzymów, prowadzącej do otrzymania efektywnych biokatalizatorów [4]. Ich porównanie z odpowiednikami, uzyskanymi popularną metodą adsorpcji fizycznej, z następczym sieciowaniem, umożliwiło krytyczne zweryfikowanie dość powszechnego poglądu o „trudnych warunkach” kowalencyjnej metody immobilizacji enzymów, skutkujących niekorzystnym obniżeniem aktywności [5]. Wykazano, że inwertaza wiązana kowalencyjnie charakteryzuje się znacznie lepszą aktywnością niż po fizycznym zaadsorbowaniu na powierzchni matrycy. Zademonstrowano także, że poprzez odpowiedni dobór warunków procesu chemicznego wiązania enzymów z podłożem oraz dobór struktury porowatej nośnika można skutecznie wyeliminować spadek aktywności, a niekiedy nawet uzyskać efekt jej zwiększenia (tzw. hyperaktywności).

W trakcie studiów doktoranckich byłam głównym wykonawcą w grantie promotorskim (N208 007) pt. „Otrzymywanie efektywnych biokatalizatorów enzymatycznych opartych na mezostrukturalnych krzemionkowych piankach komórkowych i ich procesowe wykorzystanie” oraz wykonawcą w grantie (3 T09C 038 28) pt. „Immobilizacja lakazy i tyrozynazy - dobór metod immobilizacji do zastosowań procesowych”. Ponadto dwukrotnie byłam aktywnym uczestnikiem warsztatów organizowanych przez sieć doskonałości INSIDE-PORES [6, 7] w ramach 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej oraz szkoły katalizy EFCATS [8]. Efektem prowadzonych badań było 6 publikacji z listy JCR o łącznym IF 10,13 [1-3, 9-11], a przedstawiona rozprawa doktorska została wyróżniona i uhonorowana nagrodą im. Jana Binkiewicza.

Po ukończeniu studiów doktoranckich kontynuowałam pracę naukowo-dydaktyczną na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej, najpierw na stanowisku asystenta, a od września 2009 r. na stanowisku adiunkta. W tym czasie nawiązałam nowe kontakty naukowe w kraju (dr hab. M. Szalaniec - Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN, Kraków; dr hab. Monika Pietrowska - Instytut Onkologii, Gliwice; dr inż. Karolina Labus – Politechnika Wrocławska) i poza jego granicami (prof. Edmond Magner, dr Urszula Salaj-Kosła - MSSU University of Limerick; prof. Ulf Hanefeld - Technische Universiteit Delft; dr Dirk Tischler - TU Bergakademie Freiberg). Współpraca ta skutkowała odbyciem kilku krótkich zagranicznych staży naukowych (łącznie ok. 4,5 miesiąca) oraz zaproszeniem do aplikacji w dwóch grantach europejskich: FP7-NMP (Nanobiotic Delivered Therapy Against Infectious Diseases) i ERA-NET-IB (Enzymatic sugar coupling), z których pierwszy przeszedł do drugiego etapu oceny, a drugi otrzymał finansowanie. Efektem współpracy są publikacje naukowe w czasopismach z listy JCR [**H1-H3**, 12-15].

Moje prace i osiągnięcia badawcze zostały zauważone i zyskały uznanie - otrzymałam stypendium Ministra dla Młodych Naukowców (2011 - 2013) oraz zespołową Nagrodę Rektora III stopnia za osiągnięcia naukowe (2014 r.).

TEMATYKA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

II. ENZYMATYCZNE BIOKATALIZATORY I MIKROREAKTORY – MOŻLIWOŚCI I ZNACZENIE

Zgodnie z raportem BCC (Business Communications Company) światowy rynek enzymów w 2010 r. szacowany był na 3,3 miliarda USD („billions of USD” w oryginale) i przewidywano jego wzrost do 4,4 miliarda USD w 2015 r. [16]. Tak wielkie zainteresowanie enzymami wynika głównie z ich selektywności, która pozwala na pracę nawet ze złożonymi cząsteczkami/substratami bez konieczności zabezpieczania grup funkcyjnych. Zmniejsza to ilość etapów syntezy, co redukuje zapotrzebowanie na dodatkowe chemikalia i skraca jej czas. Ponadto reakcje enzymatyczne prowadzone są w łagodnych warunkach (pH, temperatura), w zakresie ciśnień atmosferycznych, najczęściej z wykorzystaniem wodnych rozpuszczalników [17-19]. Z tego względu procesy z wykorzystaniem enzymów bardzo często określane są terminem „white biotechnology”, podkreślając w ten sposób ich pozytywny wpływ na środowisko [16]. Enzymy są z powodzeniem wykorzystywane

w takich gałęziach przemysłu, jak synteza farmaceutyków i tzw. *fine chemicals*, stosowane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, papierniczym, skórzanym, produkcji biopaliw, analizie chemicznej i biologicznej [20-24]. Szacuje się, że szczególnie w przemyśle spożywczym, produkcji *fine chemicals* i farmaceutyków - stosowanie enzymów będzie miało coraz większe znaczenie [18]. Zatem przejście od traktowania enzymów jak cząsteczek o właściwościach katalitycznych do możliwości ich rzeczywistego zastosowania w przemyśle jest wyjściem naprzeciw potrzebom naszej cywilizacji. Stosowanie stosunkowo drogich katalizatorów, jakimi są enzymy, wymaga możliwości ich wielokrotnego wykorzystania, stabilności i pełnej funkcjonalności w warunkach reakcji [19, 25]. Jedną z możliwości sprostania tym wymaganiom jest immobilizacja enzymów. Stosowanie unieruchomionych enzymów pozwala na znaczne uproszczenie konstrukcji samego reaktora i kontrolę procesu, np. jego zatrzymanie, poprzez oddzielenie katalizatora od mieszaniny reakcyjnej. Dodatkowo immobilizacja zwiększa stabilność enzymu poprzez wielopunktowe oddziaływanie z powierzchnią nośnika, generuje korzystne mikrośrodowisko, a także chroni przed oddziaływaniami międzycząsteczkowymi [25-28]. Z tych względów immobilizacja enzymu jest zazwyczaj wymagana w zastosowaniach przemysłowych [27, 28]. Pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące unieruchomionych enzymów pochodzą z 1916 r. [29], a początki ich komercyjnego wykorzystania datują się na lata sześćdziesiąte XX wieku [30].

Powszechnie uważa się, że nie ma uniwersalnych technik immobilizacji pozwalających na otrzymanie aktywnego i stabilnego preparatu. Projektując metodę unieruchamiania, należy rozpatrzyć wiele czynników, w tym [25, 28, 31]:

- oddziaływania: enzym – substrat/produkt, enzym – nośnik, substrat/produkt – nośnik;
- odporność nośnika na warunki reakcji (rozpuszczalnik, temperatura, pH, itp.);
- stosowany typ reaktora: reaktor zbiornikowy z mieszaniem, reaktor membranowy, reaktor ze złożem upakowanym, reaktor barbotażowy.

Biorąc powyższe pod rozwagę, atrakcyjnymi nośnikami enzymów wydają się być porowate materiały krzemionkowe: są nietoksyczne, posiadają dużą odporność termiczną i mechaniczną, są odporne na biodegradację, nie ulegają zmianie pod wpływem rozpuszczalników organicznych. Opanowano także proste metody modyfikacji ich powierzchni różnymi grupami funkcyjnymi [32, 33]. Zainteresowanie budzą klasyczne żele krzemionkowe, a w ostatniej dekadzie szczególnie mezoporowate materiały o uporządkowanej strukturze, otrzymywane metodą zol-żelową z wykorzystaniem tzw. szablonów (ang. templates), których pierwszą generację opracowano w latach

dziewięćdziesiątych XX wieku. Do grona tych ostatnich zaliczamy mezoporowate pianki komórkowe (MCF) oraz mezoporowate sita typu SBA-15. Z punktu widzenia rozwiązań przemysłowych oprócz charakteru chemicznego powierzchni nośnika bardzo ważne są jego granulacja oraz struktura porów. Wpływają one na wielkość powierzchni dostępnej dla enzymu i wewnętrzne opory dyfuzyjnego transportu masy do/od jego centrum aktywnego [25]. Większość nośników wykorzystywanych do immobilizacji to proszki/granulaty, zwykle stosowane w reaktorach mieszalnikowych. Ich wadą jest jednak stopniowe rozdrabnianie w trakcie procesu, co negatywnie zmienia ich właściwości i utrudnia separację. Ponadto, ze względu na konieczność zapewnienia intensywnego transportu masy w zawieszynie, ilość heterogenicznego katalizatora jest ograniczona, co wprost przekłada się na wydajność procesu. Dodatkowo w rozwiązaniach zbiornikowych pojawiają się problemy przenoszenia skali, związane z wymianą ciepła i masy oraz mieszaniem. Rozwiązaniem, które pozwala zredukować te niedogodności, są reaktory przepływowe o małej objętości (mikroreaktory) [34-36]. Problemy związane z przenoszeniem skali w przypadku zastosowania mikroreaktorów są rozwiązywane poprzez zwielokrotnienie (ang. numbering up) pojedynczego reaktora. Eliminuje to potrzebę przeprojektowywania oraz budowy instalacji pilotażowej. W stosowanych mikroreaktorach wielkość średnic kanałów wynosi zazwyczaj 0,1 – 0,5 mm, co powoduje znaczne skrócenie czasu mieszania oraz intensyfikuje wymianę ciepła i masy. Z powodu małej objętości reaktora i rozmiarów średnic kanałów znacznemu zwiększeniu ulega stosunek powierzchni aktywnej reaktora do objętości mieszaniny reakcyjnej, co przekłada się na wzrost objętościowej wydajności i obniża koszty inwestycyjne. Ponadto niewielka objętość reakcyjna sprzyja redukcji ryzyka eksploatacyjnego, szczególnie w przypadku reakcji egzotermicznych lub z użyciem substancji niebezpiecznych [34-39]. Obecnie istnieje kilka rozwiązań szczegółowych mikroreaktorów:

- mikroreaktory typu „lab-on-the-chip” - najczęściej jest to wydrążona w płytce sieć kanałów o średnicach wielkości mikrometrycznej, reaktory te są głównie przeznaczone do prowadzenia reakcji homogenicznych i znajdują zastosowanie w analizie chemicznej i medycznej [40, 41];
- mikroreaktory kapilarne – jest to pojedyncza kapilara lub ich pęk, zwykle z bardzo cienką powłoką o właściwościach katalitycznych naniesioną na wewnętrzną powierzchnię ścianek [42];

- mikroreaktory ze złożem upakowanym – w tych rozwiązaniach drobnoziarniste złożo katalizatora wypełnia wnętrze kapilary/rurki, wadą tego rozwiązania są stosunkowo duże opory przepływu [43];
- reaktory strukturalne, rdzeń reaktora tworzy porowaty materiał/monolit o przelotowych porach/kanałach połączonych ze sobą - katalizator jest wówczas unieruchomiony albo na zewnętrznej powierzchni szkieletu monolitu lub (optymalnie) w jego porach, jeśli posiada on dwu/trój-modalną strukturę porowatą [H2, H3].

Zasadniczo nośniki monolityczne dzielimy na organiczne/polimerowe i nieorganiczne/krzemionkowe [44-51]. Te pierwsze cechują się dobrą biokompatybilnością, pH stabilnością, łatwością wprowadzania różnorodnych grup funkcyjnych, jednakże ich ograniczona odporność na rozpuszczalniki organiczne może prowadzić do niekorzystnych zmian w porowatej strukturze, a tym samym zmniejszać ich stabilność mechaniczną i zmieniać charakterystykę [52]. Problem stabilności nieorganicznej struktury krzemionkowej jest praktycznie niezauważalny (*vide supra*), a materiały krzemionkowe otrzymywane metodą zol-żelową oferują dodatkowo bardzo dobrą przepuszczalność, zarówno dla rozpuszczalników organicznych jak i nieorganicznych [47-50]. Ponadto przy zmianie stosunków poszczególnych reagentów i warunków prowadzenia procesu możliwa jest precyzyjna kontrola, w dość szerokim zakresie, parametrów struktury, tj. wielkości makro/mezoporów, powierzchni właściwej, objętości całkowitej porów [H2]. Powyższe zalety sprawiają, że obecnie porowate monolity krzemionkowe wydają się bardzo dobrymi nośnikami enzymów.

III. CEL I ZAKRES BADAŃ OBEJMUJĄCYCH DYSERTACJĘ HABILITACYJNĄ – OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Inspiracją do podjęcia badań, realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej, były liczne doniesienia literaturowe o zaletach, wynikających ze stosowania reaktorów przepływowych o mikrometrycznej objętości przestrzeni wolnej, często określanych w języku angielskim terminem „microfluidic reactors” [34-39]. Prace te skupiają się głównie na reaktorach typu: lab-on-the-chip [40, 41], ze złożem upakowanym [43] czy mikrokapilarach [42]. Badań dotyczących mikroreaktorów ze złożem strukturalnym jest bardzo niewiele. Jednak ich potencjał aplikacyjny w syntezie związków z grupy *fine chemicals* wydaje się szczególnie duży, z uwagi na możliwość realizacji syntezy produktu w skali nawet multikilogramowej,

uznanej za komercyjną dla tej klasy związków. Z tego względu mikroreaktory, stały się obiektem moich zainteresowań.

Celem moich badań naukowych, opisanych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego [H1-H8], było opracowanie nowego rozwiązania mikroreaktora enzymatycznego opartego na monolitach krzemionkowych o hierarchicznej strukturze porów, łącznie z wszystkimi pośrednimi zagadnieniami procesowo-technicznymi, zakładając że powinny go cechować właściwości lepsze/korzystniejsze od znanych rozwiązań mikroreaktorów (bio)katalitycznych. Postanowiłam także opracować strukturalnie podobne, ale wymiarowo mniejsze monolity, do stosowania jako wysoko efektywne wypełnienie (bio)katalityczne reaktora rotacyjnego typu SpinChem®, będącego aktualnie przedmiotem dużego zainteresowania.

Aby możliwe było wykorzystanie monolitów krzemionkowych, jako nośników enzymów, niezbędna jest funkcjonalizacja ich powierzchni, tj. wprowadzenie na nią grup funkcyjnych, odpowiedzialnych za wiązanie enzymów, pamiętając, że o sprawności reaktora decydować będzie ilość i dostępność centrów aktywnych katalitycznie, a więc kwestie związane ze strukturą monolitów i zjawiskami zewnętrznego i wewnętrznego transportu masy/reagentów. Mając na uwadze powyższe zagadnienia, podjęłam badania naukowe w następujących kierunkach:

- funkcjonalizacji porowatych nośników krzemionkowych i przyłączenia enzymów [H1-H5];
- określenia struktury monolitów, zapewniającej efektywną pracę reaktora [H2];
- badanie działania i określenie właściwości przepływowych enzymatycznych mikroreaktorów wielokanałowych o hierarchicznej strukturze [H2, H3, H6, H7];
- intensyfikacja pracy reaktora z wirującym złożem typu SpinChem® - opracowanie efektywnego złoża o hierarchicznej strukturze porów [H8].

IV. MODYFIKACJA POWIERZCHNI NOŚNIKÓW

Efektywne wprowadzenie grup funkcyjnych na powierzchnię nośników krzemionkowych jest niezbędne dla nadania im właściwości katalitycznych [H1-H4, 31, 33, 53]. Powszechnie znane są dwie procedury wprowadzania grup funkcyjnych. Pierwsza z nich to procedura posyntezyowa, zwana też dwustopniową, druga zaś - jednostopniowa (kokondensacja) [54-58]. W procedurze posyntezyowej modyfikacja materiału polega na bezpośrednim przyłączeniu

wytypowanego organosilanu do grup silanolowych zlokalizowanych na powierzchni krzemionki, w obecności zazwyczaj niepolarnego rozpuszczalnika [59]. Metoda jednostopniowa polega na współkondensacji prekursora krzemionki (zazwyczaj tetraalkoksyilanu) z organosilanem, zgodnie z mechanizmem metody zol–żelowej [56, 57]. W moich badaniach skupiłam się na metodzie dwustopniowej głównie ze względu na fakt, że wszelkie dodatki wpływają na proces hydrolizy i kondensacji, a w konsekwencji na stopień uporządkowania struktury nośnika [50, 57]. Dodatkowo metoda jednostopniowa wymaga usunięcia organicznego szablonu, co może być problematyczne [55-57].

Celem moich prac było określenie wpływu rodzaju grup funkcyjnych obecnych na powierzchni nośnika na: (i) sposób wiązania enzymu [H2-H4], (ii) trwałość wiązania [H2], (iii) aktywność przyłączonego enzymu [H1, H4, H5].

Najczęściej do efektywnej i trwałej immobilizacji enzymów wykorzystuje się nośniki z grupami epoksydowymi i aminowymi, głównie ze względu na proste i łagodne warunki prowadzenia procesu unieruchamiania, szczególnie ważne dla zachowania pierwotnej struktury enzymu [60, 61]. Z uwagi na wielość czynników wpływających na proces immobilizacji bardzo trudne jest określenie *a priori*, która z wymienionych grup funkcyjnych jest lepsza. Panuje pogląd, że każdorazowo dla wskazanego enzymu koniecznym jest określenie tych parametrów indywidualnie, co znalazło również potwierdzenie w moich badaniach [H1, 1-3, 53, 62, 63].

Immobilizując lakazę na sfunkcjonalizowanych żelach krzemionkowych stwierdziłam, że znacznie lepszymi matrycami okazały się być żele, zmodyfikowane grupami aminowymi [53]. Zauważyłam istotny wpływ ilości i rodzaju grup aminowych na aktywność otrzymanych katalizatorów. Stosowałam dwa prekursorzy tych grup: 3-aminopropyltrioksyilan i 2-aminoetyl-3-aminopropylmetyldimetyloksyilan; w przypadku pierwszego z prekursorów mamy do czynienia z pierwszorzędową grupą aminową, a w drugim obserwujemy podwójną, pierwszo- i drugorzędową grupę aminową. Stwierdziłam znacznie lepszą aktywność biokatalizatorów opartych na nośnikach z pojedynczą, pierwszorzędową grupą aminową w porównaniu do tych z podwójną grupą aminową. Grupy aminowe wymagają w dalszym etapie aktywacji aldehydem glutarowym i najprawdopodobniej dochodzi wówczas do częściowego usieciowania podwójnych grup aminowych, które straciły zdolność wiązania enzymu. Wykazałam, że niezależnie od rodzaju prekursora grup aminowych, wzrost ilości grup funkcyjnych na powierzchni nośnika z 0,5 mmol/g nośnika do 1 mmol/g nośnika skutkowałam spadkiem aktywności katalizatora.

Dla dokładniejszego określenia optymalnej ilości grup aminowych zsyntetyzowałam nośniki z różnymi ilościami grup funkcyjnych na powierzchni (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 mmol/g nośnika) uzyskując najlepsze wyniki dla biokatalizatora wykorzystującego nośnik o stopniu funkcjonalizacji 0,75 mmol/g nośnika.

Inne zależności zaobserwowałam w przypadku immobilizacji izomerazy styrenowej (SOI), będącej przedmiotem badań zespołu z TU Freiberg [H1]. Katalizatory oparte na krzemionkach z grupami epoksydowymi wykazywały 3-, 4- krotnie wyższą aktywność w porównaniu do nośników sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi. Ponadto mezoporowate krzemionki typu SBA-15, wykorzystywane w tych badaniach, zsyntetyzowałam stosując dwie procedury: z oraz bez dodatku NH_4F . Dodatek fluorku amonu podczas syntezy nośnika nie wpływa na wielkość obecnych w jego strukturze porów. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w innej pracy [H5], gdzie zaobserwowałam jego pozytywny wpływ na aktywność otrzymanego biokatalizatora, w przypadku SOI, katalizatory bazujące na SBA-15, syntetyzowane z wykorzystaniem NH_4F , cechowała mniejsza aktywność niż ich odpowiedniki otrzymywane bez jego udziału, przy czym nie miał znaczenia rodzaj wprowadzonej posyntezy grupy funkcyjnej. Badania wpływu dodatku NH_4F przeprowadziłam również w pracy [H5]. Zsyntetyzowałam cztery nośniki: dwa o wielkościach porów 25 - 27 nm i dwa o porach 6 - 8 nm, przy czym w każdej parze jeden nośnik otrzymywany był z wykorzystaniem NH_4F , a drugi bez. Wszystkie nośniki zostały sfunkcjonalizowane grupami aminowymi, a następnie przyłączono do nich lakazę. W tym przypadku badania wykazały, że wielkość porów ma mniejsze znaczenie niż charakter chemiczny powierzchni. Nośnik o mniejszych porach, modyfikowany NH_4F , związał mniej białka w trakcie kowalencyjnego unieruchamiania, niż nośnik o większych porach, ale syntetyzowany bez dodatków, a pomimo tego ten pierwszy biokatalizator cechował się większą aktywnością. Badania te wykazały, że w przypadku immobilizacji lakazy dodatek NH_4F w trakcie syntezy nośnika, inaczej niż w przypadku unieruchamiania izomerazy styrenowej, miał bardzo pozytywny wpływ na aktywność heterogenicznego katalizatora. W pracy [H5] porównano dwie metody immobilizacji: wiązanie kowalencyjne i adsorpcję fizyczną. Stwierdzono, że katalizatory uzyskane na drodze chemicznego wiązania enzymu wykazywały znacznie większą aktywność od tych uzyskanych na drodze prostej adsorpcji. Biorąc pod uwagę liczne doniesienia o „trudnych” warunkach immobilizacji kowalencyjnej enzymów [4, 5], jest to wynik dość niespodziewany, jednakże już wcześniej przeze mnie obserwowany [10, 11]. Podsumowując osobiste doświadczenia związane z opracowywaniem

biokatalizatorów opartych na nośnikach funkcjonalizowanych grupami aminowymi i epoksydowymi, mogę stwierdzić, że nośniki sfunkcjonalizowane grupami aminowymi częściej prowadziły do otrzymania biokatalizatorów o wyższej aktywności [1, 2].

Obecność grup hydroksylowych (silanolowych) na powierzchni nośników krzemionkowych, nadaje im właściwości hydrofilowe, jednakże możliwa jest częściowa hydrofobizacja powierzchni krzemionek, co wykazałam w pracy [H4]. Hydrofobizację powierzchni osiągnęłam poprzez wprowadzenie grup metylowych, oktylowych i heksadecylowych, posiadających odpowiednio: jeden, osiem i szesnaście węgla w łańcuchu. Badania kąta zwilżalności wykazały wyraźny wzrost hydrofobowości nośnika wraz ze wzrostem długości łańcucha grupy funkcyjnej, wprowadzonej na powierzchnię. Biorąc pod uwagę strukturę stosowanego enzymu - lipazy, a w szczególności obecność hydrofobowego „wieczka” przykrywającego jej centrum aktywne, spodziewano się zmiany położenia/uchylenia „wieczka” pod wpływem oddziaływań z hydrofobowym nośnikiem/substratem, a w konsekwencji wzrostu aktywności ze wzrostem hydrofobowości powierzchni [64, 65]. Wzrost hydrofobowości powierzchni nośnika przełożył się wprawdzie na ilość związanej lipazy, jednakże nie wywarł wpływu na aktywność właściwą osadzonego enzymu. Najprawdopodobniej wynikało to z przeładowania nośnika i agregacji cząsteczek enzymu, co utrudniło dostęp do jego centrum aktywnego. Tym niemniej nawet ten „przeładowany” katalizator, oparty na nośniku zmodyfikowanym grupą heksadecylową, okazał się znacznie bardziej aktywnym od znanego, komercyjnie dostępnego preparatu tej samej lipazy (Novozymu 435) w chemo-enzymatycznej reakcji Baeyera-Villigera. Otrzymane biokatalizatory wykazały się bardzo dobrą stabilnością w kolejnych cyklach reakcyjnych, co jednoznacznie wskazuje na ich duży potencjał [H4].

Istotny wpływ chemicznego charakteru powierzchni nośnika na aktywność immobilizowanej lipazy zaobserwowałam również, prowadząc badania z wykorzystaniem nanorurek węglowych [66, 67].

Wprowadzanie grup funkcyjnych na powierzchnię nośników proszkowych, o ziarnach nie większych od dziesiątych części milimetra, jest stosunkowo proste, ponieważ istnieje możliwość zastosowania mieszania. Trudności natury technicznej pojawiają się przy funkcjonalizacji nośników monolitycznych, stosowanych w ciągłych reaktorach przepływowych, gdyż wirujące mieszadło może zniszczyć strukturę monolitu. Część badaczy rozwiązała ten problem stosując funkcjonalizację w przepływie [48, 50], jednak nie zawsze takie rozwiązanie jest możliwe, z uwagi na wieloetapową funkcjonalizację i ograniczoną

rozpuszczalność niektórych reagentów. Z tego względu w swoich badaniach stosuję rozwiązanie, opracowane przez zespół w którym pracuję [68]. Polega ono na umieszczeniu monolitu na perforowanej przegrodzie oddzielającej mieszadło od monolitu. Ten sposób umożliwia intensywną penetrację struktury monolitu przez reagenty bez obawy o jego mechaniczne uszkodzenie. Opracowana technika wprowadzania grup funkcyjnych sprawdziła się w praktyce laboratoryjnej i została wykorzystana w pracach [H2, H3, H6-H8].

Z oczywistych względów, rodzaj wprowadzanych na powierzchnię nośnika monolitycznego grup funkcyjnych warunkuje stosowane metody immobilizacji. Temat ten podjęłam w pracy [H2], w której matrycę krzemionkową funkcjonalizowałam grupami aminowymi i nitrylowymi. O ile aktywacja aldehydem glutarowym grup aminowych pozwala na kowalencyjne związanie enzymu [1-3], to grupy nitrylowe ułatwiają jego efektywną adsorpcję [69]. Korzystając z odpowiednich organosilanów sfunkcjonalizowałam monolity, a następnie stosując metodę „przepływową” przyłączyłam do ich powierzchni trypsynę. Celem było uzyskanie efektywnych przepływowych mikroreaktorów enzymatycznych do „ciąćcia białek”, które mogłyby być wykorzystane zarówno do otrzymywania bioaktywnych peptydów [70, 71] jak i sekwencjonowania i rozpoznawania białek chorobowych [72]. Przeprowadzone badania wykazały, że grupy aminowe pozwoliły na związanie dwukrotnie mniejszej ilości enzymu w porównaniu do ilości osadzonej na monolitach z grupami nitrylowymi [H2]. Rezultat ten bezpośrednio przełożył się na aktywność mikroreaktorów. Wyższe konwersje substratu otrzymywałam stosując trypsynę osadzoną adsorpcyjnie na monolicie sfunkcjonalizowanym grupami nitrylowymi. Obserwowałam niewielki spadek konwersji wraz ze wzrostem natężenia przepływu substratu przez monolit. Kowalencyjne związanie trypsyny determinowało większe spadki aktywności wraz ze wzrostem natężenia przepływu. Parametrem kluczowym dla zastosowań przemysłowych, jest stabilność proponowanych rozwiązań. W tym celu kolejne testy przeprowadziłam po tygodniu, stwierdzając wyraźny spadek aktywności trypsyny zaadsorbowanej na monolicie z grupami nitrylowymi. Trypsyna kowalencyjnie związana poprzez grupy aminowe nie wykazała żadnych zmian w aktywności zarówno po tygodniu przechowywania, jak i w trakcie dwunastogodzinnego procesu. Przeprowadzone eksperymenty pozwalają wnioskować, że oddziaływania/siły adsorpcyjne pomiędzy cząsteczką białka a powierzchnią sfunkcjonalizowanego nośnika są znacznie słabsze od sił ścinających, generowanych podczas przepływu reagentów przez monolit/reaktor. Skutkuje to wymywaniem enzymu z nośnika, a ostatecznie utratą aktywności reaktora.

Przeprowadzone eksperymenty wyraźnie dokumentują wpływ sił wiązania enzymu na stabilność, a tym samym na możliwości aplikacyjne otrzymanego mikroreaktora.

Biorąc pod rozwagę powyższe informacje postanowiłam porównać efektywność trwałego kowalencyjnego wiązania enzymu z inną, uznawaną za stabilną, techniką immobilizacji – wiązaniem z udziałem metali przejściowych [H3]. Ta nowa technika unieruchomienia białek, pozwala na ukierunkowane (specyficzne) osadzenie enzymu względem nośnika [73]. Polega ona na wytworzeniu specyficznego wiązania (chelatacja) pomiędzy resztami histydynowymi białka/enzymu a metalami przejściowymi (np. nikiel, kobalt). Dla realizacji procesu konieczne są dwa elementy: (i) wprowadzenie do struktury enzymu, metodami inżynierii genetycznej, od 3 do 9 reszt histydynowych, oraz (ii) wprowadzenie na powierzchnię nośnika atomów metali przejściowych [43, 74, 75]. Współczesna inżynieria genetyczna pozwala na wprowadzanie znaczników histydynowych w miejscach łańcucha polipeptydowego oddalonych od miejsca aktywnego enzymu. Takie usytuowanie reszt histydynowych umożliwia zorientowanie enzymu względem nośnika w taki sposób, aby miejsce aktywne było w pełni dostępne dla substratów. Tradycyjna immobilizacja kowalencyjna zaliczana jest do niespecyficzných metod unieruchamiania enzymu, tzn. nie jest możliwe usytuowanie białka wykluczające ograniczanie dostępu do jego centrum aktywnego. Wprowadzanie na powierzchnię krzemionki metali przejściowych jest najczęściej procedurą wieloetapową, a wykorzystywane reagenty mogą mieć ograniczoną rozpuszczalność [H3, 75, 76]. Zastosowanie rozwiązania objętego wnioskiem patentowym [68] umożliwia umieszczenie słabo rozpuszczających się reagentów pod przegrodą oddzielającą funkcjonalizowane monolity od mieszadła magnetycznego. W trakcie procesu są one stopniowo uwalniane i wraz z rozpuszczalnikiem dyfundują do wnętrza monolitów gdzie ulegają związaniu z powierzchnią krzemionki. Po wprowadzeniu niklu i kobaltu, nośniki zmieniły kolor z białego odpowiednio na żółty i niebiesko-szary. Dodatkowo obecność metali została potwierdzona metodą spektrometrii mas ICP, a jednolita barwa przekroju poprzecznego monolitów wskazała na ich równomierne rozłożenie. Według dostępnej mi wiedzy zespół nasz jest pierwszym, który wskazał skuteczny sposób równomierne wprowadzania niklu i kobaltu do wnętrza struktury monolitu, a tym samym efektywną metodę jego funkcjonalizacji [H3]. Wcześniej omówioną metodę wprowadzania kompleksów metali stosowano w odniesieniu do kolumn kapilarnych lub kolumn ze złożem usypanym [43, 76-79].

Potrzeba dopracowania metodyki enzymatycznej aktywacji monolitów krzemionkowych skłoniła mnie do przeprowadzenia analizy porównawczej efektywności przyłączania enzymów poprzez grupy aminowe, z aktywacją aldehydem glutarowym, oraz opisaną wyżej nową metodą specyficznego wiązania enzymu. Zmodyfikowany genetycznie enzym - acylotransferazę katalizującą transestryfikację glikolu neopentyowego, otrzymaliśmy od prof. U. Hanefeldta (TU Delft). Przeprowadzone badania wykazały, że monolity zmodyfikowane grupami aminowymi lub niklem i kobaltem, związały podobne ilości białka i wykazywały niemal identyczną aktywność w badanym procesie estryfikacji [H3]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że nasze doniesienie było pierwszym, znanym nam bezpośrednim porównaniem skuteczności tych dwóch ważnych metod immobilizacji enzymów. Szukając przyczyn braku różnicy wyników przeanalizowałam strukturę enzymu [80, 81]. Stwierdziłam, że aminokwasy otaczające centrum aktywne mają charakter hydrofobowy, podczas gdy wprowadzone domeny histydynowe otoczone są przez aminokwasy o charakterze hydrofilowym. W świetle tego uprawniona wydaje się hipoteza, że ze względu na hydrofilowy charakter powierzchni krzemionki, najprawdopodobniej te same regiony białka zostały zaangażowane w wiązanie enzymu z nośnikiem w obu metodach, stąd bardzo podobny wynik. Warto przypomnieć, że hydrofobowość centrum aktywnego powoduje taką orientację enzymu względem hydrofilowego nośnika, która umożliwi swobodny dostęp substratów. Stąd, z założenia niespecyficzne wiązanie kowalencyjne może w sprzyjających warunkach skutkować rezultatami podobnymi do wysoce specyficznego, ale też skomplikowanego wiązania enzymu z udziałem metali przejściowych. Poczynione obserwacje, eksponują kapitalne znaczenie wstępnej analizy struktury enzymu przed podjęciem decyzji odnośnie wyboru metody immobilizacji.

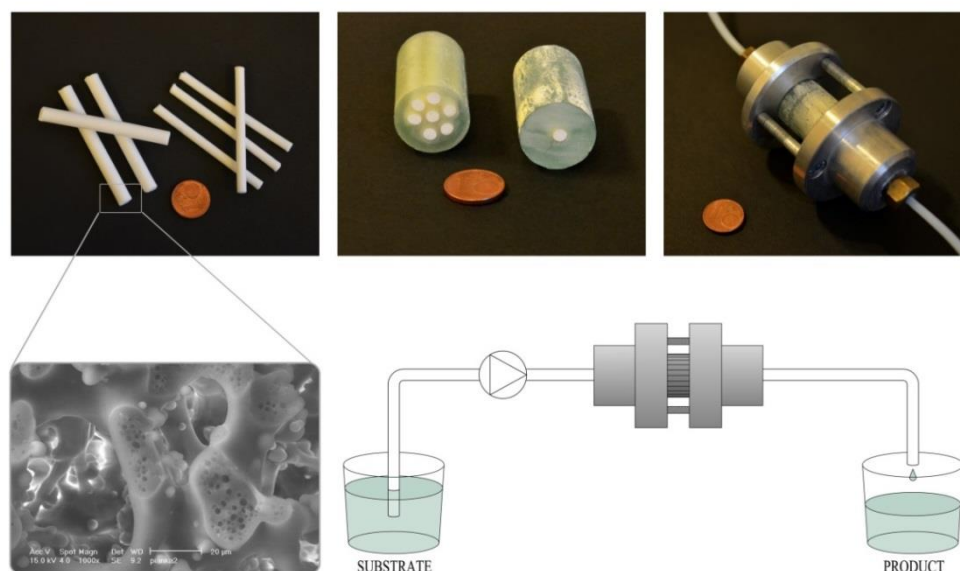
V. WIELOKANALOWE MIKROREAKTORY ENZYMATYCZNE O HIERARCHICZNEJ STRUKTURZE PORÓW

Pierwsze doniesienia dotyczące inżynierii mikroreaktorów datowane są na 1986 r., a ich pierwsze praktyczne zastosowanie miało miejsce w Karlsruhe w 1989 r. Jednakże dopiero po 1995 r. możemy mówić o większym nimi zainteresowaniu [82]. Zalety stosowania oraz podstawowe typy mikroreaktorów zostały już powyżej przedstawione. Rozważając stosowanie mikroreaktorów z punktu widzenia prowadzenia procesów ciągłych, należy zauważyć, że przepływ w prostych kanałach o małej średnicy (np. kapilarach) jest

przepływem laminarnym praktycznie w całym zakresie stosowanych warunków. Z tego względu mieszanie i transport reagentów do centrów katalitycznych osadzonych na powierzchni jest spowolnione [82, 83]. Celem intensyfikacji mieszania proponowano wprowadzanie przegród [84], stosowanie ultradźwięków [85] lub wprowadzanie fragmentów porowatych struktur [86, 87]. Z tych względów, monolity krzemionkowe z bardzo licznymi, wzajemnie połączonymi kanałami o krętej strukturze i średnicami o mikrometrycznej wielkości, wydają się być bardzo ciekawym rozwiązaniem. Krętość struktury kanałów powoduje gwałtowne zmiany kierunku przepływu cieczy, sprzyjające powstaniu zawirowań, intensyfikacji mieszania oraz kontaktów ciecz-ściana mikrokanalu, a mała ich średnica dodatkowo intensyfikuje wymianę masy i ciepła, jednak kosztem zwiększenia spadków ciśnienia.

Głównym celem moich prac w zakresie inżynierii mikroreaktorów było: (i) wykazanie możliwości i korzyści stosowania monolitów krzemionkowych o hierarchicznej strukturze porów, jako mikroreaktorów strukturalnych, (ii) wytypowanie konkretnej struktury monolitu krzemionkowego, korzystnej z punktu widzenia właściwości mikroreaktorów przepływowych, (iii) ocena efektywności prowadzonych w nich procesów enzymatycznych, (iv) oraz ocena stabilności ich pracy.

Ideę pracy monolitycznych mikroreaktorów strukturalnych przedstawiłam na Rysunku 1.



Rys. 1. Obraz (SEM) struktury monolitów i ich wygląd, budowa i wygląd mikroreaktora oraz schemat jego działania.

Monolity krzemionkowe syntetyzowałam wykorzystując metodę zol-żelową, połączoną z separacją fazową (wytwarzanie makroporów) i szablonowaniem (wytwarzanie mezoporów). Po obróbce hydrotermalnej i kalcynacji otrzymane monolity były otaczane polimerową żywicą tworzącą płaszcz wielokanałowego mikroreaktora.

Struktura porowata otrzymywanych monolitów zależy od warunków syntezy i stosunku poszczególnych reagentów, co omówiłam szczegółowo w pracy [H2]. Zmieniając stosunek ilości prekursora krzemu, związku powierzchniowo czynnego, polimeru i kwasu uzyskać można struktury, w których wielkość makroporów wahała się w zakresie od 2 – 40 μm , całkowita objętość dostępnych porów od 2,5 do 4 cm^3/g , a powierzchnia właściwa od 300 do 650 m^2/g . Duża wartość całkowitej objętości porów skutkuje porowatością z zakresu 80 - 90 %, charakterystyczną dla aerożeli. Z punktu widzenia zastosowań procesowych szczególnie interesującymi wydawały się być monolity cechujące się kanałami przelotowymi (makroporami), o średnicach w zakresie 20 - 40 μm (a więc największymi w materiałach tej klasy), oraz dużymi mezoporami (ok. 20 nm) umiejscowionymi w krzemionkowym szkielecie. Taka struktura porowata umożliwiała uzyskanie relatywnie niskich oporów przepływu, przy zwiększonej liniowej prędkości przepływu cieczy, oraz ułatwioną dostępność centrów aktywnych, dzięki dużym mezoporom, we wnętrzu cienkich mostków/żeber szkieletu, dodatkowo skracających drogę dyfuzji. Co więcej, monolity te cechuje znaczna powierzchnia właściwa, ok. 300 m^2/g , a wymiernym dowodem otwartości ich struktury jest bardzo wysoka całkowita objętością porów równa 4 cm^3/g . Wykazałam, że przepływ wzdłużny cieczy przez monolit może być opisany równaniem Darcy-Weisbacha, a współczynnik permeacji (K) jest proporcjonalny do średnicy makroporów ($K \sim d^2$); dla przedmiotowych monolitów wynosił ok. $2 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2$. Wartość spadków ciśnienia wywołanych oporami przepływu warunkuje nie tylko rodzaj stosowanego urządzenia przetłaczającego, ale niejednokrotnie może wpływać także na bezpieczeństwo. Spośród syntetyzowanych materiałów o czterech różnych wielkościach makroporów, tylko te, których wielkości makroporów wynosiły ok. 20 - 40 μm pozwalały na stosowanie natężeń przepływu w zakresie 200 - 700 $\text{cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$ przy gradientach ciśnienia z zakresu 15 - 65 kPa/cm. Zmniejszenie średnicy makroporów do 10 - 12 μm powodowało porównywalne jednostkowe spadki ciśnienia, jednakże przy znacznie mniejszych natężeniach przepływu (50 - 200 $\text{cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$). Niskie wartości spadków ciśnienia pozwalają na stosowanie nieskomplikowanych, a w konsekwencji tanich pomp dozujących, a z drugiej strony umożliwiają pracę przy zwiększonych liniowych prędkościach przepływu

(intensyfikacja wnikania masy), oraz natężeniach przepływu reagentów liczonych w dziesiątkach i setkach cm^3/min , co otwiera możliwość wielokilogramowych syntez. Wielkości te drastycznie kontrastują z tymi, cechującymi typowe reaktory mikrofluidalne, w których stosowane natężenia przepływu są rzędu dziesiątek lub setek, ale $\mu\text{m}^3/\text{min}$ [88, 89]. Warunki syntezy monolitów oraz obecność szablonu (związku powierzchniowo czynnego) wpływają na wielkość i objętość mezoporów, a w konsekwencji na wielkość i dostępność powierzchni właściwej, a więc parametry kluczowe dla efektywnej immobilizacji enzymów i skutecznego wyrażenia ich potencjału katalitycznego [1-3, 11]. Obecność związku powierzchniowo czynnego w trakcie syntezy oraz posyntezowa obróbka hydrotermalna monolitów pozwalały na 2-3-krotnie zwiększenie wielkości mezoporów, których średnia średnica przekroczyć mogła nawet 20 nm [H2], a więc wielkość cechującą najbardziej „otwarte” mezoporowate krzemionki rodziny MCF, znane ze stosowania jako efektywne nośniki katalizatorów i enzymów [1].

W wyniku przeprowadzonych procesów otrzymano monolityczny nośnik o rozbudowanej, łatwo dostępnej powierzchni i parametrach struktury (mezo)porowatej nie ustępujących najlepszym, znanym nośnikom enzymów z rodziny MCF czy SBA-15, a jednocześnie umożliwiającą ciągły przepływ reagentów, przy niskich stratach ciśnienia, przez strukturalnie upakowaną fazę stałą/katalityczną.

Jak wspominałam, jedną z podstawowych zalet mikroreaktorów, wpływających na ich efektywność, jest duża wartość stosunku powierzchni do objętości reaktora. **Syntetyzowane hierarchiczne monolity charakteryzują się stosunkiem powierzchni do objętości ok. $5 - 7 \cdot 10^7 \text{ m}^2/\text{m}^3$** , tj. co najmniej dwa rzędy większym niż w stosowanych rozwiązaniach mikroreaktorów i ok. trzy/cztery rzędy większym niż w intensywnych reaktorach przemysłowych ($1000 \text{ m}^2/\text{m}^3$) [90]. Nie powinno więc dziwić, że monolity te umożliwiły 170-krotne zwiększenie wartości maksymalnej szybkości reakcji w mikroreaktorze, w porównaniu do maksymalnej szybkości reakcji wyznaczonej w reaktorze zbiornikowym (po uwzględnieniu ilości unieruchomionej inwertazy) [H6].

Syntetyzowane monolity krzemionkowe wykorzystywałam jak rdzenie mikroreaktorów strukturalnych, w których wewnątrz immobilizowałam takie enzymy jak: inwertazę [H6], trypsynę [H2], acylotransferazę [H3], acylazę penicylinową G [H7] czy dehydrogenazę [13]. Konwersja substratu w znacznej mierze zależy od aktywności właściwej unieruchomionego enzymu, jednakże duże nagromadzenie inwertazy w małej objętości przepływowego reaktora pozwoliło mi uzyskać 90 % konwersje sacharozy w czasie krótszym niż 4 sekundy [H6].

Nieco dłuższe czasy procesu odnotowałam w trakcie enzymatycznej proteolizy z wykorzystaniem immobilizowanej trypsyny [H2]. Badałam proces hydrolizy mioglobiny i cytochromu c, białek o różnych masach cząsteczkowych i różnych wartościach punktu izoelektrycznego. Uzyskałam bardzo wysokie stopnie pokrycia sekwencji (70 % cytochrom c; 90 % mioglobina) w czasie zaledwie 24 min, podczas gdy, z wykorzystaniem enzymu natywnego, procesy te trwają 12 - 24 h [91]. Dodatkowo uzyskane hydrolizaty nie zawierały zanieczyszczeń z autolizy enzymu, a mikroreaktor wykazywał bardzo dobrą stabilność. Dotychczas przepływowe mikroreaktory z osadzoną trypsyną stosowane były zasadniczo do identyfikacji białek chorobowych, co wynikało z ich małej wydajności. Wydaje się, że zastosowanie zaproponowanych mikroreaktorów, o przepustowości sięgającej nawet $700 \text{ cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$, oraz wypracowanej przez nasz zespół umiejętności fabrykacji monolitów o przekroju poprzecznym ok. $2,5 \text{ cm}^2$, otwiera drogę do ciągłego procesu otrzymywania bioaktywnych peptydów [92]. Obecnie peptydy takie otrzymuje się głównie na drodze żmudnej i kosztownej syntezy, lub z wykorzystaniem natywnych form enzymów, poddając hydrolizie białka pochodzenia zwierzęcego i roślinnego [93].

Bardzo ciekawe rezultaty uzyskałam wykorzystując acylotransferazę, osadzoną we wnętrzu mikroreaktora, do estryfikacji glikolu neopentyłowego [H3]. Ze względu na obecność, w strukturze substratu, dwóch równorzędnych grup hydroksylowych, możliwe było otrzymanie mono- i diestru. Przeprowadzone badania wykazały praktycznie całkowite przereagowanie substratu przy średnim hydraulicznym czasie przebywania poniżej 45 sekund, przy czym głównym produktem był monoester (95%). Wydłużając czas kontaktu, zwiększeniu ulegał stosunek otrzymanego diestru do monoestru. Właściwości te mogą być bardzo przydatne przy planowaniu selektywnej produkcji. Co ciekawe przy stosowaniu natywnej formy enzymu i typowego reaktora zbiornikowego, nie udało się uzyskać wysokiej konwersji substratu nawet po 4 h, ani też dobrej selektywności ze względu na otrzymywane produkty [80]. Niemniej istotna jest bardzo dobra stabilność mikroreaktora pracującego w systemie ciekłym dwufazowym; nie stwierdzono utraty aktywności podczas 100 h pracy. Spadek aktywności zaobserwowałam stosując układ jednofazowy (organiczny), jednakże związany on był z oddziaływaniem typu rozpuszczalnik-enzym, a nie samym działaniem reaktora; po przepłukaniu mikroreaktora buforem enzym wracał do pierwotnej aktywności [H3].

Interesujące wyniki otrzymałam immobilizując acylazę penicylinową G we wnętrzu mikroreaktora, przy czym celem badań było opracowanie ciągłej metody kinetycznego

rozdziału enancjomerów kwasów aminofosfonowych i aminofosfinowych [H7]. Związki te cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na ich aktywność biologiczną. Znajdują zastosowanie jako antybiotyki, leki antywirusowe, antypasożytnicze, stosuje się je w terapii antynowotworowej i rolnictwie (pestycydy, herbicydy, fungicydy, czynniki regulujące wzrost roślin) [94-96]. Otrzymane wyniki porównano z przeprowadzonymi wcześniej badaniami natywnej formy enzymu [97], stwierdzając brak wpływu unieruchamiania enzymu na jego selektywność względem przebadanych pochodnych kwasów. Co najważniejsze, otrzymano identyczny, bardzo wysoki nadmiar enancjomeryczny (99 %) przy 47 % konwersji substratu; dla takich wartości enancjoselektywność (E) przekraczała 100, co kwalifikuje opracowany ciągły proces do zastosowań praktycznych. (Uwaga: powszechnie przyjmuje się, że praktyczne zastosowanie mogą mieć układy, dla których enancjoselektywność przekracza 20). Możliwość ciągłego prowadzenia procesu i łatwość separacji sprawiają, że opracowane rozwiązanie jest bardzo wygodnym wariantem prowadzenia procesu rozdziału kinetycznego tej klasy enancjomerów.

Za względów praktycznych, w badaniach stosowałam monolity krzemionkowe uzyskiwane w formie prętów/walców o średnicy od 4 do 6 mm (Rys. 1). Przy takiej średnicy przekroju poprzecznego za przepływ wzdłuż monolitu odpowiada kilkanaście tysięcy kanałów-makroporów, co jest liczbą imponującą. Jednakże z punktu widzenia rzeczywistych zastosowań w produkcji *fine chemicals* pożądanym wydaje się jej zwiększenie. Nie zmieniając struktury porowatej nośników, można to osiągnąć poprzez zwiększenie średnicy monolitów. Trzykrotne zwiększenie średnicy mikroreaktora (do ok. 18 mm) spowodowałoby zwiększenie ilości wzdłużnych kanałów do ponad 120 tys i byłoby już bardzo atrakcyjne. Niestety proste zwiększenie średnicy monolitu, ponad 10 mm, okazało się niemożliwe ze względu na słabą wytrzymałość i pękanie struktury. Dlatego, do znanej metody otrzymywania [H2, H6], wprowadziłam dodatkowy etap, uzyskując monolity o średnicy 18 mm, zachowując jednocześnie jego strukturę i porowatość. Rozwiązanie to już wkrótce objęte zostanie wnioskiem patentowym. Zainteresowanie takimi monolitami wykazała holenderska firma ChiralVision, z którą współpracujemy w ramach projektu ERA-NET-IB2.

VI. ZŁOŻE O HIERARCHICZNEJ STRUKTURZE JAKO EFEKTYWNE WYPEŁNIENIE REAKTORA ROTACYJNEGO TYPU SPINCHEM.

Nośniki krzemionkowe wykorzystywane do immobilizacji enzymów można podzielić na: (i) nośniki proszkowe (MCF, SBA-15 itp.), (ii) ziarniste (żele krzemionkowe) i (iii) monolityczne (rdzenie mikroreaktorów). Dwa pierwsze spośród wymienionych typów matryc wykorzystuje się głównie w reaktorach zbiornikowych (okresowych i ciągłych) z mieszaniem mechanicznym, co bardzo często prowadzi do uszkodzenia/rozdrobienia nośnika/biokatalizatora, wymycia enzymu z nośnika i utraty aktywności, oraz problemów z separacją. Rozwiązaniem może być zastosowanie reaktora rotacyjnego typu SpinChem® (opatentowanego przez szwedzką firmę Nordic ChemQuest [98]) pozwalającego na jednoczesne mieszanie i efektywną perkolację cieczy przez złożę heterogenicznego katalizatora umieszczonego w cylindrycznym koszu zamontowanym na końcu wału mieszadła (Rys. 2) [99, 100]. Reaktor ten można postrzegać jako formę znanego już reaktora koszykowego [101, 102]. Zastosowanie tego typu reaktora nie tylko pozwala na efektywne prowadzenie procesu, ale całkowicie niweluje problem mechanicznego uszkodzenia nośnika i ułatwia separację katalizatora. Ograniczeniem reaktora rotacyjnego SpinChem jest wielkość ziaren stosowanego katalizatora, których średnica musi być większa niż 0,1 - 0,2 mm [99, 100]. W związku z tym niemożliwe jest zastosowanie proszkowych nośników krzemionkowych, np. typu SBA-15 lub MCF, w których wielkość ziaren waha się od 30 do 70 μm . Drugą grupę nośników stanowią żele krzemionkowe, charakteryzujące się dużą powierzchnią właściwą (300 - 500 m^2/g) ale niedużymi mezoporami o średnicach $< 8 \text{ nm}$, których rozmiar znacznie utrudnia ich efektywne wykorzystanie. Wśród tej grupy materiałów można jednak znaleźć takie, których wielkość ziarna pozwala na zastosowanie ich w reaktorze rotacyjnym [1]. Trzecia grupa nośników krzemionkowych to obszernie opisane wyżej monolity o otwartej, hierarchicznej strukturze porów.

Celem przedstawionych badań było: (i) opracowanie stożkowych ziaren katalizatora o różnych wielkościach i dwóch rodzajach porowatej struktury, (ii) wykorzystanie otrzymanych ziaren, jako nośników enzymów, oraz sprawdzenie ich efektywności i stabilności w reaktorze rotacyjnym typu SpinChem.



Rys. 2. Schemat reaktora rotacyjnego typu SpinChem® wraz z ziarnami katalizatora.

Przedmiotem moich badań [H8] były monolity o dwóch wielkościach makroporów: MH1 które posiadały makropory w zakresie 20 - 40 μm i MH2 o makroporach mieszczących się w przedziale 8 - 10 μm . Otrzymywano je na drodze wylewania odpowiedniego zolu do stożkowych form o objętości 30 mm^3 lub 50 mm^3 i doprowadzaniu do zżelowania. Ze względu na różnicę skurczu żeli o różnej strukturze otrzymałam ziarna o czterech różnych wielkościach. W celach porównawczych, jako nośniki enzymów zastosowałam popularny żel krzemionkowy Kieselgel 60, o wielkość ziaren 0,2 - 0,5 mm, którego parametry tekstury (powierzchnia właściwa) są zbliżone do parametrów monolitycznych ziaren (MH1 i MH2). Zasadniczą różnicą cechującą małe monolityczne nośniki była wielkość ziaren (od 2 do 5 mm) oraz wielkość dużych makroporów (8 - 10 μm oraz 20 - 40 μm). Kieselgel 60 posiada tylko mezopory o średnicach ok. 6 - 8 nm.

Po funkcjonalizacji powierzchni nośników grupami aminowymi, przyłączono do nich kowalencyjnie inwertazę (modelowy enzym). Funkcjonalizacja spowodowała zmniejszenie powierzchni właściwej i objętości porów, ale wszystkie nośniki związały podobną ilość białka, co wynikało z ich bardzo podobnej tekstury. Aktywność biokatalizatorów oznaczano w reakcji hydrolizy sacharozy, stosując prędkości obrotowe kosza reaktora w zakresie 100 - 750 rpm. Stwierdzono, że konwersja substratu w nieznaczej mierze zależy od wielkości ziaren, natomiast bardzo silnie od struktury samego ziarna, co wskazuje na dominujący wpływ na aktywność wewnętrznej penetracji i dyfuzji reagentów od powierzchni zewnętrznej do centrów aktywnych. Ziarna o otwartej strukturze MH1 pozwalały na uzyskanie 100 % konwersji substratu po 75 min reakcji. W tym samym czasie,

i identycznych warunkach, dla monolitów MH2 wielkość konwersji sięgała do 30 %, a dla komercyjnych żeli krzemionkowych zaledwie 20 %. W ramach prowadzonych prac badano również wpływ szybkości obrotów mieszadła, decydującej o intensywności przepływu reagentów przez złożę, a poprzez to bezpośrednio wpływającej na intensywność wnikania masy do powierzchni ziaren katalizatora. Dla struktury MH2, charakteryzującej się obecnością mniejszych mezoporów i makroporów zwiększenie obrotów mieszadła nie zwiększało konwersji substratu. Uzyskane wyniki wskazują, że nawet znaczące zwiększenie intensywności przepływu reagentów przez złożę cząstek MH2 nie pozwalało na swobodną penetrację ich mniej otwartej struktury wewnętrznej. W przypadku ziaren MH1 wzrost obrotów, tj. intensywności przepływu przez złożę, powodował niemal proporcjonalny wzrost konwersji substratu; przykładowo konwersja sacharozy wzrosła z 50 % do 90 % przy wzroście obrotów mieszadła w zakresie 100 – 500 rpm, wskazując, że ograniczenie aktywności katalitycznej przez zewnętrzny transport masy zostało efektywnie usunięte, a także, że reagenty mogły swobodnie penetrować do wnętrza strukturalnych cząstek nośników. Dalsze zwiększanie obrotów mieszadła (do 750 rpm) powodowało już tylko nieznaczny wzrost stopnia przereagowania substratu, wskazujący na wewnętrzne ograniczenie dyfuzyjne kinetyki reakcji. Co niemniej ważne, otrzymane biokatalizatory wykazały bardzo dobrą stabilność w dziesięciu kolejnych cyklach reakcyjnych [H8].

Ze względu na łatwość regeneracji nośników krzemionkowych, ziarna MH1 poddano działaniu wysokiej temperatury, usuwając w ten sposób osadzony enzym oraz wprowadzone grupy funkcyjne. Zregenerowany nośnik poddano ponownemu procesowi funkcjonalizacji i ponownej immobilizacji inwertazy, a następnie sprawdzono jego aktywność w procesie hydrolizy sacharozy. Nie stwierdzono znaczących różnic w ilości zaimobilizowanego białka i uzyskanej aktywności. Dowodzi to możliwości ponownego wykorzystania nośnika po dezaktywacji samego enzymu.

VII. ELEMENTY NOWOŚCI, WKŁAD DO DYSCYPLINY I PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Prezentowany cykl publikacji [H1-H8] prezentuje spójny zbiór wyników badań naukowych, zwieńczonych metodologicznymi wskazaniem, charakterystykami właściwości oraz praktycznymi procedurami dotyczącymi: przygotowania nośników, immobilizacji enzymów i opracowania rozwiązań procesowych. Jako całość, składają się one na nowe

rozwiązanie wysoko efektywnego wielokanałowego mikroreaktora przepływowego, a dodatkowo proponują także nowe strukturalne wypełnienie, intensyfikujące działanie reaktora rotacyjnego typu SpinChem. Otrzymane wyniki, opisane w bloku publikacji, pozwalają na sformułowanie następujących uwag:

1. Opracowana metoda wprowadzania grup funkcyjnych/kompleksów metali na powierzchnię porowatych krzemionek w formie proszków i monolitów umożliwia specyficzne wiązanie enzymu. Rozwiązanie odnoszące się do techniki funkcjonalizacji monolitów objęte zostało wnioskiem patentowym [**H1-H8**].
2. W większości analizowanych przypadków wyższa aktywność cechowała biokatalizatory z enzymami przyłączonymi kowalencyjnie przez grupy aminowe, jednakże trudno określić *a priori* rodzaj grupy funkcyjnej odpowiedniej dla danego enzymu [**H1-H3, H5-H8**]. Stwierdzenie to potwierdza wcześniejsze obserwacje innych autorów.
3. Obecność grup Si-F w nośniku krzemionkowym może znacząco wpłynąć na aktywność biokatalizatorów otrzymanych metodą kowalencyjnego wiązania enzymu. Wpływ ten może być jednak albo pozytywny lub negatywny w zależności od immobilizowanego enzymu [**H1, H5**].
4. Badania wykazały istotny wpływ hydrofobizacji krzemionki na ilość i aktywność osadzonej lipazy. Zasadniczo, wzrost hydrofobowości nośnika pozwala na związanie większej ilości enzymu, jednakże po przekroczeniu określonej wielkości jego aktywność katalityczna maleje [**H4**].
5. Badania wpływu metody immobilizacji na aktywność i stabilność otrzymanych biokatalizatorów wykazały, że metoda chemicznego wiązania enzymów pozwala na uzyskanie stabilnych katalizatorów, pozwalających na wielogodzinną pracę w systemie ciągłym. Przeprowadzone badania wykazały, że przy odpowiednim dobrze warunków niespecyficznego wiązania kowalencyjnego, uzyskane biokatalizatory wykazują aktywność podobną do katalizatorów preparowanych metodą wysoko specyficznej immobilizacji, np. wiązaniem za pomocą metali przejściowych [**H2, H3, H6, H7**].
6. Monolity krzemionkowe o krętej, dwu- lub trój-modalnej hierarchicznej strukturze porów, posiadają wyjątkowy potencjał, jako wielokanałowe mikroreaktory enzymatyczne. Wykazałam, że przepływ przez strukturę monolitu może być opisany równaniem Darcy-Weisbacha, a współczynnik permeacji (K) jest proporcjonalny

do średnicy makroporów ($K \sim d^2$). Syntetyzowane monolity charakteryzują się niewielkimi oporami przepływu, pozwalającymi na stosowanie prostych i tanich urządzeń wymuszających przepływ, a także natężeń przepływu ciekłych reagentów sięgających $700 \text{ cm}^3/\text{cm}^2 \text{ min}$, co otwiera drogę do ich stosowania w wielokilogramowych zadaniach technologicznych [H2].

7. Wykazałam, że zwiększenie stosunku łatwo dostępnej powierzchni aktywnej do objętości mieszaniny reakcyjnej, w połączeniu z obecnością olbrzymiej ilości kanałów o średnicach z zakresu 20-40 μm , pozwala na bardzo znaczne zwiększenie szybkości reakcji w opracowanych mikroreaktorach w porównaniu do reaktora mieszalnikowego pracującego z katalizatorem zawieszonym [H3, H6].
8. W konsekwencji pkt. 7, opracowane ciągłe, monolityczne mikroreaktory strukturalne umożliwiają osiągnięcie bardzo wysokich konwersji substratu w znacząco krótszym czasie (od kilku sekund do kilkunastu/kilkudziesięciu minut) niż ma to miejsce w typowych aparatach. Wykazałam także, że reakcje mogą być prowadzone zarówno w układzie ciekłym jedno- jak i dwufazowym (organiczno-nieorganicznym) [H2, H3, H6, H7].
9. Stosowanie opracowanych przepływowych mikroreaktorów, w złożonych układach reakcji, może znacząco wpływać na selektywność określonych produktów; w konkretnych przypadkach może to mieć istotne znaczenie praktyczne [H3].
10. Opracowałam efektywne strukturalne wypełnienie dla reaktora rotacyjnego typu SpinChem, cechujące się wysoką wartością współczynnika permeacji i otwartością struktury, umożliwiającą bardzo znaczną intensyfikację przebiegu reakcji w reaktorach tego typu. Wykazałam, że złoże może łatwo regenerować i wykorzystać ponownie [H8].

VIII. PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

Przedmiotem moich zainteresowań, które chciałabym rozwijać w przyszłości są monolity krzemionkowe i ich zastosowanie jako wielokanałowych mikroreaktorów przepływowych. W 2016 r. zespół rozpoczął realizację trzyletniego projektu, którego celem nie jest już tylko otrzymanie efektywnego reaktora z unieruchomionym pojedynczym enzymem, ale naśladując przyrodę, utworzenie systemu wieloenzymatycznego (kaskada trzech enzymów). Układy kaskadowe wydają się mieć duże znaczenie szczególnie dla otrzymywania produktów o dużej

wartości dodanej. Chciałabym również wykorzystać monolity krzemionkowe jako twarde szablony do otrzymywania monolitów węglowych o podobnej, hierarchicznej strukturze porów. Materiały węglowe o dobrych właściwościach przewodnictwa elektrycznego mają ogromne znaczenie w elektrochemii: biosensory, kataliza elektrochemiczna. Wydaje się także, że ich znaczenie będzie rosło. Moją ambicją i spełnieniem zawodowych marzeń byłoby otrzymanie przepływowych mikroreaktorów elektrochemicznych, a później może nawet utworzenie kaskady reakcyjnej gdzie poszczególne etapy mogą być katalizowane enzymatycznie bądź elektrochemicznie.

IX. ZAKOŃCZENIE

Realizacja powyższych badań była możliwa dzięki odpowiednim środkom finansowym:

2008 – 2010 „Development of nanostructured microreactor-based reaction technologies for the continuous in situ production of food and drug intermediates from renewable resources” PNRF –109-AI –1/07.

2010 – 2014 „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” POIG.01.03.01-00-158/09-00.

2014 – 2017 „Podstawy procesowe ciągłego trójfazowego mikroreaktora enzymatycznego ze złożem o hierarchicznej strukturze” UMO-2013/09/B/ST8/02420.

2014 - 2017 „Podstawy procesowe szybkiej proteolizy z wykorzystaniem mikroreaktorów o hierarchicznej strukturze” UMO-2013/09/D/ST8/04002.

2016-2018 „Nowatorskie biokatalityczno-procesowe rozwiązania dla nowych zrównoważonych procesów – biokatalizatory np. enzymy, mikroorganizmy i układy bezkomórkowe” ERA-NET-IB/NO-P/11/2016.

X. LITERATURA

1. 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.
2. 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) 2-10.
3. A. Rekuć, J. Bryjak, K. Szymańska, A. B. Jarzębski, *Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity*, Proc. Biochem. 44 (2009) 191-198.
4. J. Pedroche, M. Mar Yust, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J. Girón-Calle, M. Alaiz, J. Vioque, J.M. Guisán, F. Millán, *Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability*, Enz. Microb. Technol. 40 (2007) 1160-1166.
5. A. Petri, T. Gambicorti, P. Salvadori, *Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst*, J. Mol. Catal. B: Enz. 27 (2004) 103-106.
6. K. Szymańska, E. Kostrzewa, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń, A. B. Jarzębski, „*Properties of invertase covalently immobilized on siliceous mesostructured cellular foams*”, 2nd International School and Workshop on INSIDE-POReS, CERTH, Thessaloniki, Greece, 24-28th February 2007.
7. K. Szymańska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Białoń, A. B. Jarzębski, “*Mesostructured cellular foams – the carriers of choice for immobilization of trypsin*”, 3rd International School and Workshop on INSIDE-POReS, Alicante, Spain, 24 -26th September 2007.
8. K. Szymańska, K. Maresz, J. Mrowiec-Białoń, A. B. Jarzębski, “*Sulfonic acid functionalized mesoporous cellular foams as catalysts for esterification reactions*”, 3rd EFCATS School on Catalysis – Ustroń, Poland, 21-26th September 2004.
9. J. Mrowiec-Białoń, K. Szymańska, K. Maresz, *Functionalized cellular foam catalysts: Preparation and properties*, Chem. Proc. Eng. 25(3/2) (2004) 1367-1372.
10. K. Szymańska, J. Bryjak, A. B. Jarzębski, *Engineering of efficient biocatalysts using nanostructured mesoporous silicate*, Clean Technology (2008) 367-370
11. K. Szymańska, J. Bryjak, A. B. Jarzębski, *Immobilization of invertase on mesoporous silicas to obtain hyper active biocatalysts*, Top. Catal. 52 (2009) 1030-1036.
12. A. Drożdż, U. Hanefeld, K. Szymańska, A. Jarzębski, A. Chrobok, *A robust chemo-enzymatic lactone synthesis using acyltransferase from Mycobacterium smegmatis*, Catal. Comm. 81 (2016) 37–40.
13. A. Rugor, M. Tataruch, J. Staroń, A. Dudzik, E. Niedzialkowska, P. Nowak, A. Hogendorf, A. Michalik-Zym, D. Napruszewska, A. Jarzębski, K. Szymańska, W. Białas, M. Szaleniec, *Regioselective hydroxylation of cholecalciferol, cholesterol and their derivatives by steroid C25 dehydrogenase*, App. Microb. Biotechnol. 101 (2017) 1163–1174.

14. K. Labus, K. Szymańska, J. Bryjak, A. B. Jarzębski, *Immobilisation of tyrosinase on siliceous cellular foams affording highly effective and stable biocatalysts*, Chem. Papers 69 (8) (2015) 1058–1066.
15. J. Qi, M. K. Anke, K. Szymańska, D. Tischler, *Immobilization of Rhodococcus opacus ICP azoreductase to obtain azo dye degrading biocatalysts operative at acidic pH*, Inter. Biodeteriorat. Biodegrad. 118 (2017) 89-94.
16. P. Grunwald, *Industrial Biocatalysis*, CRC Press 2015 Boca Raton Florida USA
17. J. P. Rasor, E. Voss, *Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry*, App. Catal. A:General 221 (2001) 145-158.
18. A. Schmidt, F. Hollmann, J. B. Park, B. Bühler, *The use of enzymes in the chemical industry in Europe*, Current Opinion Biotechnol. 13 (2002) 359-366.
19. R. A. Sheldon, S. Van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 6223-6235.
20. A-C. Albertsson, R. K. Srivastava, *Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization*, Advan. Drug Delivery Rev. 60 (2008) 1077-1093.
21. N. R. Khan, V.K. Rathod, *Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review*, Proc. Biochem. 50 (2015) 1793-1806.
22. K-R. Kim, D-K. Oh, *Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes*, Biotechnol. Advan. 31 (2013) 1473-1485.
23. K. R. Jegannathan, P. H. Nielsen, *Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review*, J. Cleaner Prod. 42 (2013) 228-240.
24. K. Beerens, T. Desmet, W. Soetaert, *Enzymes for the biocatalytic production of rare sugars*, J. Ind. Microbiol. 39 (2012) 823-834.
25. A. Liese, L. Hilterhaus, *Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications*, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 6236-6249.
26. R. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization*, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 6290-6307.
27. C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*, Enz. Microb. Technol. 40 (2007) 1451-1463.
28. Y. Zhang, J. Ge, Z. Liu, *Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes*, ACS Catal. 5 (2015) 4503-4513.
29. J. M. Nelson, E. G. Griffin, *Adsorption of invertase*, J. Am. Chem. Soc. 38 (1916) 1109-1115.
30. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Studies on continuous enzyme reactions. Preparation of a DEAE-sephadex–aminoacylase column and continuous optical resolution of acyl-DL-amino acids*, Biotechnol. Bioeng. 9 (1967) 603-615.
31. U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Understanding enzyme immobilization*, Chem. Soc. Rev. 38 (2009) 453–468.
32. S. Hudson, E. Magner, J. Cooney, *Proteins in mesoporous silicates*, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 8582 – 8594
33. E. Magner, *Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials*, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 6213-6222.

34. Y. Asano, S. Togashi, H. Tsudome, S. Murakami, *Microreactor technology: Innovations in production processes*, Pharm. Eng. 30 (1) (2010) 32-42.
35. J. M. Woodley, N. J. Titchener-Hooker, *The use of windows of operation as a bioprocess design tool*, Bioproc. Eng. 14 (1996) 263–268.
36. R. Wohlgemuth, I. Plazl, P. Znidaršič-Plazl, K. V. Gernaey, J. M. Woodley, *Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis*, Trends Biotechnol. 33 (2015) 302-314.
37. 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) 1010-1016.
38. K. S. Elvira, X. Casadevall i Solvas, R. C. R. Wootton, A. J. de Mello, *The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis*, Nature Chem. 5 (2013) 905–915.
39. A. de Mello, R. Wootton, *But what is it good for? Applications of microreactor technology for the fine chemical industry*, Lab Chip 2 (2002) 7-13.
40. H. Kim, A. Nagaki, J. Yoshida, *A flow-microreactor approach to protecting-group-free synthesis using organolithium compounds*, Nature Com. 2(1) (2011) 264.
41. J. Lawrence, B. O’Sullivan, G. J. Lye, R. Wohlgemuth, N. Szita, *Microfluidic multi-input reactor for biocatalytic synthesis using transketolase*, J. Mol. Catal. B: Enz. 95 (2013) 111–117.
42. J. Gonzalez-Alvarez, P. Arias-Abrodo, M. Puerto, M. Espinal Viguri, J. Perez, M. D. Gutierrez- Alvarez, *Polymerized phosphonium-based ionic liquids as gas chromatography stationary phases*, RSC Adv. 3 (2013) 21377-21380.
43. A. Halima, 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– 575.
44. Ch. Yao, L. Qi, W. Hu, F. Wang, G. Yang, *Immobilization of trypsin on sub-micron skeletal polymer monolith*, Anal. Chimica Acta 692 (2011) 131-137.
45. Y. Liang, D. Tao, J. Ma, L. Sun, Z. Lang, L. Zhang, Y. Zhang, *Hydrophilic monolith based immobilized enzyme reactors in capillary and on microchip for high-throughput proteomic analysis*, J. Chrom. A 1218 (2011) 2898-2905.
46. S. Wu, L. Sun, J. Ma, K. Yang, Z. Liang, L. Zhang, Y. Zhang, *High throughput tryptic digestion via poly (acrylamide-co-methylenebisacrylamide) monolith based immobilized enzyme reactor*, Talanta 83 (2011) 1748-1753.
47. A. Sachse, A. Galarneau, *Synthesis of zeolite monoliths for flow continuous processes. The case of sodalite as a basic catalyst*, Chem. Mater. 22 (2010) 4123-4125.
48. A. Koreniuk, K. Maresz, J. Mrowiec-Białoń, *Supported zirconium-based continuous-flow microreactor for effective Meerwein–Ponndorf–Verley reduction of cyclohexanone*, Catal. Comm. 64 (2015) 48-51.
49. 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) 58-68.

50. A. Koreniuk, K. Maresz, K. Odrozek, J. Mrowiec-Białoń, *Titania-silica monolithic multichannel microreactors. Proof of concept and fabrication/structure/catalytic properties in the oxidation of 2,3,6-trimethylphenol*, Micropor. Mesopor. Mater. 229 (2016) 98-105.
51. A. Galarneau, A. Sachse, B. Said, C-H. Pelisson, P. Boscaro, 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) 231-247.
52. J. Ma, Z. Liang, X. Qiao, Q. Deng, D. Tao, L. Zhang, Y. Zhang, *Organic–inorganic hybrid silica monolith based immobilized trypsin reactor with high enzymatic activity*, Anal. Chem. 80 (2008) 2949-2956.
53. A. Rekuć, J. Bryjak, K. Szymańska A. B. Jarzębski, *Very stable silica-gel-bound laccase biocatalysts for selective oxidation in continuous system*, Bioresource Technol. 101 (2010) 2076-2083.
54. S. Hamoudi, S. Kaliaguine, *Sulfonic acid-functionalized periodic mesoporous organosilica*, Micropor. Mesopor. Mater., 59 (2003) 195-204.
55. I. Diaz, F. Mohino, J. Perez-Pariente, E. Sastre, *Synthesis, characterization and catalytic activity of MCM-41-type mesoporous silicas functionalized with sulfonic acid*, Appl. Catal. A 205 (2001) 19-30.
56. R. Richer, L. Mercier, *Direct synthesis of functional mesoporous silica by neutral ph nonionic surfactant assembly: factors affecting framework structure and composition*, Chem. Mater. 13 (2001) 2999- 3008.
57. A. Sayari, S. Hamoudi, *Periodic mesoporous silica-based organic–inorganic nanocomposite materials*, Chem. Mater. 13 (2001) 3151- 3168.
58. S. Mikhailenko, D. Desplandier-Giscard, C. Danumah, S. Kaliaguine, *Solid electrolyte properties of sulfonic acid functionalized mesostructured porous silica*, Micropor. Mesopor. Mater. 52 (2002) 29-37.
59. D. Brunel, A. C. Blanc, A. Galarneau, F. Fajula, *New trends in the design of supported catalysts on mesoporous silicas and their applications in fine chemicals*, Catal. Today 73 (2002) 139-152.
60. C. Mateo, R. Torres, G. Fernández-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. López-Gallego, O. Abian, J. M. Palomo, L. Betancor, B. C. C. Pessela, J. M. Guisan, R. Fernández-Lofuente, *Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method*, Biomacromolecules 4 (2003) 772-777.
61. J.-K. Kim, J.-K. Park, H.-K. Kim, *Synthesis and characterization of nanoporous silica support for enzyme immobilization*, Coll. Surface A 241 (2004) 113-117.
62. K. Zynek, J. Bryjak, K. Szymańska, A. B. Jarzębski, *Screening of porous and cellulose materials for covalent immobilisation of Agoricus bisporus tyrosinase*, Biotech. Bioproc. Eng. 16 (2011) 180-189.
63. Z. Hrydziuszko, A. Dmytryk, P. Majewska, K. Szymańska, J. Liesiene, A. B. Jarzębski, J. Bryjak, *Screening of lipase carriers for reactions in water, biphasic and pure organic solvent systems*, Acta Bioch. Pol. 61(1) (2014) 1-6.
64. G. Fernández-Lorente, Z. Cabrera, C. Godoy, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Palomo, J. M. Guisan, *Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties*, Process Biochem. 43 (2008) 1061–1067.

65. R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero, G. Díaz-González, *Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts*, J. Mol. Catal. B: Enz. 30 (2004) 83–93.
66. S. Boncel, A. Zniszczoł, K. Szymańska, J. Mrowiec-Białoń A. B. 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*, Enz. Microb. Technol. 53 (2013) 263-270.
67. 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-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselective synthesis of Solketal esters*, Enz. Microb. Technol. 87 (2016) 61–69.
68. K. Szymańska, A. B. Jarzębski, Wniosek patentowy nr P.407124 z dnia 10.02.2014, „Sposób funkcjonalizacji powierzchni monolitów porowatych zwłaszcza krzemionkowych”.
69. L. Qiao, Y. Liu, S. Hudson, P. Yang, E. Magner, B. Liu, *A nanoporous reactor for efficient proteolysis*, Chem. Eur. J. 14 (2008) 151 – 157.
70. K. Ryder, A. El-Din Bekhit, M. McConnell, A. Carne, *Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases*, Food Chem. 208 (2016) 42–50.
71. C. S. F. Bah, A. Carne, M. A. McConnell, S. Mros, A. El-Din A. Bekhit, *Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations*, Food Chem. 202 (2016) 458–466.
72. J. Ma, L. Zhang, Z. Liang, Y. Shan, Y. Zhang, *Immobilized enzyme reactors in proteomics*, Trends Anal. Chem. 30 (2011) 691-702.
73. W. Liu, L. Wang, R. Jiang, *Specific enzyme immobilization approaches and their application with nanomaterials*, Top. Catal. 55 (2012) 1146-1156.
74. K. Terpe, *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 (2003) 523–533.
75. D. Gaffney, N. H. Abdallah, J. C. Cooney, F. R. Laffir, K. Engelmark Cassimjee, P. Berglund, U. Hanefeld, E. Magner, *Preparation and characterisation of a Ni²⁺/Co²⁺-cyclam modified mesoporous cellular foam for the specific immobilisation of His6-alanine racemase*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 109 (2014) 154-160.
76. M. Miyazaki, J. Kaneno, S. Yamaori, T. Honda, M. P. P. Briones, M. Uehara, K. Arima, K. Kanno, K. Yamashita, Y. Yamaguchi, H. Nakamura, H. Yonezawa, M. Fujii, H. Maeda, *Efficient immobilization of enzymes on microchannel surface through His-tag and application for microreactor*, Protein Pept. Lett. 12 (2005) 207-210.
77. Z. Guo, S. Xu, Z. Lei, H. Zou, B. Guo, *Immobilized metal-ion chelating capillary microreactor for peptide mapping analysis of proteins by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*, Electrophoresis 24 (2003) 3633-3639.
78. S. Matosevic, G. J. Lye, F. Baganz, *Immobilised enzyme microreactor for screening of multi-step bioconversions: characterisation of a de novo transketolase- ω -transaminase pathway to synthesise chiral amino alcohols*, J. Biotechnol. 155 (2011) 320-329.
79. S. Matosevic, G. J. Lye, F. Baganz, *Design and characterization of a prototype enzyme microreactor: Quantification of immobilized transketolase kinetics*, Biotechnol. Progr. 26 (2010) 118-126.

80. L. Wiermans, S. Hofzumahaus, C. Schotten, L. Weigand, M. Schallmeyer, A. Schallmeyer and P. Dominguez de Maria, *Transesterifications and peracid-assisted oxidations in aqueous media catalyzed by Mycobacterium smegmatis Acyl Transferase*, ChemCatChem 5 (2013) 3719–3724.
81. I. Mathews, M. Soltis, M. Saldajeno, G. Ganshaw, R. Sala, W. Weyler, M. A. Cervin, G. Whited, R. Bott, *Structure of a novel enzyme that catalyzes acyl transfer to alcohols in aqueous conditions*, Biochemistry 46 (2007) 8969–8979.
82. W. Reschetilowski, *Microreactors in Preparative Chemistry: Practical Aspects in Bioprocessing*, Nanotechnology, Catalysis and more, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
83. G. M. Whitesides, A. D. Stroock, *Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems*, Phys. Today, 54 (2001) 42–48.
84. A. D. Stroock, S. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone, G. M. Whitesides, *Chaotic mixer for microchannels*, Science 295 (2002) 647–651.
85. Z. Yang, S. Matsumoto, H. Goto, M. Matsumoto, R. Maeda, *Ultrasonic micromixer for microfluidic systems*, Sens. Actuators A 93 (2001) 266–272.
86. T. Rohr, C. Yu, H. Davey, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Porous polymer monoliths: Simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips*, Electrophoresis, 22 (2001) 3959–3967.
87. M. Heule, K. Rezwani, L. Cavalli, L. J. Gauckler, *A miniaturized enzyme reactor based on hierarchically shaped porous ceramic microstruts*, Adv. Mater. 15 (2003) 1191–1194.
88. J. Duan, Z. Liang, Ch. Yang, J. Zhang, L. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, *Rapid protein identification using monolithic enzymatic microreactor and LC–ESI-MS/MS*, Proteomics 6 (2006) 412–419.
89. E. Calleri, C. Temporini, F. Gasparini, P. Simone, C. Villani, A. Ciogli, G. Massolini, *Immobilized trypsin on epoxy organic monoliths with modulated hydrophilicity: novel bioreactors useful for protein analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8937–8945.
90. T. Wirth, *Microreactors in organic chemistry and catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2013.
91. E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, C. Stella, S. Rudaz, D. Lubda, G. Mellerio, J.-L. Veuthey, G. Caccialanza, G. Massolini, *Development of bioreactor based on trypsin immobilized on monolithic support for the on-line digestion and identification of proteins*, J. Chromatogr. A 1045 (2004) 99–109.
92. G. Ruan, M. Wei, Z. Chen, R. Su, F. Du, Y. Zheng, *Novel regenerative large volume immobilized enzyme reactor: preparation, characterization and application*, J. Chromatogr. B 967 (2014) 13–20.
93. A. Dhaval, N. Yadav, S. Purwar, *Potential applications of food derived bioactive peptides in management of health*, Int. J Pept Res Ther 22 (2016) 377–398.
94. P. Kafarski, B. Lejczak, *Aminophosphonic acids of potential medical importance*, Curr. Med. Chem. Anticancer Agents 1 (2001) 301–312.
95. F. Orsini, G. Sello, M. Sisti, *Aminophosphonic acids and derivatives. Synthesis and biological applications*, Cur. Med. Chem. 17 (2010) 264–289.

96. L-X. Xiao, K. Li, D-Q Shi, *A Convenient Synthesis and Herbicidal Activity of N-phosphonoalkylpyrazolo[4,3-e][1,2,4]-triazolo[1,5-d]pyrimidines*, Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem. 183 (2008) 3156-3165.
97. K. Zielińska, R. Mazurkiewicz, K. Szymańska, A. Jarzębski, S. Magiera, K. Erfurt, *Penicillin G acylase-mediated kinetic resolution of racemic 1-(N-acylamino)alkylphosphonic and 1-(N-acylamino)alkylphosphinic acids and their esters*, J. Mol. Cat. B: Enzym. 132 (2016) 31–40.
98. <http://www.spinchem.com/>
99. C.-J. Aurell, S. Karlsson, F. Pontén, S.M. Andersen, *Lipase catalyzed regioselective lactamization as a key step in the synthesis of N-boc (2R)-1,4-oxazepane-2-carboxylic acid*, Org. Process Res. Dev. 18 (2014) 1116–1119.
100. M. Mallin, J. Muschiol, E. Byström, U. T. Bornscheuer, *Efficient biocatalysis with immobilized enzymes or encapsulated whole cell microorganism by using the SpinChem reactor system*, Chem. Cat. Chem. 5 (2013) 3529–3532.
101. J. Carberry, *Designing laboratory catalytic reactors*, Ind. Eng. Chem. 56 (11) (1964) 39–46.
102. J. A. Mahoney, K. K. Robinson, E. C. Myers, *Catalyst evaluation with the gradientless reactor*, Chemtech. 8 (1978) 758–763.

Katarzyna Szymańska